

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（アジュバント・油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

令和6年4月4日（告示719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たもの又はこれを濃縮したものに、アルミニウムゲル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。

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 J 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。生菌を豚に接種したとき病原性を示さない。

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 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、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 -50°C 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 -50°C 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 -50°C 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

製造に相当と認められた液状培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を相当と認められた培地に接種し、培養して増菌・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。培地には必要に応じて消泡剤を加えてもよい。

培養菌液について3.2の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液に相当と認められた不活化剤を加えて不活化し、不活化剤を相当と認められた方法で中和したものを不活化菌液とする。

不活化菌液を限外ろ過又は相当と認められた方法により濃縮したものを原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液にアルミニウムゲルアジュバント、安定剤及び溶剤を加えたものに、油性アジュバントに乳化剤を混合したものを加え、最終バルクとする。

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、3.4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。

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

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。

3.1.3 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

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。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 染色試験

3.2.1.1 試験材料

検体を試料とする。

3.2.1.2 試験方法

検体をスライドグラス上でグラム染色し、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以外の菌を検出してはならない。

3.2.2 確認試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

培養菌液を遠心して得られた菌体を、適量の0.9w/v%滅菌生理食塩液に懸濁したものを試料とする。

3.2.2.2 試験方法

試料と兎免疫血清（付記1）を混合し、室温で凝集反応を行う。

3.2.2.3 判定

5分間以内に凝集を示さなければならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 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。

3.3.2 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。

3.3.3 不活化試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.3.2 試験方法

不活化菌液1 mLを9 mLの適当と認められた液状培地に接種し、 37 ± 1 °Cで14日間培養後に液状培地に継代し、7日間培養する。

3.3.3.3 判定

培地の黄変を認めてはならない。

3.3.4 抗原量測定試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.4.2 試験方法

標準抗原（付記2）、濃縮参照抗原（付記3）、試料、ハーベスト参照抗原（付記4）100 μ Lずつをそれぞれ希釈液（付記5）で希釈した後、2倍階段希釈を行う。

それぞれの希釈試料50 μ Lを抗原吸着プレート1（付記6）に移した後、2倍階段希釈

した各穴に兔免疫血清を、残りの各穴に希釈液をそれぞれ50 μ L加え、37℃で90分間反応させた後、洗浄液（付記7）で3回洗浄する。各穴に希釈したペルオキシダーゼ標識抗兔IgG抗体を100 μ Lずつ加え、37℃で40分間反応させた後、洗浄液で4回洗浄する。あらかじめ37 $\pm$ 1℃に加温したTMB色素・基質液（付記8）の100 μ Lを各穴に加え、37℃で15分間反応させる。反応停止液として1.5mol/Lリン酸を100 μ Lずつの各穴に加え、測定波長450nm、参照波長540～630nmで全ての穴のOD値を測定する。

3.3.4.3 判定

標準抗原の各2倍階段希釈のOD値から作成した標準曲線に基づいて、濃縮参照抗原及び試験試料の抗原量を算出し、既知の濃縮参照抗原の抗原量より試料に含まれる抗原量を求めるとき、参照ワクチン（付記9）1mL中の抗原量を1とした場合の試料中の相対抗原量は、4以上でなければならない。

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均質な懸濁液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 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 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法及びチメロサル含有量とする。

3.4.4 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、0.85～1.15mg/mLでなければならない。

3.4.5 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0.4mLとし、体重測定は4日目に行うものとする。

3.4.6 力価試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 注射材料

試験品及び参照ワクチンを試験品から培養菌体を除いた組成の溶液又はこれと同等の溶液で希釈したものを注射材料とする。

3.4.6.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

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

ポリソルベート20抽出抗原（付記10）を用いる。

3.4.6.2 試験方法

試験動物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腹腔内に注射する。注射後4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で200倍に希釈したものを抗原吸着プレート2（付記11）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12）を希釈液で200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。

4℃で18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（付記13）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。基質液（付記14）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃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。

3.4.6.3 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。また、参照ワクチン群と対照群の血清の平均吸光度値の差は0.7以上、対照群の血清の平均吸光度値は0.35未満、参照陽性血清の平均吸光度値は、0.8～1.8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3年2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 兔免疫血清

製造用株で免役した兔の血清であって、マイコプラズマ・ハイオニューモニエと特異的に反応し、最適な希釈倍率を確認したもの

付記2 標準抗原

本剤の製造方法と同様に作製された濃縮菌液を0.85w/v%滅菌生理食塩液でたん白量50 μ g/mLに調整したもの

付記3 濃縮参照抗原

本剤の製造方法と同様に作製された濃縮菌液であって、1 mL当たりの相対抗原量が既に判明しているものであり、動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記4 ハーベスト参照抗原

本剤の製造方法と同様に作製された不活化菌液であって、参照ワクチンの調製に使われたロットと同じものであり、陽性対照として用いるもの

付記5 希釈液

1,000mL中

塩化ナトリウム	8	g
塩化カリウム	0.2	g
リン酸一水素ナトリウム、無水	1.15	g
リン酸二水素カリウム	0.2	g
水	残	量

付記6 抗原吸着プレート1

固相化抗原（付記15）を希釈液でたん白量 $6.5\mu\text{g/mL}$ となるよう希釈し、96穴マイクロプレートに $100\mu\text{L}$ ずつ加え、 4°C で一夜反応させたものであって、洗浄液で1回洗浄後、 $1\text{ w/v}\%$ 牛血清アルブミンを加えた希釈液を各穴に $150\mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で1時間反応させた後、プレートを洗浄液で2回洗浄したもの

付記7 洗浄液

ポリソルベート20 0.5mL と希釈液 $1,000\text{mL}$ を混合したもの

付記8 TMB色素・基質液

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9 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若しく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、アルミニウムゲル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って、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り、動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記10 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培養菌液を遠心集菌し、希釈液に懸濁後、 4°C で24時間攪拌して菌体を洗浄したものであって、洗浄菌体をトリス緩衝液（1）にたん白濃度 1 mg/mL になるように懸濁後、 $2\text{ vol}\%$ ポリソルベート20加トリス緩衝液（2）を等量加え、 37°C で30分間振とうしながら加温したものであり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に希釈液を加え、適当と認められるたん白濃度に調整したもの

(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) 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とトリス緩衝液980mLを混合したもの

付記11 抗原吸着プレート2

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫した兔免疫血清を炭酸緩衝液（付記16）で100倍に希釈したものを、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、洗浄液で3回洗浄したものであって、さらに、0.1w/v%ゼラチン液（付記17）を各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させ、洗浄液で3回洗浄したものであり、これに、ポリソルベート20抽出抗原を各穴に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12 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で免疫したマウスの血清であって、希釈液で200倍に希釈してELISAを行うとき、平均吸光度値が0.8～1.8となるように濃度を調整したもの

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18）100mLに溶解したもの

付記15 固相化抗原

製造用株を用い、本剤の製造方法で培養した培養菌液を遠心し、沈渣を希釈液で2回遠心洗浄したものであって、凍結融解を5～6回行った後、たん白量1mg当たり1mgのドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を加えて可溶化後、透析したもの

付記16 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に調整したもの

付記17 0.1w/v%ゼラチン液

ゼラチン 1 gを希釈液1,000mLで溶解したもの

付記18 基質緩衝液

1,000mL中

塩化マグネシウム・六水和物 0.049 g

ジエタノールアミン 96 mL

水 残 量

pHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの