

豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（1・2・5型、組換え型毒素）感染症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュvantト加）不活化ワクチン

平成24年3月13日（告示第675号）新規追加
令和元年8月26日（告示第723号）一部改正

1 定義

アクチノバシラス・プルロニューモニエ（以下この項において「App」という。）1型菌、2型菌及び5型菌の培養菌液を不活化したもの、組換え大腸菌で產生される無毒変異型App毒素（rApx I、rApx II及びrApx III）を可溶化したもの及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化したものにそれぞれアルミニウムゲルアジュvantを添加し、これらを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 App 1型菌

2.1.1.1 名称

App 41-1株（血清型1型）又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

細胞毒素Apx I及びApx IIを產生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

2.1.1.3 繼代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地（付記1）又は適當と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあっては3代以内、種菌にあっては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.2 App 2型菌

2.1.2.1 名称

App SHP-1株（血清型2型）又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

細胞毒素Apx II及びApx IIIを產生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

2.1.2.3 繼代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地又は適當と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあっては3代以内、種菌にあっては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.3 App 5型菌

2.1.3.1 名称

App Ng-2株（血清型5型）又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

細胞毒素Apx I及びApx IIを產生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

2.1.3.3 繼代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地又は適當と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあっては3代以内、種菌にあっては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.4 rApx I 產生組換え大腸菌

2.1.4.1 名称

rApx I 產生組換え大腸菌ESN1113株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App 41-1株染色体DNA由来apx I A遺伝子を挿入したプラスミドpSN110を有する。イソプロピルチオガラクトシド（以下「IPTG」という。）を添加した培地により発育させると、rApx Iたん白を產生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

2.1.4.3 繙代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp寒天培地（付記2）又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあっては3代以内、種菌にあっては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.5 rApx II 產生組換え大腸菌

2.1.5.1 名称

rApx II 產生組換え大腸菌ESN1074株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App Ng-2株染色体DNA由来apx II A遺伝子を挿入したプラスミドpSN63を有する。IPTGを添加した培地により発育させると、rApx IIたん白を產生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

2.1.5.3 繙代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあっては3代以内、種菌にあっては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.6 rApx III 產生組換え大腸菌

2.1.6.1 名称

rApx III 產生組換え大腸菌ESN1166株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App SHP-1株染色体DNA由来apx III A遺伝子を挿入したプラスミドpSN148を有する。IPTGを添加した培地により発育させると、rApx IIIたん白を產生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

2.1.6.3 繙代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあっては3代以内、種菌にあっては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.7 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

2.1.7.1 名称

マイコプラズマ・ハイオニューモニエMI-3株又はこれと同等と認められた株

2.1.7.2 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。

2.1.7.3 繙代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた液状培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では5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。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

2.2.1.1 App 1、2 及び5型菌

製造に適當と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

2.2.1.2 組換え大腸菌

製造に適當と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

2.2.1.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

製造に適當と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 App 1、2 及び5型菌

2.3.1.1 培養

App各株の種菌をそれぞれ寒天培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを各株の培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1の試験を行う。

2.3.1.2 不活化及び集菌

各株の培養菌液をホルマリン又は適當と認められた不活化剤で不活化した後、遠心して得られた菌体を、リン酸緩衝食塩液に均一に浮遊し、チメロサール又は適當と認められた保存剤を添加したものを、各株の不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.1.3 濃度調整

各株の不活化菌液を総菌数が規定量となるようにリン酸緩衝食塩液で希釈し、チメロサール又は適當と認められた保存剤を添加したものを、各株の原液とする。

原液について、3.5.1の試験を行う。

2.3.2 rApx I、II 及びIIIたん白

2.3.2.1 培養

組換え大腸菌各株の種菌をそれぞれ寒天培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを、各株の培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.2の試験を行う。

2.3.2.2 発現培養

各株の培養菌液にIPTGを添加した液状培地を加えて培養した菌液を、各株の発現菌液とする。

発現菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.2.3 集菌及び破碎

各株の発現菌液を遠心し、菌体を発現菌液量の約1/100量の適當と認められた緩衝液に浮遊し、これにリゾチームを添加し、攪拌する。これに、適當と認められた緩衝液を加え、高压細胞破碎装置により処理を行ったものを、各株の破碎菌液とする。

