

豚大腸菌性下痢症（K88保有全菌体・K99保有全菌体） （アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成21年11月12日（告示第1569号） 新規追加

1 定義

シードロット規格に適合した線毛抗原 K88 及び K99 を保有する大腸菌の培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 K88 線毛抗原保有大腸菌

2.1.1.1 名称

毒素原性大腸菌 KY-4-1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

易熱性エンテロトキシンを産生する。0～3日齢哺乳豚に経口接種すると下痢を発症させる。

2.1.1.3 マスターシード菌

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの継代数は、10代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

2.1.1.4 ワーキングシード菌

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシード菌

2.1.1.5.1 増殖

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖する。

2.1.2 K99 線毛抗原保有大腸菌

2.1.2.1 名称

毒素原性大腸菌 T-2-1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

耐熱性エンテロトキシンを産生する。0～3日齢哺乳豚に経口接種すると下痢を発症させる。

2.1.2.3 マスターシード菌

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの継代数は、10代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

2.1.2.4 ワーキングシード菌

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシード菌

2.1.2.5.1 増殖

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液（各大腸菌原液）

2.3.1 培養

それぞれのプロダクションシード菌を培地で培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.3 原液（各大腸菌原液）

不活化菌液を遠心し、リン酸緩衝食塩液（付記1）で再浮遊させ、原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整し、アルミニウムゲルアジュバントを添加し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.5の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.4.1.1を準用して試験を実施するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.1 試験材料

検体及びBCP乳糖寒天培地（付記2）を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体を滅菌生理食塩液で溶解したものを試料とし、シャーレに固めたBCP乳糖寒天培地に塗抹し、37℃で24時間培養する。

3.1.1.2.3 判定

いずれの培地上にも大腸菌以外の集落を認めてはならない。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

検体を接種材料とし、3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 型別試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

培養菌液 10mL を低温下で遠心分離により集菌し、2 mL の生理食塩液にそれぞれ浮遊したものを試料とする。

3.2.2.1.2 抗血清

抗大腸菌 K88 血清（付記 3）及び抗大腸菌 K99 血清（付記 4）を用いる。

3.2.2.2 試験方法

KY-4-1 株由来の試料 30 μ L と抗大腸菌 K88 血清 30 μ L、及び T-2-1 株由来の試料 30 μ L と抗大腸菌 K99 血清 30 μ L を各々スライドガラス上で混合し、急速凝集反応を行う。

3.2.2.3 判定

各々の試料は各々の抗血清で 30 秒以内に凝集しなければならない。

3.2.3 生菌数試験

3.2.3.1 試験材料

検体及び試験用培地 I（付記 5）及び試験用培地 II（付記 6）又はこれらと同等の発育の得られる培地を用いる。

3.2.3.2 試験方法

検体を試験用培地 I を用いて、10 倍階段希釈で 10^8 まで希釈し、 10^7 希釈液の 0.5mL と 10^8 希釈液の 1.0mL とを、各々試験用培地 II の 20mL を用いて、直径 9 cm のシャーレに混釈して固める。各希釈ごとに 2 枚ずつ作製し、36 $^{\circ}$ C で 16 時間培養後、発育した集落数を計測する。

3.2.3.3 判定

試料の希釈倍数、接種量、及び発育した集落数より生菌数を計算するとき、検体の生菌数は 1 mL 中 3×10^8 個以上でなければならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

検体及び試験用培地 I を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試験用培地 I を 20mL ずつ分注した培地 4 本に、検体を 0.5mL ずつ接種し、37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養観察する。

3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.3.2 型別試験

3.2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならない。異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.5.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は 0.3vol % 以下でなければならない。

3.5.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量試験法を準用して試験するとき、1 mL 中のアルミニウムの含有量は、0.65 ~ 1.00 mg の範囲でなければならない。

3.5.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、試験品の注射量は 0.2 mL とし、体重測定は 4 日目に行うものとする。

3.5.7 力価試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.7.1.2 試験動物

約 5 週齢のマウスを用いる。

3.5.7.1.3 酵素抗体反応用抗原

精製 K88 抗原（付記 7）及び精製 K99 抗原（付記 8）を用いる。

3.5.7.2 試験方法

試験動物 30 匹以上を試験群、30 匹以上を対照群とする。注射材料 0.5mL ずつを 2 週間隔で 2 回試験群の筋肉内に注射する。第 2 回目の注射後 14 日目に両群から得られた各個体の血清について酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）により抗体価を測定する。

試験群と対照群の血清、参照陽性血清（付記 9）及び参照陰性血清（付記 10）をポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液（付記 11。以下「ポリソルベート PBS」という。）で 100 倍に希釈したものを抗原吸着プレート（付記 12）の各穴に 100 μ L ずつ加え、30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、ポリソルベート PBS でよく洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 液（付記 13）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、ポリソルベート PBS でよく洗浄する。その後、基質液（付記 14）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して常温で 30 分間反応させた後、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、その差の平均値を吸光度値とする。

3.5.7.3 判定

参照陽性血清の吸光度を ODp、参照陰性血清の吸光度を ODn、試験群の血清の吸光度を ODv、対照群の血清の吸光度を ODc とし、吸光度比を算出する。

試験群の血清の 70 % 以上が $ODv / ODp > 1$ でなければならない。かつ、対照群の血清の 70 % 以上が $ODc / ODn \leq 2$ でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は製造後 1 年 9 か月とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記 1 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

りん酸水素二ナトリウム・12 水

1.725g

りん酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
水	残量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整して、121 °C で 30 分間高圧滅菌する。

