

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（アジュバント加） 不活化ワクチン（シード）

平成 21 年 7 月 1 日（告示第 861 号） 新規追加

1 定義

シードロット規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化したもの又はこれを濃縮したものに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

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ BQ14 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ基準株に一致する生物学的性状を示す。

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、適当と認められた液状培地で増殖させ、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、その継代数とする。

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、適当と認められた液状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、適当と認められた液状培地で増殖する。

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 以下又は凍結乾燥して 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について、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた液状培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を培地に接種して増菌・継代培養後、更に培地に接種して培養したものを培養菌液とする。培養菌液は、粗ろ過してもよい。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2 原液の調製

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て不活化したものを原液とする。こ

の場合、不活化した後に濃縮し、又は適当と認められた保存剤を添加してもよい。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適量のアジュバントを加え、混合したものを最終バルクとする。この場合、pH を調整し、又は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て、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、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、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、3.2.2 及び 3.2.3 の試験、3.2.1 及び 3.2.4 の試験又は 3.2.1 及び 3.2.2 の試験を行う。

3.2.1 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、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.2.2 同定試験

以下の試験方法で試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.2.2.1 試験材料

検体又は検体をトリプトース・ホスフェイト・ブロスで 10 倍階段希釈したものを試料とする。

3.2.2.2 試験方法

寒天培地（付記 1）及び抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエウサギ免疫血清（付記 2）を染み込ませたろ紙ディスクを用い、試料についてマイコプラズマ発育阻止試験（付記 3）を実施する。試料を接種した培地を 37℃で 14 日間、微好氣的に培養する。

3.2.2.3 判定

試料のいずれかにおいて、ろ紙ディスクの周辺に明瞭な発育阻止帯を認めなければならない。

3.2.3 総菌数試験

3.2.3.1 試験材料

検体を遠心し、得られた沈渣を適量のリン酸緩衝食塩液（付記 4）に浮遊したものを試料とする。

3.2.3.2 試験方法

分光光度計を用い、試料の吸光度を測定する。

3.2.3.3 判定

標準検量線及び吸光度値から総菌数を算出するとき、検体中の総菌数は、1 mL 中 1.4×10^8 個以上でなければならない。

3.2.4 生菌数試験

3.2.4.1 試験材料

培養粗ろ液を接種材料とする。

3.2.4.2 試験方法

試験管に 1.8mL ずつ分注した BHL 培地（付記 5）で、接種材料を 10 倍階段希釈し、37 °C で 14 日間培養し、観察する。

3.2.4.3 判定

培地が黄色に変化したものをマイコプラズマ陽性とし、CCU を算出する。検体の生菌数は、1 mL 中 5×10^6 CCU 以上でなければならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 及び 3.3.2 の試験又は 3.3.1、3.3.2、3.3.3 及び 3.3.4 の試験を行う。

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1、3.3.2.2 又は 3.3.2.3 の試験を行う。

3.3.2.1 不活化試験 1

3.3.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

液状培地（付記 6）に試料を接種し、37 °C で 14 日間培養する。培養中に培地の黄変が認められたときは、寒天培地に塗抹し、37 °C で 14 日間微好氣的に培養して、マイコプラズマ・ハイオニューモニエの発育の有無を調べる。

3.3.2.1.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエの発育を認めてはならない。

3.3.2.2 不活化試験 2

3.3.2.2.1 試料

検体を用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

BHL 培地に検体を接種し、十分に混和し、14 日間培養する。なお、この場合、対照として培地及び不活化前の菌液を接種したものを同様に観察する。

3.3.2.2.3 判定

検体及び培地を接種した培地にはマイコプラズマ・ハイオニューモニエ発育を認めてはならず、不活化前の菌液を接種した培地においてはマイコプラズマ・ハイオニューモニエの発育を認めなければならない。