破碎菌液について、3.4の試験を行う。

2.3.2.4 rApxたん白の回収と可溶化

各株の破碎菌液を遠心し、各rApxたん白を発現菌液量の約1/250量の滅菌蒸留水に浮遊する。

これに、適當と認められた可溶化剤を加えて可溶化し、遠心する。得られた上清を各rApxたん白の原液とする。

原液について、3.5.1、3.5.2及び3.5.3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

2.3.3.1 培養

種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、3.1.3の試験を行う。

2.3.3.2 原液の調製

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後、水酸化アルミニウムゲルを加えて菌体を吸着させる。菌体吸着水酸化アルミニウムゲルを回収してリン酸緩衝食塩液に懸濁し、ホルマリン及びチメロサール、又は適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.5.1及び3.5.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 Appバルク

App各株の原液をリン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルで総菌数が規定濃度になるよう希釈して調整する。これにホルマリン及びチメロサール又は適当と認められた保存剤を添加したものを、各株のAppバルクとする。

2.4.2 rApxバルク

rApx I、II及びIIIたん白の各原液をそれぞれたん白濃度を調整して混合した後、リン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルを加えて感作し、各rApxたん白を水酸化アルミニウムゲルに吸着させる。遠心によりrApxたん白の吸着した水酸化アルミニウムゲルを回収し、元の量と等量のリン酸緩衝食塩液に再浮遊する。これに、ホルマリン及びチメロサール又は適当と認められた保存剤を添加したものを、rApxバルクとする。

2.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエバルク

原液をリン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルで総菌数が規定濃度になるよう希釈して調整する。これに、ホルマリン及びチメロサール又は適当と認められた保存剤を添加したものを、マイコプラズマ・ハイオニューモニエバルクとする。

2.4.4 最終バルク

rApxバルク、3株のAppバルク及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエバルクを混合したものを作成する。

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3.6の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 App菌株の夾雜菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2 組換え大腸菌株の夾雜菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、大腸菌以外の発育を認めてはならない。

3.1.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ培養菌液の試験

3.1.3.1 夾雜菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 同定試験

3.1.3.2.1 試験材料

検体又は検体をトリプトース・ホスフェイト・ブロスで 10^{-2} まで10倍階段希釈したものを試料とする。

3.1.3.2.2 試験方法

BHL寒天培地（付記3）及び抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兔免疫血清（付記4）を染み込ませたろ紙ディスクを用い、試料についてマイコプラズマ発育阻止試験（付記5）を実施する。試料を接種した培地を37°Cで14日間、微好気的に培養する。

3.1.3.2.3 判定

試料のいずれかにおいて、ろ紙ディスクの周辺に明瞭な発育阻止帯を認めなければならない。

3.1.3.3 総菌数試験

3.1.3.3.1 試験材料

検体を遠心し、得られた沈渣を適定量のリン酸緩衝食塩液（付記6）に浮遊したものを試料とする。

3.1.3.3.2 試験方法

分光光度計を用い、試料の吸光度を測定する。

3.1.3.3.3 判定

標準検量線及び吸光度値から総菌数を算出するとき、検体中の総菌数は、1 mL 中 1.4×10^8 個以上でなければならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

検体及び製造に適當と認められた培地を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体0.5mLずつを20mLの培地2本以上に接種し、37°Cで2日間培養する。

3.2.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.2.2 総菌数試験

3.2.2.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で適度に希釈したものを、試料とする。

3.2.2.2 試験方法

試料の吸光度を分光光度計で測定する。

3.2.2.3 判定

標準検量曲線、吸光度の測定値及び検体の希釈倍率から総菌数を算出する。

検体中の総菌数は、1 mL 中 3×10^{10} 個以上でなければならない。

3.3 発現菌液の試験

3.3.1 発現たん白確認試験

3.3.1.1 試験材料

検体 $50\mu\text{L}$ に等量のサンプルバッファー（付記7）を加え、3分間煮沸したものを試料とする。

3.3.1.2 試験方法

試料の $10\mu\text{L}$ を 10w/v\% SDS -ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、クマシー・ブルー染色により泳動像を観察する。

3.3.1.3 判定

ESN1113株及びESN1074株の検体には分子量約 105kDa の位置に、ESN1166株の検体には分子量約 120kDa の位置に、明瞭なバンドを認めなければならない。

3.4 組換え大腸菌各株の破碎菌液の試験

3.4.1 破碎確認試験

3.4.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.4.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライド・グラス上に 1cm^2 の区画に塗抹し、乾燥させ、火炎固定し、ギムザ染色又はグラム染色する。

3.4.1.3 判定

鏡検により、ほぼ全ての菌体の破碎像が観察されなければならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 同定試験

3.5.2.1 試験材料

検体を水によりたん白量 $300\mu\text{g/mL}$ となるように希釈し、その $50\mu\text{L}$ に等量のサンプルバッファーを加え、3分間煮沸したものを、試料とする。

3.5.2.2 試験方法

3.3.1.2を準用して試験する。

3.5.2.3 判定

rApx I 及びrApx II たん白の試料には分子量約105kDaの位置に、rApxIII たん白の試料には約120kDaの位置に、明瞭なバンドを認めなければならない。

3.5.3 たん白定量試験

3.5.3.1 試験材料

検体を $20\sim200\mu\text{g/mL}$ となるように2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.3.2 試験方法

各試料をLowry法により測定し、検体 1mL 中のたん白量を算出する。

3.5.3.3 判定

各検体のたん白量は、 1mL 中 10mg 以上でなければならない。

3.5.4 不活化試験

3.5.4.1 試料

検体を用いる。

3.5.4.2 試験方法

BHL培地（付記8）に試料を接種し、 37°C で14日間培養する。培養中に培地の黄変が認められたときは、BHL寒天培地に塗抹し、 37°C で14日間微好気的に培養して、マイコプラズマ・ハイオニューモニエの発育の有無を調べる。

3.5.4.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエの発育を認めてはならない。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 チメロサール定量試験

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。

3.6.5 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、 $0.25\text{vol}\%$ 以下でなければならない。

3.6.6 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、 1mL 中 3.3mg 以下でなければならない。

3.6.7 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、

体重測定は、4日目に行うものとする。

3.6.8 力価試験

3.6.8.1 豚App 感染症力価試験

3.6.8.1.1 試験材料

3.6.8.1.1.1 注射材料

試験品を希釀用液（付記9）又は適当と認められた希釀液で20倍に希釀したものを注射材料とする。

3.6.8.1.1.2 試験動物

約3週齢のマウスを用いる。

3.6.8.1.1.3 攻撃用菌液

凍結乾燥したApp 1型菌1H-7株又は適当と認められた株、App 2型菌SH-15株又は適当と認められた株及びApp 5型菌KN-1株又は適当と認められた株をそれぞれハートインフュジョン培地で溶解し、試験用培地1（付記10）に移植し、37℃で16時間増殖させ、集落を釣菌して試験用培地2（付記11）に移植し、37℃で3～6時間振とう培養したものを各攻撃用菌液とする。

3.6.8.1.2 試験方法

試験動物90匹以上を試験群、90匹以上を対照群とする。

注射材料0.5mLずつを試験群の腹腔内に注射する。注射後2週目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。1型菌株攻撃用菌液をハートインフュジョン培地で3段階に希釀し、更にこれらの希釀菌液を10w/v%ムチン液で10倍に希釀したものを、試験群及び対照群にそれぞれ0.5mLずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7日間臨床観察する。

また同様に、注射後2週目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。2型菌株攻撃用菌液をハートインフュジョン培地で3段階に希釀し、更にこれらの希釀菌液を10w/v%ムチン液で10倍に希釀したものを、試験群及び対照群にそれぞれ0.5mLずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7日間臨床観察する。

また同様に、注射後2週目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。5型菌株攻撃用菌液をハートインフュジョン培地で3段階に希釀し、更にこれらの希釀菌液を10w/v%ムチン液で10倍に希釀したものを、試験群及び対照群にそれぞれ0.5mLずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7日間臨床観察する。

3.6.8.1.3 判定

各攻撃菌株の対照群の80%以上が死亡した攻撃菌量において、試験群では、80%以上が耐過生存しなければならない。

3.6.8.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

3.6.8.2.1 試験材料

3.6.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.8.2.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

3.6.8.2.1.3 二抗体サンドイッチ酵素抗体反応（以下この項において「二抗体サンドイッチELISA」という。）用抗原

ポリソルベート20抽出抗原（付記12）を用いる。

3.6.8.2.2 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、二抗体サンドイッチELISAを行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清（付記13）を希釀液（付記14）で10倍に希釀したも

のを、更に希釈液で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（付記15）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℃で18時間反応させた後、洗浄液（付記16）で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記17）を100 μ Lずつ加え、37℃で90分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液（付記18）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、3mol/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。

3.6.8.2.3 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、全て抗体価320倍以下でなければならない。また、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 チョコレート寒天培地

1,000mL中	
ハートインフュージョン寒天	40 g
水	残量
加温溶解した後、121℃で15分間高压滅菌を行う。約80℃に冷却した後、馬脱線維血を	
10vol%となるように添加する。	

付記2 LB-Amp寒天培地

1,000mL中	
カゼインペプトン	10 g
酵母エキス	5 g
塩化ナトリウム	5 g
水	残量
加熱溶解した後、pHを7.4～7.6に調整し、121℃で15分間高压滅菌する。56℃に冷却した後、	
アンピシリンを最終力価250 μ g/mLとなるように添加する。	

付記3 BHL寒天培地

BHL培地（付記8）1,000mL分の基礎培地に精製寒天4.0gを加え、加温溶解した後、115℃で15分間滅菌する。約50℃に冷却し、あらかじめ過滅菌された付記8と同様の添加物を混合し、直径90mmのシャーレに分注する。

付記4 抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兎免疫血清

製造用株で兎を免疫して得た血清であって、少量に小分けして一20℃に保存したものである。約10⁶個の菌液を用いた発育阻止試験においては、約5mmの阻止帯を示す。

付記5 マイコプラズマ発育阻止試験

寒天平板の一端に試料を約0.05mL滴下し、培地を傾けて試料を他端に向か流下させる。表面が乾燥した後、あらかじめ抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兎免疫血清を浸み込ませて乾燥させたろ紙ディスクを流線の中央に置き、37℃で14日間、微好気的に培養する。培養後

観察すると、ディスクから拡散した抗血清によりその周辺におけるマイコプラズマ・ハイオニューモニエの集落の発育が阻止され、阻止帯が形成される。マイコプラズマ・ハイオニューモニエ以外のマイコプラズマに対しては、発育阻止は起こらない。

付記6 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.0 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化カリウム	0.2 g
水	残 量

pH を6.8～7.2に調整して、121℃で20分間高压滅菌又はろ過滅菌する。

付記7 サンプルバッファー

1,000 mL中	
0.25mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)	500 mL
20w/v% ラウリル硫酸ナトリウム	260 mL
グリセリン	200 mL
ジチオスレイトール	1.54 g
プロムフェノールブルー	1.00 g
水	残 量

付記8 BHL培地

基礎培地	
ブルセラブロス	5.8 g
ハンクス液粉末	4.9 g
ラクトアルブミン水解物	2.0 g
水	750 mL
添加物	
非働化豚血清	200 mL
5 w/v% 酵母エキス液	50 mL
2.5w/v% 醋酸タリウム水溶液	4 mL
クロキサシリソナトリウム	100 mg
又は	
アンピシリソナトリウム	250 mg

基礎培地を加温溶解した後、115℃で15分間滅菌する。冷却した後、あらかじめろ過滅菌された添加物を混合し、pHを7.5～7.7に調整する。

付記9 希釀用液

1,000mL 中	
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.435 g
リン酸二水素カリウム	0.435 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	残 量

pHを6.9～7.1に調整した後、121℃で20分間高压滅菌する。

付記10 試験用培地1

ハートインフュージョン寒天培地を121℃で15分間高压滅菌し、冷却した後、ろ過滅菌した鶏非働化血清を5 vol%及び0.1w/v% β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下この項において「 β -NAD」という。）液を1 vol%の割合に加えたもの。

付記11 試験用培地2

ハートインフュージョン培地を121℃で15分間高压滅菌し、冷却後、ろ過滅菌した鶏非働化血清を5 vol %及び0.1w/v % β -NAD液を1 vol%の割合に加えたもの。

付記12 ポリソルベート20抽出抗原

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、希釀液に懸濁後、4℃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）にたん白濃度1mg/mLになるように懸濁した後、2 vol%ポリソルベート20加トリス緩衝液（2）を等量加え、37℃で30分間振とうしながら加温する。遠心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及び塩化ナトリウム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及びトリス緩衝液980mLを混合したもの。

付記13 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、二抗体サンドイッチELISA抗体価が2,560～5,120倍となるように濃度を調整し、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記14 希釀液

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
無水リン酸一水素ナトリウム	1.15 g
水	残 量

121℃で15分間高压滅菌する。

付記15 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に対する兎免疫血清（付記19）を炭酸緩衝液（付記20）で100倍に希釀した後、96穴マイクロプレートの各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させる。その後、洗浄液で3回洗浄する。0.1w/v%ゼラチン液（付記21）を各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させる。さらに、洗浄液で3回洗浄した後、ポリソルベート20抽出抗原を希釀液でたん白量12.5 μ g/mLになるように希釀し、各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記16 洗浄液

ポリソルベート20 0.5mL及び希釈液1,000mLを混合したもの。

付記17 標識抗体

アルカリホ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18 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22）100mLで溶解したもの。

付記19 兔免疫血清

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3mm以上の阻止帯を示すもの。

付記20 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、pHを9.6に調整する。

付記21 0.1w/v%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22 基質緩衝液

塩化マグネシウム六水和物0.049g及びジエタノールアミン96mLを水に溶解した後、5mol/Lの塩酸でpHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの。