

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加）不活化ワクチン（シード）

平成24年7月4日(告示第1622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、カルボキシビニルポリマー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 P-5722-3 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 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 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 -20°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

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後に、適当と認められた方法で不活化剤を中和したものを原液とする。この場合、必要に応じて濃縮し、適当と認められた保存剤又は消

泡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

原液を混合し、濃度調整したものに適量のアジュバントを加えたものを最終バルクとする。この場合、必要に応じて濃度調整し、適当と認められた保存剤等を添加してもよい。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、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には、その試験法によるものとする。

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 0.01mL 以上をスライドガラス上に塗抹し、乾燥・固定した後にグラム染色して標本を作成する。標本は、約 1,000 倍に拡大して 1 視野以上を鏡検する。

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 抗原量定量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体 1.5mL を 12,000G 以上で 10 分間遠心し、上清を完全に除去した後、菌体を TNES 液 (付記 1) 0.12mL に再浮遊させたものを試料とする。

3.2.2.2 試験方法

試料 0.01mL に適量の 0.04w/v % Hoechst 色素又はこれと同等の Hoechst 色素溶液を加えて混合し、蛍光量計で試料中の総 DNA 量 (ng) を測定した後、検体 1 mL 当たりの抗原量を DNA 量 (ng/mL) 又は *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA Cell equivalents (MHDCE) (付記 2) として以下の計算式により算出する。

検体 1 mL 中の MHDCE = DNA 量 (ng/mL) \times 1.25 \times 10⁶

3.2.2.3 判定

検体 1 mL 中の抗原量は、所定の値でなければならない。

3.3 原液の試験

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、その試験法によるものとする。

3.3.2 抗原量定量試験

3.3.2.1 又は 3.3.2.2 の試験を行う。

3.3.2.1 抗原量定量試験 1

3.2.2 を準用して試験するとき、検体 1 mL 中の抗原量は、所定の値でなければならない。

3.3.2.2 抗原量定量試験 2

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

原液及び参照ワクチン 1（付記 3）を凍結融解したものを試料とする。

3.3.2.2.2 試験方法

捕捉抗体吸着プレート（付記 4）にブロッキング液（付記 5）を 100 μ L ずつ加え、試料を各々 3 穴に 100 μ L ずつ加えてプレート上で 2 倍階段希釈する。また、陽性対照抗原（付記 6）及び陰性対照抗原（付記 7）をいずれも凍結融解した後、プレートの 4 穴ずつに 100 μ L ずつ加え、プレート上で 2 倍希釈する。35 ~ 39 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液（付記 8）で 3 回洗浄する。マウス抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエモノクローナル抗体（付記 9）をブランクを除く各穴に 100 μ L ずつ、ブランクにはブロッキング液を 100 μ L ずつ加え、35 ~ 39 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。標識抗体 1（付記 10）をブランクを除く各穴に 100 μ L ずつ、ブランクにはブロッキング液を 100 μ L ずつ加え、35 ~ 39 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。基質液 1（付記 11）を各穴に 100 μ L ずつ加え、10 分間反応させた後、各穴に 1 mol/L 塩酸を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。

3.3.2.2.3 判定

参照ワクチン 1 の抗原量を 1.0 とし、適当と認められた統計学的計算方法により原液中の抗原相対力価を算出するとき、相対力価は 1.25 以上でなければならない。また、陽性対照抗原の吸光度値は 0.542 ~ 1.578 を示さなければならない、陰性対照抗原の吸光度値は 0.081 以下でなければならない。

3.3.3 不活化試験

3.3.3.1 又は 3.3.3.2 の試験を行う。

3.3.3.1 不活化試験 1

3.3.3.1.1 試験材料

3.3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.3.1.1.2 培地

製造用培地を用いる。

3.3.3.1.2 試験方法

試料 0.5mL を培地 4.5mL に接種し、これを更に培地で 10 倍階段希釈する。陰性対照は、培地のみとする。各段階の希釈液及び陰性対照を 35 ~ 37 $^{\circ}$ C で 14 日間培養した後、継代して同様に 7 日間培養する。

