

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表  
 ○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）  
 次の表により、改正後欄に掲げる規定の傍線を付した部分を加える。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>アカバネ病生ワクチン</b></p> <p>(略)</p> <p style="text-align: center;"><b><u>アカバネ病（アジュバント加）不活化ワクチン</u></b></p> <p>1 定義  <u>アカバネウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。</u></p> <p>2 製法          2.1 製造用株          2.1.1 名称  <u>アカバネウイルスKN-06株又はこれと同等と認められた株</u>          2.1.2 性状  <u>生後2日以内の乳のみマウスの脳内に接種するとマウスは3日以内に死亡する。</u>  <u>牛腎初代培養細胞、豚腎初代培養細胞、HmLu-1細胞、ESK細胞及びVero細胞でCPEを伴って増殖する。</u>          2.1.3 継代及び保存  <u>原株及び種ウイルスは、HmLu-1細胞で継代する。</u>  <u>継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。</u>  <u>原株及び種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃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。</u>          2.2 製造用材料          2.2.1 培養細胞  <u>HmLu-1細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。</u>          2.2.2 培養液</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>アカバネ病生ワクチン</b></p> <p>(略)</p> <p style="text-align: center;">(新設)</p>

<p><u>製造に相当と認められた培養液を用いる。</u></p> <p><u>2.3 原液</u></p> <p><u>2.3.1 細胞の培養</u> <u>1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。</u> <u>個別培養細胞について、3.1の試験を行う。</u></p> <p><u>2.3.2 ウイルスの培養</u> <u>種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。</u> <u>ウイルス浮遊液について、3.2の試験を行う。</u></p> <p><u>2.3.3 不活化</u> <u>ウイルス浮遊液にホルマリンを0.1vol%となるように加える方法又はその他の相当と認められた方法によりウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。</u> <u>不活化ウイルス液について、3.3の試験を行う。</u></p> <p><u>2.3.4 原液</u> <u>不活化ウイルス液に相当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。</u> <u>原液について、3.4の試験を行う。</u></p> <p><u>2.4 最終バルク</u> <u>原液を混合し、最終バルクとする。この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。</u></p> <p><u>2.5 小分製品</u> <u>最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。</u> <u>小分製品について、3.5の試験を行う。</u></p> <p><u>3 試験法</u></p> <p><u>3.1 個別培養細胞の試験</u> <u>個別培養細胞の1%以上又は500mL以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。</u></p> <p><u>3.1.1 培養観察</u> <u>対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。</u></p> <p><u>3.1.2 赤血球吸着試験</u> <u>3.1.1の試験最終日に培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄後、2群に分け、生理食塩液で調製した0.1vol%のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液を重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察す</u></p>	
--	--

るとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

### 3.2 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.2.1 ウイルス含有量試験

##### 3.2.1.1 試験材料

###### 3.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、34～36℃で7日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

##### 3.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上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、そのウイルス含有量とする。

### 3.3 不活化ウイルス液の試験

#### 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。

#### 3.3.2 不活化試験

##### 3.3.2.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体5 mLを4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

###### 3.3.2.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.3.2.2 試験方法

試料の全量を1 mLにつき3 cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34～36℃で7日間培養し、観察する。

##### 3.3.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 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。

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均質な懸濁液でなければならず、異物又は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。

#### 3.5.4 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、0.1vol%以下でなければならない。

#### 3.5.5 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、1 mL中1 mg以下でなければならない。

#### 3.5.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法2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、試験動物の死亡時には剖検を実施し、腸重積等の注射に起因すると推察される腸管の局所的な病変を確認した場合は、当該試験動物を除外する。なお、除外可能な試験動物数は2匹までとする。

#### 3.5.7 力価試験

##### 3.5.7.1 試験材料

###### 3.5.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.7.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

###### 3.5.7.1.3 中和試験用ウイルス

アカバネウイルスJaGAR39株又は適当と認められたアカバネウイルス株を用いる。

###### 3.5.7.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.5.7.2 試験方法

注射材料0.16mLずつを5匹の試験動物に3週間隔で2回筋肉内注射し、第2回目の注射後10日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID<sub>50</sub>の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつを4本（穴）の培養細胞に接種し、34～36℃で7日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

#### 3.5.7.3 判定

培養細胞の2本（穴）以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。中和抗体価8倍以上を中和抗体陽性とする。

試験動物の中和抗体陽性率は、80%以上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、その判定方法とする。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後1年11か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

#### 付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 10～20 mL

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。

牛血清はアカバネウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表  
 ○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）  
 次の表により、改正後欄に掲げる規定の傍線を付した部分を加える。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p><b>イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・<math>\alpha</math> 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン</b></p> <p>(略)</p> <p><b><u>イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・<math>\alpha</math> 溶血性レンサ球菌症・類結節症混合（多糖アジュバント加）不活化ワクチン</u></b></p> <p>1 定義  <u>ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型、ラクトコッカス・ガルビエ及びフトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダの培養菌液並びにマダイイリドウイルスを培養細胞で増殖させて得られたウイルス液を不活化した後、多糖アジュバントを添加して混合したワクチンである。</u></p> <p>2 製法  <u>2.1 製造用株</u>  <u>2.1.1 マダイイリドウイルス</u>  <u>2.1.1.1 名称</u>  <u>マダイイリドウイルスEI-01G-7株又はこれと同等と認められた株</u>  <u>2.1.1.2 性状</u>  <u>GF細胞でCPEを伴って増殖し、イリドウイルス病に対する免疫原性を有する。</u>  <u>2.1.1.3 継代及び保存</u>  <u>原株及び種ウイルスは、GF細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。</u>  <u>継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2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、その継代数以内とする。</u>  <u>原株及び種ウイルスは、凍結して-70℃以下で保存する。</u></p> <p>2.1.2 <u>ビブリオ・アングイラルム</u></p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p><b>イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・<math>\alpha</math> 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン</b></p> <p>(略)</p> <p>(新設)</p>

2.1.2.1 名称

ビブリオ・アングイラルムAY-1G-3株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型に一致する性状を示し、J-O-3型ビブリオ病に対する免疫原性を有する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下で保存する。

2.1.3 ラクトコッカス・ガルビエ

2.1.3.1 名称

ラクトコッカス・ガルビエSS91-014G-3株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

ラクトコッカス・ガルビエKG(-)型に一致する性状を示し、α溶血性レンサ球菌症に対する免疫原性を有する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下で保存する。

2.1.4 フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ

2.1.4.1 名称

フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダAW-02 G-3株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダに一致する性状を示し、類結節症に対する免疫原性を有する。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 マダイイリドウイルス

2.2.1.1 培養細胞

GF細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 ビブリオ・アングイラルム

2.2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.3 ラクトコッカス・ガルビエ

2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.4 フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ

2.2.4.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 マダイイリドウイルス

2.3.1.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液を濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は製造に相当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液を混合したものを原液とする。

原液について、3.6の試験を行う。

2.3.2 ビブリオ・アンゲイラルム

2.3.2.1 培養

種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.5.1.1の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を原液とする。

原液について、3.6の試験を行う。

2.3.3 ラクトコッカス・ガルビエ

2.3.3.1 培養



<p><u>種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。</u> <u>培養菌液について、3.3の試験を行う。</u></p> <p><u>2.3.3.2 不活化</u> <u>培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。</u> <u>不活化菌液について、3.5.1.2の試験を行う。</u></p> <p><u>2.3.3.3 原液</u> <u>不活化菌液を原液とする。</u> <u>原液について、3.6の試験を行う。</u></p> <p><u>2.3.4 フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ</u></p> <p><u>2.3.4.1 培養</u> <u>種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。</u> <u>培養菌液について、3.3の試験を行う。</u></p> <p><u>2.3.4.2 不活化</u> <u>培養菌液にホルマリンを加えて不活化し、適当と認められた方法で濃縮し、濃度調整したものを不活化菌液とする。不活化菌液について、3.5.1.3の試験を行う。</u></p> <p><u>2.3.4.3 原液</u> <u>不活化菌液を原液とする。</u> <u>原液について、3.6の試験を行う。</u></p> <p><u>2.4 最終バルク</u> <u>各原液を必要により濃度調整した後混合し、アジュバントを添加し、最終バルクとする。</u></p> <p><u>2.5 小分製品</u> <u>最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。</u> <u>小分製品について、3.7の試験を行う。</u></p> <p><u>3 試験法</u></p> <p><u>3.1 培養細胞の試験</u> <u>個体別培養細胞の1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。</u></p> <p><u>3.1.1 培養観察</u> <u>対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。</u></p> <p><u>3.2 ウイルス浮遊液の試験</u></p> <p><u>3.2.1 無菌試験</u> <u>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。</u></p> <p><u>3.2.2 ウイルス含有量試験</u></p>	
---	--

### 3.2.2.1 試験材料

#### 3.2.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記1）又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.2.2.1.2 培養細胞

GF細胞を96穴プレートに培養したものをを用いる。

### 3.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを、それぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、25℃で21～28日間培養して、CPEの有無を観察する。

### 3.2.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>6.3</sup>TCID<sub>50</sub>以上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、その含有量とする。

## 3.3 培養菌液の試験

### 3.3.1 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、ビブリオ・アングイラルムの検体は、ビブリオ・アングイラルム以外の菌の発育を認めてはならない。ラクトコッカス・ガルビエの検体は、ラクトコッカス・ガルビエ以外の菌の発育を認めてはならない。フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダの検体は、フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

### 3.3.2 生菌数試験

#### 3.3.2.1 試験材料

##### 3.3.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈用液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.3.2.1.2 培地

トリプトース・ホスフェイト・ブロス寒天培地（付記2）又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.3.2.2 試験方法

各試料0.1mLずつをそれぞれ2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させたものを、適当と認められた温度及び時間で培養した後、生じた集落数を数える。

#### 3.3.2.3 判定

各試料の集落数から生菌数を算出する。ビブリオ・アングイラルムの検体の生菌数は、1 mL中10<sup>8.3</sup>CFU以上でなければならない。ラクトコッカス

・ガルビエの検体の生菌数は、1 mL中 $10^9$ CFU以上でなければならない。フ  
ォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダの検体の生菌  
数は、1 mL中 $10^{8.12}$ CFU以上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、その生菌数とする。

### 3.4 不活化ウイルス液の試験

#### 3.4.1 不活化試験

##### 3.4.1.1 試験材料

###### 3.4.1.1.1 試料

検体 2 mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて2～8℃で一夜透  
析したものを試料とする。

###### 3.4.1.1.2 培養細胞

GF細胞又は適当と認められた培養細胞を細胞増殖用培養液又は適当と  
認められた培養液に浮遊させたものを用いる。

##### 3.4.1.2 試験方法

試料 2 mLにつき18 mL以上の培養細胞に接種し、25℃で21日間培養した  
後、その上清 2 mLを新たな培養細胞に同様に接種し、25℃で21日間隔で3  
代目まで培養する。

##### 3.4.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。  
検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.5 不活化菌液の試験

#### 3.5.1 不活化試験

##### 3.5.1.1 ビブリオ・アングイラルム

###### 3.5.1.1.1 試験材料

###### 3.5.1.1.1.1 試料

検体を試料とする。

###### 3.5.1.1.1.2 培地

1.5w/v%食塩加トリプトース・ホスフェイト・ブロス寒天培地（付記3）  
を用いる。

###### 3.5.1.1.2 試験方法

試料0.1 mLずつを培地 5 枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを  
適当と認められた温度で7日間培養した後、集落の有無を観察する。

###### 3.5.1.1.3 判定

接種した全ての培地に集落を認めてはならない。

##### 3.5.1.2 ラクトコッカス・ガルビエ

###### 3.5.1.2.1 試験材料

###### 3.5.1.2.1.1 試料

<p><u>検体を試料とする。</u></p> <p><u>3.5.1.2.1.2 培地</u> トリプトース・ホスフェイト・ブロス寒天培地を用いる。</p> <p><u>3.5.1.2.2 試験方法</u> 試料0.1mLずつを培地5枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを 適当と認められた温度で7日間培養した後、集落の有無を観察する。</p> <p><u>3.5.1.2.3 判定</u> 接種した全ての培地に集落を認めてはならない。</p> <p><u>3.5.1.3 フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ</u></p> <p><u>3.5.1.3.1 試験材料</u></p> <p><u>3.5.1.3.1.1 試料</u> 検体を試料とする。</p> <p><u>3.5.3.3.1.2 培地</u> 1.5w/v%食塩加トリプトース・ホスフェイト・ブロス寒天培地を用いる。</p> <p><u>3.5.3.3.2 試験方法</u> 試料0.1mLずつを培地5枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを 適当と認められた温度で7日間培養した後、集落の有無を観察する。</p> <p><u>3.5.3.3.3 判定</u> 接種した全ての培地に集落を認めてはならない。</p> <p><u>3.6 原液の試験</u></p> <p><u>3.6.1 無菌試験</u> 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。</p> <p><u>3.7 小分製品の試験</u></p> <p><u>3.7.1 特性試験</u> 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 均質な懸濁液又は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。</p> <p><u>3.7.2 pH測定試験</u> 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。</p> <p><u>3.7.3 無菌試験</u> 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。</p> <p><u>3.7.4 ホルマリン定量試験</u> 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、0.1vol%以下でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に</p>	
--	--

認められた場合には、その含有量とする。

### 3.7.5 安全試験

#### 3.7.5.1 試験材料

##### 3.7.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.7.5.1.2 試験動物

水温25℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重30～300gのかんぱち又はぶり20尾以上を用いる。

#### 3.7.5.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群10尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料0.5mLを腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温25℃、循環式で飼育し、14日間観察する。

#### 3.7.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.7.6 力価試験

#### 3.7.6.1 イリドウイルス病力価試験

##### 3.7.6.1.1 試験材料

##### 3.7.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.7.6.1.1.2 試験動物

水温20℃、循環式で維持していたかんぱち又はぶりを1日当たり1～2℃ずつ温度上昇させて馴致し、4日間かけて飼育水温を27℃に上昇させる。次に、3日間27℃で予備飼育し、合計7日間かけて27℃に温度馴致し、異常のないことを確認した体重30～50gのかんぱち又はぶり180尾以上を用いる。

##### 3.7.6.1.1.3 攻撃用ウイルス液

マダイイリドウイルス強毒株（付記4）の感染まだい脾臓乳剤（付記5）を2 vol%牛胎子血清加イーグルMEMで階段希釈し、適当と考えられる3段階の希釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。

##### 3.7.6.1.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群90尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に、注射材料0.1mLを腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は、対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。水温27℃、循環式で10日間飼育する。

注射後9日目から24時間以上餌止めした試験群及び対照群をそれぞれ30尾以上の3群ずつに分けて、それぞれの攻撃用ウイルス液0.1mLを腹腔内

に注射して攻撃し、20日間観察して各群の生死を調べる。

#### 3.7.6.1.3 判定

対照群の20%以上が死亡した攻撃用ウイルスの希釈段階のうち、少なくとも1段階において、試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない (Fisherの直接確率計算法、 $P < 0.05$ )。

#### 3.7.6.2 ビブリオ病力価試験

##### 3.7.6.2.1 試験材料

###### 3.7.6.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.7.6.2.1.2 試験動物

水温25℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重30～300gのかんぱち又はぶり20尾以上を用いる。

##### 3.7.6.2.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めた後、1群10尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料0.1mLを腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温25℃、循環式で14日間飼育する。

注射後14日目に、試験群及び対照群のそれぞれ10尾から採血し、45℃で20分間非働化した血清について、マイクロタイター法で凝集試験を行う。

試験群と対照群の血清、参照陽性血清 (付記6) 及び参照陰性血清 (付記7) をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し各希釈血清に凝集反応用抗原 (付記8) を等量加えて、25℃で2時間反応させ、更に4℃で一晩静置した後、管底の凝集の有無を観察する。

##### 3.7.6.2.3 判定

凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。

試験群の血清は、いずれも抗体価4倍以上でなければならない。かつ、抗体価の幾何平均値は16倍以上でなければならない。対照群の血清の抗体価の幾何平均値は2倍以下でなければならない。また、参照血清は所定の抗体価を示さなければならない。

#### 3.7.6.3 α溶血性レンサ球菌症力価試験

##### 3.7.6.3.1 試験材料

###### 3.7.6.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.7.6.3.1.2 試験動物

水温25℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重30～300gのかんぱち又はぶり30尾以上を用いる。

###### 3.7.6.3.1.3 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記9）の培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈し、対照群の死亡率が80%と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

#### 3.7.6.3.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群15尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料0.1mLを腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温25℃、循環式で14日間飼育する。

注射後13日目から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ15尾以上の腹腔内に、攻撃用菌液を0.1mLずつ注射して攻撃した後、14日間観察して各群の生死を調べる。

#### 3.7.6.3.3 判定

試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない（Fisherの直接確率計算法、 $P < 0.05$ ）。この場合、対照群は、60%以上が死亡しなければならない。

#### 3.7.6.4 類結節症力価試験

##### 3.7.6.4.1 試験材料

###### 3.7.6.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.7.6.4.1.2 試験動物

水温25℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重30～300gのかんばち又はぶり180尾以上を用いる。

###### 3.7.6.4.1.3 攻撃用菌液

寒天培地上に発育させたフォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ強毒菌（付記10）を掻き取ってトリプトース・ホスフェイト・ブロスに浮遊させた後、同ブロスで10倍階段希釈し、対照群の死亡率が80%と予測される希釈とその前後の3段階の希釈菌液を攻撃用菌液とする。

##### 3.7.6.4.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群90尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料0.1mLを腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温25℃、循環式で14日間飼育する。

注射後13日目から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ30尾以上の3群に分けて、それぞれの攻撃用菌液0.1mLずつを腹腔内に注射して攻撃し、14日間観察して各群の生死を調べる。

##### 3.7.6.4.3 判定

対照群の50%以上が死亡した攻撃用菌液の希釈段階のうち、少なくとも1段階において、試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない (Fisherの直接確率計算法、 $P < 0.05$ )。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後2年間とする。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 細胞増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

L-グルタミン 0.292 g

牛胎子血清 20~50 mL

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.2に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

##### 付記2 トリプトース・ホスフェイト・ブロス寒天培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 29.5 g

寒天 20.0 g

水 残量

加熱溶解後、121°Cで15分間高压蒸気滅菌する。

pHを7.2~7.6に調整する。

##### 付記3 1.5w/v%食塩加トリプトース・ホスフェイト・ブロス寒天培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 29.5 g

寒天 20.0 g

塩化ナトリウム 15.0 g

水 残量

加熱溶解後、121°Cで15分間高压蒸気滅菌する。

pHを7.2~7.6に調整する。

##### 付記4 マダイイリドウイルス強毒株

マダイイリドウイルスKa-20/C株又はこれと同等以上の毒力を有する株



<p>付記5 <u>感染まだい脾臓乳剤</u>  マダイイリドウイルス強毒株を体重30～100gのまだいの腹腔内に注射し、発症期に脾臓を採材し、2 vol%牛胎子血清加イーグルMEM又は適当と認められた液で10w/v%乳剤とし、これを2,000Gで10分間遠心した上清</p>	
<p>付記6 <u>参照陽性血清</u>  ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型の加熱死菌をぶりに注射して得た血清であって、凝集抗体価が256～512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</p>	
<p>付記7 <u>参照陰性血清</u>  健康なぶりの血清であって、凝集抗体価が2倍未満であり、凍結又は凍結乾燥したもの</p>	
<p>付記8 <u>凝集反应用抗原</u>  ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型の加熱死菌をリン酸緩衝食塩液でMcFarland混濁管No. 1～3の濃度になるように浮遊させたものであって、既知抗体価の陽性血清に対し所定の凝集抗体価を示すことを確認したもの</p>	
<p>付記9 <u>ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌</u>  ラクトコッカス・ガルビエKG9502株又はこれと同等以上の毒力を有する株</p>	
<p>付記10 <u>フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ強毒菌</u>  フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダAW-02G-3株又はこれと同等以上の毒力を有する株</p>	

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表  
 ○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）  
 次の表により、改正後欄に掲げる規定の傍線を付した部分を加える。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>破傷風（アジュバント加）トキソイド（シード）</b></p> <p>（略）</p> <p><b><u>牛ボツリヌス症（C・D型）（アジュバント加）トキソイド（シード）</u></b></p> <p>1 定義  <u>シードロット規格に適合したクロストリジウム・ボツリヌスC型菌及びD型菌の培養上清をそれぞれ無毒化したものを混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したトキソイドである。</u></p> <p>2 製法  <u>2.1 製造用株</u>  <u>2.1.1 クロストリジウム・ボツリヌスC型菌</u>  <u>2.1.1.1 名称</u>  <u>クロストリジウム・ボツリヌスC型菌BC01株又はこれと同等と認められた株</u>  <u>2.1.1.2 性状</u>  <u>製造用培地（付記1）又は製造に相当と認められた培地で増殖させたとき、ボツリヌスC型毒素を産生する。</u>  <u>2.1.1.3 マスターシード菌</u>  <u>2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数</u>  <u>マスターシード菌は、相当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。</u>  <u>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-70℃以下で保存する。</u>  <u>マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。</u></p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>破傷風（アジュバント加）トキソイド（シード）</b></p> <p>（略）</p> <p>（新設）</p>

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。

#### 2.1.1.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.1.4.1 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-70℃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。

##### 2.1.1.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.1.5.1 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-70℃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。

#### 2.1.2 クロストリジウム・ボツリヌスD型菌

##### 2.1.2.1 名称

クロストリジウム・ボツリヌスD型菌BD02株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

製造用培地（付記1）又は製造に適当と認められた培地で増殖させたとき、ボツリヌスD型毒素を産生する。

##### 2.1.2.3 マスターシード菌

##### 2.1.2.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-70℃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。

##### 2.1.2.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.2.4.1 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-70℃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。

### 2.1.2.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.2.5.1 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-70℃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培地を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 クロストリジウム・ボツリヌスC型トキソイド

##### 2.3.1.1 培養

クロストリジウム・ボツリヌスC型菌のワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を適当と認められた培地で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。

##### 2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

##### 2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心分離した上清を、適当と認められた方法で濃縮し、これにホルマリンを0.1vol%添加したものを原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

#### 2.3.2 クロストリジウム・ボツリヌスD型トキソイド

##### 2.3.2.1 培養

クロストリジウム・ボツリヌスD型菌のワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を適当と認められた培地で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。

##### 2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

##### 2.3.2.3 原液

不活化菌液を遠心分離した上清を、適当と認められた方法で濃縮し、これにホルマリンを0.1vol%添加したものを原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

各原液を混合し、濃度調整し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものを最終バルクとする。

## 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、3.5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

###### 3.1.1.2.1 試験材料

検体及び普通寒天斜面培地（付記2）を用いる。

###### 3.1.1.2.2 試験方法

検体0.05mLを普通寒天斜面培地2本に塗抹し、37℃で好氣的に48～96時間培養する。

###### 3.1.1.2.3 判定

いずれの斜面も菌の発育を認めてはならない。

##### 3.1.1.3 毒素中和試験

###### 3.1.1.3.1 試験材料

###### 3.1.1.3.1.1 試料

検体を0.45 μm以下のフィルターでろ過し、約4週齢のマウスに対して40LD<sub>50</sub>/mLに希釈液（付記3）で調製したものを試料とする。

###### 3.1.1.3.1.2 試験動物

約4週齢のマウスを用いる。

###### 3.1.1.3.2 試験方法

試料にC型菌の場合は抗ボツリヌスC型毒素血清（付記4）、D型菌の場合は抗ボツリヌスD型毒素血清（付記5）を等量加えて22℃で1時間感作する。同時に対照として、試料に等量の希釈液を加えたものも22℃で1時間静置する。感作終了後、1群5匹の試験動物の腹腔内に0.5mLずつ注射し、試験動物の生死を7日間観察する。

###### 3.1.1.3.3 判定

抗毒素血清を加えた試料を注射した試験動物は全て生残し、対照を注射した試験動物は全て死亡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

<p><u>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。</u></p> <p><u>3.1.3 プロダクションシード菌の試験</u></p> <p><u>3.1.3.1 夾雑菌否定試験</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>3.2 培養菌液の試験</u></p> <p><u>3.2.1 夾雑菌否定試験</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>3.2.2 毒力試験</u></p> <p><u>3.2.2.1 試験材料</u></p> <p><u>3.2.2.1.1 試料</u></p> <p><u>検体を遠心し、0.45 μm以下のフィルターでろ過したものを試料とする。</u></p> <p><u>3.2.2.1.2 試験動物</u></p> <p><u>約4週齢のマウスを用いる。</u></p> <p><u>3.2.2.1.3 試験方法</u></p> <p><u>試料を希釈液（付記3）でC型菌培養菌液の場合は5,000倍～80,000倍まで2倍階段希釈したもの、D型菌培養菌液の場合は50,000倍～800,000倍まで2倍階段希釈したもの0.5mLずつを4匹の試験動物の腹腔内に注射し、試験動物の生死を7日間観察する。</u></p> <p><u>3.2.2.1.4 判定</u></p> <p><u>死亡したマウス数からLD<sub>50</sub>を算出する。</u></p> <p><u>試料の毒力はC型培養菌液の場合は2.0×10<sup>4</sup>LD<sub>50</sub>/mL以上、D型培養菌液の場合は4.0×10<sup>5</sup>LD<sub>50</sub>/mL以上でなければならない。</u></p> <p><u>3.2.3 同定試験</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>3.3 不活化菌液の試験</u></p> <p><u>3.3.1 不活化試験</u></p> <p><u>3.3.1.1 試験材料</u></p> <p><u>検体及び一般試験法の無菌試験法の1細菌否定試験の液状チオグリコール酸培地を用いる。</u></p> <p><u>3.3.1.2 試験方法</u></p> <p><u>検体1 mL及び2 mLを液状チオグリコール酸培地2本ずつに接種し、37℃で14日間培養する。</u></p> <p><u>3.3.1.3 判定</u></p> <p><u>いずれの培地も菌の発育を認めてはならない。</u></p> <p><u>3.4 原液の試験</u></p> <p><u>3.4.1 無菌試験</u></p>	
--	--

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。

### 3.4.2 無毒化試験

#### 3.4.2.1 試験材料

約4週齢のマウスを用いる。

#### 3.4.2.2 試験方法

検体0.5mLを5匹の試験動物の腹腔内に注射し7日間観察する。

#### 3.4.2.3 判定

観察期間中、試験動物に死亡又は神経症状を認めてはならない。

### 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。

#### 3.5.2 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。

#### 3.5.4 ホルマリン定量方法

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0.2vol%以下でなければならない。

#### 3.5.5 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1 mL中1.65mg以下でなければならない。

#### 3.5.6 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、体重測定は注射後5日目に行うものとする。

#### 3.5.7 力価試験

##### 3.5.7.1 試験材料

###### 3.5.7.1.1 試験動物

約4週齢のマウス30匹を用い、20匹を試験群、10匹を無処置対照群とする。

###### 3.5.7.2 試験方法

試験品を0.2mLずつ試験群マウスの大腿部筋肉内に3週間隔で2回注射する。最終注射の2週間後、約9週齢のマウスに対して20LD<sub>50</sub>/0.5mLになる

ように希釈液（付記3）で調製したボツリヌスC型毒素（付記6）及びD型毒素（付記7）をそれぞれ試験群のマウス10匹、対照群のマウス5匹の腹腔に0.5mLずつ注射し、生死を7日間観察する。

#### 3.5.7.3 判定

試験群のマウスはいずれも80%以上が生残しなければならず、このとき対照群のマウスは全て死亡しなければならない。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後2年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、この限りでない。

#### 付記1 製造用培地

1,000mL中

カゼイン製ペプトン 30 g

酵母エキス 10 g

ブドウ糖 5 g

L-システイン塩酸塩 1.5 g

水 残量

溶解後、水酸化ナトリウムでpH7.0に調整後、121℃で15分間高压蒸気滅菌する。

#### 付記2 普通寒天斜面培地

普通寒天培地を内径約1.5cm、高さ約16.5cmの試験管に8mL分注し、全斜面培地にしたもの。

#### 付記3 希釈液

1,000mL中

リン酸二水素ナトリウム二水和物 2.80 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 0.70 g

ゼラチン 2.0 g

水 残量

pHを6.0～6.2に調整し、121℃で15分間高压蒸気滅菌する。

#### 付記4 抗ボツリヌスC型毒素血清

クロストリジウム・ボツリヌスC型菌BC01株トキソイドを動物に免疫して得られた血清で、ボツリヌスC型毒素を中和する。希釈液（付記3）で40LD<sub>50</sub>/mLのボツリヌスC型毒素のマウス致死活性を完全に中和する力価に調整して使用する。更新時には、ボツリヌスC型毒素



を中和するが、ボツリヌスD型毒素を中和しないことを確認する。

付記5 抗ボツリヌスD型毒素血清

クロストリジウム・ボツリヌスD型菌BD02株トキシドを動物に免疫して得られた血清で、ボツリヌスD型毒素を中和する。希釈液（付記3）で40LD<sub>50</sub>/mLのボツリヌスD型毒素のマウス致死活性を完全に中和する力価に調整して使用する。更新時には、ボツリヌスD型毒素を中和するが、ボツリヌスC型毒素を中和しないことを確認する。

付記6 ボツリヌスC型毒素

クロストリジウム・ボツリヌスC型菌BC01株を製造用培地（付記1）で増殖させた菌液を0.45 μ m以下のフィルターでろ過したもので、約9週齢のマウスに対して1 mLあたり8.0×10<sup>3</sup>LD<sub>50</sub>以上を示す。-70℃以下で凍結保存する。

付記7 ボツリヌスD型毒素

クロストリジウム・ボツリヌスD型菌BD02株を製造用培地（付記1）で増殖させた菌液を0.45 μ m以下のフィルターでろ過したもので、約9週齢のマウスに対して1 mLあたり1.6×10<sup>5</sup>LD<sub>50</sub>以上を示す。-70℃以下で凍結保存する。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表  
 ○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）  
 次の表により、改正後欄に掲げる規定の傍線を付した部分を加える。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>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（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</b></p> <p>（略）</p> <p><b><u>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（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）</u></b></p> <p>1 定義  <u>シードロット規格に適合したアクチノバシラス・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アルミニウムゲルアジュバントを添加したものと、同規格に適合した組換え大腸菌で産生される無毒変異型App毒素（rApx I、rApx II及びrApx III）にアルミニウムゲルアジュバントを添加したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u></p> <p>2 製法          2.1 製造用株          2.1.1 App 1 型菌          2.1.1.1 名称  <u>App 41-1株（血清型 1 型）又はこれと同等と認められた株</u>          2.1.1.2 性状  <u>細胞毒素Apx I 及びApx IIを産生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。</u></p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>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（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</b></p> <p>（略）</p> <p>（新設）</p>

### 2.1.1.3 マスターシード菌

#### 2.1.1.3.1 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、チョコレート寒天培地（付記1）又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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は、その継代数以内とする。

### 2.1.1.4 ワーキングシード菌

#### 2.1.1.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

### 2.1.1.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.1.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

### 2.1.2 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を産生する。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 マスターシード菌

#### 2.1.2.3.1 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、チョコレート寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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、その継代数以内とする。

#### 2.1.2.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.2.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

##### 2.1.2.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.2.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

#### 2.1.3 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 を産生する。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 マスターシード菌

##### 2.1.3.3.1 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、チョコレート寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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、その継代数以内とする。

##### 2.1.3.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.3.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

##### 2.1.3.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.3.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

#### 2.1.4 rApx I 産生組換え大腸菌

##### 2.1.4.1 名称

rApx I 産生組換え大腸菌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apxIA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 たん白を産生することが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 マスターシード菌

###### 2.1.4.3.1 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、LB-Amp寒天培地（付記2）又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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、その継代数以内とする。

##### 2.1.4.4 ワーキングシード菌

###### 2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

##### 2.1.4.5 プロダクションシード菌

###### 2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

#### 2.1.5 rApx II 産生組換え大腸菌

##### 2.1.5.1 名称

rApx II 産生組換え大腸菌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apxIIA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たん白を産生することが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 マスターシード菌

###### 2.1.5.3.1 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、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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、その継代数以内とする。

##### 2.1.5.4 ワーキングシード菌

###### 2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

##### 2.1.5.5 プロダクションシード菌

###### 2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

#### 2.1.6 rApx III 産生組換え大腸菌

##### 2.1.6.1 名称

rApx III 産生組換え大腸菌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apxIII4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、rApxIIIたん白を産生することが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 マスターシード菌

##### 2.1.6.3.1 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、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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、その継代数以内とする。

#### 2.1.6.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.6.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた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-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

#### 2.1.6.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.6.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃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

#### 2.2.1.1 App 1、2及び5型菌

製造に適当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

製造に適当と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 App 1、2及び5型菌

#### 2.3.1.1 培養

App各株のプロダクションシード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、3.2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当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、各株の不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3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、各株の原液とする。

原液について、3.6.1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プロダクションシード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、3.2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、3.4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1/25～1/100量の精製水に浮遊し、適量のアンピシリンを添加する。これにリゾチームを添加し、攪拌する。これに適当と認められた緩衝液を加え、高圧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、3.5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1/100～1/250量の滅菌蒸留水に浮遊する。これに適当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、3.6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に希釈して調製する。これにホルマリン及びチメロサ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の調整をして混合した後、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1/2～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 API25バルク

rApxバルクを最終バルク量の1/4量になるようにリン酸緩衝食塩液で希釈する。希釈したrApxバルク1容量に対して、3株のAppバルクをそれぞれ1/3容量ずつ混合したものを、API25バルクとする。

API25バルクについて、3.7の試験を行う。

#### 2.4.4 最終バルク

API25バルクに油性アジュバントを添加し、混合したものを最終バルクとする。

#### 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、3.8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

###### 3.1.1.1.1 App菌株の同定試験

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。

###### 3.1.1.1.2 組換え大腸菌株の同定試験

シードロット規格の1.4.2.5.2.1.1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

###### 3.1.1.2.1 App菌株の夾雑菌否定試験

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。

3.1.1.2.2 組換え大腸菌株の夾雑菌否定試験

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

3.1.1.3 組換え遺伝子等安定性確認試験

3.1.1.3.1 組換え大腸菌株の組換え遺伝子等安定性確認試験

一般試験法の組換え遺伝子等安定性確認試験法を準用して試験をするとき、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

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

貯蔵するものについて次の試験を行う。

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 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。

3.3 不活化菌液の試験

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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

検体及び製造に相当と認められた培地を用いる。

3.3.2.2 試験方法

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

3.3.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.3.3 総菌数試験

3.3.3.1 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。

3.3.3.2 試験方法

試料の吸光度を分光光度計で測定する。

3.3.3.3 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。

<p>検体中の総菌数は、1 mL中 <math>3 \times 10^{10}</math>個以上でなければならない。</p> <p><u>3.4 発現菌液の試験</u></p> <p><u>3.4.1 発現たん白確認試験</u></p> <p><u>3.4.1.1 試験材料</u> 大腸菌各株の発現菌液に等量のサンプルバッファー（付記3）を加えて煮沸したものを試料とする。</p> <p><u>3.4.1.2 試験方法</u> 試料の10 <math>\mu</math>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。</p> <p><u>3.4.1.3 判定</u> 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。</p> <p><u>3.5 破碎菌液の試験</u></p> <p><u>3.5.1 破碎確認試験</u></p> <p><u>3.5.1.1 試験材料</u> 破碎菌液を試料とする。</p> <p><u>3.5.1.2 試験方法</u> 検体0.01mLをスライドガラス上に1 cm<sup>2</sup>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。</p> <p><u>3.5.1.3 判定</u> 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。</p> <p><u>3.6 原液の試験</u></p> <p><u>3.6.1 無菌試験</u> 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。</p> <p><u>3.6.2 同定試験</u></p> <p><u>3.6.2.1 試験材料</u> 各rApxたん白の原液を精製水又は2～4 mol/L尿素液によりたん白量300 <math>\mu</math>g/mLとなるように希釈したものを、試料とする。</p> <p><u>3.6.2.2 試験方法</u> 3.4.1.2を準用して試験する。</p> <p><u>3.6.2.3 判定</u> rApx I及びrApx IIたん白の試料には分子量約105kDaの位置に、rApx IIIたん白の試料には分子量約120kDaの位置に明瞭なバンドを認めなければならない。</p> <p><u>3.6.3 たん白定量試験</u></p>	
--	--

### 3.6.3.1 試験材料

各rApxたん白の原液を20～200  $\mu$ g/mLとなるように2倍階段希釈したものを試料とする。

### 3.6.3.2 試験方法

Lowry法により測定し、原液1 mL中のたん白量を算出する。

### 3.6.3.3 判定

各rApxたん白の原液のたん白量は、1 mL中4 mg以上でなければならない。

## 3.7 AP125バルクの試験

### 3.7.1 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1 mL中3.6mg以下でなければならない。

### 3.7.2 チメロサル定量試験

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。

## 3.8 小分製品の試験

### 3.8.1 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。

### 3.8.2 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。

### 3.8.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.125vol%以下でなければならない。

### 3.8.4 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験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、注射後の体重測定は6日目とする。

### 3.8.5 力価試験

#### 3.8.5.1 試験材料

##### 3.8.5.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で20倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.8.5.1.2 試験動物

約3週齢のマウスを用いる。

### 3.8.5.1.3 攻撃用菌液

App 1 型菌AH-1株又は適当と認められた株、App 2 型菌SHP-1株又は適当と認められた株及びApp 5 型菌Ng-2株又は適当と認められた株をそれぞれを試験用培地 1（付記 4）に移植し、37°Cで16時間培養する。集落を釣菌して試験用培地 2（付記 5）に移植し、37°Cで4～8時間振とう培養したものを各攻撃用菌液とする。

### 3.8.5.2 試験方法

試験動物70匹以上を試験群とし、70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14日目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹以上ずつの7群、計14群に分ける。1型菌攻撃用菌液及び2型攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で2段階、5型菌攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で3段階に希釈し、更にこれらの希釈菌液を10w/v%ムチン液で10倍に希釈したものを、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。

### 3.8.5.3 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。

## 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後3年3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°Cで15分間高压滅菌を行う。約80°C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

寒天粉末 15 g

塩化ナトリウム 5 g

水 残 量

加温溶解した後、pHを7.4～7.6に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。寒天が固まらない程度に冷却した後、アンピシリンを最終力価250 μg/mLとなるように添加する。

付記3 サンプルバッファー

1.000mL中

0.25mol/L トリス塩酸緩衝液、pH6.8 500 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

ブロムフェノールブルー 1.00 g

水 残 量

付記4 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分間高圧滅菌し、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「β-NAD」という。）液を1 vol%の割合で加えたもの。

付記5 試験用培地 2

ハートインフュージョン培地を121℃で15分間高圧滅菌し、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-NAD液を1 vol%の割合で加えたもの。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>トリニューモウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</b></p> <p>1 （略）</p> <p>2 製法</p> <p>2.1・2.2 （略）</p> <p>2.3 原液</p> <p>2.3.1 （略）</p> <p>2.3.2 ウイルスの培養</p> <p style="padding-left: 2em;">種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した<u>感染細胞を含む培養液を超音波処理したものを</u>ウイルス浮遊液とする。</p> <p>2.3.3 不活化</p> <p style="padding-left: 2em;">ウイルス浮遊液にβ-プロピオラクトンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化浮遊液を原液としてもよい。</p> <p style="padding-left: 2em;">不活化ウイルス浮遊液について、<u>3.2</u>の試験を行う。</p> <p>2.3.4 アジュバントの添加</p> <p style="padding-left: 2em;">不活化ウイルス浮遊液に<u>適当と認められた油性アジュバントを</u>添加し、原液とする。</p> <p style="padding-left: 2em;">ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。</p> <p style="padding-left: 2em;">原液について<u>3.3</u>の試験を行う。</p> <p>2.4 （略）</p> <p>2.5 小分製品</p> <p style="padding-left: 2em;">最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。</p> <p style="padding-left: 2em;">小分製品について、<u>3.4</u>の試験を行う。</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>トリニューモウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</b></p> <p>1 （略）</p> <p>2 製法</p> <p>2.1・2.2 （略）</p> <p>2.3 原液</p> <p>2.3.1 （略）</p> <p>2.3.2 ウイルスの培養</p> <p style="padding-left: 2em;">種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した<u>培養液のろ液及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合し、</u>ウイルス浮遊液とする。</p> <p style="padding-left: 2em;"><u>ウイルス浮遊液について、3.2の試験を行う。</u></p> <p>2.3.3 不活化</p> <p style="padding-left: 2em;">ウイルス浮遊液にβ-プロピオラクトンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化浮遊液を原液としてもよい。</p> <p style="padding-left: 2em;">不活化ウイルス浮遊液について、<u>3.3</u>の試験を行う。</p> <p>2.3.4 アジュバントの添加</p> <p style="padding-left: 2em;">不活化ウイルス浮遊液に<u>適当と認められた油性アジュバントを</u>添加し、原液とする。</p> <p style="padding-left: 2em;">ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。</p> <p style="padding-left: 2em;">原液について<u>3.4</u>の試験を行う。</p> <p>2.4 （略）</p> <p>2.5 小分製品</p> <p style="padding-left: 2em;">最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。</p> <p style="padding-left: 2em;">小分製品について、<u>3.5</u>の試験を行う。</p>

### 3 試験法

#### 3.1 (略) (削る)

#### 3.2 不活化ウイルス浮遊液の試験

##### 3.2.1 (略)

##### 3.2.2 抗原含有量試験

###### 3.2.2.1 試験材料

検体をELISA緩衝液（付記1）で6倍に希釈し、更に1.5倍階段希釈した希釈液を試料とする。

###### 3.2.2.2 試験方法

七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化したELISAプレート（付記2）に試料及びELISA緩衝液で1.5倍階段希釈した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原定量用参照抗原（付記3）を添加し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液（付記4）で洗浄した後、ビオチン標識マウス抗七面鳥鼻気管炎ウイルスモノクローナル抗体（付記5）を添加し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを添加し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄した後、基質液（付記6）を添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ で反応させる。反応終了後、反応停止液（付記7）を加えて、反応を停止させる。

###### 3.2.2.3 判定

### 3 試験法

#### 3.1 (略)

#### 3.2 ウイルス浮遊液の試験

##### 3.2.1 ウイルス含有量試験

###### 3.2.1.1 試験材料

###### 3.2.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記1）で調製した鶏胚初代細胞浮遊液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.2.1.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞を用いる。

###### 3.2.1.2 試験方法

試料200 $\mu\text{L}$ ずつを、それぞれ96穴組織培養用プレートの5穴以上に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ で5～7日間培養し、観察する。

###### 3.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中 $10^{6.5}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.3 不活化ウイルス浮遊液の試験

##### 3.3.1 (略)

##### 3.3.2 抗原含有量試験

###### 3.3.2.1 試験材料

検体を洗浄用緩衝液（付記2）で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.2.2 試験方法

七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化したELISAプレートに各試料及び陰性対照を50 $\mu\text{L}$ ずつ添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ で45分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、七面鳥鼻気管炎ウイルス抗体陽性鶏血清を50 $\mu\text{L}$ ずつ添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体を50 $\mu\text{L}$ ずつ添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、基質液（付記3）を50 $\mu\text{L}$ ずつ添加し、室温で10分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記4）を25 $\mu\text{L}$ ずつ加えて、反応を停止させる。

###### 3.3.2.3 判定



波長450nmで吸光度値を測定する。階段希釈した参照抗原の吸光度値から作成した標準曲線より検体の相対抗原量を算出する。

検体の相対抗原量は、1 mL中250EU以上でなければならない。

3.2.3 (略)

3.3 (略)

3.4 小分製品の試験

3.4.1~3.4.3 (略)

3.4.4 力価試験

3.4.4.1 (略)

3.4.4.2 試験方法

3.4.3の試験終了日に試験群及び対照群から採取した血清について、ELISA抗体価を測定する。

固相化緩衝液(付記8)で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原(付記9)を96穴平底マイクロプレートに100µLずつ分注し、37°Cで3時間反応後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、乾燥させる。次に被検血清をIB・EIA緩衝液(付記10)で2倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100µLずつ加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体(付記11)を100µLずつ加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、基質液を100µLずつ加え、室温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液を50µLずつ加えて、反応を停止させ、波長450nmで吸光度値を測定する。

3.4.4.3 判定

参照陰性血清(付記12)の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数をELISA抗体価とすると、試験群の80%以上がELISA抗体価 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群は全て $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清(付記13)は、 $2^{6.64}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。

4 (略)

付記1 ELISA緩衝液  
1,000mL 中

波長450nmで吸光度値を測定する。陰性対照より2倍以上の吸光度値を示す最終希釈倍数を相対抗原量とする。

検体の抗原量は、250EU/mL以上でなければならない。

3.3.3 (略)

3.4 (略)

3.5 小分製品の試験

3.5.1~3.5.3 (略)

3.5.4 力価試験

3.5.4.1 (略)

3.5.4.2 試験方法

3.5.3の試験終了日に試験群及び対照群から採取した血清について、ELISA抗体価を測定する。

固相化緩衝液(付記5)で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原(付記6)を96穴平底マイクロプレートに100µLずつ分注し、37°Cで3時間反応後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、乾燥させる。次に被検血清をIB・EIA緩衝液(付記7)で2倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100µLずつ加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体(付記8)を100µLずつ加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、基質液を100µLずつ加え、室温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液を50µLずつ加えて、反応を停止させ、波長450nmで吸光度値を測定する。

3.5.4.3 判定

参照陰性血清(付記9)の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数をELISA抗体価とすると、試験群の80%以上がELISA抗体価 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清(付記10)は、 $2^{6.64}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。

4 (略)

付記1 細胞増殖用培養液  
1,000mL 中

<p>リン酸二ナトリウム十二水和物      71.9    g  塩化ナトリウム                      11.69   g  水    残 量  <u>pH6.9～7.1 に調整した後、ポリソルベート 80 を 0.05vol%となるように  添加したもの</u></p>	<p><u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>    0.83    g  <u>トリプトース</u>                              1.00    g  <u>ラクトアルブミン水解物</u>                1.25    g  <u>炭酸水素ナトリウム</u>                    2.45    g  <u>牛血清</u>                                        50    mL  <u>イーグル MEM</u>                            残 量  <u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u></p>
<p>付記 2 <u>七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化した  ELISA プレート</u>  <u>七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1#8544 株で作製したハイブリドーマの培  養上清から得たモノクローナル抗体 T32-INT を 0.05M 重炭酸緩衝液で希  釈した希釈液を 96 穴プレートの各穴に添加して固相化したもの</u></p>	<p>(新設)</p>
<p>付記 3 <u>七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原定量用参照抗原</u>  <u>七面鳥鼻気管炎ウイルス原液を ELISA 緩衝液で濃度調整したもの</u></p>	<p>(新設)</p>
<p>付記 4 (略)</p>	<p>付記 2 (略)</p>
<p>付記 5 <u>ビオチン標識マウス抗七面鳥鼻気管炎ウイルスモノクローナル抗体</u>  <u>七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1#8544 株で作製したハイブリドーマの培  養上清から得たモノクローナル抗体 T32-INT をビオチン標識し、カゼイ  ンを 0.2%となるように添加した ELISA 緩衝液で希釈したもの</u></p>	<p>(新設)</p>
<p>付記 6～付記 13 (略)</p>	<p>付記 3～付記 10 (略)</p>