付記 2 BCP 乳糖寒天培地

1,000mL 中	
バクトビーフ・イクストラクト	3.0 g
バクトペプトン	5.0 g
乳糖	10.0 g
寒天	10.0 g
プロモクレゾールパープル	0.025g
水	残量

pH を 6.8 ~ 7.0 に調整して、121 °C 15 分間高圧滅菌する。

付記 3 抗大腸菌 K88 血清

K88 抗原を保有している大腸菌の兔免疫血清を同じ菌株から調製した加熱処理抗原で吸収したもので、あらかじめ K88 抗原の十分な発現を確認した当該菌の不活化抗原と急速凝集反応を行うとき、30 秒以内に凝集しなければならず、当該菌の加熱処理抗原及び K99 保有不活化抗原と急速凝集反応を行うとき、2 分以内に凝集してはならない。

付記 4 抗大腸菌 K99 血清

K99 抗原を保有している大腸菌の兔免疫血清を同じ菌株から調製した加熱処理抗原で吸収したもので、あらかじめ K99 抗原の十分な発現を確認した当該菌の不活化抗原と急速凝集反応を行うとき、30 秒以内に凝集しなければならず、当該菌の加熱処理抗原及び K88 保有不活化抗原と急速凝集反応を行うとき、2 分以内に凝集してはならない。

付記 5 試験用培地 I

1,000mL 中	
トリプチケース・ペプトン	17.0 g
バクトペプトン	3.0 g
ブドウ糖	2.5 g
りん酸二水素カリウム	2.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
水	残量

pH を 7.1 ~ 7.5 に調整し、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 6 試験用培地 II

1,000mL 中	
トリプチケース・ペプトン	10.0 g
バクトソイトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
細菌用寒天	12.0 g
水	残量

pH を 7.1 ~ 7.5 に調整し、121 °C で 20 分間高圧滅菌する。

付記 7 精製 K88 抗原

K88 抗原を保有する大腸菌から精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、23 ~ 26kDa に特異的なバンドを認め、他に有意なバンドを認めない。また、電子顕微鏡で線毛様構造物を認める。

付記 8 精製 K99 抗原

K99 抗原を保有する大腸菌から精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、17 ~ 19kDa に特異的なバンドを認め、他に有意なバンドを認めない。また、電子顕微鏡で線毛様構造物を認める。

付記 9 参照陽性血清

K88 抗原保有菌及び K99 抗原保有菌をそれぞれ約 8 週齢のマウスに注射して得られた抗血清で、抗原吸着プレートで ELISA を実施したとき、その吸光度値が 100 倍希釈血清で 0.6 以上を示す。また、K88 抗原保有菌体及び K99 抗原保有菌体を用いる凝集抗体価測定法（付記 15）では、40 ~ 160 倍を示す。小分けして凍結乾燥し保存する。

付記 10 参照陰性血清

非免疫マウスの血清で、抗原吸着プレートで ELISA を実施したとき、その吸光度値が 100 倍希釈血清で 0.07 以下を示す。また、K88 抗原保有菌体及び K99 抗原保有菌体を用いる凝集抗体価測定法では、2 倍以下を示す。小分けして凍結乾燥し保存する。

付記 11 ポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

りん酸水素二ナトリウム・12 水	2.9 g
りん酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 12 抗原吸着プレート

精製 K88 抗原及び精製 K99 抗原を炭酸緩衝液（付記 16）で至適抗原濃度に希釈し、それぞれ ELISA 用プレートの穴に 100 μ L ずつ加え、4 °C で 18 時間反応させ、ポリソルベート PBS でよく洗浄し、2 w/v % 牛血清アルブミン液（付記 17）を各穴に 250 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させた後、ポリソルベート PBS でよく洗浄したもの。

なお、至適の抗原濃度は、精製 K88 抗原及び精製 K99 抗原を炭酸緩衝液で階段希釈して、それぞれ ELISA 用プレートに固相化し、参照陽性血清及び参照陰性血清をそれぞれ 100 倍に希釈したものを用いて ELISA を実施した場合、その吸光度値が参照陽性血清で 0.6 以上、参照陰性血清で 0.07 以下となることとする。

付記 13 ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG

参照陽性血清の吸光度値を測定するとき、吸光度値が 100 倍希釈で 0.6 以上、参照陰性血清

で 0.07 以下を示すように調整して使用する。

付記 14 基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 40mg を、リン酸クエン酸緩衝液（付記 18）100mL に溶解し、遮光する。使用直前に過酸化水素(30)40 μ L を添加する。

付記 15 凝集抗体価測定法

参照血清として供試する予定の血清をリン酸緩衝食塩液（pH7.2）で 10 倍希釈したものを、2 倍階段希釈し、これに、K88 抗原保有大腸菌ホルマリン死菌抗原及び K99 抗原保有大腸菌ホルマリン死菌抗原（共に McFarlandNo.4 に調整）をそれぞれ等量加え、50 °C 2 時間感作後、室温に一晩放置して判定する。

凝集の認められる最終希釈を凝集抗体価とする。

付記 16 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム 1.59 g

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

水 残 量

pH を 9.6 に調整する。4 °C で保存し、1 週間以内に使用する。

付記 17 2 w/v % 牛血清アルブミン液

牛血清アルブミン 2 g をポリソルベート PBS100 mL で使用直前に溶解したもの

付記 18 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸 4.67 g

りん酸一水素ナトリウム 19.95 g

水 残 量

pH を 5.0 に調整する。