

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント・油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成24年8月10日(告示第2005号)新規追加

マイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液又はこれを濃縮したものを不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバント及び油性アジュバントを添加したワクチンである。

1 小分製品の試験

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。

1.2 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、注射量は0.2mLとし、体重測定は4日目に行うものとする。

1.3 力価試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 注射材料

試験品及び参照ワクチン（付記1）を注射材料とする。

1.3.1.2 試験動物

6～7週齢のICR系雌マウスを用いる。

1.3.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原

固相化抗原（付記2）を用いる。

1.3.2 試験方法

試験動物の40匹を試験群、5匹を対照群とする。

試験群を1群20匹の2群に分け、1群（以下この項において「試験品群」という。）には試験品を、他の1群（以下この項において「参照ワクチン群」という。）には参照ワクチンをそれぞれ0.2mLずつ皮下に注射する。注射後2週間目に、試験品群、参照ワクチン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。

試験品群、参照ワクチン群及び対照群の血清を希釈液（付記3）で100倍に希釈したものを抗原吸着プレート（付記4）の2穴ずつに100 μ Lずつ加え、希釈液のみの穴をブランクとする。また、参照陽性血清（付記5）を希釈液で100倍に希釈したものを抗原吸着プレートの4穴に100 μ Lずつ加える。37℃で30分間反応させた後、洗浄液（付記6）で4回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記7）を100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、洗浄液で4回洗浄する。基質液（付記8）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で20分間遮光して反応させた後、1 w/v %ドデシル硫酸ナトリウム溶液を各穴に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。

1.3.3 判定

各被検血清の吸光度からブランクの平均吸光度を引いた値を各被検血清の吸光度値として平均吸光度値を算出する。

試験品群の血清の平均吸光度値は、参照ワクチン群の血清の平均吸光度値と同値以上を示さなければならない。ただし、試験品群の血清の平均吸光度値が参照ワクチン群の血清の平均吸光度値を下回った場合であっても、両者に有意差がない場合は、適合とする（片側t検定、 $P \geq 0.05$ ）。

また、対照群の血清の平均吸光度値は0.1未満でなければならない、参照陽性血清の平均吸光度値は0.5～1.0でなければならない。

付記 1 参照ワクチン

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、カルボキシビニルポリマーアジュバント及び油性アジュバントを添加したワクチンであり、豚における攻撃試験にお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 2 固相化抗原

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免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、TNE 液（付記 9）で菌体を洗浄する。洗浄菌体をたん白質濃度が $200 \mu\text{g/mL}$ となるように濃度を調整したもの。凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 10°C 以下で保存する。

付記 3 希釈液

1,000mL 中

トリス緩衝食塩液（付記 10）	100 mL
牛血清アルブミン	1.0 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
豚血清（付記 11）	20 mL
水	残 量

用時調製する。

付記 4 抗原吸着プレート

固相化抗原を炭酸緩衝液（付記 12）でたん白量が $10 \mu\text{g/mL}$ となるように濃度を調整したものを 96 穴マイクロプレートの各穴に $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させた後、 $2 \sim 7^\circ\text{C}$ で 18 時間反応させ、洗浄液で 4 回洗浄したもの。

付記 5 参照陽性血清

製造用株又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、カルボキシビニルポリマーアジュバント及び油性アジュバントを添加したワクチンで免疫したマウスの血清であって、希釈液で 100 倍に希釈して ELISA を行うとき、平均吸光度値が $0.5 \sim 1.0$ となるように濃度を調整したもの。凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 10°C 以下で保存する。

付記 6 洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.5 g
無水リン酸二水素ナトリウム	0.253 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.19 g
ポリソルベート 20	3.0 mL
水	残 量

pH を 7.1 ～ 7.3 に調整する。

付記 7 標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を希釈液で至適濃度に希釈したもの。

付記 8 基質液

A 液：0.6g の 2,2'-アジノージ (3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート) を 1,000mL の 0.3g/L グリシン加クエン酸緩衝液で溶解したもの。

B 液：0.02w/v %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 9 TNE 液

1,000mL 中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	3.94 g
-------------------	--------

エデト酸ナトリウム	3.72 g
-----------	--------

塩化ナトリウム	14.6 g
---------	--------

水	残 量
---	-----

付記 10 トリス緩衝食塩液

1,000mL 中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	60.55 g
-------------------	---------

塩化ナトリウム	87.66 g
---------	---------

無水エデト酸ナトリウム	3.72 g
-------------	--------

水	残 量
---	-----

pH を 7.3 ～ 7.5 に調整する。

付記 11 豚血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ補体結合反応の抗体価が 64 倍以下の豚血清。

付記 12 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 ～ 9.8 に調整する。