3.3.3.1.3 判定

いずれの培養液にも、菌の発育による pH の低下を認めてはならない。

3.3.3.2 不活化試験 2

3.3.3.2.1 試験材料

3.3.3.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.3.2.1.2 培地

フェノールレッドを含有する液状の製造用培地を用いる。

3.3.3.2.2 試験方法

試料 1mL を培地 10mL に接種し、35 ～ 39 °C で 7 日間培養する。接種後 7 日目に継代し、更に 35 ～ 39 °C で 7 日間培養し、培地の色の変化を観察する。また、不活化前の培養液及び不活化前の培養液に試料を加えたものを陽性対照とし、培地のみを陰性対照として同様に培養する。なお、陽性対照については、接種 7 日目に培地の色が変化した場合には、継代培養を行わない。

3.3.3.2.3 判定

試料を接種した培養液及び陰性対照は、培地の色の変化を認めてはならず、陽性対照は、培地の色が黄変しなければならない。

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。

3.4.2 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。

3.4.5 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、ホルマリンの含有量が 0.125vol % 以下でなければならない。

3.4.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 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、0.3mL とする。また、3.4.7 の試験を行うときは、本試験は実施しなくてもよい。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

3 ～ 5 週齢の豚を用いる。

3.4.7.2 試験方法

注射材料 2 頭分ずつを 2 頭の豚の頸部筋肉内に注射する。更に 2 週間後に 1 頭分ずつを反対側の頸部筋肉内に注射し、2 週間臨床観察する。また、初回注射前及び観察期間終了時に体重を測定する。

3.4.7.3 判定

観察終了時の体重は初回注射前の体重と同等以上でなければならない。また、観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。

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 力価試験 1

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 注射材料

試験品及び参照ワクチン 2（付記 12）を注射材料とする。

3.4.8.1.1.2 試験動物

6～7 週齢の ICR 系雌マウスを用いる。

3.4.8.1.1.3 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 1（付記 13）を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

試験動物の 40 匹を試験群、10 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 2 をそれぞれ 0.2mL ずつ皮下に注射する。注射後 2 週目に、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 14）で 40 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1（付記 15）の 2 穴ずつに 100 μ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。また、指示陽性血清（付記 16）を希釈液で 40 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 の 4 穴に 100 μ L ずつ加える。1 時間反応させた後、希釈液で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 2（付記 17）を 100 μ L ずつ加え、30 分間反応させた後、希釈液で 4 回洗浄する。基質液 2（付記 18）を各穴に 100 μ L ずつ加えて反応させ、主波長 405nm、副波長 450nm で吸光度を測定する。各被検血清の吸光度から血清対照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とき、指示陽性血清の平均吸光度値が 0.85 ～ 1.05 となった時点を反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定し、試験品群、参照ワクチン群及び対照群の平均吸光度値を算出する。

3.4.8.1.3 判定

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それと同値以上を示すか、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それを下回った場合には、両者に有意差があつてはならない（片側 t 検定、 $P < 0.05$ ）。この場合、参照ワクチン群と対照群の血清の平均吸光度値の差は、0.4 以上でなければならず、かつ、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。

3.4.8.2 力価試験 2

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 注射材料

試験品をワクチン注射液（付記 19）で 90 倍に希釈した後、更に生理食塩液で 2 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.8.2.1.2 試験動物

6～7 週齢の SPF の ddY 系雌マウスを用いる。

3.4.8.2.1.3 ELISA 用抗原

固相化抗原 2（付記 20）を用いる。

3.4.8.2.2 試験方法

試験動物の 20 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後 3 週目に、試験品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。

試験品群と対照群の血清及び参照陽性血清（付記 21）をブロッキング液で 10 倍に希釈したものを、更に同液で 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 22）の穴に 100 μ L ずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 3（付記 23）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 3 回洗浄する。その後、基質液 1 を各穴に 100 μ L ずつ加えて 10 分間反応させた後、各穴に 1 mol/L 塩酸を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定す

る。

3.4.8.2.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に 0.5 を加えた値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 20 倍以下でなければならない。また、参照陽性血清は、抗体価 320 ~ 640 倍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 9 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 TNES 液

以下の組成のもの又は動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

100mL 中

トリス	1.21 g
エデト酸ナトリウム	0.37 g
塩化ナトリウム	5.84 g
ドデシル硫酸ナトリウム	0.1 g
水	残 量

pH を 7.4 に調整する。

付記 2 MHDCE (*Mycoplasma hyopneumoniae* DNA cell equivalents)

M. hyopneumoniae 培養菌液から抽出した DNA の量を測定し、菌 1 個当たりの DNA 量である 8×10^7 ng で除して菌量を算出するもので、DNA 換算菌量を示す。この場合、1 ng の DNA 量は、菌 1.25×10^6 個に相当する。

付記 3 参照ワクチン 1

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不活化し、カルボキシビニルポリマー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 4 捕捉抗体吸着プレート

抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兎抗体（付記 24）をトリス緩衝食塩液（付記 25）で適当と考えられる濃度に希釈し、96 穴 ELISA プレートに 100 μ L ずつ加える。なお、プレートの両端各 1 列は、ブランクとし、トリス緩衝食塩液を 100 μ L ずつ加える。35 ~ 39 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、洗浄液で 3 回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に 100 μ L ずつ加え、2 ~ 8 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄したもの。

付記 5 ブロッキング液

1,000mL 中

スキムミルク	50 g
洗浄液	残 量

必要に応じ、200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 6 陽性対照抗原

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不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加し、3.3.2.2.2 の ELISA における吸光度値が適当な値となるように生理食塩液で濃度を調整したもの。

付記 7 陰性対照抗原

製造用培地にカルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したもの。

付記 8 洗浄液

1,000mL 中

ポリソルベート 20

0.5 mL

トリス緩衝食塩液

残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 9 マウス抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエモノクローナル抗体

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ p44 抗原に対するマウス由来のモノクローナル抗体で、ブロッキング液で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 10 標識抗体 1

ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を標識抗体 1 希釈液（付記 26）で至適濃度に希釈したもの。

付記 11 基質液 1

液中に 3,3', 5,5'-テトラメチルベンチジン（TMB）及び過酸化水素を含むもの。

付記 12 参照ワクチン 2

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不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチンであり、1 mL 中に最小有効抗原量である約 1×10^9 MHDCE が含有されるように濃度を調整する。動物医薬品検査所が適当と認めたものを参照ワクチンとして用いる。

付記 13 固相化抗原 1

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 27）で菌体を洗浄する。洗浄菌体をたん白質濃度が 200 μ g/mL となるように調整し、1 mL ずつ分注して凍結乾燥する。

付記 14 希釈液

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

0.22 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

0.5 mL

水

残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 15 抗原吸着プレート 1

固相化抗原 1 本を 10mL の抗原溶解液（付記 28）で溶解した後、96 穴 ELISA プレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、36 ~ 38 °C で 1 時間反応させた後、2 ~ 7 °C で 18 時間反応させ、希釈液で 3 回洗浄したもの。

付記 16 指示陽性血清

参照ワクチン 2 で免疫したマウスの血清であって、3.4.8.1.2 の試験により希釈液で 40 倍に希釈した後の平均吸光度値が 0.85 ~ 1.00 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 17 標識抗体 2

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 18 基質液 2

A : 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 のグリシン緩衝液で溶解したもの。

B : 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 19 ワクチン注射液

0.5w/v % カルボキシビニルポリマー液（付記 29）を生理食塩液で 5 倍に希釈したもの。

付記 20 固相化抗原 2

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、菌体を洗浄した後、超音波処理をしてたん白質濃度が 173 μ g/mL となるように濃度を調整した抗原。凍結して - 50 °C 以下で保存する。

付記 21 参照陽性血清

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不活化し、カルボキシビニルポリマー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、3.4.8.2.2 の試験により抗体価が 320 ~ 640 倍となるように濃度を調整したもの。凍結して - 50 °C 以下で保存する。

付記 22 抗原吸着プレート 2

固相化抗原 2 をトリス緩衝食塩液で 25 倍に希釈し、96 穴 ELISA プレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄したもの。

付記 23 標識抗体 3

ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体をブロッキング液で至適濃度に希釈したもの。

付記 24 抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兔抗体

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株で免疫して得た兔血清を ProteinG アフィニティクロマトグラフィーで精製した抗体。

付記 25 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	2.42 g
塩化ナトリウム	8.77 g
水	残量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 26 標識抗体 1 希釈液
1,000mL 中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	2.42 g
塩化ナトリウム	8.77 g
スキムミルク	50 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
豚血清	50 mL
水	残量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。必要に応じ、200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 27 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 28 抗原溶解液
1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.5 g
グリシン	0.75 g
水	残量

pH を 9.5 ~ 9.7 に調整する。

付記 29 0.5w/v %カルボキシビニルポリマー液
1,000mL 中

カルボキシビニルポリマー	5 g
水	残量

pH を 7.2 ~ 7.5 に調整して、121 °C で 30 分間高圧滅菌する。