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加える。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>トリレオウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</b></p> <p>1 （略）</p> <p>2 製法</p> <p>2.1・2.2 （略）</p> <p>2.3 原液</p> <p>2.3.1 （略）</p> <p>2.3.2 ウイルスの培養</p> <p style="padding-left: 2em;">種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別別培養細胞ごとに採取した培養液又は培養液のろ液をウイルス浮遊液とする。</p> <p style="padding-left: 2em;">ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。</p> <p>2.3.3 不活化</p> <p style="padding-left: 2em;">ウイルス浮遊液を濃縮した後ホルマリンを加えて不活化したもの又はウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化した後に濃縮したものを不活化ウイルス浮遊液とする。</p> <p style="padding-left: 2em;">不活化ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。</p> <p>2.3.4 （略）</p> <p>2.4・2.5 （略）</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 （略）</p> <p>3.2 ウイルス浮遊液の試験</p> <p>3.2.1 ウイルス含有量試験</p> <p>3.2.1.1 試験材料</p> <p>3.2.1.1.1・3.2.1.1.2 （略）</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>トリレオウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</b></p> <p>1 （略）</p> <p>2 製法</p> <p>2.1・2.2 （略）</p> <p>2.3 原液</p> <p>2.3.1 （略）</p> <p>2.3.2 ウイルスの培養</p> <p style="padding-left: 2em;">種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液をウイルス浮遊液とする。</p> <p style="padding-left: 2em;">ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。</p> <p>2.3.3 不活化</p> <p style="padding-left: 2em;">ウイルス浮遊液を濃縮した後ホルマリンを加えて不活化したものを不活化ウイルス浮遊液とする。</p> <p style="padding-left: 2em;">不活化ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。</p> <p>2.3.4 （略）</p> <p>2.4・2.5 （略）</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 （略）</p> <p>3.2 ウイルス浮遊液の試験</p> <p>3.2.1 ウイルス含有量試験</p> <p>3.2.1.1 試験材料</p> <p>3.2.1.1.1・3.2.1.1.2 （略）</p>

3.2.1.2 (略)  
3.2.1.3 (略)  
3.3 不活化ウイルス浮遊液の試験  
3.3.1 (略)  
3.3.2 不活化試験  
3.3.2.1 試験材料  
3.3.2.1.1 試料  
(略)  
3.3.2.1.2 (略)  
3.3.2.2・3.3.2.3 (略)  
3.4・3.5 (略)  
4 (略)  
  
付記1～付記4 (略)

3.2.1.1.3 (略)  
3.2.1.1.4 (略)  
3.3 不活化ウイルス浮遊液の試験  
3.3.1 (略)  
3.3.2 不活化試験  
3.3.2.1 試験材料  
3.3.2.1.1 注射材料  
(略)  
3.3.2.1.2 (略)  
3.3.2.2・3.3.2.3 (略)  
3.4・3.5 (略)  
4 (略)  
  
付記1～付記4 (略)

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・ 鶏伝染性ファブリキウス嚢病・トリニューモ ウイルス感染症混合（油性アジュバント加） 不活化ワクチン</b></p> <p>1 （略） 2 製法 2.1 （略） 2.2 製造用材料 2.2.1 ニューカッスル病ウイルス 2.2.1.1 発育鶏卵 <u>9～11 日齢のものを用いる。</u> 2.2.2～2.2.4 （略） 2.3 原液 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液 2.3.1.1 （略） 2.3.1.2 ウイルスの培養 種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の<u>ろ液</u>をウイルス浮遊液とする。 2.3.1.3・2.3.1.4 （略） 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス 2.3.2.1 （略） 2.3.2.2 ウイルスの培養 各株の種ウイルスを発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液の<u>ろ液</u>を各株のウイルス浮遊液とする。</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・ 鶏伝染性ファブリキウス嚢病・トリニューモ ウイルス感染症混合（油性アジュバント加） 不活化ワクチン</b></p> <p>1 （略） 2 製法 2.1 （略） 2.2 製造用材料 2.2.1 ニューカッスル病ウイルス 2.2.1.1 発育鶏卵 <u>10～11 日齢のものを用いる。</u> 2.2.2～2.2.4 （略） 2.3 原液 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液 2.3.1.1 （略） 2.3.1.2 ウイルスの培養 種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の<u>遠心上清</u>をウイルス浮遊液とする。 <u>ウイルス浮遊液について、3.2.1.1 の試験を行う。</u> 2.3.1.3・2.3.1.4 （略） 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス 2.3.2.1 （略） 2.3.2.2 ウイルスの培養 各株の種ウイルスを発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液の<u>遠心上清</u>を各株のウイルス浮遊液とする。</p>

<p>ウイルス浮遊液について、<u>3.2.1.1</u>の試験を行う。</p> <p>2.3.2.3 不活化 各ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて<u>不活化したもの又は不活化後に濃縮したものを</u>、それぞれの株の不活化ウイルス浮遊液とする。 この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。</p> <p>2.3.2.4 (略)</p> <p>2.3.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス</p> <p>2.3.3.1 (略)</p> <p>2.3.3.2 ウイルスの培養 種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液をウイルス浮遊液とする。</p> <p>2.3.3.3 不活化 ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化した後、<u>濃縮したものを不活化</u>ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.3.3.4 (略)</p> <p>2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス</p> <p>2.3.4.1 (略)</p> <p>2.3.4.2 ウイルスの培養 種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した<u>感染細胞を含む培養液を超音波処理したものを</u>ウイルス浮遊液とする。</p> <p>2.3.4.3 不活化 ウイルス浮遊液にβ-プロピオラクトンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。</p> <p>2.3.4.4 (略)</p> <p>2.4・2.5 (略)</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 (略)</p> <p>3.2 ウイルス浮遊液の試験</p>	<p>ウイルス浮遊液について、<u>3.2.1.2</u>の試験を行う。</p> <p>2.3.2.3 不活化 各ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて<u>不活化し</u>、それぞれの株の不活化ウイルス浮遊液とする。 この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。</p> <p>2.3.2.4 (略)</p> <p>2.3.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス</p> <p>2.3.3.1 (略)</p> <p>2.3.3.2 ウイルスの培養 種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した<u>培養液のろ液又は遠心上清を</u>ウイルス浮遊液とする。 <u>ウイルス浮遊液について、3.2.1.3の試験を行う。</u></p> <p>2.3.3.3 不活化 ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて<u>不活化し</u>、不活化ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.3.3.4 (略)</p> <p>2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス</p> <p>2.3.4.1 (略)</p> <p>2.3.4.2 ウイルスの培養 種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した<u>培養液のろ液及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合し</u>、ウイルス浮遊液とする。 <u>ウイルス浮遊液について、3.2.1.4の試験を行う。</u></p> <p>2.3.4.3 不活化 ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。</p> <p>2.3.4.4 (略)</p> <p>2.4・2.5 (略)</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 (略)</p> <p>3.2 ウイルス浮遊液の試験</p>
---	--

3.2.1 ウイルス含有量試験  
(削る)

3.2.1.1 (略)  
(削る)

(削る)

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 ニューカッスル病ウイルス

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～11 日齢の発育鶏卵を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37°C で 5 日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol% 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.2.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>9.0</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

3.2.1.2 (略)

3.2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

3.2.1.3.1 試験材料

3.2.1.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 枚の培養細胞に接種し、37°C で 60 分間静置吸着させる。第 1 次重層寒天培地（付記 2）を加え 3～4 日間培養後、第 2 次重層寒天培地（付記 3）を重ねし、観察する。

3.2.1.3.3 判定

試料の各希釈段階の平均プラック数からウイルス含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>8.0</sup>PFU 以上でなければならない。

3.2.1.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

3.2.1.4.1 試験材料

3.2.1.4.1.1 試料

<p>3.3 (略)</p> <p>3.4 原液の試験</p> <p>3.4.1 (略)</p> <p>3.4.2 抗原含有量試験</p> <p>3.4.2.1 (略)</p> <p>3.4.2.2 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス</p> <p>3.4.2.2.1 (略)</p> <p>3.4.2.2.2 試験方法</p> <p>試料及び参照抗原(付記1)をR63モノクローナル抗体(付記2)で固相化した96穴平底マイクロプレートに添加し、37°Cで反応後、ビオチン標識R63抗体(付記3)を添加し、37°Cで反応させる。その後ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジンを加え、37°Cで反応させた後、<u>基質液(付記4)</u>を加え、発色させる。反応停止後、450nmで吸光度を測定する。</p> <p>3.4.2.3 七面鳥鼻気管炎ウイルス</p> <p>3.4.2.3.1 試験材料</p> <p>3.4.2.3.1.1 試料</p> <p>検体をELISA緩衝液(付記5)で6倍に希釈し、更に1.5倍階段希釈した希釈液を試料とする。</p> <p>3.4.2.3.2 試験方法</p> <p>七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化したELISAプレート(付記6)に試料及びELISA緩衝液で1.5倍階段希釈した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原定量用参照抗原(付記7)を添加し、<u>37±1°C</u>で反応させ</p>	<p>検体を細胞増殖用培養液(付記4)で調整した鶏胚初代細胞浮遊液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>3.2.1.4.1.2 培養細胞</p> <p>生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞浮遊液を用いる。</p> <p>3.2.1.4.2 試験方法</p> <p>試料200µLずつを、それぞれ96穴組織培養用プレートの5穴以上に接種し、37°Cで5～7日間培養し、観察する。</p> <p>3.2.1.4.3 判定</p> <p>培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。  <u>検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。</u></p> <p>3.3 (略)</p> <p>3.4 原液の試験</p> <p>3.4.1の試験又は3.4.1若しくは3.4.2の試験を行う。</p> <p>3.4.1 (略)</p> <p>3.4.2 抗原含有量試験</p> <p>3.4.2.1 (略)</p> <p>3.4.2.2 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス</p> <p>3.4.2.2.1 (略)</p> <p>3.4.2.2.2 試験方法</p> <p>試料及び参照抗原(付記5)をR63モノクローナル抗体(付記6)で固相化した96穴平底マイクロプレートに添加し、37°Cで反応後、ビオチン標識R63抗体(付記7)を添加し、37°Cで反応させる。その後ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン(付記8)を加え、37°Cで反応させた後、<u>過酸化尿素を加えたテトラメチルベンチジン</u>を加え、発色させる。反応停止後、450nmで吸光度を測定する。</p> <p>3.4.2.3 七面鳥鼻気管炎ウイルス</p> <p>3.4.2.3.1 試験材料</p> <p>3.4.2.3.1.1 試料</p> <p>検体を洗浄用緩衝液(付記9)で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>3.4.2.3.2 試験方法</p> <p>七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化した96穴平底マイクロプレートに各試料及び陰性対照を50µLずつ添加し、37°Cで45分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、<u>七面鳥鼻気管炎ウ</u></p>
--	--



る。反応終了後、洗浄用緩衝液（付記 8）で洗浄した後、ビオチン標識マウス抗七面鳥鼻気管炎ウイルスモノクローナル抗体（付記 9）を添加し、37±1°Cで反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄した後、アビジン・ペルオキシダーゼコンジュゲートを添加し、37±1°Cで反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄した後、基質液（付記 4）を添加し、37°Cで反応させる。反応終了後、反応停止液（付記10）を加えて、反応を停止させる。

#### 3.4.2.3.3 判定

波長450nmで吸光度値を測定する。階段希釈した参照抗原の吸光度値から作成した標準曲線より検体の相対抗原量を算出する。

検体の相対抗原量は、1 mL中250EU以上でなければならない。

#### 3.5 小分製品の試験

##### 3.5.1～3.5.4 (略)

##### 3.5.5 力価試験

##### 3.5.5.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.5.5.1.1・3.5.5.1.2 (略)

##### 3.5.5.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下「HI 抗体価」という。）とする。

試験群の 80%以上が HI 抗体価 80 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てが 5 倍以下でなければならない。

##### 3.5.5.2 (略)

##### 3.5.5.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病力価試験

##### 3.5.5.3.1 (略)

##### 3.5.5.3.2 試験方法

3.5.4 の試験最終日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中和試験を行う。

血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液（付記 11）で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中 100～200PFU を含む中和試験用ウイルス液をそれぞれ等量加えて混合し、37°Cで 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37°Cで 60 分間静置吸着させた後、第 1 次重層寒天培地（付記 12）を加え、3～4 日間静置培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 13）を重層し、観察する。

##### 3.5.5.3.3 判定

ブラック数を 50 %減少させる血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

ウイルス抗体陽性鶏血清を 50μL 添加し、37°Cで 30 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体を 50μL 添加し、37°Cで 30 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で洗浄した後、基質液（付記 10）を 50μL ずつ添加し、室温で 10 分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記 11）を 25μL 加えて、反応を停止させる。

#### 3.4.2.3.3 判定

波長 450nm で吸光度を測定する。陰性対照より 2 倍以上の吸光度値を示す最終希釈倍数を相対抗原量とする。

検体の抗原量は、250EU/mL 以上である。

#### 3.5 小分製品の試験

##### 3.5.1～3.5.4 (略)

##### 3.5.5 力価試験

##### 3.5.5.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.5.5.1.1・3.5.5.1.2 (略)

##### 3.5.5.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下「HI 抗体価」という。）とする。

試験群の 80%以上が HI 抗体価 80 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべてが 5 倍以下でなければならない。

##### 3.5.5.2 (略)

##### 3.5.5.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病力価試験

##### 3.5.5.3.1 (略)

##### 3.5.5.3.2 試験方法

3.5.4 の試験最終日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中和試験を行う。

血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液（付記 12）で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中 100～200PFU を含む中和試験用ウイルス液をそれぞれ等量加えて混合し、37°Cで 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37°Cで 60 分間静置吸着させた後、第 1 次重層寒天培地（付記 13）を加え、3～4 日間静置培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 14）を重層し、観察する。

##### 3.5.5.3.3 判定

ブラック数を 50 %減少させる血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の70%以上が中和抗体価128倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て中和抗体価4倍以下でなければならない。

#### 3.5.5.4 七面鳥鼻気管炎力価試験

##### 3.5.5.4.1 (略)

##### 3.5.5.4.2 試験方法

3.5.4の試験終了日に試験群及び対照群から採取した各個体の血清についてELISAを行う。

固相化緩衝液(付記14)で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原(付記15)を96穴平底マイクロプレートに100μLずつ分注し、37°Cで3時間反応後、洗浄用緩衝液で2回洗浄した後、乾燥させる。次に被検血清をIB・EIA緩衝液(付記16)で2倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100μLずつ加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体(付記17)を100μL加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、基質液を100μL加え、常温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液を50μL加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

##### 3.5.5.4.3 判定

参照陰性血清(付記18)の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数をELISA抗体価とすると、試験群の80%以上がELISA抗体価 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群は全て $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清(付記19)は、 $2^{6.64}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。

#### 4 (略)

(削る)

(削る)

試験群の70%以上が中和抗体価128倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて中和抗体価4倍以下でなければならない。

#### 3.5.5.4 七面鳥鼻気管炎力価試験

##### 3.5.5.4.1 (略)

##### 3.5.5.4.2 試験方法

3.5.4の試験終了日に試験群及び対照群から採取した各個体の血清についてELISAを行う。

固相化緩衝液(付記15)で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原(付記16)を96穴平底マイクロプレートに100μLずつ分注し、37°Cで3時間反応後、洗浄用緩衝液で2回洗浄した後、乾燥させる。次に被検血清をIB・EIA緩衝液(付記17)で2倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100μLずつ加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体(付記18)を100μL加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、基質液を100μL加え、常温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液を50μL加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

##### 3.5.5.4.3 判定

参照陰性血清(付記19)の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数をELISA抗体価とすると、試験群の80%以上がELISA抗体価 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清(付記20)は、 $2^{6.64}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。

#### 4 (略)

##### 付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 20 mL

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.4に調整する。

必要最小量の抗生物質を加えてもよい。

##### 付記2 第1次重層寒天培地

1,000mL 中

<p>(削る)</p> <p>(削る)</p>	<table border="0"> <tr> <td><u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u></td> <td><u>2.95</u></td> <td><u>g</u></td> </tr> <tr> <td><u>牛血清</u></td> <td><u>20</u></td> <td><u>mL</u></td> </tr> <tr> <td><u>寒天</u></td> <td><u>10</u></td> <td><u>g</u></td> </tr> <tr> <td><u>イーグル MEM</u></td> <td></td> <td><u>残 量</u></td> </tr> </table> <p><u>炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0～7.4 に調整する。</u> <u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u></p> <p><u>付記 3 第 2 次重層寒天培地</u> <u>第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v% ニュートラルレッド液を 2 vol% とする</u> <u>ように加えたもの</u></p>	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95</u>	<u>g</u>	<u>牛血清</u>	<u>20</u>	<u>mL</u>	<u>寒天</u>	<u>10</u>	<u>g</u>	<u>イーグル MEM</u>		<u>残 量</u>						
<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95</u>	<u>g</u>																	
<u>牛血清</u>	<u>20</u>	<u>mL</u>																	
<u>寒天</u>	<u>10</u>	<u>g</u>																	
<u>イーグル MEM</u>		<u>残 量</u>																	
<p><u>付記 1～付記 3</u> (略)</p> <p>(削る)</p>	<p><u>付記 4 細胞増殖用培養液</u> <u>1,000mL 中</u></p> <table border="0"> <tr> <td><u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u></td> <td><u>0.83</u></td> <td><u>g</u></td> </tr> <tr> <td><u>トリプトース</u></td> <td><u>1.00</u></td> <td><u>g</u></td> </tr> <tr> <td><u>ラクトアルブミン水解物</u></td> <td><u>1.25</u></td> <td><u>g</u></td> </tr> <tr> <td><u>炭酸水素ナトリウム</u></td> <td><u>2.45</u></td> <td><u>g</u></td> </tr> <tr> <td><u>牛血清</u></td> <td><u>50</u></td> <td><u>mL</u></td> </tr> <tr> <td><u>イーグル MEM</u></td> <td></td> <td><u>残 量</u></td> </tr> </table> <p><u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u></p> <p><u>付記 5～付記 7</u> (略)</p>	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>0.83</u>	<u>g</u>	<u>トリプトース</u>	<u>1.00</u>	<u>g</u>	<u>ラクトアルブミン水解物</u>	<u>1.25</u>	<u>g</u>	<u>炭酸水素ナトリウム</u>	<u>2.45</u>	<u>g</u>	<u>牛血清</u>	<u>50</u>	<u>mL</u>	<u>イーグル MEM</u>		<u>残 量</u>
<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>0.83</u>	<u>g</u>																	
<u>トリプトース</u>	<u>1.00</u>	<u>g</u>																	
<u>ラクトアルブミン水解物</u>	<u>1.25</u>	<u>g</u>																	
<u>炭酸水素ナトリウム</u>	<u>2.45</u>	<u>g</u>																	
<u>牛血清</u>	<u>50</u>	<u>mL</u>																	
<u>イーグル MEM</u>		<u>残 量</u>																	
<p><u>付記 4 基質液</u></p> <table border="0"> <tr> <td><u>TMB 溶液</u></td> <td><u>0.2</u></td> <td><u>mL</u></td> </tr> <tr> <td><u>UP 緩衝液</u></td> <td><u>1.5</u></td> <td><u>mL</u></td> </tr> <tr> <td><u>水</u></td> <td><u>15</u></td> <td><u>mL</u></td> </tr> </table> <p><u>TMB 溶液は、DMSO 1,000mL に TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) を 6 g 溶かしたもの</u> <u>UP 緩衝液は、尿素過酸化 140mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136g を約 500mL の水に溶かし、1.5mol/L クエン酸で pH5.3～5.7 に調整した後、水を加えて 1,000mL とし、121℃、20 分間高圧滅菌したもの)</u></p>	<u>TMB 溶液</u>	<u>0.2</u>	<u>mL</u>	<u>UP 緩衝液</u>	<u>1.5</u>	<u>mL</u>	<u>水</u>	<u>15</u>	<u>mL</u>	<p><u>付記 8 ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン</u> <u>参照抗原が規定の抗原量を示すように IB・EIA 緩衝液で調製したもの</u></p> <p>(新設)</p>									
<u>TMB 溶液</u>	<u>0.2</u>	<u>mL</u>																	
<u>UP 緩衝液</u>	<u>1.5</u>	<u>mL</u>																	
<u>水</u>	<u>15</u>	<u>mL</u>																	

<p><u>100mL に溶かしたもの</u></p> <p>付記 5 <u>ELISA緩衝液</u>  <u>1,000mL中</u>  リン酸二ナトリウム十二水和物            <u>71.9</u>    g  塩化ナトリウム                                <u>11.69</u>   g  水    <u>残量</u>  <u>pH6.9～7.1に調整した後、ポリソルベート80を0.05vol%となるように添加したもの</u></p>	<p>(新設)</p>
<p>付記 6 <u>七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化したELISAプレート</u>  <u>七面鳥鼻気管炎ウイルスBUT1#8544株で作製したハイブリドーマの培養上清から得たモノクローナル抗体T32-INTを0.05M重炭酸緩衝液で希釈した希釈液を96穴プレートの各穴に添加して固相化したもの</u></p>	<p>(新設)</p>
<p>付記 7 <u>七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原定量用参照抗原</u>  <u>七面鳥鼻気管炎ウイルス原液をELISA緩衝液で濃度調整したもの</u></p>	<p>(新設)</p>
<p>付記 8 (略)</p>	<p>付記 9 (略)</p>
<p>付記 9 <u>ビオチン標識マウス抗七面鳥鼻気管炎ウイルスモノクローナル抗体</u>  <u>七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1#8544 株で作製したハイブリドーマの培養上清から得たモノクローナル抗体 T32-INT をビオチン標識し、カゼインを0.2%となるように添加したELISA緩衝液で希釈したもの</u></p>	<p>(新設)</p>
<p>(削る)</p>	<p>付記 10 <u>基質液</u>  <u>TMB 溶液    0.2 mL</u>  <u>UP 緩衝液    1.5 mL</u>  <u>水    15 mL</u>  <u>TMB 溶液は、DMSO1,000mL に TMB (3,3',5,5'テトラメチルベンジジン) を 6 g 溶かしたもの</u>  <u>UP 緩衝液は、尿素過酸化化物 140mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136g を約 500mL の水に溶かし、1.5mol/L クエン酸で pH5.3～5.7 に調整した後、水を加えて 1,000mL とし、121℃、20 分間高压滅菌したもの)</u></p>

<u>付記 10～付記 19</u> (略)	<u>100mL に溶かしたもの</u> <u>付記 11～付記 20</u> (略)
------------------------	--

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加える。

改正後	改正前
<p style="text-align: center;">ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）</b></p> <p>1（略）                  2 製法                  2.1 製造用株                  2.1.1 K88 線毛抗原保有大腸菌                  2.1.1.1・2.1.1.2（略）                  2.1.1.3 マスターシード菌                  2.1.1.3.1 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、<u>適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。</u>                  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、凍結乾燥して 2～7℃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。<u>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。</u></p> <p>2.1.1.4 ワーキングシード菌                  2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存                  ワーキングシード菌は、<u>適当と認められた培地で増殖及び継代する。</u>                  ワーキングシード菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。<u>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。</u>                  ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。</p> <p>2.1.1.5 プロダクションシード菌                  2.1.1.5.1 増殖及び保存                  プロダクションシード菌は、<u>適当と認められた培地で増殖させる。</u></p>	<p style="text-align: center;">ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）</b></p> <p>1（略）                  2 製法                  2.1 製造用株                  2.1.1 K88 線毛抗原保有大腸菌                  2.1.1.1・2.1.1.2（略）                  2.1.1.3 マスターシード菌                  2.1.1.3.1 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、<u>適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。</u>                  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、凍結乾燥して 2～7℃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。</p> <p>2.1.1.4 ワーキングシード菌                  2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存                  ワーキングシード菌は、<u>適当と認められた培地で増殖及び継代する。</u>                  ワーキングシード菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃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。</p> <p>2.1.1.5 プロダクションシード菌                  2.1.1.5.1 増殖及び保存                  プロダクションシード菌は、<u>適当と認められた培地で増殖させる。</u></p>

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2 K99 線毛抗原保有大腸菌

##### 2.1.2.1・2.1.2.2 (略)

##### 2.1.2.3 マスターシード菌

###### 2.1.2.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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、凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.2.4.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その最高継代数とする。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.2.5.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.3 987P 線毛抗原保有大腸菌

##### 2.1.3.1・2.1.3.2 (略)

##### 2.1.3.3 マスターシード菌

###### 2.1.3.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2 K99 線毛抗原保有大腸菌

##### 2.1.2.1・2.1.2.2 (略)

##### 2.1.2.3 マスターシード菌

###### 2.1.2.3.1 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、凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.2.4.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.2.5.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.3 987P 線毛抗原保有大腸菌

##### 2.1.3.1・2.1.3.2 (略)

##### 2.1.3.3 マスターシード菌

###### 2.1.3.3.1 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

結乾燥して2～7℃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。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。

#### 2.1.3.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.3.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.3.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.3.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.4 K99 及び F41 線毛抗原保有大腸菌

##### 2.1.4.1・2.1.4.2 (略)

#### 2.1.4.3 マスターシード菌

##### 2.1.4.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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、凍結乾燥して2～7℃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。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。

#### 2.1.4.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.4.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。

結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.3.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.3.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.3.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.3.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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

#### 2.1.4 K99 及び F41 線毛抗原保有大腸菌

##### 2.1.4.1・2.1.4.2 (略)

#### 2.1.4.3 マスターシード菌

##### 2.1.4.3.1 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、凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.4.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.4.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。



2.1.4.5 プロダクションシード菌

2.1.4.5.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.5 易熱性エンテロトキシンBサブユニット成分(以下この項において「LT<sub>B</sub>」という。)

2.1.5.1・2.1.5.2 (略)

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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、凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.5.4 ワーキングシード菌

2.1.5.4.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.5.5 プロダクションシード菌

2.1.5.5.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.6 クロストリジウム・パーフリンゲンスC型菌

2.1.6.1・2.1.6.2 (略)

2.1.6.3 マスターシード菌

2.1.6.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程によ

2.1.4.5 プロダクションシード菌

2.1.4.5.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.5 易熱性エンテロトキシンBサブユニット成分(以下この項において「LT<sub>B</sub>」という。)

2.1.5.1・2.1.5.2 (略)

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 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、凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.5.4 ワーキングシード菌

2.1.5.4.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.5.5 プロダクションシード菌

2.1.5.5.1 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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ 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。

2.1.6 クロストリジウム・パーフリンゲンスC型菌

2.1.6.1・2.1.6.2 (略)

2.1.6.3 マスターシード菌

2.1.6.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分

り作製し、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、凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.6.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.6.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.6.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.6.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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・2.3 (略)

#### 2.4 最終バルク

各原液を混合し、濃度調整し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものを最終バルクとする。

最終バルクにおいて力価試験を実施する場合について 3.5 の試験を行う。

#### 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

##### 3.1～3.4 (略)

#### 3.5 最終バルクの試験

##### 3.5.1 力価試験

小分製品において力価試験を実施する場合には、この試験を行わなくてもよい。

##### 3.5.1.1 大腸菌線毛抗原及び大腸菌 LT<sub>B</sub> 成分の力価試験

3.5.1.1.1 又は 3.5.1.1.2 の試験を行う。

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、凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.6.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.6.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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。

#### 2.1.6.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.6.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃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・2.3 (略)

#### 2.4 最終バルク

各原液を混合し、濃度調整し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものを最終バルクとする。

#### 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、3.5の試験を行う。

#### 3 試験法

##### 3.1～3.4 (略)

(新設)

### 3.5.1.1.1 相対力価 (付記 13) による力価試験

#### 3.5.1.1.1.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

##### 3.5.1.1.1.1.1 試験材料

##### 3.5.1.1.1.1.1.1 試料

検体を、必要に応じて希釈・洗浄液 1 で希釈したものを試料とする。

##### 3.5.1.1.1.1.2 試験方法

線毛抗原 K88 成分の参照品 (付記 14) を、必要に応じて希釈・洗浄液 1 で希釈後、希釈した参照品及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 1 (付記 15) の各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 (付記 16) を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2 (付記 17) を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が参照品毎に規定された値となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

##### 3.5.1.1.1.1.3 判定

参照品中の K88 線毛抗原量を 1.0 として、試料の K88 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法 (付記 18) により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

#### 3.5.1.1.1.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

##### 3.5.1.1.1.2.1 試験材料

##### 3.5.1.1.1.2.1.1 試料

検体を、希釈・洗浄液 1 で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液 (付記 19) を加え、常温で 60 分間振とうする。

##### 3.5.1.1.1.2.2 試験方法

線毛抗原 K99 成分の参照品 (付記 20) を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で 1 時間振とうした後、希釈・洗浄液 2 で希釈したもの及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 2 (付記 21) の各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、15~30°C で 15  $\pm$  2 分間静置し、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 (付記 22) を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 1.1~1.5

となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

#### 3.5.1.1.1.2.3 判定

参照品中の K99 線毛抗原量を 1.0 として、試料の K99 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

#### 3.5.1.1.1.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

##### 3.5.1.1.1.3.1 試験材料

##### 3.5.1.1.1.3.1.1 試料

検体を、希釈・洗浄液 2 で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液を加え、常温で 60 分間振とうする。

##### 3.5.1.1.1.3.2 試験方法

線毛抗原 987P 成分の参照品（付記 23）を希釈・洗浄液 2 で希釈したもの及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 3（付記 24）の各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 15 分間静置した後、30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 1（付記 25）を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、標識抗体 2（付記 26）を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させる。30 秒間振とうした後、主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 1.1~1.5 となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

##### 3.5.1.1.1.3.3 判定

参照品中の 987P 線毛抗原量を 1.0 として、試料の 987P 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.1 以上でなければならない。

#### 3.5.1.1.1.4 大腸菌線毛抗原 F41 成分の力価試験

##### 3.5.1.1.1.4.1 試験材料

##### 3.5.1.1.1.4.1.1 試料

検体を、希釈・洗浄液 1 で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液を加え、常温で 60 分間振とうする。

##### 3.5.1.1.1.4.2 試験方法

線毛抗原 F41 成分の参照品（付記 27）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で 1 時間振とうした後、希釈・洗浄液 2 で希釈したもの及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 4（付記 28）の各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で

洗淨した後、抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1 (付記 29) を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗淨液 2 で洗淨した後、標識抗体 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗淨液 2 で洗淨した後、基質液 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 1.1~1.5 となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

#### 3.5.1.1.1.4.3 判定

参照品中の F41 線毛抗原量を 1.0 として、試料の F41 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

#### 3.5.1.1.1.5 大腸菌 LT<sub>B</sub> の力価試験

##### 3.5.1.1.1.5.1 試験材料

##### 3.5.1.1.1.5.1.1 試料

検体を滅菌精製水で希釈し、水酸化ナトリウム溶液 (付記 30) で pH を 12.0 に調整した後、硫酸アンモニウム溶液 (付記 31) を混合して中和する。この混合液を遠心し、その上清を試料とする。

##### 3.5.1.1.1.5.2 試験方法

大腸菌 LT<sub>B</sub> 成分の参照品を滅菌精製水で再溶解したもの及び試料の希釈・洗淨液 1 による 2 倍階段希釈液を作製し、氷槽で保存する。 GANGRI オシド固相化プレートの各穴に 50  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間加温する。希釈・洗淨液 2 で 1 回、希釈・洗淨液 1 で 2 回洗淨した後、抗 LT<sub>B</sub> 抗原兔ポリクローナル抗体を各穴に 50  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間加温する。洗淨液 3 で洗淨した後、標識抗体 1 を各穴に 50  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間加温する。洗淨液 3 で洗淨した後、基質液 1 を各穴に 200  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 490nm、副波長 630nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 0.9~1.1 となった時点を反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定する。

##### 3.5.1.1.1.5.3 判定

参照品中の LT<sub>B</sub> 抗原量を 1.0 として、試料の LT<sub>B</sub> 抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

