

鶏大腸菌症（O78全菌体破碎処理）（脂質アジュバント加）不活化ワクチン

平成26年1月22日（告示第90号）新規追加

1 定義

O78の大腸菌の培養菌液を破碎処理したものを不活化し、脂質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 KAI-2 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

O78 抗血清により特異的に凝集し、鶏の静脈内に注射すると、敗血症を起こす。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

種菌を製造用培地（付記1）で培養後、新たな製造用培地に移植し培養したものを遠心集菌後、約1/25量のリン酸緩衝食塩液に再浮遊したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1の試験を行う。

2.3.2 菌体破碎

培養菌液を破碎したものを破碎菌液とする。

破碎菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.3 不活化

破碎菌液にホルマリンを加えて不活化したものを原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液にリン酸緩衝食塩液を加え濃度調整し、適当と認められた脂質アジュバントを混合し、保存剤を添加したものを最終バルクとする。

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、3.4の試験を行う。

3 試験方法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.1 試験材料

3.1.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.1.1.1.2 培地

BCP 乳糖寒天培地（付記 2）を用いる。

3.1.1.2 試験方法

検体 1 白金耳を培地の 5 枚に連続して塗抹し、37 °C で 24 時間培養する。

3.1.1.3 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 総菌数試験

3.1.2.1 試験材料

3.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを試料とする。

3.1.2.2 試験方法

試料の濁度を分光光度計で測定する。

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。

3.1.2.3 判定

検体の総菌数は、1 mL 中 1.0×10^{11} 以上でなければならない。

3.2 破碎菌液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1 を準用して試験するとき、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。

3.2.2 破碎確認試験

3.1.2 を準用して破碎前後の総菌数を算出するとき、90 % 以上の菌体が破碎されていなければならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

検体及び製造用培地を用いる。

3.3.2.2 試験方法

検体を培地が分注された 4 本の試験管に接種し、37 °C で 48 時間培養観察する。

3.3.2.3 判定

いずれの試験管も菌の発育による混濁を認めてはならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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、固有の色調を有し、不透明でやや粘稠性のある液体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。

3.4.2 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。

3.4.3 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。

3.4.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量試験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。

3.4.5 安全試験

3.4.5.1 試験材料

3.4.5.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.4.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 0～4 日齢の鶏を用いる。

3.4.5.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

接種材料 1 羽分ずつを試験群に点眼接種し、対照群と共に 3 週間観察する。

3.4.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

3.4.6 力価試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.4.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 30～35 日齢の鶏を用いる。

3.4.6.1.3 酵素抗体反応用抗原

リポ多糖抗原（付記 3。以下この項において「LPS 抗原」という。）を用いる。

3.4.6.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、10 羽を対照群とする。

接種材料 1 羽分ずつを試験群に点眼接種する。接種後 2 週目に両群から得られた血清について、抗体価を酵素抗体法（以下この項において「ELISA」という。）により測定する。

試験群と対照群の各血清並びに参照陽性血清（付記 4）及び参照陰性血清（付記 5）を、牛胎子血清を 5 vol % となるように加えたポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液（付記 6。以下この項において「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 7）の各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、ポリソルベート PBS で洗浄する。次に各穴にペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 液（付記 8）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、ポリソルベート PBS で洗浄する。その後、基質液（付記 9）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光し、30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応後、1 mol/L の硫酸を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定し、その差を ELISA 抗体価とする。

3.4.6.3 判定

試験群の ELISA 抗体価の平均値は対照群の ELISA 抗体価の平均値よりも有意に高くなければならない（t-検定、 $P < 0.05$ ）。この場合、参照陽性血清の ELISA 抗体価は 0.4 以上 0.8 以下を示さなければならず、参照陰性血清の ELISA 抗体価は 0.3 以下を示さなければならぬ。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、この限りでない。

付記 1 製造用培地

1,000mL 中

塩化ナトリウム 5.0 g

大豆製ペプトン 10.0 g

カゼイン製ペプトン 1.0 g

乾燥酵母エキス 5.0 g

鶏肉水 残 量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整し、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 2 BCP 乳糖寒天培地

