

# 豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）

平成 25 年 9 月 26 日（告示第 2480 号）一部改正  
令和 3 年 3 月 9 日（告示第 360 号）一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合した線毛抗原 K88、K99、987P 及び F41 を保有する大腸菌の培養菌液を不活化したもの、同規格に適合した易熱性エンテロトキシン産生大腸菌培養菌液の遠心上清及び同規格に適合したクロストリジウム・パーフリンゲンズ C 型菌の培養菌液を無毒化したものの遠心上清をそれぞれ混合し、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

大腸菌 pPS002 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認め、アラビノース利用能（+）、イノシトール利用能（-）、ソルビトール利用能（+）、硫化水素産生能（-）、インドール産生能（+）、ウレアーゼ活性（-）、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性（+）及び硝酸塩還元性（+）の性状を示し、K88 線毛を保有する。また、病原性に関与する毒素をコードするプラスミドを欠損し、耐熱性エンテロトキシン（ST）及び易熱性エンテロトキシン（LT）を産生しない。

##### 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 2～7℃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。

##### 2.1.1.4 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、凍結して -60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃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 増殖及び保存

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 -60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃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。

#### 2.1.2 K99 線毛抗原保有大腸菌

##### 2.1.2.1 名称

大腸菌 NL-1005 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、5 vol %羊血液寒天培地上で溶血性を認めず、インドール産生能 (+)、硝酸塩還元性 (+)、硫化水素産生能 (-)、グルコース利用能 (+) 及びマンノース利用能 (+) の性状を示し、K99 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

#### 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2～7℃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。

#### 2.1.2.4 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、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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 増殖及び保存

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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.3 987P 線毛抗原保有大腸菌

##### 2.1.3.1 名称

大腸菌 NADC1413 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、アラビノース利用能 (+)、イノシトール利用能 (-)、ソルビトール利用能 (+)、硫化水素産生能 (-)、インドール産生能 (+)、ウレアーゼ活性 (-)、β-ガラクトシダーゼ活性 (+) 及び硝酸塩還元性 (+) の性状を示し、987P 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

#### 2.1.3.3 マスターシード菌

##### 2.1.3.3.1 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2～7℃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。

#### 2.1.3.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.3.4.1 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、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。

### 2.1.3.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.3.5.1 増殖及び保存

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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.4 K99 及び F41 線毛抗原保有大腸菌

#### 2.1.4.1 名称

大腸菌 NADC1471 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.4.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、アラビノース利用能 (+)、イノシトール利用能 (-)、ソルビトール利用能 (+)、硫化水素産生能 (-)、インドール産生能 (+)、ウレアーゼ活性 (-)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 (+) 及び硝酸塩還元性 (+) の性状を示し、K99 線毛及び F41 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

#### 2.1.4.3 マスターシード菌

##### 2.1.4.3.1 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 $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.4.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.4.4.1 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、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.4.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.4.5.1 増殖及び保存

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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.5 易熱性エンテロトキシン B サブユニット成分 (以下この項において「LT<sub>B</sub>」という。) 産生大腸菌

#### 2.1.5.1 名称

大腸菌 NL-1001 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.5.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認め、アラビノース利用能 (+)、イノシトール利用能 (-)、ソルビトール利用能 (+)、硫化水素産生能 (-)、インドール産生能 (+)、ウレアーゼ活性 (-)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 (+) 及び硝酸塩還元性 (+) の性状を示す。ST 及び LT を産生しないが、LT<sub>B</sub> を産生する。また、本製造用菌株は、定着に必要な線毛をコードするプラスミドを欠損している。

#### 2.1.5.3 マスターシード菌

##### 2.1.5.3.1 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 $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.5.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.5.4.1 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、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.5.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.5.5.1 増殖及び保存

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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.6 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌

##### 2.1.6.1 名称

クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌 NL-1003 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.6.2 性状

グラム陽性桿菌で、グルコース利用能 (+)、マルトース利用能 (+)、アラビノース利用能 (+)、ラクトース利用能 (+)、マンノース利用能 (+)、キシロース利用能 (+) 及びインドール産生能 (-) の性状を示す。 $\beta$  毒素を産生し、本毒素を含む培養上清ろ液をマウス及び子豚の静脈内に投与すると、毒性を示す。

##### 2.1.6.3 マスターシード菌

###### 2.1.6.3.1 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 $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.6.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.6.4.1 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、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.6.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.6.5.1 増殖及び保存

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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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

### 2.3.1 大腸菌 pPS002 株、NL-1005 株、NADC1413 株及び NADC1471 株原液

#### 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。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

#### 2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加え、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。

#### 2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、リン酸緩衝食塩液で再浮遊させ、チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

### 2.3.2 大腸菌 NL-1001 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 濃縮及び除菌

培養菌液を遠心分離し、上清液を中空糸フィルターで濃縮した後、透析して除菌する。チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

### 2.3.3 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌 NL-1003 株原液

#### 2.3.3.1 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。

#### 2.3.3.2 不活化及び無毒化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加え、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。

#### 2.3.3.3 原液

不活化菌液を 2～7℃に冷却し、遠心分離して上清液を採り、チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加し、限外ろ過により濃縮したものを原液とする。

## 2.4 最終バルク

各原液を混合し、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、3.5 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

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、大腸菌又はクロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

##### 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 大腸菌 pPS002 株、NADC1413 株及び NADC1471 株の試験

###### 3.2.1.1 染色試験

###### 3.2.1.1.1 試験材料

検体を用いる。

###### 3.2.1.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm<sup>2</sup> の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

###### 3.2.1.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

###### 3.2.1.2 型別試験

###### 3.2.1.2.1 試験材料

###### 3.2.1.2.1.1 試料

検体を用いる。

###### 3.2.1.2.1.2 抗血清

抗大腸菌線毛抗原 K88 血清（付記 1）、抗大腸菌線毛抗原 987P 血清（付記 2）及び抗大腸菌線毛抗原 F41 血清（付記 3）を用いる。

###### 3.2.1.2.2 試験方法

pPS002 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 K88 血清、NADC1413 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 987P 血清、NADC1471 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 F41 血清をスライドガラス上でそれぞれ混合し、急速凝集反応を行う。

###### 3.2.1.2.3 判定

検体は、当該抗血清で速やかに凝集しなければならない。

##### 3.2.2 大腸菌 NL-1005 株の試験

###### 3.2.2.1 染色試験

###### 3.2.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

###### 3.2.2.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm<sup>2</sup> の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

###### 3.2.2.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

###### 3.2.2.2 型別試験

###### 3.2.2.2.1 試験材料

###### 3.2.2.2.1.1 試料

検体を用いる。

###### 3.2.2.2.1.2 抗血清

抗大腸菌線毛抗原 K99 血清（付記 4）を用いる。

###### 3.2.2.2.2 試験方法

NL-1005 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 K99 血清をスライドガラス上で混合し、急速凝集反応を

行う。

#### 3.2.2.2.3 判定

検体は、当該抗血清で速やかに凝集しなければならない。

#### 3.2.2.3 吸光度測定試験

検体を波長 420nm で吸光度を測定するとき、その値は、規定の値でなければならない。

### 3.2.3 大腸菌 NL-1001 株の試験

#### 3.2.3.1 染色試験

##### 3.2.3.1.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.2.3.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm<sup>2</sup> の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

##### 3.2.3.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

#### 3.2.3.2 大腸菌 LT<sub>B</sub> 確認試験

##### 3.2.3.2.1 試料

検体を用いる。

##### 3.2.3.2.2 試験方法

大腸菌 LT<sub>B</sub> 成分の参照品（付記 5）を滅菌精製水で再溶解したもの及び試料の希釈・洗浄液 1（付記 6）による 6 段階の 2 倍階段希釈液を作製し、氷槽にて保存する。ガングリオシド固相化プレート（付記 7）の各穴に 50 μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。希釈・洗浄液 2（付記 8）で 1 回、希釈・洗浄液 1 で 2 回洗浄後、抗 LT<sub>B</sub> 抗原兎ポリクロナール抗体（付記 9）を各穴に 50 μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄液 3（付記 10）で洗浄後、標識抗体 1（付記 11）を各穴に 50 μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄液 3 で洗浄後、基質液 1（付記 12）を各穴に 200 μL ずつ加え、常温で反応させる。主波長 490nm、副波長 630nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 0.9 ~ 1.1 となった時点をもって反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定する。

##### 3.2.3.2.3 判定

参照品中の LT<sub>B</sub> 抗原量を 1.0 として、試料の LT<sub>B</sub> 抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.62 以上でなければならない。

#### 3.2.3.3 吸光度測定試験

検体を波長 420nm で吸光度を測定するとき、その値は、規定の値でなければならない。

### 3.2.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 NL-1003 株の試験

#### 3.2.4.1 染色試験

##### 3.2.4.1.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.2.4.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm<sup>2</sup> の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

##### 3.2.4.1.3 判定

均一なグラム陽性桿菌以外の菌を認めてはならない。

### 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

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

##### 3.3.1.2 試験方法

検体 1 mL を 300mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23 °C で、他の 2 本は 33 °C で 6 ～ 8 日間一次培養する。次に各一次培養液 1 mL を新しい 300mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23 °C で、他の 2 本は 33 °C で 7 日間培養して観察する。

#### 3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

### 3.4 原液の試験

#### 3.4.1 大腸菌 NL-1001 株

##### 3.4.1.1 無菌試験

###### 3.4.1.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

###### 3.4.1.1.2 試験方法

検体 1 mL を 300mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23 °C で、他の 2 本は 33 °C で 6 ～ 8 日間一次培養する。次に各一次培養液 1 mL を新しい 300mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23 °C で、他の 2 本は 33 °C で 7 日間培養して観察する。

###### 3.4.1.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

### 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、帯黄褐色のゲル状混濁液で、静置すると沈殿物の上層が無色又は帯黄褐色、振とうすれば均一な懸濁液でなければならず、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

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 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、アルミニウムの含有量は、1.5 mg/mL 以下でなければならない。

#### 3.5.6 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、ホルマリン含有量は、0.1vol % 以下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は、この限りでない。

#### 3.5.7 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 0.3 mL とし、体重測定は 4 日目に行うものとする。

#### 3.5.8 エンドトキシン試験

日本薬局方一般試験法のエンドトキシン試験法の光学的定量法の比色法を準用して試験するとき、1 頭分当たり  $1 \times 10^6$  EU 未満でなければならない。

#### 3.5.9 力価試験

##### 3.5.9.1 大腸菌線毛抗原及び大腸菌 LT<sub>B</sub> 成分の力価試験

3.5.9.1.1 又は 3.5.9.1.2 の試験を行う。

###### 3.5.9.1.1 相対力価（付記 13）による力価試験

###### 3.5.9.1.1.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

###### 3.5.9.1.1.1.1 試験材料



#### 3.5.9.1.1.1.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液1で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液（付記14）を加え、常温で60分間振とうする。

#### 3.5.9.1.1.1.1.2 試験方法

線毛抗原 K88 成分の参照品（付記15）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で1時間振とうした後、希釈・洗浄液2で希釈したもの、及び試料の希釈・洗浄液2による2倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート1（付記16）の各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体（付記17）を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、基質液2（付記18）を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が1.1～1.5となった時点反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

#### 3.5.9.1.1.1.1.3 判定

参照品中の K88 線毛抗原量を 1.0 として、試料の K88 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法（付記19）により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

#### 3.5.9.1.1.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

##### 3.5.9.1.1.2.1 試験材料

##### 3.5.9.1.1.2.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液1で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液を加え、常温で60分間振とうする。

##### 3.5.9.1.1.2.2 試験方法

線毛抗原 K99 成分の参照品（付記20）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で1時間振とうした後、希釈・洗浄液2で希釈したもの、及び試料の希釈・洗浄液2による2倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート2（付記21）の各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、15～30℃で15±2分間静置し、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体（付記22）を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、基質液2を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が1.1～1.5となった時点反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

##### 3.5.9.1.1.2.3 判定

参照品中の K99 線毛抗原量を 1.0 として、試料の K99 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

#### 3.5.9.1.1.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

##### 3.5.9.1.1.3.1 試験材料

##### 3.5.9.1.1.3.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液2で希釈する。

##### 3.5.9.1.1.3.2 試験方法

線毛抗原 987P 成分の参照品（付記23）を希釈・洗浄液2で希釈したもの、及び試料の希釈・洗浄液2による2倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート3（付記24）の各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で15分間静置した後、30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体1（付記25）を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、標識抗体2（付記26）を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、基質液2を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させる。30秒間振とうした後、主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が1.1～1.5となった時点反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

### 3.5.9.1.1.3.3 判定

参照品中の 987P 線毛抗原量を 1.0 として、試料の 987P 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.1 以上でなければならない。