3.3.2.3 不活化試験 3

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体を遠心し、その沈渣を試料とする。

3.3.2.3.1.2 培地

マイコプラズマ・ハイオニューモニエの発育に相当と認められた液状培地を用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料を液状培地に接種し、36 °C で 14 日間培養する。接種後 7 日目に継代し、さらに 36 °C で 14

日間培養し、培地の色の変化を観察する。

3.3.2.3.3 判定

培養液の色では、黄変を認めてはならない。

3.3.3 同定試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

50 倍希釈した原液、適当と認められた陽性対照及び分子量マーカーを試料とする。

3.3.3.2 試験方法

各試料について、5～10w/v%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、膜に転写する。転写した膜をブロッキング処理を行った後、抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエポリクローナル抗体液と反応させる。膜を緩衝液で洗浄し、ブロッキング処理を行った後、標識抗体液と反応させる。膜を洗浄した後、基質液と反応させ、十分な発色を確認して反応を止め、膜を乾燥させる。

3.3.3.3 判定

陽性対照及び分子量マーカーと比較した場合、原液にはマイコプラズマ・ハイオニューモニエに特有のバンドが出現しなければならない。

3.3.4 抗原含有量試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 試料

適当と認められた参照原液及び原液について、可溶化操作を行ったものを試料とする。

3.3.4.2 試験方法

適当と認められたウサギ抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗体を希釈し、ELISA プレートの各穴に固相化する。プレートを洗浄し、2 倍階段希釈したそれぞれの試料を各穴に加え、37℃で1 時間反応させる。プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗体を加え、37℃で1 時間反応させる。洗浄し、テトラメチルベンチジン基質液を加えて 30 分間反応させた後、硫酸で反応を停止させ、吸光度を測定する。参照原液と比較し、平行線検定法により含有量を算出する。

3.3.4.3 判定

検体中の抗原含有量は、1 mL 中 500～5,000 抗原単位の範囲でなければならない。

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、固有の色調を有する液体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。

3.4.2 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 チメロサル定量試験

チメロサル添加剤については、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。

3.4.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加剤については、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。

3.4.6 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、アルミニウムの含有量は、1mL 中 0.6

～0.9mg 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、その含有量とする。

3.4.7 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定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。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 又は 3.4.8.2 の試験を行う。

3.4.8.1 二抗体サンドイッチ酵素抗体反応(以下「二抗体サンドイッチ ELISA」という。)による試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.8.1.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

3.4.8.1.1.3 二抗体サンドイッチ ELISA 用抗原

ポリソルベート 20 抽出抗原(付記 7)を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

試験動物の 20 匹を試験群とし、5 匹を対照群とする。

注射材料 1.0mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。注射後 4 週間目に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、二抗体サンドイッチ ELISA を行う。

試験群と対照群の血清及び参照陽性血清 1(付記 8)を希釈液(付記 9)で 10 倍に希釈したものを、更に同希釈液で 2 倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート 1(付記 10)の穴に 100 μ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4℃で 18 時間反応させた後、洗浄液(付記 11)で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 1(付記 12)を 100 μ L ずつ加え、37℃で 90 分間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。その後、基質液 1(付記 13)を各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃で 30 分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405nm で各穴の吸光度を測定する。

3.4.8.1.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値 + 0.5 以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価 2,560 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 320 倍以下でなければならない。また、参照陽性血清 1 は、抗体価 2,560 ～ 5,120 倍を示さなければならない。

3.4.8.2 間接 ELISA による試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.8.2.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

3.4.8.2.1.3 間接 ELISA 用抗原

ポリソルベート 20 抽出抗原を用いる。

3.4.8.2.2 試験方法

試験動物の 20 匹を試験群、5 匹を対照群とする。

注射材料 1.0mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。注射後 4 週間目に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、間接 ELISA を行う。

試験群と対照群の血清及び参照陽性血清 2(付記 14)を希釈液で 100 倍に希釈したものを、更に同希釈液で 2 倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート 2(付記 15)の穴に 50 μ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4℃で一夜反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄

する。次に、各穴に標識抗体 2（付記 16）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。その後、基質液 2（付記 17）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた後、0.32w/v% フッ化ナトリウム溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 415nm で各穴の吸光度を測定する。

3.4.8.2.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値の 2 倍をカットオフ値とし、これ以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、80 % 以上が抗体価 6,400 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 400 倍以下でなければならない。また、参照陽性血清 2 は、抗体価 3,200 ~ 6,400 倍を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 2 年間とする。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 寒天培地

付記 5 の液状培地 1,000mL に精製寒天 4.0g を加え、加温溶解した後、115 $^{\circ}$ C で 15 分間滅菌する。約 50 $^{\circ}$ C に冷却し、あらかじめろ過滅菌された付記 6 と同様の添加物を混合し、直径 90mm のシャーレに分注する。

付記 2 抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエウサギ免疫血清

製造用株でウサギを免疫して得た血清であって、少量に小分けして - 20 $^{\circ}$ C に保存したものである。約 10^6 個の濃度の菌液を用いた発育阻止試験においては、約 5 mm の阻止帯を示す。

付記 3 マイコプラズマ発育阻止試験

寒天平板の一端に試料を約 0.05mL 滴下し、培地を傾けて試料を他端に向け流下させる。表面が乾燥した後、あらかじめ抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ免疫血清を浸み込ませて乾燥させたろ紙ディスクを流線の中央に置き、37 $^{\circ}$ C で 14 日間、微好氣的に培養する。培養後観察すると、ディスクから拡散した抗血清によりその周辺におけるマイコプラズマ・ハイオニューモニエの集落の発育が阻止され、阻止帯が形成される。マイコプラズマ・ハイオニューモニエ以外のマイコプラズマに対しては発育阻止は、起こらない。

付記 4 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化カリウム	0.2 g
水	残量

pH を 6.8 ~ 7.2 に調整して、121 $^{\circ}$ C で 20 分間高压滅菌又はろ過滅菌する。

付記 5 BHL 培地

ハンクス液* ¹	500 mL
ラクトアルブミン	2 g
ブルセラブロス	5.8 g
25w/v % 新鮮酵母エキス	50 mL

豚血清	200 mL
アミノベンジルペニシリン	125 mg
フェノールレッド	0.1 g
水	250 mL

5 mol/L 水酸化ナトリウム液で pH を 7.6 ~ 8.0 に調整して、450nm のメンブランフィルターでろ過滅菌した後、更に 220nm でろ過滅菌する。

*1 1,000mL 中

塩化ナトリウム	8 g
塩化カリウム	0.4 g
リン酸水素二ナトリウム・十二水和物	0.15 g
リン酸二水素カリウム	0.06 g
ブドウ糖	4 g
水	残量

2.5mol/L 水酸化ナトリウム液で pH を 7.3 ~ 7.7 に調整して、450nm のメンブランフィルターでろ過した後、更に 220nm でろ過滅菌する。

付記 6 液状培地

1,000mL 中

基礎培地

ブルセラブロス	5.8 g
ハンクス液粉末	4.9 g
ラクトアルブミン水解物	2.0 g
水	750 mL

添加物

非働化豚血清	200 mL
5 w/v % 酵母エキス液	50 mL
2.5w/v % 酢酸タリウム水溶液	4 mL
クロキサシリンナトリウム	100 mg
又は	
アンピシリンナトリウム	250 mg

基礎培地を加温溶解した後、115 °C で 15 分間滅菌する。冷却した後、あらかじめろ過滅菌された添加物を混合し、pH を 7.5 ~ 7.7 に調整する。

付記 7 ポリソルベート 20 抽出抗原

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の振盪培養菌液を遠心集菌し、希釈液に懸濁した後、4 °C で 24 時間攪拌して菌体を洗浄する。洗浄菌体をトリス緩衝液(1)に蛋白濃度 1 mg/mL になるように懸濁した後、2 vol % ポリソルベート 20 加トリス緩衝液(2)を等量加え、37 °C で 30 分間振盪しながら加温する。遠心後の上清にジエチルエーテルを等量加えて振盪した後、エーテル層を完全に除去したものである。

