

豚大腸菌性下痢症（K88ab・K88ac・K99・987P保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成 23 年 5 月 11 日 (告示第 939 号)新規追加

1 定義

シードロット規格に適合した大腸菌から得られた線毛抗原 K88ab、K88ac 及び K99、並びに線毛抗原 987P を保有するシードロット規格に適合した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 名称

大腸菌 CN6913 株、CN6845 株、B41 株及び 987 株、又はこれらと同等と認められた株

2.1.2 性状

各株は、次のような O 抗原及び線毛抗原を有する。

CN6913 株 : O 8 : K87、K88ab

CN6845 株 : O149 : K91、K88ac

B41 株 : O101 : K99

987 株 : O 9 : K103、987P

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 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、血液寒天培地（付記 1）又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、凍結して - 70 °C 以下又は凍結乾燥して 5 °C 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最高継代数は、10 代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、血液寒天培地又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、凍結して - 70 °C 以下又は凍結乾燥して 5 °C 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。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、血液寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して - 70 °C 又は凍結乾燥して 5 °C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

大腸菌 CN6913 株及び CN6845 株には製造用培地 1（付記 2）、大腸菌 B41 株には製造用培地 2（付記 3）、大腸菌 987 株には製造用培地 3（付記 4）、又は製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 大腸菌 CN6913 株、CN6845 株及び B41 株原液

2.3.1 原液（各大腸菌原液）

2.3.1.1 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。
それぞれの培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

それぞれの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。
それぞれの不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.3 原液の調製

それぞれの不活化菌液の遠心上清にアルミニウムゲルアジュバントを加え、攪拌し、濃縮したものを原液とする。
それぞれの原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 大腸菌 987 株原液

2.3.2.1 培養

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。

2.3.2.2 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。

2.3.2.3 原液の調製

不活化菌液を濃縮し、アルミニウムゲルアジュバントを加え、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

大腸菌 CN6913 株、CN6845 株、B41 株及び 987 株原液を混合し、濃度調整し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

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

検体及び血液寒天培地を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体の 0.1mL ずつを 8 枚の培地に塗抹し、4 枚ずつを 22℃及び 31℃で 7 日間培養する。

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。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 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

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

検体及び参照陽性血清（付記5）を用いる。

3.2.2.2 試験方法

検体の 30 μ L ずつと、それぞれの参照陽性血清の 30 μ L を、スライドグラス上で混合し、急速凝集反応を行う。

3.2.2.3 判定

検体は、当該参照陽性血清で速やかに凝集するが、他の参照陽性血清では凝集しないか、弱い凝集を示す。

3.2.3 総菌数試験

3.2.3.1 試験方法

検体を適当と認められた希釈用液で適度に希釈し、分光光度計で濁度を測定する。

3.2.3.2 判定

標準検量線、濁度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出するとき、検体 1 mL 中の総菌数は、CN6913 株で 1×10^{10} 個、CN6845 株で 1.5×10^{10} 個、B41 株で 2×10^{10} 個、987 株で 1×10^9 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、及び血液寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体の 0.1mL ずつを 4 枚の培地に塗抹し、31 $^{\circ}$ C で 48 時間培養後、集落の有無を観察する。

3.3.1.3 判定

いずれの培地も大腸菌の発育を認めてはならない。

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。異物及び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 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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、0.2vol %以下でなければならない。

3.5.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量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、2.8mg 以下でなければならない。

3.5.7 安全試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品の2ドーズを注射材料とする。

3.5.7.1.2 試験動物

体重15～20kgの豚を用いる。

3.5.7.2 試験方法

試験動物2頭を試験群、1頭を対照群とする。注射材料を試験群の頸部皮下又は筋肉内に注射し、対照群と共に2週間観察する。

3.5.7.3 判定

試験群は、軽度の沈鬱を認めても速やかに回復し、観察期間中、その他の異常を認めてはならない。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料1とし、試験品を0.8w/v %アルミニウムゲルアジュバントで256倍に希釈したものを注射材料2とする。

3.5.8.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.5.8.1.3 凝集反応用抗原

線毛凝集反応用抗原(付記6)を用いる。

3.5.8.2 試験方法

試験動物20匹を試験群、5匹を対照群とする。試験群を10匹ずつ2群に分け、1群には注射材料1を、残りの群には注射材料2をそれぞれ1 mL ずつ2週間隔で2回、皮下に注射する。第2回目の注射後2週目に両群から得られた血清について線毛凝集試験を行う。

U型マイクロプレートを用い、試験群と対照群の血清及び参照陽性血清のそれぞれ25 μL について2倍階段希釈による希釈列を作り、等量の線毛凝集反応用抗原を加え、攪拌後、室温で18時間静置し、管底像で判定する。

3.5.8.3 判定

凝集が認められた血清の最高希釈倍数で抗体価を表す。

大腸菌 CN6913、CN6845 及び B41 株の線毛凝集反応用抗原に対して注射材料2の試験群の血清抗体価が16倍以上である個体数が、70 %以上でなければならない。大腸菌 987 株の線毛凝集反応用抗原に対して注射材料1の試験群の血清抗体価が8倍以上である個体数が、70 %以上でなければならない。また、参照陽性血清に対応する抗原に対して所定の抗体価を示さなければならない。

この場合、対照群の血清は、いずれの抗原に対しても全て2倍以下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3年3か月間とする。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 血液寒天培地

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	17.0 g
大豆製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g
寒天	20.0 g
水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整して、121 °C 15 分間高圧滅菌する。約 50 °C に冷却後、羊血液を 5 vol % となるように添加する。

付記 2 製造用培地 1

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	50 g
ショ糖	30 g
酵母エキス	10 g
水	残 量

pH を 6.8 ~ 7.2 に調整して、121 °C 20 分間高圧滅菌する。

付記 3 製造用培地 2

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	17.0 g
大豆製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
グリセリン	12.5 g
水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整して、121 °C 20 分間高圧滅菌する。

付記 4 製造用培地 3

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	17.0 g
大豆製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g
水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整して、121 °C 20 分間高圧滅菌する。

付記 5 参照陽性血清

精製した大腸菌の線毛抗原 K88ab、K88ac、K99 及び 987P をそれぞれ兔に免疫して得られた抗血清で、それぞれに対応する線毛凝集反応用抗原に対して凝集価が 32 倍以上となるように調整したものであり、小分けし、凍結乾燥して 5 °C 以下で保存する。

付記 6 線毛凝集反応用抗原

大腸菌 CN6913 及び CN6845 株をそれぞれ製造用培地 1 で、大腸菌 B41 株を製造用培地 2 で、

987 株を製造用培地 3 で 37 °C で 18 時間培養し、ホルマリンで不活化後、菌体をリン酸緩衝食塩液に浮遊させ、McFarland 混濁管 No. 4 の濃度に調整し、参照陽性血清を用いて線毛凝集反応を行い、32 倍を示すように抗原力価を調整したもの