

豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（粗精製トキシイド）・ マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバ ント加）不活化ワクチン（シード）

平成26年1月22日（告示第 90号）新規追加
平成29年6月28日（告示第1010号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したボルデテラ・ブロンキセプチカの菌体破碎上清濃縮液、パスツレラ・ムルトシダの粗精製濃縮液及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液の培養濃縮粗ろ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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌S1株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地（付記1）上に隆起した小円形の集落を形成し、 β 溶血性を示す。また、K抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後7日齢以内の豚に点鼻接種すると、萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

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、ボルデー・ジャング培地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、3.1.1.1及び3.1.1.2.1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、ボルデー・ジャング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、3.1.2.1.1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、ボルデー・ジャング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 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は、3.1.3.1.1の試験を行う。

2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.1.2.1 名称

パストレラ・ムルトシダA型ZF-899-1株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

デキストロース・スターチ寒天培地（付記2）上に蛍光色のムコイド型集落を形成する。莢膜を保有する。

子豚の鼻腔内に接種すると、萎縮性鼻炎を起こす。

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、デキストロース・スターチ寒天培地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、3.1.1.1及び3.1.1.2.2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、デキストロース・スターチ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、3.1.2.1.2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、デキストロース・スターチ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 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は、3.1.3.1.2の試験を行う。

2.1.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

2.1.3.1 名称

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ1986-1-1株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 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。

2.1.3.3 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、3.1.1.1及び3.1.1.2.3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、3.1.2.1.3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、適当と認められた液状培地で増殖させる。

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 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は、3.1.3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

2.2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.1.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

2.3.1.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種して培養したものを、更に2代、培地に接種して増菌培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について3.2.1の試験を行う。

2.3.1.2 毒素濃縮

培養菌液の菌を物理的処理により破碎した後、遠心分離し、得られた上清を濃縮・ろ過した毒素液を抗原液とする。

抗原液について3.3.1の試験を行う。

2.3.1.3 無毒化

抗原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無毒化したものを原液とする。

原液について3.4.1の試験を行う。

2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ原液

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種して培養したものを、更に2代、培地に接種して増菌培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について3.2.2の試験を行う。

2.3.2.2 粗精製毒素濃縮

培養菌液の菌を物理的処理により破碎した後、遠心分離し、得られた上清をイオン交換カラムで粗精製した後、濃縮・ろ過した毒素液を抗原液とする。

抗原液について3.3.2の試験を行う。

2.3.2.3 無毒化

抗原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無毒化したものを原液とする。

原液について3.4.2の試験を行う。

2.3.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液

2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種して培養したものを、更に2代、培地に接種して増菌培養したものを培養菌液とする。培養菌液は、濃縮及び粗ろ過をしてもよい。

培養菌液について3.2.3の試験を行う。

2.3.3.2 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て不活化したものを原液とする。
原液について3.4.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液、パストツレラ・ムルトシダ原液及びマイコプラズマ・ハイオニューモニーモエ原液を混合し、適当と認められた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、3.5の試験を行う。

3 試験方法

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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、ボルデテラ・ブロンキセプチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.2.2 パストツレラ・ムルトシダ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、パストツレラ・ムルトシダ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.2.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニーモエ

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。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

3.1.1.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.1.2 パストツレラ・ムルトシダ

3.1.1.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.1.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニーモエ

3.1.1.2.3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

3.1.3.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

3.1.1.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.1.2 パストツレラ・ムルトシダ

3.1.1.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.1.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニーモエ

3.1.1.2.3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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ培養菌液の試験

3.2.1.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 生菌数試験

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.2.1.2 培地

ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた寒天培地を用いる。

3.2.1.2.1.3 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37°Cで48時間培養後、集落を数える。

3.2.1.2.1.4 判定

各試料の集落数及び検体希釈倍率から生菌数を算出するとき、検体の菌数は1 mL中 7×10^8 個以上でなければならない。

3.2.1.3 毒素量測定試験

3.2.1.3.1 試験材料

3.2.1.3.2 試料

検体及びボルデテラ・ブロンキセプチカ参照毒素（付記3）を細胞維持用培養液（付記4）で25倍から2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.3.3 培養細胞

牛胎子肺（以下この項において「EBL」という。）細胞（付記5）を細胞増殖用培養液（付記6）で、約 1×10^5 個/mLに調製した後、96穴の細胞培養用プレートに0.1mLずつ分注し、37°C、5 vol%炭酸ガス下で3～4日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.3.4 試験方法

96穴EBL細胞培養プレートから細胞増殖用培養液を静かに抜き取り、試料0.1mLずつをそれぞれ培養細胞に接種する。これを37°C、5 vol%炭酸ガス下で5日間培養した後、細胞のCPEの有無を観察する。

3.2.1.3.5 判定

培養細胞にCPEが認められたものを陽性とし、その最大希釈倍数を0.1mL中のEBL単位とするとき、検体の毒素量は、0.1mL中3,200EBL単位以上でなければならない。また、ボルデテラ・ブロンキセプチカ参照毒素は、所定の値を示さなければならない。

3.2.2 パスツレラ・ムルトシダ培養菌液の試験

3.2.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 生菌数試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.2.1.2 培地

デキストロース・スターチ寒天培地又は適当と認められた寒天培地を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37°Cで24時間培養後、集落を数える。

3.2.2.2.3 判定

各試料の集落数及び検体希釈倍数から生菌数を算出するとき、検体の菌数は1 mL中 1×10^8 個以上でなければならない。

3.2.2.3 毒素量測定試験

3.2.1.3を準用し、検体及びパスツレラ・ムルトシダ参照毒素（付記7）を細胞維持用培養液で25倍から2倍階段希釈したものを試料として試験するとき、検体の毒素量は0.1mL中102,400EBL単位以上でなければならない。パスツレラ・ムルトシダ参照毒素は、所定の値を示さなければならない。

3.2.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ培養菌液の試験

3.2.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.3を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.2 生菌数試験

3.2.3.2.1 試験材料

3.2.3.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.2.3.2.1.2 培地

適当と認められた液体培地を用いる。

3.2.3.2.2 試験方法

試験管に培地をそれぞれ1.8mLずつ分注した後、検体0.2mLを接種し、 $10^1 \sim 10^{10}$ まで10倍階段希釈する。これを37℃で14日間培養した後、培地の色調変化を観察する。

3.2.3.2.3 判定

培地が黄色に変化したものを陽性とし、色調変化単位（CCU）を算出するとき、検体の生菌数は、1 mL中 5×10^5 CCU以上でなければならない。

3.3 抗原液の試験

3.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ抗原液の試験

3.3.1.1 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。

3.3.1.2 毒素量測定試験

3.2.1.3を準用して試験するとき、検体の毒素量は、0.1mL中6,400EBL単位以上でなければならない。

3.3.2 パスツレラ・ムルトシダ抗原液の試験

3.3.2.1 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。

3.3.2.2 毒素量測定試験

3.2.2.3を準用して試験するとき、検体の毒素量は、0.1mL中409,600EBL単位以上でなければならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液の試験

3.4.1.1 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。

3.4.1.2 無毒化試験

3.2.1.3を準用して試験するとき、検体の毒素量は、0.1mL中400EBL単位以下でなければならない。

3.4.2 パスツレラ・ムルトシダ原液の試験

3.4.2.1 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。

3.4.2.2 無毒化試験

3.2.2.3を準用して試験するとき、検体の毒素量は、0.1mL中400EBL単位以下でなければならない。

3.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液の試験

3.4.3.1 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。

3.4.3.2 不活化試験

3.4.3.2.1 試験材料

3.4.3.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.4.3.2.1.2 培地

製造用培地を用いる。

3.4.3.2.2 試験方法

培地に検体を接種し、十分に混和した後、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。

3.4.3.2.3 判定

検体及び培地を接種した培地には菌の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菌の発育を認めなければならない。

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。

3.5.2 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 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、ホルマリンの含有量は、0.25vol%以下でなければならない。

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 mL中1.30～1.70mgでなければならない。

3.5.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、注射量は、0.3mLとする。

3.5.7 無毒化試験

3.5.7.1 試験材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.5.7.3 試験方法

注射材料0.1mLずつを試験動物2匹の背部皮内に注射し、10日間観察する。

3.5.7.4 判定

注射反応は、無視し得る程度以下でなければならない、試験動物は、全て生存しなければならない。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

3.5.8.1.1 試験材料

3.5.8.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.1.1.2 試験動物

6～7週齢のddY系SPFマウスを用いる。

3.5.8.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用ボルデテラ・ブロンキセプチカ抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ精製抗原（付記8）を用いる。

3.5.8.1.2 試験方法

試験動物10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。

試験群及び対照群の各血清、並びにボルデテラ・ブロンキセプチカ参照陽性血清（付記9）を希釈液（付記10）で40～10,240倍まで2倍階段希釈したものをボルデテラ・ブロンキセプチカ精製抗原吸着プレート（付記11）に100 μ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4 $^{\circ}$ Cで18～24時間反応させた後、洗浄液（付記12）で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体（付記13）を100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液（付記14）を各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ 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320倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て80倍以下でなければならない。また、ボルデテラ・ブロンキセプチカ参照陽性血清は、抗体価320～640倍を示さなければならない。

3.5.8.2 豚パストツレラ症力価試験

3.5.8.2.1 試験材料

3.5.8.2.1.1 試験動物

3.5.8.1の試験に用いた動物を用いる。

3.5.8.2.1.2 ELISA用パストツレラ・ムルトシダ抗原

パストツレラ・ムルトシダ精製抗原（付記15）

3.5.8.2.2 試験方法

3.5.8.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、並びにパストツレラ・ムルトシダ参照陽性血清（付記16）を希釈液で40～10,240倍まで2倍階段希釈したものをパストツレラ・ムルトシダ精製抗原吸着プレート（付記17）に100 μ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4 $^{\circ}$ Cで18～24時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体を100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ 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。

3.5.8.2.3 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1,280倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て320倍以下でなければならない。また、パストツレラ・ムルトシダ参照陽性血清は、抗体価640～1,280倍を示さなければならない。

3.5.8.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

3.5.8.3.1 試験材料

3.5.8.3.1.1 試験動物

3.5.8.1の試験に用いた動物を用いる。

3.5.8.3.1.2 ELISA用マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗原

ポリソルベート20抽出抗原（付記18）を用いる。

3.5.8.3.2 試験方法

3.5.8.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、並びにマイコプラズマ・ハイオニューモニエ参照陽性血清（付記19）を希釈液で40～10,240倍まで2倍階段希釈したものをマイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗原吸着プ

レート（付記20）に100 μ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4 $^{\circ}$ Cで18～24時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体を0.1mLずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで90分間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ 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。

3.5.8.3.3 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、全て320倍以下でなければならない。また、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ参照陽性血清は、抗体価2,560～5,120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、この限りでない。

付記1 ボルデー・ジャング培地

1,000mL中

ボルデー・ジャング・アガーベース	30 g
グリセリン	10 g
水	残 量

加温溶解後、121 $^{\circ}$ Cで15分間高压滅菌する。

約50 $^{\circ}$ Cに冷却した後、馬又は羊血液を7～15vol%となるように添加する。

付記2 デキストロース・スターチ寒天培地

1,000mL中

プロテオース・ペプトン	15.0 g
デキストロース	2.0 g
可溶性でんぷん	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二ナトリウム	3.0 g
ゼラチン	20.0 g
寒天	10.0 g
水	残 量

加温溶解後、121 $^{\circ}$ Cで15分間高压滅菌する。

付記3 ボルデテラ・ブロンキセプチカ参照毒素

ボルデテラ・ブロンキセプチカ製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、毒素量を0.1mL中800～1,600EBL単位となるように調製したもの。

付記4 細胞維持用培養液

1,000mL中

牛血清	40～60 mL
変法ハンクス液（付記21）	450 mL
イーグルMEM	残 量

必要最小量の抗生物質を加えても良い。

付記5 EBL細胞

妊娠牛の体内より摘出した胎子の肺実質部をトリプシン液で消化して得られた細胞で、継代は20代以内とする。

付記6 細胞増殖用培養液

1,000mL中

牛血清

100~120 mL

変法ハンクス液

450 mL

イーグルMEM

残量

必要最小量の抗生物質を加えても良い。

付記7 パスツレラ・ムルトシダ参照毒素

パスツレラ・ムルトシダ製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、陰イオンカラムで粗精製し、毒素量を0.1mL中51,200~102,400EBL単位となるように調製したもの。

付記8 ボルデテラ・ブロンキセプチカ精製抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素であり、SDSポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、分画の主成分は、分子量約140~160kDaを示し、モルモットの皮下に注射すると貧血斑を示す。

付記9 ボルデテラ・ブロンキセプチカ参照陽性血清

ボルデテラ・ブロンキセプチカ製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素で免疫したマウスの血清で、ELISA抗体価が320~640倍となるように調製し、凍結乾燥したもの。

付記10 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

付記11 ボルデテラ・ブロンキセプチカ抗原吸着プレート

ボルデテラ・ブロンキセプチカ精製抗原を炭酸緩衝液（付記22）で40倍に希釈し、96穴マイクロプレートに100 μ Lずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間反応後、洗浄液で10回洗浄し、更にゼラチン液（付記23）を各穴に150 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応後、洗浄液で10回洗浄したもの。

付記12 洗浄液

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13 標識抗体

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14 基質液

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24）100mLに溶解したもの。

付記15 パスツレラ・ムルトシダ精製抗原

パスツレラ・ムルトシダ製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素であり、SDSポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、分画の主成分は、分子量約125～145kDaを示し、モルモットの皮下に注射すると壊死斑を示す。

付記16 パスツレラ・ムルトシダ参照陽性血清

パスツレラ・ムルトシダ製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素で免疫したマウスの血清で、ELISA抗体価が640～1,280倍となるように調製し、凍結乾燥したもの。

付記17 パスツレラ・ムルトシダ精製抗原吸着プレート

パスツレラ・ムルトシダ精製抗原を炭酸緩衝液で希釈後、96穴マイクロプレートに100 μ Lずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄し、更に、ゼラチン液を各穴に150 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応後、洗浄液で10回洗浄したもの。

付記18 ポリソルベート20抽出抗原

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ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にたん白濃度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) 2vol%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19 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ参照陽性血清

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マウスの血清であって、ELISA抗体価が2,560～5,120倍となるように調製し、凍結乾燥したもの。

付記20 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗原吸着プレート

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免疫血清（付記25）を炭酸緩衝液で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 $^{\circ}$ Cで18時間反応させる。洗浄液で10回洗浄した後、ゼラチン液を各穴に150 μ Lずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間反応させる。更に、洗浄液で10回洗浄後、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たものを、100 μ Lずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄したもの。

付記21 変法ハンクス液

1,000mL中

塩化ナトリウム	8.00 g
塩化カリウム	0.40 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
グルコース	4.00 g
水	残 量

付記22 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液を混合し、pH9.6に調整する。

付記23 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24 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25 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兔の血清であって、発育阻止試験において直径約3 mm以上の阻止帯を示すもの。