(1) トリス緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.03g、塩化ナトリウム 14.61g を水に溶解し、全量を 1,000mL としたもの

(2) 2 vol % ポリソルベート 20 加トリス緩衝液

ポリソルベート 20 20mL とトリス緩衝液 980mL とを混合したもの

付記 8 参照陽性血清 1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清であって、二抗体サンドイッチ ELISA 抗体価が 2,560 ~ 5,120 倍となるように調整し、凍結又は凍結乾燥したもの

付記 9 希釈液

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 1.15 g

水 残量

121 °C で 15 分間高圧滅菌又はろ過滅菌する。

付記 10 抗原吸着プレート 1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株に対するウサギ免疫血清（付記 18）を炭酸緩衝液（付記 19）で 100 倍に希釈した後、96 穴マイクロプレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、4 °C で 18 時間反応させる。その後、洗浄液で 3 回洗浄する。0.1w/v %ゼラチン液（付記 20）を各穴に 100 μ L ずつ加え、4 °C で 18 時間反応させる。更に、洗浄液で 3 回洗浄した後、ポリソルベート 20 抽出抗原を希釈液で蛋白量 12.5 μ g/mL になるように希釈し、各穴に 100 μ L ずつ加え、4 °C で 18 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄したものである。

付記 11 洗浄液

ポリソルベート 20 0.5mL と希釈液 1,000mL とを混合したもの

付記 12 標識抗体 1

アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体を希釈液で至適濃度に希釈したもの

付記 13 基質液 1

P-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム 100mg を基質緩衝液 1（付記 21）100mL で溶解したもの

付記 14 参照陽性血清 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清であって、間接 ELISA 抗体価が 3,200 ~ 6,400 倍となるように調整し、凍結乾燥したもの

付記 15 抗原吸着プレート 2

ポリソルベート 20 抽出抗原を炭酸緩衝液で蛋白濃度 25 μ g/mL になるように希釈し、96 穴マイクロプレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させる。その後、洗浄液で 3 回洗浄する。牛血清アルブミン液（付記 22）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 90 分間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄したものである。

付記 16 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を牛血清アルブミン液で至適濃度に希釈したもの

付記 17 基質液 2

2,2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)二アンモニウム塩 45mg を 1 mL の水に溶解し、その 0.15mL と 5 vol% 過酸化水素 0.05mL を基質緩衝液 2 (付記 23) 10mL に加えたもの

付記 18 ウサギ免疫血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したウサギの血清であって、発育阻止試験において直径 3 mm 以上の阻止帯を示すもの

付記 19 炭酸緩衝液

A 液：炭酸ナトリウム 5.3g を水に溶解し、全量を 1,000mL とする。

B 液：炭酸水素ナトリウム 4.2g を水に溶解し、全量を 1,000mL とする。

A 液と B 液を等量混合し、pH を 9.6 に調整する。

付記 20 0.1w/v %ゼラチン液

ゼラチン 1.0g を希釈液 1,000mL で溶解したもの

付記 21 基質緩衝液 1

塩化マグネシウム六水和物 0.049g、ジエタノールアミン 96mL を水に溶解した後、5 mol/L の塩酸で pH を 9.8 に調整し、全量を 1,000mL としたもの

付記 22 牛血清アルブミン液

牛血清アルブミン 10g を希釈液 1,000mL で溶解したもの

付記 23 基質緩衝液 2

A 液：クエン酸一水和物 21g を水に溶解し、全量を 1,000mL とする。

B 液：クエン酸三ナトリウム二水和物 29.4g を水に溶解し、全量を 1,000mL とする。

A 液と B 液を等量混合し、pH を 4.0 に調整する。