### 3.5.9.1.1.4 大腸菌線毛抗原 F41 成分の力価試験

#### 3.5.9.1.1.4.1 試験材料

##### 3.5.9.1.1.4.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液 1 で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液を加え、常温で 60 分間振とうする。

##### 3.5.9.1.1.4.2 試験方法

線毛抗原 F41 成分の参照品（付記 27）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で 1 時間振とうした後、希釈・洗浄液 2 で希釈したもの、及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 4（付記 28）の各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1（付記 29）を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、標識抗体 2 を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2 を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 1.1 ~ 1.5 となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

##### 3.5.9.1.1.4.3 判定

参照品中の F41 線毛抗原量を 1.0 として、試料の F41 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

### 3.5.9.1.1.5 大腸菌 LT<sub>B</sub> の力価試験

#### 3.5.9.1.1.5.1 試験材料

##### 3.5.9.1.1.5.1.1 試料

試験品を滅菌精製水で希釈し、水酸化ナトリウム溶液（付記 30）で pH を 12.0 に調整した後、硫酸アンモニウム溶液（付記 31）を混合して中和する。この混合液を遠心し、その上清を試料とする。

##### 3.5.9.1.1.5.2 試験方法

大腸菌 LT<sub>B</sub> 成分の参照品を滅菌精製水で再溶解したもの及び試料の希釈・洗浄液 1 による 2 倍階段希釈液を作製し、氷槽で保存する。ガングリオシド固相化プレートの各穴に 50  $\mu$  L ずつ加え、37 °C で 1 時間加温する。希釈・洗浄液 2 で 1 回、希釈・洗浄液 1 で 2 回洗浄した後、抗 LT<sub>B</sub> 抗原兔ポリクローナル抗体を各穴に 50  $\mu$  L ずつ加え、37 °C で 1 時間加温する。洗浄液 3 で洗浄した後、標識抗体 1 を各穴に 50  $\mu$  L ずつ加え、37 °C で 1 時間加温する。洗浄液 3 で洗浄した後、基質液 1 を各穴に 200  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 490nm、副波長 630nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 0.9 ~ 1.1 となった時点を反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定する。

##### 3.5.9.1.1.5.3 判定

参照品中の LT<sub>B</sub> 抗原量を 1.0 として、試料の LT<sub>B</sub> 抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

### 3.5.9.1.2 抗体測定法による力価試験

#### 3.5.9.1.2.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

##### 3.5.9.1.2.1.1 試験材料

##### 3.5.9.1.2.1.1.1 注射材料

試験品を水酸化アルミニウムゲル（付記 32）で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.5.9.1.2.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.5.9.1.2.1.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 K88 参照陽性血清 1 (付記 33) については 512 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 (付記 34) で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 (付記 35) を希釈液 3 で 1,024 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 (付記 36) の穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 (付記 37) を 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後、洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、1,024 倍希釈した線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

#### 3.5.9.1.2.1.3 判定

試験群の血清は、80 %以上が抗体価 2,048 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 K88 参照陽性血清 1 は、抗体価 2,048 ~ 4,096 倍を示さなければならない。

#### 3.5.9.1.2.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

##### 3.5.9.1.2.2.1 試験材料

##### 3.5.9.1.2.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.9.1.2.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.5.9.1.2.2.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。2 週間隔で 2 回注射後 2 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 K99 参照陽性血清 1 (付記 38) については 8 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 (付記 39) を希釈液 3 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 2 (付記 40) の各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数を抗体価とする。

#### 3.5.9.1.2.2.3 判定

試験群の血清は、80 %以上が抗体価 32 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 K99 参照陽性血清 1 は、抗体価 32 ~ 64 倍を示さなければならない。

#### 3.5.9.1.2.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

##### 3.5.9.1.2.3.1 試験材料

##### 3.5.9.1.2.3.1.1 試験動物

3.5.9.1.2.2 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.9.1.2.3.2 試験方法

3.5.9.1.2.2 の試験で得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清については4倍から、対照群血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清 1（付記 41）については2倍から、希釈液 3 で2倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清 2（付記 42）を希釈液 3 で128倍に希釈したものを抗原吸着プレート 3（付記 43）の穴に100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で1時間反応させた後、洗浄液 2 で3回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で1時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で3回洗浄する。基質液 2 を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、128倍希釈した線毛抗原 987P 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数を抗体価とする。

#### 3.5.9.1.2.3.3 判定

試験群の血清は、80 %以上が抗体価 8 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 987P 参照陽性血清 1 は、抗体価 8 ~ 16 倍を示さなければならない。

#### 3.5.9.1.2.4 大腸菌線毛抗原 F41 の力価試験

##### 3.5.9.1.2.4.1 試験材料

##### 3.5.9.1.2.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.9.1.2.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.5.9.1.2.4.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 F41 参照陽性血清 1（付記 44）については64倍から、対照群血清については2倍から、希釈液 3 で2倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 F41 参照陽性血清 2（付記 45）を希釈液 3 で512倍に希釈したものを抗原吸着プレート 4（付記 46）の穴に100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で1時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で3回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で1時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で3回洗浄する。基質液 2 を各穴に100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512倍希釈した線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

#### 3.5.9.1.2.4.3 判定

試験群の血清は、80 %以上が抗体価 256 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 F41 参照陽性血清 1 は、抗体価 256 ~ 512 倍を示さなければならない。

#### 3.5.9.1.2.5 大腸菌 LT<sub>B</sub> の力価試験

##### 3.5.9.1.2.5.1 試験材料

##### 3.5.9.1.2.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.9.1.2.5.1.2 試験動物

約 6 週齢の雄 ddY 系マウスを用いる。

##### 3.5.9.1.2.5.2 試験方法

試験動物 15 匹を用い、10 匹を試験群、5 匹を対照群とする。注射材料の 0.5mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次

の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 1（付記 47）については 128 倍から、対照群血清については 8 倍から、希釈液 4（付記 48）で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 2（付記 49）を希釈液 4 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 5（付記 50）の穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 1 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 2（付記 51）を 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数を抗体価とする。

#### 3.5.9.1.2.5.3 判定

試験群の血清は、70 %以上が抗体価 256 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 8 倍以下でなければならない。

LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 1 は、抗体価 256 ~ 512 倍を示さなければならない。

#### 3.5.9.2 クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイドの力価試験

##### 3.5.9.2.1 試験材料

##### 3.5.9.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.9.2.1.2 試験動物

体重 1.8 ~ 3.6kg の SPF ニュージーランドホワイト種の兔、及び約 5 週齢の ICR 系又は適当と認められたマウスを用いる。

##### 3.5.9.2.2 試験方法

注射材料の 1 mL を、3 週間隔で 2 回、8 匹の兔の皮下に注射する。第 2 回注射後 2 週目に得られた血清について、抗毒素抗体価を測定する。試験動物 8 匹から得られた血清を等量混合する。プール血清の 1、2、3、4 及び 5 倍希釈液をバクト-ペプトン液（付記 52）で作製する。10L<sub>0</sub> 量（付記 53）に濃度を調整したクロストリジウム・パーフリンゲンス C 型  $\beta$  毒素液（付記 54）と各希釈血清を等量混合後、25  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、氷中に保存する。各混合液を 1 群 5 匹のマウスに 0.2mL ずつ尾静脈内接種し、24 時間後に観察する。同時に、試験に用いた 10L<sub>0</sub> 量及び 10L<sub>+</sub>量（付記 55）毒素液 1 mL と 10 国際抗毒素単位（以下この項において「IAU」という。付記 56）の標準抗毒素（付記 57）1 mL との混合液を同様にマウスに接種し毒素量を定量するとき、10L<sub>0</sub> 群では全マウスが生存し、10L<sub>+</sub>群では 80%以上のマウスが死亡しなければならない。

##### 3.5.9.2.3 判定

マウスが全数生存している群の最大希釈倍数を 10 倍した値を抗毒素抗体価とし、IAU で表すとき、プール血清の抗毒素抗体価は、10 IAU 以上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 6 か月間とする。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 抗大腸菌線毛抗原 K88 血清

精製した大腸菌の線毛抗原 K88 を兔に免疫して得られた抗血清

##### 付記 2 抗大腸菌線毛抗原 987P 血清

精製した大腸菌の線毛抗原 987P を兔に免疫して得られた抗血清

付記3 抗大腸菌線毛抗原 F41 血清  
精製した大腸菌の線毛抗原 F41 を兎に免疫して得られた抗血清

付記4 抗大腸菌線毛抗原 K99 血清  
精製した大腸菌の線毛抗原 K99 を兎に免疫して得られた抗血清

付記5 大腸菌 LT<sub>B</sub> 成分の参照品  
大腸菌 NL-1001 株培養液から精製した LT<sub>B</sub> 成分を凍結乾燥したもの。

付記6 希釈・洗浄液 1  
1,000mL 中  
塩化ナトリウム 8.0 g  
塩化カリウム 0.2 g  
無水リン酸水素二ナトリウム 1.15 g  
リン酸二水素カリウム 0.2 g  
精製水 残量  
pH を 7.2 に調整する。200 nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記7 ガングリオシド固相化プレート  
希釈・洗浄液 1 で溶解したガングリオシド溶液 (LT<sub>B</sub> 20ng 以上を結合させるのに十分な量の GM ガングリオシドを含む。) を 100  $\mu$  L ずつ 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 1 で洗浄し、ブロッキング液 (付記 58) を加え、更に反応させた後、希釈・洗浄液 1 を加えたもの。

付記8 希釈・洗浄液 2  
1,000mL 中  
ポリソルベート 20 0.5 mL  
希釈・洗浄液 1 残量  
pH を 7.2 に調整する。

付記9 抗 LT<sub>B</sub> 抗原兎ポリクロナール抗体  
兎に精製 LT<sub>B</sub> 成分を複数回筋肉内又は皮下注射した後、採取した血清を希釈・洗浄液 1 で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記10 洗浄液 3  
1,000mL 中  
ブロッキング液 100 mL  
希釈・洗浄液 1 残量

付記11 標識抗体 1  
市販のプロテイン A ペルオキシンダーゼとプロテイン A 溶解液を 9 : 1 の割合で混合し、希釈したもの。

付記 12 基質液 1

A液：25mg の 4-アミノアンチピリンを 50 mL の 0.17mol/L フェノールで溶解したもの。

B液：0.3%過酸化水素溶液をリン酸ナトリウム緩衝液（付記 59）で希釈したもの。

A液とB液を使用時に等量混合したもの。

付記 13 相対力価

不活化ワクチンの力価試験において、酵素抗体反応による *in vitro* 抗原定量法を評価し、参照品との比較により、試験品の有効抗原量を数値化するために考案された単位

付記 14 溶出緩衝液

リン酸二水素カリウム

8.2 g

水

94 mL

pH を 9.3 に調整する。

付記 15 線毛抗原 K88 成分の参照品

次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

(1) 大腸菌 NL-1002 株培養液から精製した線毛抗原 K88 成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。

(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 16 抗体固相化プレート 1

希釈液 5（付記 60）で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 1（付記 61）を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 17 ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体

大腸菌線毛抗原 K88 に対するマウスモノクローナル抗体をペルオキシダーゼで標識したものを希釈液 6（付記 62）で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 18 基質液 2

C液：0.6g の 2,2'-アジノ-ジ (3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート) を 1,000mL のグリシン緩衝液で希釈したもの。

D液：0.02vol %過酸化水素溶液

C液とD液を使用時に等量混合したもの。

付記 19 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記 20 線毛抗原 K99 成分の参照品

次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

(1) 大腸菌 NL-1008 株培養液から精製した線毛抗原 K99 成分で、ペプトンで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。

(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 21 抗体固相化プレート 2

希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1 (付記 63) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 22 ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体  
抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1 をペルオキシダーゼで標識したものを希釈・洗浄液 2 で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 23 線毛抗原 987P 成分の参照品  
次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。  
(1) 大腸菌 NADC1413 株培養液から精製した線毛抗原 987P 成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。  
(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 24 抗体固相化プレート 3  
希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 987P 兎ポリクローナル抗体 (付記 64) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 25 抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 1  
精製線毛抗原 987P で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 1BB6-3D6 が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7 (付記 65) で適当に希釈したもの。

付記 26 標識抗体 2  
ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体を 50%グリセリン溶液 (付記 66) で溶解し、更に希釈液 8 (付記 67) で希釈したもの。

付記 27 線毛抗原 F41 成分の参照品  
次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。  
(1) 大腸菌 NADC1471 株培養液から精製した線毛抗原 F41 成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して凍結乾燥したもの。  
(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 28 抗体固相化プレート 4  
希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 F41 兎ポリクローナル抗体 (付記 68) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 29 抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1  
精製線毛抗原 F41 で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ SDSU56/85 が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7 で適当に希釈したもの。

付記 30 水酸化ナトリウム溶液

1,000mL 中

水酸化ナトリウム

30.0 g

水

残量



付記 31 硫酸アンモニウム溶液

1,000mL 中

硫酸アンモニウム

132.0 g

水

残 量

付記 32 水酸化アルミニウムゲル

硫酸アルミニウム 18 水和物 33.3g を精製水 50mL に溶解し、これに 1.0mol/L 水酸化ナトリウム 300mL を加え攪はんする。精製水で沈殿物を洗浄し、この沈殿物に適量の精製水を加え、ブレンダーで碎細する。水酸化アルミニウム含量が 2.0w/v %となるように精製水で濃度を調整し、最終濃度が 0.15mol/L となるように塩化ナトリウム水溶液を加え、121 °Cで 15 分間高圧滅菌する。これを希釈・洗浄液 1 で水酸化アルミニウム含量が 0.35w/v%となるように濃度を調整したもの。

付記 33 線毛抗原 K88 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 K88 (付記 69) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 2,048 ~ 4,096 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 34 希釈液 3

1,000mL 中

牛血清アルブミン

1.0 g

希釈・洗浄液 2

残 量

付記 35 線毛抗原 K88 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 K88 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 K88 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、1,024 倍希釈で 0.9 ~ 1.1 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 36 抗原吸着プレート 1

希釈液 5 で 0.5  $\mu$  g/mL に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 70) 100  $\mu$  L ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K88 を希釈・洗浄液 2 で希釈したものを各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37 °Cで 1 時間反応させたもの。

なお、精製線毛抗原 K88 の至適濃度は、線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 を 1,024 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9 ~ 1.1 となる濃度とする。

付記 37 ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1

ペルオキシダーゼ標識山羊抗モルモット IgG(H+L)を希釈液 3 で希釈したもの。

付記 38 線毛抗原 K99 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 K99 (付記 71) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 32 ~ 64 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 39 線毛抗原 K99 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 K99 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 K99 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512 倍希釈で 0.9 ~ 1.1 となるように濃度を調

整し、凍結乾燥したもの。

#### 付記 40 抗原吸着プレート 2

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g/mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 72)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K99 を希釈・洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 K99 濃度は、線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が  $0.9 \sim 1.1$  となる濃度とする。

#### 付記 41 線毛抗原 987P 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 987P (付記 73) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で  $8 \sim 16$  倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

#### 付記 42 線毛抗原 987P 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 987P で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 987P を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、128 倍希釈で  $0.9 \sim 1.1$  となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

#### 付記 43 抗原吸着プレート 3

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g/mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 2 (付記 74)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 987P 濃度は、線毛抗原 987P 参照陽性血清 2 を 128 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が  $0.9 \sim 1.1$  となる濃度とする。

#### 付記 44 線毛抗原 F41 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 F41 (付記 75) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で  $256 \sim 512$  倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

#### 付記 45 線毛抗原 F41 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 F41 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 F41 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512 倍希釈で  $0.9 \sim 1.1$  となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

#### 付記 46 抗原吸着プレート 4

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g/mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 76)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 F41 濃度は、線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が  $0.9 \sim 1.1$  となる濃度とする。

#### 付記 47 LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 1

精製大腸菌 LT<sub>B</sub> (付記 77) で免疫したマウスの血清であって、酵素抗体反応で  $256 \sim 512$  倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 48 希釈液 4  
100mL 中  
カゼイン 1.0 g  
希釈・洗浄液 2 残 量

付記 49 LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 2  
精製大腸菌 LT<sub>B</sub> で免疫したマウスの血清であって、精製大腸菌 LT<sub>B</sub> を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512 倍希釈で 0.9 ~ 1.1 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 50 抗原吸着プレート 5  
希釈・洗浄液 1 で希釈したガングリオシド (付記 78) 100  $\mu$  L ずつを 96 穴プレートの各穴に加え、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製大腸菌 LT<sub>B</sub> を希釈・洗浄液 1 で希釈し、プレートに 50  $\mu$  L ずつに加え、37 °C で 1 時間反応させたもの。  
なお、至適の精製 LT<sub>B</sub> 濃度は、LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9 ~ 1.1 となる濃度とする。

付記 51 ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 2  
ペルオキシダーゼ標識山羊抗マウス IgG(H+L) を希釈液 4 で希釈したもの。

付記 52 バクト-ペプトン液  
1,000mL 中  
バクト-ペプトン 10 g  
塩化ナトリウム 2.5 g  
水 残 量  
溶解後、pH を 7.2 に調整し、121 °C で 25 分間滅菌する。

付記 53 10L<sub>0</sub> 量  
10 IAU の標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、死亡させない毒素の最大量

付記 54 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型  $\beta$  毒素液  
クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 NL-1003 株又はこれと同等の  $\beta$  毒素を産生する株の培養上清をろ過滅菌し、滅菌グリセロールを最終濃度 10vol % となるように添加したもの。

付記 55 10L<sub>+</sub> 量  
10 国際抗毒素単位の標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、80 % 以上を死亡させる毒素の最小量

付記 56 IAU (International Antitoxin Units)  
クロストリジウム・パーフリンゲンス  $\beta$  毒素トキソイドに対する抗毒素の国際単位

付記 57 標準抗毒素  
動物医薬品検査所が適当と認めた標準抗毒素又はこれと比較して標準化された抗毒素

- 付記 58 ブロッキング液  
1,000mL 中  
牛血清アルブミン 10.0 g  
希釈・洗浄液 1 残 量  
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記 59 リン酸ナトリウム緩衝液  
1,000mL 中  
リン酸二水素ナトリウム一水和物 10.76 g  
無水リン酸水素二ナトリウム 17.37 g  
水 残 量  
pH を 7.0 に調整する。
- 付記 60 希釈液 5  
1,000mL 中  
無水炭酸ナトリウム 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。
- 付記 61 抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 1  
K88ac、ab 及び ad の 3 種類の線毛抗原で免疫したマウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 21BA1-1H1 が産出するマウスモノクローナル抗体
- 付記 62 希釈液 6  
1,000mL 中  
オボアルブミン 10.0 g  
希釈・洗浄液 2 残 量  
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記 63 抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1  
線毛抗原 K99 で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 2BD4E4 が産出するマウスモノクローナル抗体
- 付記 64 抗大腸菌線毛抗原 987P 兎ポリクローナル抗体  
987P を産生する大腸菌 987 株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の NADA138 株で吸収を行ったもの。
- 付記 65 希釈液 7  
1,000mL 中  
牛血清アルブミン 20.0 g  
希釈・洗浄液 2 残 量  
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記 66 50%グリセリン溶液

滅菌精製水とグリセリンを等量混合したもの。

付記 67 希釈液 8

兔血清 1 mL 当たり 100mL の希釈・洗浄液 2 を混合したもの。

付記 68 抗大腸菌線毛抗原 F41 兔ポリクローナル抗体

F41 を産生する大腸菌 1839 株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の 1839 株で吸収したもの。

付記 69 精製線毛抗原 K88

線毛抗原 K88 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液（付記 79）に懸濁した後、加熱抽出し、硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生成させた後、陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 K88 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 29kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 70 抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 K88 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 K88 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 29kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 71 精製線毛抗原 K99

線毛抗原 K99 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、加熱抽出し、硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生成させた後、陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 K99 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 19kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 72 抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 K99 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 K99 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 19kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 73 精製線毛抗原 987P

線毛抗原 987P を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、ホモジナイザーによる細胞破碎、超遠心及び陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 987P を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 23 kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 74 抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 987P に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 987P を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 23kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 75 精製線毛抗原 F41

線毛抗原 F41 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、ホモジナイザーによる細胞破碎、超遠心及び陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、

SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 F41 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 30kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 76 抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 F41 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 F41 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行った場合、約 30kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 77 精製大腸菌 LT<sub>B</sub>

LT<sub>B</sub> を保有する大腸菌培養液を遠心し、上清を濃縮、精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行うとき、約 10 kDa の位置に単一のバンドを認める。

付記 78 ガングリオシド

市販の GM ガングリオシドを希釈・洗浄液 1 で 50  $\mu$  g/mL の濃度に調整して使用する。

付記 79 2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液

1,000mL 中

尿素

120 g

0.05mol/L リン酸緩衝液 (pH7.2) (付記 80)

残 量

付記 80 0.05mol/L リン酸緩衝液 (pH7.2)

0.2mol/L リン酸二水素ナトリウム約 35mL と 0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム約 90mL を混合し、pH を 7.2 に調整し、この液 100mL に水を加え 400mL としたものの。