1,000 mL 中

乾燥牛肉消化物	3.0 g
ペプトン	5.0 g
乳糖	10.0 g
寒天	10.0 g
ブロムクレゾールパープル	0.025 g
水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整し、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 3 LPS 抗原

製造用培地で培養した鶏大腸菌 KAI-2 株又は適当と認められた株を 65 ~ 68 °C の温水に浮遊し、これに 65 ~ 68 °C に加温した 90w/v % フェノール溶液を等量加え、20 ~ 30 分間十分に攪拌する。4 °C に冷却後、遠心 (8,000G、20 分間) し、水層を採取する (水層 1)。フェノール層に等量の純水を加え、加温し、20 ~ 30 分間攪拌する。次いで、4 °C に冷却、遠心 (8,000G、20 分間) し、水層を採取する (水層 2)。水層 1 及び水層 2 を混合し、透析膜に入れ、流水で一晩透析する。透析後、約 1/10 量になるまで減圧濃縮を行う。得られた濃縮液を遠心 (8,000G、20 分間) し、上清を採取する。上清に少量の酢酸ナトリウムを加えた後に、エタノールを 10 倍量加え、遠心 (4,000G、20 分間) し、沈殿物を回収し、まずエタノールで、次いでアセトンでそれぞれ 1 回ずつ遠心洗浄 (4,000G、20 分間) を行い、粗精製 LPS を得る。次に、粗精製 LPS を水に溶解し、遠心 (100,000G、60 分間) し、沈渣を得る。沈渣を再び水に溶解し、遠心 (100,000G、60 分間) する。得られた沈渣を水に溶解し、LPS 抗原とする。

付記 4 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 30 日齢の鶏に鶏大腸菌症 (O78 全菌体破碎処理) (油性アジュバント加) 不活化ワクチンを投与して得られた血清であって、抗原吸着プレートを用いて ELISA を実施するとき、100 倍希釈した血清の ELISA 抗体価は、0.4 以上 0.8 以下を示す。小分けして - 20 °C 以下で凍結保存する。

付記 5 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 30 日齢の鶏の血清であって、抗原吸着プレートを用いて ELISA を実施するとき、100 倍希釈血清の ELISA 抗体価は、0.3 以下を示す。小分けして - 20 °C 以下で凍結保存する。

付記 6 ポリソルベート PBS

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.89 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 7 抗原吸着プレート

LPS 抗原を炭酸緩衝液（付記 10）で至適抗原濃度に希釈し、ELISA プレーートの各穴に 100 μ L ずつ加え、4℃で一夜反応後、ポリソルベート PBS で3回洗浄し、5 w/v %スキムミルク加リン酸緩衝食塩液（付記 11）を各穴に 200 μ L ずつ加え、37℃で1時間反応後、ポリソルベート PBS で3回洗浄したもの。

なお、至適の抗原濃度は、LPS 抗原を炭酸緩衝液で階段希釈して ELISA プレートに固相化し、参照陽性血清及び参照陰性血清を 100 倍に希釈したものをを用いて ELISA を実施したとき、その ELISA 抗体価が参照陽性血清で 0.4 以上 0.8 以下、参照陰性血清が 0.3 以下となる場所とする。

付記 8 ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 液

100 倍に希釈した参照陽性血清及び参照陰性血清の ELISA 抗体価を測定するとき、前者が 0.4 以上 0.8 以下、後者が 0.3 以下を示すように濃度を調整して使用する。

付記 9 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 12）100mL に溶解し、遮光する。使用直前に濃縮過酸化水素水を 40 μ L 添加する。

付記 10 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 に調整し、4℃で保存し、1 週間以内に使用する。

付記 11 5 w/v %スキムミルク加リン酸緩衝食塩液

スキムミルク 5 g をリン酸緩衝食塩液 100mL で使用直前に溶解したもの

付記 12 リン酸クエン酸緩衝液

1,000 mL 中

無水クエン酸 4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95 g

水 残 量

pH を 5.0 に調整する。