#### 3.5.1.1.2 抗体測定法による力価試験

##### 3.5.1.1.2.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

##### 3.5.1.1.2.1.1 試験材料

##### 3.5.1.1.2.1.1.1 注射材料

検体を水酸化アルミニウムゲル (付記 32) で 10 倍に希釈したものを注

射材料とする。

#### 3.5.1.1.2.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

#### 3.5.1.1.2.1.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 K88 参照陽性血清 1 (付記 33) については 512 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 (付記 34) で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 (付記 35) を希釈液 3 で 1,024 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 (付記 36) の穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 (付記 37) を 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させる。その後、洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、1,024 倍希釈した線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9~1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

#### 3.5.1.1.2.1.3 判定

試験群の血清は、80%以上が抗体価 2,048 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 K88 参照陽性血清 1 は、抗体価 2,048~4,096 倍を示さなければならない。

#### 3.5.1.1.2.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

##### 3.5.1.1.2.2.1 試験材料

##### 3.5.1.1.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

##### 3.5.1.1.2.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.5.1.1.2.2.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。2 週間隔で 2 回注射後 2 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 K99 参照陽性血清 1 (付記 38) については 8 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 (付記 39) を希釈液 3 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 2 (付記 40) の各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9~1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

#### 3.5.1.1.2.2.3 判定

試験群の血清は、80%以上が抗体価 32 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。線毛抗原 K99 参照陽性血清 1 は、抗体価 32~64 倍を示さなければならない。

#### 3.5.1.1.2.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

##### 3.5.1.1.2.3.1 試験材料

##### 3.5.1.1.2.3.1.1 試験動物

3.5.1.1.2.2 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.1.1.2.3.2 試験方法

3.5.1.1.2.2 の試験で得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清については 4 倍から、対照群血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清 1 (付記 41) については 2 倍から、希釈液 3 で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清 2 (付記 42) を希釈液 3 で 128 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 3 (付記 43) の穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた後、洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、128 倍希釈した線毛抗原 987P 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9~1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

#### 3.5.1.1.2.3.3 判定

試験群の血清は、80%以上が抗体価8倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価2倍以下でなければならない。

線毛抗原 987P 参照陽性血清 1 は、抗体価 8～16 倍を示さなければならない。

#### 3.5.1.1.2.4 大腸菌線毛抗原 F41 の力価試験

##### 3.5.1.1.2.4.1 試験材料

###### 3.5.1.1.2.4.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.5.1.1.2.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.5.1.1.2.4.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 F41 参照陽性血清 1 (付記 44) については 64 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 (付記 45) を希釈液 3 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 4 (付記 46) の穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9～1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

##### 3.5.1.1.2.4.3 判定

試験群の血清は、80%以上が抗体価 256 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 F41 参照陽性血清 1 は、抗体価 256～512 倍を示さなければならない。

#### 3.5.1.1.2.5 大腸菌 LT<sub>B</sub> の力価試験

##### 3.5.1.1.2.5.1 試験材料

###### 3.5.1.1.2.5.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.5.1.1.2.5.1.2 試験動物



約6週齢の雄 ddY 系マウスを用いる。

#### 3.5.1.1.2.5.2 試験方法

試験動物 15 匹を用い、10 匹を試験群、5 匹を対照群とする。注射材料の 0.5mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 1 (付記 47) については 128 倍から、対照群血清については 8 倍から、希釈液 4 (付記 48) で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 2 (付記 49) を希釈液 4 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 5 (付記 50) の穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 1 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 2 (付記 51) を 100  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9~1.1 である時点反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

#### 3.5.1.1.2.5.3 判定

試験群の血清は、70%以上が抗体価 256 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 8 倍以下でなければならない。

LT<sub>B</sub> 参照陽性血清 1 は、抗体価 256~512 倍を示さなければならない。

#### 3.5.1.2 クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイドの力価試験

##### 3.5.1.2.1 試験材料

##### 3.5.1.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

##### 3.5.1.2.1.2 試験動物

体重 1.8~3.6kg の SPF ニューゼalandホワイト種の兔及び約 5 週齢の ICR 系又は適当と認められたマウスを用いる。

##### 3.5.1.2.2 試験方法

注射材料の 1 mL を、3 週間隔で 2 回、8 匹の兔の皮下に注射する。第 2 回注射後 2 週目に得られた血清について、抗毒素抗体価を測定する。試験動物 8 匹から得られた血清を等量混合する。プール血清の 1、2、3、4 及び 5 倍希釈液をバクト-ペプトン液 (付記 52) で作製する。10L<sub>0</sub> 量 (付記 53) に濃度を調整したクロストリジウム・パーフリンゲンス C 型  $\beta$  毒素液 (付記 54) と各希釈血清を等量混合後、25°C で 1 時間反応させ、氷中に保存する。各混合液を 1 群 5 匹のマウスに 0.2mL ずつ尾静脈内接種し、

24 時間後に観察する。同時に、試験に用いた 10L<sub>0</sub> 量及び 10L<sub>+</sub> 量 (付記 55) 毒素液 1 mL と 10 国際抗毒素単位 (付記 56。以下「IAU」という。) の標準抗毒素 (付記 57) 1 mL との混合液を同様にマウスに接種し毒素量を定量するとき、10L<sub>0</sub> 群では全マウスが生存し、10L<sub>+</sub> 群では 80% 以上のマウスが死亡しなければならない。

#### 3.5.1.2.3 判定

マウスが全数生存している群の最大希釈倍数を 10 倍した値を抗毒素抗体価とし、IAU で表すとき、プール血清の抗毒素抗体価は、10IAU 以上でなければならない。

#### 3.6 小分製品の試験

3.6.1～3.6.8 (略)

#### 3.6.9 力価試験

試験品について 3.5.1 に準じて試験するとき、適合しなければならない。ただし、最終バルクにおいて力価試験を実施する場合には、この試験を行わなくてもよい。

3.6.9.1～3.6.9.2 (略)

4 (略)

付記 1～8 (略)

付記 9 抗 LT<sub>B</sub> 抗原兔ポリクローナル抗体

付記 10～13 (略)

(削る)

付記 14 (略)

付記 15 抗体固相化プレート 1

希釈液 5 (付記 60) で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 1 (付記 61) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 16 ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナ

#### 3.5 小分製品の試験

3.5.1～3.5.8 (略)

#### 3.5.9 力価試験

3.5.9.1～3.5.9.2 (略)

4 (略)

付記 1～8 (略)

付記 9 抗 LT<sub>B</sub> 抗原兔ポリクローナル抗体

付記 10～13 (略)

付記 14 溶出緩衝液

リン酸二水素カリウム

8.2 g

水

94 mL

pH を 9.3 に調整する。

付記 15 (略)

付記 16 抗体固相化プレート 1

希釈液 5 (付記 60) で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 1 (付記 61) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 17 ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナ

<p><u>ル抗体</u> (略)</p>	<p><u>ル抗体</u> (略)</p>
<p>付記 17・付記 18 (略)</p>	<p>付記 18・付記 19 (略)</p>
<p>付記 19 <u>溶出緩衝液</u> リン酸二水素カリウム <math>\frac{8.2}{94}</math> g 水 <math>\frac{94}{94}</math> mL pH を 9.3 に調整する。</p>	<p>(新設)</p>
<p>付記 20 (略)</p>	<p>付記 20 (略)</p>
<p>付記 21 <u>抗体固相化プレート 2</u> 希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1 (付記 63) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。</p>	<p>付記 21 <u>抗体固相化プレート 2</u> 希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1 (付記 63) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。</p>
<p>付記 22 <u>ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体</u> (略)</p>	<p>付記 22 <u>ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体</u> (略)</p>
<p>付記 23 (略)</p>	<p>付記 23 (略)</p>
<p>付記 24 <u>抗体固相化プレート 3</u> 希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原 987P 兎ポリクローナル抗体 (付記 64) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。</p>	<p>付記 24 <u>抗体固相化プレート 3</u> 希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 987P 兎ポリクローナル抗体 (付記 64) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。</p>
<p>付記 25 <u>抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 1</u> (略)</p>	<p>付記 25 <u>抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 1</u> (略)</p>
<p>付記 26・付記 27 (略)</p>	<p>付記 26・付記 27 (略)</p>
<p>付記 28 <u>抗体固相化プレート 4</u> 希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原 F41 兎ポリクローナル抗体 (付記 68) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。</p>	<p>付記 28 <u>抗体固相化プレート 4</u> 希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 F41 兎ポリクローナル抗体 (付記 68) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。</p>

付記 29 抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1  
(略)

付記 30～付記 35 (略)

付記 36 抗原吸着プレート 1

希釈液 5 で  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 70)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K88 を希釈・洗浄液 2 で希釈したものを各穴に  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、精製線毛抗原 K88 の至適濃度は、線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 を 1,024 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 37～付記 39 (略)

付記 40 抗原吸着プレート 2

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 72)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K99 を希釈・洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 K99 濃度は、線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 41・付記 42 (略)

付記 43 抗原吸着プレート 3

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 2 (付記 74)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 987P 濃度は、線毛抗原 987P 参照陽性血

付記 29 抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1  
(略)

付記 30～付記 35 (略)

付記 36 抗原吸着プレート 1

希釈液 5 で  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 70)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K88 を希釈・洗浄液 2 で希釈したものを各穴に  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、精製線毛抗原 K88 の至適濃度は、線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 を 1,024 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 37～付記 39 (略)

付記 40 抗原吸着プレート 2

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 72)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K99 を希釈・洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 K99 濃度は、線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 41・付記 42 (略)

付記 43 抗原吸着プレート 3

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 2 (付記 74)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 987P 濃度は、線毛抗原 987P 参照陽性血

清 2 を 128 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 44・付記 45 (略)

付記 46 抗原吸着プレート 4

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 76)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加え反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 F41 濃度は、線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 47～付記 80 (略)

清 2 を 128 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 44・付記 45 (略)

付記 46 抗原吸着プレート 4

希釈液 5 で  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 76)  $100 \mu\text{L}$  ずつを 96 穴プレートの各穴に加え反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 F41 濃度は、線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 47～付記 80 (略)

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（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）</b></p> <p>1 （略） 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 （略） 2.1.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ 2.1.2.1・2.1.2.2 （略） 2.1.2.3 マスターシード菌 2.1.2.3.1 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、<u>適当と認められた液状培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。</u> 2.1.2.4・2.1.2.5 （略） 2.2 （略） 2.3 原液 2.3.1 （略） 2.3.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液 2.3.2.1 （略） 2.3.2.2 不活化 培養菌液に<u>適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化菌液とする。</u> 2.3.2.3 原液 適当と認められた方法で不活化剤を中和し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。 原液について、<u>3.6</u>の試験を行う。ただし、濃縮前に保存する場合は、保</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（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）</b></p> <p>1 （略） 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 （略） 2.1.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ 2.1.2.1・2.1.2.2 （略） 2.1.2.3 マスターシード菌 2.1.2.3.1 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、<u>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。</u> 2.1.2.4・2.1.2.5 （略） 2.2 （略） 2.3 原液 2.3.1 （略） 2.3.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液 2.3.2.1 （略） 2.3.2.2 不活化 培養菌液に<u>適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化菌液とする。不活化菌液について、3.6の試験を行う。</u> 2.3.2.3 原液 適当と認められた方法で不活化剤を中和し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。 原液について、<u>3.7</u>の試験を行う。ただし、濃縮前に保存する場合は、保</p>

<p>存前の原液について<u>3.6.1</u>及び<u>3.6.3</u>の試験を行う。</p> <p>2.4 (略)</p> <p>2.5 小分製品</p> <p>2.5.1 PCV2ワクチン 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、<u>3.7</u>の試験を行う。</p> <p>2.5.2 Mhpワクチン 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、<u>3.7</u>の試験を行う。</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1～3.4 (略)</p> <p>3.5 培養菌液の試験</p> <p>3.5.1 暗視野顕微鏡下観察試験</p> <p>3.5.1.1 (略)</p> <p>3.5.1.2 試験方法 検体を<u>スライドガラス</u>にとり、暗視野顕微鏡下で鏡検する。</p> <p>3.5.1.3 (略)</p> <p>3.5.2・3.5.3 (略) (削る)</p> <p><u>3.6</u> マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液の試験</p> <p><u>3.6.1</u> (略)</p> <p><u>3.6.2</u> 不活化試験</p> <p><u>3.6.2.1</u> 試験材料</p>	<p>存前の原液について<u>3.7.1</u>及び<u>3.7.3</u>の試験を行う。</p> <p>2.4 (略)</p> <p>2.5 小分製品</p> <p>2.5.1 PCV2ワクチン 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、<u>3.8</u>の試験を行う。</p> <p>2.5.2 Mhpワクチン 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、<u>3.8</u>の試験を行う。</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1～3.4 (略)</p> <p>3.5 培養菌液の試験</p> <p>3.5.1 暗視野顕微鏡下観察試験</p> <p>3.5.1.1 (略)</p> <p>3.5.1.2 試験方法 検体を<u>スライドガラス</u>にとり、暗視野顕微鏡下で鏡検する。</p> <p>3.5.1.3 (略)</p> <p>3.5.2・3.5.3 (略)</p> <p><u>3.6</u> 不活化菌液の試験</p> <p><u>3.6.1</u> 不活化試験</p> <p><u>3.6.1.1</u> 試験材料</p> <p><u>3.6.1.1.1</u> 試料 検体を<u>適当と認められた方法</u>で中和したものを試料とする。</p> <p><u>3.6.1.2</u> 試験方法 <u>不活化前の培養液を陽性対照試料とし、培地に試料、陽性対照試料並びに試料及び陽性対照試料を接種して、適当と認められた方法で培養し、培地の色調を観察する。</u></p> <p><u>3.6.1.3</u> 判定 <u>試料を接種した培地に色調の変化を認めてはならない。また、陽性試料を接種した培地並びに試料及び陽性対照試料を接種した培地には、赤色から黄色への色調の変化を認めなければならない。</u></p> <p><u>3.7</u> マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液の試験</p> <p><u>3.7.1</u> (略)</p> <p><u>3.7.2</u> 不活化試験 <u>3.6.1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、検体を試料とする。</u></p>
--	--

### 3.6.2.1.1 試料

検体を試料とする。

### 3.6.2.2 試験方法

不活化前の培養液を陽性対照試料とする。培地に試料又は陽性対照試料を接種し、陽性対照試料を接種した培地のうち、適当と認められた数の培地に試料を追加で接種する。以上の培地を適当と認められた方法で培養し、培地の色調を観察する。

### 3.6.2.3 判定

試料を接種した培地に色調の変化を認めてはならない。また、陽性試料を接種した培地並びに試料及び陽性対照試料を接種した培地には、赤色から黄色への色調の変化を認めなければならない。

### 3.6.3 抗原定量試験

#### 3.6.3.1・3.6.3.2 (略)

#### 3.6.3.3 試験方法

抗体固相化プレートを洗浄液（付記17）で洗浄し、100 $\mu$ Lのブロッキング液（付記18）を全ての穴に加える。

試料の100 $\mu$ Lずつを該当するプレートの各穴に加え、ピペッティングにより混和した後、最後の列から混合液を100 $\mu$ Lずつ除去し、プレートを35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで約1時間反応させる。

プレートを洗浄液で洗浄し、ブランクとなる各穴に100 $\mu$ Lのブロッキング液を加える。その他各穴に100 $\mu$ Lのモノクローナル抗体（付記19）を加え、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで約1時間間反応させる。

プレートを洗浄液で洗浄し、ブランクの各穴には標識抗体希釈液（付記20）を、その他の各穴には酵素標識抗体をそれぞれ100 $\mu$ L加え、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで約1時間反応させる。反応終了後、プレートを洗浄液で洗浄し、全ての穴に100 $\mu$ Lの基質液を加えて常温で10分間反応させる。反応終了後、全ての穴に100 $\mu$ Lの1 mol/L塩酸を加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。得られた吸光度について、解析ソフトを用い、参照品に対する検体の相対力価を算出する。

