

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（油性アジュバント加）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
平成22年4月22日（告示第646号）一部改正
平成28年4月18日（告示第1020号）一部改正
令和元年8月26日（告示第723号）一部改正

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、油性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 NL1042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 -20°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 -20°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 -20°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又はこれを適当と認められた方法で濃縮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

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化したもの又はこれを適当と認められた方法で過剰の不活化剤を中和したものを不活化菌液とする。ただし、最終バルクの調整時に過剰の不活化剤を中和してもよい。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.3 アジュバントの添加

不活化菌液又は適当と認められた方法で濃縮した不活化菌液に適量のアジュバントを添加したものを原液とする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。ただし、最終バルクの調整時にアジュバントを添加してもよい。

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、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 染色試験

3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体をスライドガラス上でグラム染色するか又はクリスタルバイオレットとヨウ化物で染色し、鏡検する。

3.2.1.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ様菌（球状又は球桿状から短桿状の菌）以外の菌を検出してはならない。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.2.1.2 培地

適当と認められた液状培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料を培地でさらに10倍階段希釈し、36～38℃で14～17日間培養する。

3.2.2.3 判定

培養液を観察し、色調が変化したものをマイコプラズマ陽性とみなし、CCUを算出する。

検体の菌量は、1mL中 5×10^6 CCU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

3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.1.1.2 培地

適当と認められた液状培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料を培地に接種し、37℃で7日間以上培養する。

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 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。

3.5 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液体でなければならず、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

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、0.05vol %以下でなければならない。

3.5.6 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。

ただし、3.5.7の試験を行うときは、本試験は実施しない。

3.5.7 安全試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品を用いる。

3.5.7.1.2 試験動物

3週齢の子豚を用いる。

3.5.7.2 試験方法

試験動物 2頭に1回目は両頸部に2 mLずつ、2回目は14日後に2 mLを左後肢にそれぞれ筋肉内注射する。それぞれの接種後14日間、一般症状を観察する。試験期間中、1回目接種の前日及び3日後、2回目接種の当日及び14日後に体重を測定し、それぞれの接種の前日から3日後まで毎日直腸温を測定する。

3.5.7.3 判定

各項目について観察期間中に著しい異常を認めてはならない。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1、3.5.8.2又は3.5.8.3の試験を行う。

3.5.8.1 マウス試験法

3.5.8.1.1 試験材料

3.5.8.1.1.1 注射材料

試験品あるいは試験品を適当と認められた希釈液で希釈したものを注射材料とする。

3.5.8.1.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

3.5.8.1.1.3 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

ポリソルベート20抽出抗原1（付記1）を用いる。

3.5.8.1.2 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、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2）を希釈液1（付記3）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4）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°Cで18時間反応させた後、洗浄液1（付記5）で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体1（付記6）を100 μ Lずつ加え、37°Cで90分間反応させた後、洗浄液1で3回洗浄する。その後、基質液1（付記7）を各穴に100 μ Lずつ加え、37°C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。

3.5.8.1.3 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。

3.5.8.2 ウサギ試験法

3.5.8.2.1 試験材料

3.5.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.2.1.2 試験動物

体重1.6～3.2kgのウサギを用いる。

3.5.8.2.1.3 ELISA用抗原

ポリソルベート20抽出抗原2（付記8）を用いる。

3.5.8.2.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。

注射材料1.0mLずつを試験群の後肢筋肉内に注射する。注射後6週間目に試験群及び対照群から

得られた血清についてELISAを行う。

試験群と対照群の各ウサギ血清を等量混合した各プール血清、参照陽性血清2（付記9）及び参照陰性血清（付記10）を希釈液2（付記11）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2（付記12）の3穴ずつに100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液2（付記13）で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体2（付記14）を100 μ 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。その後、基質液2（付記15）を各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた後、0.5vol%フッ化水素酸溶液を各穴に100 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。

3.5.8.2.3 判定

参照陰性血清の全穴の平均吸光度値の2倍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。また、参照陽性血清2及び試験群の血清の各希釈段階における吸光度値は、3穴の平均値とする。

試験群では、参照陽性血清2の抗体価以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて20倍以下でなければならない。また、参照陰性血清の平均吸光度値は0.05～0.11、参照陽性血清2の抗体価は40～160倍を示さなければならない。

3.5.8.3 相対力価試験法

3.5.8.3.1 試験材料

試験品及び参照品（付記16）を用いる。

3.5.8.3.2 試験方法

3.5.8.3.2.1 試料の調製

試験品を2回凍結融解したものを試料とする。この場合、凍結は、 -65° C以下で24時間以上行う。

3.5.8.3.2.2 固相化プレートの作製

希釈した捕獲抗体（付記17）を96穴プレートの各穴に分注し、2～7 $^{\circ}$ Cで16～72時間静置する。プレートを洗浄した後、ブロッキング液（付記18）を各穴に加え、35～39 $^{\circ}$ Cで30～60分間反応させる。再度洗浄したものを固相化プレートとする。

3.5.8.3.2.3 反応

ELISAによりOD値を測定する。

試料及び参照品をブロッキング液で適当な濃度に希釈したもの、及びそれらを階段希釈したものを、固相化プレートの各穴に加え、21～25 $^{\circ}$ Cで60～75分間反応させる。洗浄した後、希釈した指示抗体（付記19）を各穴に加え、21～25 $^{\circ}$ Cで60～75分間反応させる。洗浄した後、基質液（付記20）を各穴に加え、21～25 $^{\circ}$ Cで反応させる。主波長405nm、副波長490nm又は492nmで最低希釈倍率の参照品の平均OD値を測定し、その値が1.5～2.2となった時点で反応終了とし、全ての穴のOD値を測定する。

3.5.8.3.3 判定

各穴のOD値を用いて、参照品中の抗原量を1.0として、試料の抗原量を相対力価（RP）の計算法（付記21）により算出するとき、試験品のRPは1.38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2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 ポリソルベート20抽出抗原1

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の振とう培養菌液を遠心集菌し、希釈液に懸濁後、4 $^{\circ}$ 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1mg/mLになるように懸濁後、2vol%ポリソルベート20加トリス緩衝液（2）を等量加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間振とうしながら加温する。遠心後の上清にジエチルエーテルを等量加えて振とう後、エー

テル層を完全に除去したもの。

(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を混合したもの。

付記2 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、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3 希釈液1

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
無水リン酸一水素ナトリウム	1.15 g
水	残量

121°Cで15分間高圧滅菌する。

付記4 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22）を炭酸緩衝液1（付記23）で100倍に希釈後、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1で3回洗浄する。0.1w/v%ゼラチン液（付記24）を各穴に100 μ Lずつ加え、4°Cで18時間反応させる。さらに、洗浄液1で3回洗浄後、ポリソルベート20抽出抗原1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1で3回洗浄したもの。

付記5 洗浄液1

ポリソルベート20 0.5mLと希釈液1,000mLを混合したもの。

付記6 標識抗体1

アルカリフォ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7 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（付記25）100mLで溶解したもの。

付記8 ポリソルベート20抽出抗原2

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、蛋白量として2 mg/mLとなるようにリン酸緩衝液2（付記26）中に懸濁し、2 vol%ポリソルベート20溶液を等量加えて、37°Cで90分間振とうしながら加温し、遠心後に採取し、適当な濃度に調製したもの。

付記9 参照陽性血清2

豚での有効性が確認されている最少抗原量を含有するワクチン（ 3×10^8 CCU/dose）の1 mL

をウサギに免疫して得られた血清で、ELISA抗体価40～160倍となるように調製し、小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記10 参照陰性血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗体陰性のウサギ血清でELISA抗体価20倍以下のものを小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記11 希釈液 2

1,000mL中

塩化ナトリウム 9.0 g

トリスヒドロキシアミノメタン 1.21 g

牛血清アルブミン 10.0 g

ポリソルベート20 0.5 mL

水 残量

pHを7.3～7.5に調整する。

付記12 抗原吸着プレート 2

ポリソルベート20抽出抗原 2 を炭酸緩衝液 2 (付記27) で蛋白量として10 μ g/mLに調製した抗原液をマイクロプレートの各穴に100 μ Lずつ分注し、プレートをシールして室温で18～72時間感作したもの。

付記13 洗浄液 2

1,000mL中

塩化ナトリウム 9.0 g

ポリソルベート20 0.5 mL

水 残量

pHを7.3～7.5に調整する。

付記14 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L) を希釈液 2 で至適濃度に希釈したもの。

付記15 基質液 2

A液：0.6gの2,2'-アジノージ (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの。

B液：0.02vol%過酸化水素溶液

A液とB液を使用時に等量混合する。

付記16 参照品

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株若しくはこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液又はこれを濃縮したものを不活化し、油性アジュバントを添加したものであり、豚における攻撃試験において肺病変及び抗体価に基づいて有効性が確認されたものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記17 捕獲抗体

ハイブリドマクローンによって作製された抗p46マウスモノクローナル抗体。

付記18 ブロッキング液

溶液A	60 mL
牛胎子血清	0.3 mL

溶液A

溶液B	90 mL
Triton X-100	0.1 mL
Tween 20	10 mL

溶液B

カゼイン	1 g
リン酸緩衝食塩液	100 mL

リン酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム	8 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
精製水	残量

pH7.1~7.3に調整する。孔径0.2 μ m以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記19 指示抗体

ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した抗p46マウスモノクローナル抗体。

付記20 基質液

2,2' -アジノビス (3 -エチルベンゾチアゾリン-6 -スルホン酸) (ABTS) 液

付記21 相対力価 (RP) の計算法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記22 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、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23 炭酸緩衝液 1

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液を混合し、pHを9.6に調整する。

付記24 0.1w/v%ゼラチン液

ゼラチン1.0gを希釈液 2 1,000mLで溶解したもの。

付記25 基質緩衝液

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26 リン酸緩衝液 2

A液：リン酸二水素ナトリウム一水和物2.75gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。

B液：無水リン酸一水素ナトリウム2.84gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。

A液775mLとB液225mLを混合してpHを7.0に調整する。この液に、塩化ナトリウム14.6g、硫酸マグネシウム1.2gを加え、全量を1,000mLにする。

付記27 炭酸緩衝液 2

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2 mol/L水酸化ナトリウム溶液で9.55～9.65に調整した後、水を加えて全量を1,000mLにする。