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
令和　4 年 4 月 7 日(告示第　697 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、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、凍結してー 20 ℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その最高継代数とする。

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、凍結してー 20 ℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、凍結してー 20 ℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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撹拌し、不活化菌液とする。

不活化菌液について、必要に応じて 3.3 の試験を行う。

不活化菌液の不活化剤を適当と認められた方法で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、3.4 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、3.5 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、3.2.2、3.2.3 及び 3.2.4、又は 3.2.3 及び 3.2.4 の試験を行う。

3.2.1 暗視野顕微鏡下観察試験

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 以上をスライドグラスにとり、暗視野顕微鏡下で、約 1,000 倍に拡大して５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 pH 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 7.0 以下でなければならない。

3.2.3 染色試験

3.2.3.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.3.2 試験方法

検体 0.01mL 以上をスライドグラスにとり、グラム染色し、約 1,000 倍に拡大して５視野以上を鏡

検する。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。

3.2.3.3 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。

3.2.4 抗原量定量試験

3.2.4.1 又は 3.2.4.2 の試験を行う。

3.2.4.1 DNA 含有量試験

3.2.4.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.4.1.2 試験方法

検体 1.5mL を 1 本の試験管にとり、20,000*G* 以上で 10 分間遠心分離した後、上清を除いた沈渣を適当と認められた液に懸濁する。適当と認められた分析用溶液で 40 倍に希釈した後、既知の DNA 濃度の標準液で較正した分光蛍光光度計を用いて DNA 量を測定する。

3.2.4.1.3 判定

検体の DNA 含有量は 5,000ng/mL 以上でなければならない。

3.2.4.2 抗原定量試験 1

3.2.4.2.1 試験材料

3.2.4.2.1.1 試料

検体 1.5mL を 12,000*G* 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。

3.2.4.2.1.2 試験方法

試料 0.01mL に適量の 0.04 % 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）× 1.25 × 10^6

3.2.4.2.1.3 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 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験 1

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体に適当と認められた中和剤を加え、不活化剤を中和したものを試料とする。

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

培地 10mL を分注した試験管５本に試料１ mL ずつを接種する。また、不活化剤添加前の同じ培養菌液を陽性対照試料とし、培地 10mL を分注した試験管４本に陽性対照試料１ mL ずつを接種し、その中の２本の試験管に試料１ mL を加える。合計９本の試験管及び試料未接種の培地のみの試験管２本（陰性対照）と共に 35 ～ 39 ℃で７日間培養する。

培養７日目に、試料を接種した試験管５本及び陰性対照２本につき、各１ mL をそれぞれ新しい培地に接種し、35 ～ 39 ℃で更に７日間培養した後、培地の色調を観察する。

培養７日目に陽性対照試料を接種した試験管４本の培地の色調に変化が認められなかった場合、陽性対照試料を接種した培地１ mL を新しい培地に接種する。これを 35 ～ 39 ℃で更に７日間培養し、培地の色調を観察する。

3.3.1.3 判定

試料を接種した試験管及び陰性対照の試験管には、色調の変化を認めてはならない。また、試料と陽性対照試料を接種した試験管及び陽性対照試料のみを接種した試験管には、赤色から黄色への色調変化を認めなければならない。

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、その試験法によるものとする。

3.4.2 抗原定量試験

3.4.2.1 又は 3.4.2.2 の試験を行う。

3.4.2.1 抗原定量試験１

3.2.4.2 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。

3.4.2.2 抗原定量試験２

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

検体及び参照ワクチン１（付記３）を凍結融解したものを試料とする。

3.4.2.2.2 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 ℃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 ℃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、ブランクには標識抗体１希釈液（付記 11）を 100 μ L ずつ加え、35 ～ 39 ℃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 12）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。

3.4.2.2.3 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ず、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。

3.4.3 不活化試験

3.3.1 を準用して試験するか、又は 3.4.3.1 若しくは 3.4.3.2 の試験を行う。

ただし、3.3.1 を準用して試験するときは、中和は行わず、検体を試料として用いる。

3.4.3.1 不活化試験２

3.4.3.1.1 試験材料

3.4.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.3.1.1.2 培地

製造用培地を用いる。

3.4.3.1.2 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 ℃で 14 日間培養した後、継代して同様に７日間培養する。

3.4.3.1.3 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。

3.4.3.2 不活化試験３

3.4.3.2.1 試験材料

3.4.3.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.3.2.1.2 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。

3.4.3.2.2 試験方法

試料 1mL を培地 10mL に接種し、35 ～ 39 ℃で７日間培養する。接種後７日目に継代し、更に 35 ～ 39 ℃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。

3.4.3.2.3 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。

3.5 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。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。

3.5.4 チメロサール定量試験

チメロサール添加製剤については、一般試験法のチメロサー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 カルボキシビニルポリマー定量試験

沈降法又はメチレンブルー法により試験をするとき、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。

3.5.6 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。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。

3.5.7 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、3.5.8 の試験を行うとき又は農林水産大臣が特に認めた場合には、本試験は実施しなくてもよい。

3.5.8 安全試験

農林水産大臣が特に認めた場合には、本試験は実施しなくてもよい。

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.1.2 試験動物

３～５週齢の豚を用いる。

3.5.8.2 試験方法

注射材料２頭分ずつを２頭の豚の頚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頚部筋肉内に注射し、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。

3.5.8.3 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。

3.5.9 抗原定量試験

必要に応じて、3.4.2.2 を準用して試験するとき、試験品の抗原 RP は 1.0 ～ 4.6 でなければならない。

3.5.10 力価試験

3.5.10.1 又は 3.5.10.2 の試験を行う。

3.5.10.1 力価試験１

3.5.10.1.1 試験材料

3.5.10.1.1.1 注射材料

試験品及び参照ワクチン２（付記 13）を注射材料とする。

3.5.10.1.1.2 試験動物

６～７週齢の ICR 系雌マウスを用いる。

3.5.10.1.1.3 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 14）を用いる。

3.5.10.1.2 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 15）で 40 倍に希釈したものを抗原吸着プレート１（付記 16）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 17）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 18）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 19）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。

3.5.10.1.3 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、両者に有意差があってはならない（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。

3.5.10.2 力価試験２

3.5.10.2.1 試験材料

3.5.10.2.1.1 注射材料

試験品をワクチン希釈液（付記 20）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。

3.5.10.2.1.2 試験動物

６～７週齢の SPF の ddY 系雌マウスを用いる。

3.5.10.2.1.3 ELISA 用抗原

固相化抗原２（付記 21）を用いる。

3.5.10.2.2 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 22）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 23）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 ℃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 24）を 100 μ L ずつ加え、37 ℃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。

3.5.10.2.3 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 25）をトリス緩衝食塩液（付記 26）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 ℃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℃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、3.4.2.2.2 の試験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 11）で至適濃度に希釈したもの。

付記 11　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 12　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 13　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× 10^9MHDCE 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 14　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 μg/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 15　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 16　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 ℃で１時間反応させた後、２～７℃で 18 時間反応させ、希釈液で３回洗浄したもの。

付記 17　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 18　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 19　基質液２

Ａ：0.6g の 2.2’－アジノ－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 20　ワクチン希釈液

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 21　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 ℃以下で保存する。

付記 22　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 ℃以下で保存する。

付記 23　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 ℃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 ℃で１時間反応させた後、洗浄液で３回洗浄したもの。

付記 24　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 25　抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兎抗体

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兎血清を 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 26　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 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 ℃で 30 分間高圧滅菌する。