#### 3.6.3.4 判定

検体の相対力価は、1.25以上でなければならない。

### 3.7 小分製品の試験

#### 3.7.1 $\sim$ 3.7.3 (略)

#### 3.7.4 抗原定量試験

##### 3.7.4.1 豚サーコウイルス2型感染症抗原定量試験

##### 3.7.4.1.1 試験材料

PCV2ワクチン、参照抗原2（付記21）、陰性対照抗原、陽性対照抗原2

### 3.7.3 抗原定量試験

#### 3.7.3.1・3.7.3.2 (略)

#### 3.7.3.3 試験方法

抗体固相化プレートを洗浄液（付記17）で洗浄し、100 $\mu$ Lのブロッキング液（付記18）を全ての穴に加える。

試料の100 $\mu$ Lずつを該当するプレートの各穴に加え、ピペッティングにより混和した後、最後の列から混合液を100 $\mu$ Lずつ除去し、プレートを35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで約1時間反応させる。

プレートを洗浄液で洗浄し、ブランクとなる各穴に100 $\mu$ Lのブロッキング液を加える。その他各穴に100 $\mu$ Lのモノクローナル抗体（付記19）を加え、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで約1時間間反応させる。

プレートを洗浄液で洗浄し、ブランクの各穴には標識抗体希釈液（付記20）を、その他の各穴には酵素標識抗体をそれぞれ100 $\mu$ L加え、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで約1時間反応させる。反応終了後、プレートを洗浄液で洗浄し、全ての穴に100 $\mu$ Lの基質液を加えて常温で10分間反応させる。反応終了後、全ての穴に100 $\mu$ Lの1 mol/L塩酸を加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。得られた吸光度について、解析ソフトを用い、参照品に対する検体の抗原RPを算出する。

#### 3.7.3.4 判定

検体の抗原RPは、所定の値以上でなければならない。

### 3.8 小分製品の試験

#### 3.8.1 $\sim$ 3.8.3 (略)

(新設)



(付記22)、抗PCV2ORF2豚IgG、抗PCV2ORF2モノクローナル抗体及び酵素標識抗体を用いる。

#### 3.7.4.1.2 試験方法

##### 3.7.4.1.2.1 試料の調製

PCV2ワクチン、参照抗原2、陰性対照抗原及び陽性対照抗原2を洗浄・希釈液でそれぞれ30倍から3倍、段階希釈した各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.7.4.1.2.2 反応

抗PCV2ORF2豚IgGを固相したプレートを用いる。固相プレートにブロッキング緩衝液を250 $\mu$ Lずつ加え、35~39 $^{\circ}$ Cで約60分間反応させた後、洗浄・希釈液で洗浄する。各試料100 $\mu$ Lずつをプレートの3穴に加え、35~39 $^{\circ}$ Cで約60分間反応させる。反応後、プレートを洗浄液で洗浄する。洗浄・希釈液で300倍に希釈した抗PCV2ORF2モノクローナル抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ分注し、35~39 $^{\circ}$ Cで約60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。1 vol% 兔血清加希釈用緩衝液で5,000~20,000倍に希釈した酵素標識抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ分注し、35~39 $^{\circ}$ Cで約45分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。基質液を100 $\mu$ Lずつ各穴に分注し、室温で反応させる。その後、1 mol/L塩酸溶液を100 $\mu$ Lずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

##### 3.7.4.1.2.3 吸光度測定

波長450nmで吸光度を測定する。

##### 3.7.4.1.3 判定

参照抗原2の力価を1.0として、PCV2ワクチンの相対力価を統計学的計算方法により算出する。このとき、PCV2ワクチンの相対力価は、1.0~3.75でなければならない。また、陽性対照抗原2の480倍希釈液の平均吸光度は0.988~2.500であり、陰性対照抗原の30倍希釈液の平均吸光度は0.124以下でなければならない。

#### 3.7.4.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症抗原定量試験

Mhpワクチンについて3.6.3を準用して試験するとき、Mhpワクチンの相対力価は1.0~4.6でなければならない。

##### 3.7.5 (略)

#### 3.7.6 力価試験

##### 3.7.6.1 豚サーコウイルス2型感染症力価試験

小分製品において、豚サーコウイルス2型感染症抗原定量試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

##### 3.7.6.1.1 試験材料

##### 3.7.6.1.1.1・3.7.6.1.1.2 (略)

##### 3.8.4 (略)

#### 3.8.5 力価試験

##### 3.8.5.1 豚サーコウイルス2型感染症力価試験

##### 3.8.5.1.1 試験材料

##### 3.8.5.1.1.1・3.8.5.1.1.2 (略)

### 3.7.6.1.1.3 酵素抗体反応用抗原

固相化抗原 1 (付記23) を用いる。

### 3.7.6.1.2 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0.2mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。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、酵素抗体反応を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清 1 (付記24) 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 1 (付記25) の穴に100  $\mu$ 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°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100  $\mu$ Lずつ加え、37°Cで60分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100  $\mu$ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100  $\mu$ 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。

### 3.7.6.1.3 (略)

### 3.7.6.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

小分製品において、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症抗原定量試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

### 3.7.6.2.1 試験材料

#### 3.7.6.2.1.1・3.7.6.2.1.2 (略)

### 3.7.6.2.1.3 酵素抗体反応用抗原

固相化抗原 2 (付記26) を用いる。

### 3.7.6.2.2 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0.2mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後3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、酵素抗体反応を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清 2 (付記27) 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28) の穴に100  $\mu$ 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°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100  $\mu$ 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、基質液を各穴に100  $\mu$ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100  $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測

### 3.8.5.1.1.3 酵素抗体反応用抗原

固相化抗原 1 (付記21) を用いる。

### 3.8.5.1.2 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0.2mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。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、酵素抗体反応を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清 1 (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 1 (付記23) の穴に100  $\mu$ 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°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100  $\mu$ Lずつ加え、37°Cで60分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100  $\mu$ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100  $\mu$ 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。

### 3.8.5.1.3 (略)

### 3.8.5.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

### 3.8.5.2.1 試験材料

#### 3.8.5.2.1.1・3.8.5.2.1.2 (略)

### 3.8.5.2.1.3 酵素抗体反応用抗原

固相化抗原 2 (付記24) を用いる。

### 3.8.5.2.2 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0.2mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後3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、酵素抗体反応を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清 2 (付記25) 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26) の穴に100  $\mu$ 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°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100  $\mu$ 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、基質液を各穴に100  $\mu$ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100  $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測

<p>定する。  <u>3.7.6.2.3</u> (略)  4 (略)</p> <p>付記1～付記4 (略)</p> <p>付記5 抗PCV2ORF2豚IgG  ワクチンで免疫したCDCD(帝王切開由来初乳未摂取)豚血清から精製した抗PCV2ORF2豚IgGであって、間接蛍光抗体価が1,500倍以上のもの。  吸着用緩衝液(付記29)で希釈して用いる。</p> <p>付記6～付記12 (略)</p> <p>付記13 参照品  マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ製造方法により製造されたワクチンで、豚での攻撃試験により有効性が確認されたもので相対力価が約1.0のもの。参照品が更新される際には、同じ製造方法により製造され、<u>相対力価</u>が1.0になるように調整した後、豚での攻撃試験で現行参照品と同等の有効性が担保されなければならない。</p> <p>付記14 陽性対照  マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ方法により製造されたワクチンで、抗原定量試験における吸光度は0.542～1.578のもの。陽性対照を更新する場合は、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ方法により製造し、抗原定量試験における吸光度が0.542～1.578を示すように<u>調製する</u>。</p> <p>付記15 陰性対照  マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原の製造用培地にアジュバントを加えて調製されたもので、抗原定量試験における吸光度は0.081以下を示す。陰性対照を更新する場合は、元の陰性対照と同じ方法により製造し、抗原定量試験における吸光度が0.081以下を示すよ</p>	<p>定する。  <u>3.8.5.2.3</u> (略)  4 (略)</p> <p>付記1～付記4 (略)</p> <p>付記5 抗PCV2ORF2豚IgG  ワクチンで免疫したCDCD(帝王切開由来初乳未摂取)豚血清から精製した抗PCV2ORF2豚IgGであって、間接蛍光抗体価が1,500倍以上のもの。  吸着用緩衝液(付記27)で希釈して用いる。</p> <p>付記6～付記12 (略)</p> <p>付記13 参照品  マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ製造方法により製造されたワクチンで、豚での攻撃試験により有効性が確認されたもので相対力価 <u>(RP)</u> が約1.0のもの。参照品が更新される際には、同じ製造方法により製造され、<u>RP</u>が1.0になるように調整した後、豚での攻撃試験で現行参照品と同等の有効性が担保されなければならない。</p> <p>付記14 陽性対照  マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ方法により製造されたワクチンで、抗原定量試験における吸光度は0.542～1.578のもの。陽性対照を更新する場合は、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ方法により製造し、抗原定量試験における吸光度が0.542～1.578を示すように<u>調整する</u>。</p> <p>付記15 陰性対照  マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原の製造用培地にアジュバントを加えて調製されたもので、抗原定量試験における吸光度は0.081以下を示す。陰性対照を更新する場合は、元の陰性対照と同じ方法により製造し、抗原定量試験における吸光度が0.081以下を示すよ</p>
---	--

うに調製する。

付記16 抗体固相化プレート

96穴平底プレートにトリス緩衝食塩液（付記30）で希釈した捕捉抗体2（付記31）を加えて35～39℃で約1時間静置した後、洗浄液で洗浄後、ブロッキング液を加えて2～8℃で16～24時間静置したもの

付記17～付記19 （略）

付記20 標識抗体希釈液

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	8.766	g
スキムミルク	50.0	g
ポリソルベート20	0.5	g
豚血清	50.0	mL
注射用水		残量

トリスヒドロキシメチルアミノメタンと塩化ナトリウムを適量の注射用水に溶かし、pHを7.2～7.4に調整する。残りの原料を加え、分散させた後、注射用水を加えて1,000mLとする。

付記21 参照抗原2

ワクチンの製造方法で製造された、参照陽性抗原1に対する相対力価4.45のPCV2ORF2抗原52容に、ワクチンのアジュバントを20容及び生理食塩液を28容加えたもの。

更新する場合には、元の参照抗原2に対する相対力価が1.0となり、豚への免疫原性が、元の参照抗原2のそれと同等となるよう調製する。

〃

付記22 陽性対照抗原2

ワクチンの製造方法で製造された、参照抗原1に対する相対力価4.45のPCV2ORF2抗原液8容にワクチンのアジュバントを2容加えたもの。

更新する場合には、元の陽性対照抗原2との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。

付記23 （略）

うに調整する。

付記16 抗体固相化プレート

96穴平底プレートにトリス緩衝食塩液（付記28）で希釈した捕捉抗体2（付記29）を加えて35～39℃で約1時間静置した後、洗浄液で洗浄後、ブロッキング液を加えて2～8℃で16～24時間静置したもの

付記17～付記19 （略）

付記20 標識抗体希釈液

1,000mL中

トリスヒドロキシメチルアミノエタン	2.42	g
塩化ナトリウム	8.766	g
スキムミルク	50.0	g
ポリソルベート20	0.5	g
豚血清	50.0	mL
注射用水		残量

トリスヒドロキシメチルアミノメタンと塩化ナトリウムを適量の注射用水に溶かし、pHを7.2～7.4に調整する。残りの原料を加え、分散させた後、注射用水を加えて1,000mLとする。

（新設）

（新設）

付記21 （略）

付記24 参照陽性血清 1  
混合ワクチンで免疫したddY系マウスの血清であって、3.7.6.1の試験により抗体価が640～1280倍となるように濃度を調整したもの

付記25・付記26 (略)

付記27 参照陽性血清 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た抗原で免疫したマウスの血清であって、3.7.6.2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

付記28～付記31 (略)

付記22 参照陽性血清 1  
混合ワクチンで免疫したddY系マウスの血清であって、3.8.5.1の試験により抗体価が640～1280倍となるように濃度を調整したもの

付記23・付記24 (略)

付記25 参照陽性血清 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た抗原で免疫したマウスの血清であって、3.8.5.2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

付記26～付記29 (略)

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード）</b></p> <p>1 （略）</p> <p>2 製法</p> <p>2.1・2.2 （略）</p> <p>2.3 原液</p> <p>2.3.1 （略）</p> <p>2.3.2 ウイルスの培養</p> <p>プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。</p> <p><u>原液に相当と認められた必要最少量の抗生物質又は原液に相当と認められた必要最少量の抗生物質及び安定剤を加えてもよい。</u></p> <p>原液について 3.4 の試験を行う。</p> <p><u>なお、最終バルクについて 3.5 の試験を行う場合は、3.4.2 の試験を行わない。</u></p> <p>2.4 最終バルク</p> <p>原液を混合し、相当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、最終バルクとする。この場合、相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p> <p>小分製品が錠剤である製剤については、原液を混合して凍結乾燥し、相当と認められた賦形剤及び滑沢剤を加えて調製し、最終バルクとする。</p> <p><u>小分製品が粒状に凍結乾燥された製剤については、原液を規定量ずつ凍結乾燥させたものを最終バルクとする。</u></p> <p><u>粒状に凍結乾燥した最終バルクについて 3.5 の試験を行う。</u></p> <p>2.5 小分製品</p> <p>最終バルクを小分容器に分注して凍結乾燥し、小分製品とする。</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード）</b></p> <p>1 （略）</p> <p>2 製法</p> <p>2.1・2.2 （略）</p> <p>2.3 原液</p> <p>2.3.1 （略）</p> <p>2.3.2 ウイルスの培養</p> <p>プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。</p> <p>原液に相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p> <p>原液について 3.4 の試験を行う。</p> <p>2.4 最終バルク</p> <p>原液を混合し、相当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、最終バルクとする。この場合、相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p> <p>小分製品が錠剤である製剤については、原液を混合して凍結乾燥し、相当と認められた賦形剤及び滑沢剤を加えて調製し、最終バルクとする。</p> <p>2.5 小分製品</p> <p>最終バルクを小分容器に分注して凍結乾燥し、小分製品とする。</p>

小分製品が錠剤である製剤については、最終バルクを錠剤に成型し、小分製品とする。

小分製品が粒状に凍結乾燥された製剤については、規定量となる分量を小分容器に充填し、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

3.1～3.4 (略)

#### 3.5 最終バルクの試験

##### 3.5.1 ウイルス含有量試験

##### 3.5.1.1 試験材料

##### 3.5.1.1.1 試料

検体を注射用水100mLで溶解し、トリプトース溶液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

##### 3.5.1.2 試験方法

試料0.2mLずつをそれぞれ10個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37°Cで3日間培養する。培養終了後2～8°Cに2時間静置した後、尿膜腔液を採取し、酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）を行う。

試料を注射した発育鶏卵の尿膜腔液と参照陰性対照（付記2）の各50μLを、予めEIA緩衝液（付記3）を50μLずつ加えた抗体固相化プレート（付記4）の各穴に加える。尿膜腔液は1穴、参照陰性対照は6穴とする。参照陽性対照（付記5）は2倍階段希釈になるように、EIA緩衝液で無希釈から128倍まで希釈した100μLを1穴に加える。2穴にはEIA緩衝液の100μLを加える。37°Cで1時間反応させた後、洗浄液（付記6）で3回洗浄する。次に、各穴に検出抗体（付記7）を100μL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。次に、酵素標識抗体液（付記8）を100μLずつ加え、45分間反応させた後、洗浄液（付記6）で3回洗浄及び水で1回洗浄する。発色用基質液（付記9）を各穴に100μLずつ加え、10分間反応させた後、2 mol/L硫酸を50μLずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を450nmで測定する。

##### 3.5.1.3 判定

参照陰性対照の平均吸光度の少なくとも1.5倍の吸光度を示した尿膜腔液を感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

小分製品が錠剤である製剤については、最終バルクを錠剤に成型し、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

3.1～3.4 (略)

(新設)

### 3.6 小分製品の試験

3.6.1～3.6.8 (略)

#### 3.6.9 力価試験

それぞれのワクチンについて、3.6.9.1の試験又は3.6.9.2の試験のいずれかを行う。

##### 3.6.9.1 (略)

#### 3.6.9.2 抗体量測定試験

##### 3.6.9.2.1 試験材料

3.6.9.2.1.1・3.6.9.2.1.2 (略)

##### 3.6.9.2.1.3 酵素抗体反応用抗原 (略)

##### 3.6.9.2.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。試験群に、接種材料0.03mLずつを点眼接種し、対照群と共に3～4週間観察する。観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

試験終了時、試験群及び対照群から得られた血清についてELISAを行う。各群の血清は、それぞれ等量をプールする。

試験群と対照群のプール血清及び陽性血清(付記11)を血清希釈液(付記12)で50倍に希釈したものを、それぞれELISA用抗原吸着プレート(付記13)の3穴に100 $\mu$ Lずつ加える。37°Cで60分間反応させた後、洗浄液(付記14)で洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体液(付記15)を100 $\mu$ Lずつ加え、37°Cで60分間反応させた後、洗浄液(付記14)で洗浄する。発色用基質液(付記9)を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37°Cで30分間反応させた後、1 mol/Lリン酸水溶液を100 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を450nmで測定する。

3.6.9.2.3 (略)

3.6.10 (略)

4 (略)

#### 付記1 トリプトース溶液

トリプトース	25	g
水		残量

121°Cで15～30分間高圧蒸気滅菌したもの。必要最小限の抗生物質を加えてもよい。

### 3.5 小分製品の試験

3.5.1～3.5.8 (略)

#### 3.5.9 力価試験

それぞれのワクチンについて、3.5.9.1の試験又は3.5.9.2の試験のいずれかを行う。

##### 3.5.9.1 (略)

#### 3.5.9.2 抗体量測定試験

##### 3.5.9.2.1 試験材料

3.5.9.2.1.1・3.5.9.2.1.2 (略)

##### 3.5.9.2.1.3 酵素抗体反応(以下、ELISAという。)用抗原 (略)

##### 3.5.9.2.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。試験群に、接種材料0.03mLずつを点眼接種し、対照群と共に3～4週間観察する。観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

試験終了時、試験群及び対照群から得られた血清についてELISAを行う。各群の血清は、それぞれ等量をプールする。

試験群と対照群のプール血清及び陽性血清(付記1)を血清希釈液(付記2)で50倍に希釈したものを、それぞれELISA用抗原吸着プレート(付記3)の3穴に100 $\mu$ Lずつ加える。37°Cで60分間反応させた後、洗浄液(付記4)で洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体液(付記5)を100 $\mu$ Lずつ加え、37°Cで60分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。発色用基質液(付記6)を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37°Cで30分間反応させた後、1 mol/Lリン酸水溶液を100 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を450nmで測定する。

3.5.9.2.3 (略)

3.5.10 (略)

4 (略)

(新設)



<p>付記2 <u>参照陰性対照</u>  <u>生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵から採取した鶏伝染性気管支炎ウイルス陰性の尿膜腔液</u></p>	(新設)
<p>付記3 <u>EIA 緩衝液</u>  <u>1,000mL 中</u>  <u>塩化ナトリウム</u>                    <u>29.22 g</u>  <u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u>            <u>2.31 g</u>  <u>リン酸水素二ナトリウム二水和物</u>            <u>24.06 g</u>  <u>ポリソルベート 20</u>                    <u>200.50 g</u>  <u>ウシ血清アルブミン</u>                    <u>1.00 g</u>  <u>水</u>    <u>残 量</u>  <u>孔径 0.22µm のメンブランフィルターでろ過する。</u></p>	(新設)
<p>付記4 <u>抗体固相化プレート</u>  <u>製造用株に特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の培養上清を 0.04mol/L リン酸緩衝食塩液 (付記 10) で適当な濃度に希釈し、希釈液を 96 穴プレートの各穴に 100µL ずつ加え、37°C で 3 時間静置して固相化した後、洗浄液で 3 回洗浄したもの</u></p>	(新設)
<p>付記5 <u>参照陽性対照</u>  <u>製造用株を生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵の尿膜腔内で培養して採取した尿膜腔液で、EIA 緩衝液 (付記 3) で指摘濃度に希釈したもの</u></p>	(新設)
<p>付記6 <u>洗浄液</u>  <u>1,000mL 中</u>  <u>塩化ナトリウム</u>                    <u>37.2 g</u>  <u>塩化カリウム</u>                        <u>0.2 g</u>  <u>リン酸二水素カリウム</u>                    <u>0.2 g</u>  <u>リン酸水素二ナトリウム</u>                    <u>1.15 g</u></p>	(新設)

水	残 量								
<p>付記7 <u>検出抗体</u>  <u>製造用株を生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の鶏に免疫して得られた血清を EIA 緩衝液 (付記 3) で至適濃度に希釈したもの</u></p>	(新設)								
<p>付記8 <u>酵素標識抗体液</u>  <u>山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体を EIA 緩衝液 (付記 3) で至適濃度に希釈したもの</u></p>	(新設)								
<p>付記9 <u>発色用基質液</u>  <u>テトラメチルベンジジン (TMB) を用いる。</u></p>	(新設)								
<p>付記10 <u>0.04mol/L リン酸緩衝食塩液</u>  <u>1000mL 中</u></p> <table data-bbox="264 849 846 1002"> <tr> <td><u>塩化ナトリウム</u></td> <td><u>37.2 g</u></td> </tr> <tr> <td><u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u></td> <td><u>1.43 g</u></td> </tr> <tr> <td><u>リン酸水素二ナトリウム二水和物</u></td> <td><u>6.02 g</u></td> </tr> <tr> <td><u>水</u></td> <td><u>残 量</u></td> </tr> </table>	<u>塩化ナトリウム</u>	<u>37.2 g</u>	<u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u>	<u>1.43 g</u>	<u>リン酸水素二ナトリウム二水和物</u>	<u>6.02 g</u>	<u>水</u>	<u>残 量</u>	(新設)
<u>塩化ナトリウム</u>	<u>37.2 g</u>								
<u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u>	<u>1.43 g</u>								
<u>リン酸水素二ナトリウム二水和物</u>	<u>6.02 g</u>								
<u>水</u>	<u>残 量</u>								
<p>付記11 <u>陽性血清</u>  <u>生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の鶏に製造用株を点眼接種して免疫した血清であり、発育鶏卵を用いてウイルス希釈法により中和指数を算出するとき、中和指数は 2.0 以上を示すよう血清希釈液で希釈したもの</u></p>	<p>付記1 <u>陽性血清</u>  <u>生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の鶏に製造用株を点眼接種して免疫した血清であり、発育鶏卵を用いてウイルス希釈法により中和指数を算出するとき、中和指数は 2.0 以上を示すよう血清希釈液で希釈したもの。</u></p>								
<p>付記12 <u>血清希釈液</u>  <u>洗浄液 (付記14) 100mL にスキムミルク 1 g を溶解したもの</u></p>	<p>付記2 <u>血清希釈液</u>  <u>洗浄液 100mL にスキムミルク 1 g を溶解したもの。</u></p>								
<p>付記13 <u>ELISA用抗原吸着プレート</u>  <u>ELISA 用抗原を 0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液 (付記 16) で 1 mL 中</u></p>	<p>付記3 <u>ELISA用抗原吸着プレート</u></p>								

10<sup>5.5</sup>EID<sub>50</sub>以上となるように25倍以上に希釈したものをプレートにそれぞれ100μLずつ加え、37°Cで60分間静置し、固相化する。固相化したプレートを洗浄液で洗浄し、ブロッキング液(付記17)を300μLずつ加え、37°Cで60分間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの

付記14・付記15 (略)

(削る)

付記16 0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液

pH9.6になるように、0.05mol/L炭酸ナトリウム溶液と0.05mol/L炭酸水素ナトリウム溶液を混合したもの

0.05mol/L炭酸ナトリウム溶液

1,000mL中

炭酸ナトリウム	5.3 g
精製水	残量

0.05mol/L炭酸水素ナトリウム溶液

1,000mL中

炭酸水素ナトリウム	4.2 g
精製水	残量

付記17 ブロッキング液

洗浄液(付記14)100mLにスキムミルク5gを溶解したもの

ELISA用抗原を0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液(付記7)で1mL中10<sup>5.5</sup>EID<sub>50</sub>以上となるように25倍以上に希釈したものをプレートにそれぞれ100μLずつ加え、37°Cで60分間静置し、固相化する。固相化したプレートを洗浄液で洗浄し、ブロッキング液(付記8)を300μLずつ加え、37°Cで60分間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記4・付記5 (略)

付記6 発色用基質液

テトラメチルベンジジン(TMB)を用いる。

付記7 0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液

pH9.6になるように、0.05mol/L炭酸ナトリウム溶液と0.05mol/L炭酸水素ナトリウム溶液を混合したもの。

0.05mol/L炭酸ナトリウム溶液

1,000mL中

炭酸ナトリウム	5.3 g
精製水	残量

0.05mol/L炭酸水素ナトリウム溶液

1,000mL中

炭酸水素ナトリウム	4.2 g
精製水	残量

pH9.6になるように、0.05mol/L炭酸ナトリウム溶液と0.05mol/L炭酸水素ナトリウム溶液を混合する。

付記8 ブロッキング液

洗浄液100mLにスキムミルク5gを溶解したもの。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月3日農林水産省告示第1567号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加える。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ（A・C型）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</b></p> <p>1・2 （略） 3 試験法 3.1～3.6 （略） 3.7 小分製品の試験 3.7.1～3.7.4 （略） 3.7.5 力価試験 3.7.5.1 ニューカッスル病力価試験 3.7.5.1.1～3.7.5.1.3 （略） 3.7.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験 3.7.5.2.1 （略） 3.7.5.2.2 試験方法 3.7.4の試験最終日に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、血清希釈法により中和試験を行う。<u>各群の血清は、それぞれ等量をプールし、非働化する。</u> 血清を細胞増殖用培養液（付記2）で20倍に希釈した後、更に5倍階段希釈し、各段階の希釈液に0.4mL中200PFUとなるように濃度を調整した中和試験用ウイルス液を等量混合し、4℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した液0.4mLずつをそれぞれ4枚以上の鶏腎初代細胞を培養したシャーレに接種し、37℃で60分間吸着させ第1次重層寒天培地（付記3）を重層し、2日後更に第2次重層寒天培地（付記4）を重層し、24～48時間培養し、ブラックの出現を観察する。 3.7.5.2.3 （略）</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ（A・C型）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</b></p> <p>1・2 （略） 3 試験法 3.1～3.6 （略） 3.7 小分製品の試験 3.7.1～3.7.4 （略） 3.7.5 力価試験 3.7.5.1 ニューカッスル病力価試験 3.7.5.1.1～3.7.5.1.3 （略） 3.7.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験 3.7.5.2.1 （略） 3.7.5.2.2 試験方法 3.7.4の試験最終日に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、血清希釈法により中和試験を行う。<u>各群ごとに血清をそれぞれ等量プールし、非働化する。</u> 血清を細胞増殖用培養液（付記2）で20倍に希釈した後、更に5倍階段希釈し、各段階の希釈液に0.4mL中200PFUとなるように濃度を調整した中和試験用ウイルス液を等量混合し、4℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した液0.4mLずつをそれぞれ4枚以上の鶏腎初代細胞を培養したシャーレに接種し、37℃で60分間吸着させ第1次重層寒天培地（付記3）を重層し、2日後更に第2次重層寒天培地（付記4）を重層し、24～48時間培養し、ブラックの出現を観察する。 3.7.5.2.3 （略）</p>

3.7.5.3 鶏伝染性コリナーザ (A型) 力価試験

3.7.5.3.1 試験材料

3.7.5.3.1.1 (略)

3.7.5.3.1.2 赤血球凝集抗原

A型参照抗原 (付記5) を用いる。

3.7.5.3.2 試験方法

3.7.4の試験最終日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、鶏伝染性コリナーザ (A型) 赤血球凝集抑制試験を行う。

3.7.5.3.3 (略)

3.7.5.4 鶏伝染性コリナーザ (C型) 力価試験

3.7.5.4.1 試験材料

3.7.5.4.1.1 試験動物

3.7.4の試験に用いた動物を用いる。

3.7.5.4.1.2 ELISA

鶏伝染性コリナーザ (C型) 菌の破碎抗原 (付記6)、抗HAモノクローナル抗体 (付記7)、参照陽性血清 (C型のみ) (付記8)、参照陰性血清 (付記9) 及び酵素標識抗体 (付記10) を用いる。

3.7.5.4.1.3 検体

3.7.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清を検体とする。

3.7.5.4.2 試験方法

鶏伝染性コリナーザ (C型) 菌の破碎抗原を炭酸緩衝液 (付記11) で希釈し、ELISA用マイクロプレートの各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩吸着させる。このプレートを洗淨液 (付記12) で洗淨し、各穴にブロッキング液 (付記13) を100 $\mu$ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間感作する。プレートを洗淨液で洗淨後、希釈液 (付記14) で10倍に希釈した検体及び参照陰性血清並びに120倍、960倍及び7680倍に希釈した参照陽性血清を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。プレートを洗淨液で洗淨後、希釈液で希釈した抗HAモノクローナル抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。プレートを洗淨液で洗淨後、希釈液で希釈した酵素標識抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。プレートを洗淨液で洗淨後、基質溶液 (付記15) を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、遮光して30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、反応停止液 (付記16) を各穴に100 $\mu$ L加え、発色液に適切な波長で測定し、OD値を求める。

3.7.5.4.3 判定

3.7.5.3 鶏伝染性コリナーザ (A・C型) 力価試験

3.7.5.3.1 試験材料

3.7.5.3.1.1 (略)

3.7.5.3.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリナーザ (A型) 診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリナーザ (C型) 赤血球凝集抗原 (付記5) を用いる。

3.7.5.3.2 試験方法

3.7.4の試験最終日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、鶏伝染性コリナーザ (A型) 赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリナーザ (C型) 赤血球凝集抑制試験を行う。

3.7.5.3.3 (略)

(新設)

<p>次式に従い、検体及び各参照陽性血清で阻止率を計算する。  <u>阻止率 (%) = 100 × (1 - 検体のOD / 参照陰性血清のOD)</u>  <u>阻止率が45%以上を陽性とする。</u>  <u>ELISA試験において、試験群の70%以上が陽性でなければならない。この場合、対照群では、全て陰性でなければならない。また、参照陽性血清の120倍での阻止率は57~76%でなければならない。</u>  <b>3.7.5.5</b> マイコプラズマ・ガリセプチカム力価試験  <b>3.7.5.5.1</b> 試験材料  <b>3.7.5.5.1.1</b> 試験動物  (略)  <b>3.7.5.5.1.2</b> 赤血球凝集抗原  マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原 (付記17) を用いる。  <b>3.7.5.5.2</b>・<b>3.7.5.5.3</b> (略)  4 (略)  付記1～付記4 (略)  付記5 <u>A型参照抗原</u>  <u>アビバクテリウム・パラガリナルムA型菌を適当な方法で処理した、赤血球凝集価が80倍以上のもの。</u>  付記6 <u>鶏伝染性コリーザ (C型) 菌の破碎抗原</u>  <u>アビバクテリウム・パラガリナルムC型菌KA株の不活化菌液を適当な方法で処理し、至適濃度に希釈したもの。</u>  付記7 <u>抗HAモノクローナル抗体</u>  <u>アビバクテリウム・パラガリナルムC型菌に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ8C1C株の培養上清を適当な方法で精製し、至適濃度に希釈したもの。</u>  付記8 <u>参照陽性血清 (C型のみ)</u>  <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の鶏をアビバクテリウム・パラガリナルムC型抗原で免疫した血清であり、鶏伝染性コリーザ (C型) 赤血球凝集抑制試験を行うときHI抗体価80倍を示し、鶏伝染性コリーザ (A型) 赤血球凝集抑制試験を行うときHI抗体価は5倍未満を示すもの。</u></p>	<p><b>3.7.5.4</b> マイコプラズマ・ガリセプチカム力価試験  <b>3.7.5.4.1</b> 試験材料  <b>3.7.5.4.1.1</b> 試験動物  (略)  <b>3.7.5.4.1.2</b> 赤血球凝集抗原  マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原 (付記6) を用いる。  <b>3.7.5.4.2</b>・<b>3.7.5.4.3</b> (略)  4 (略)  付記1～付記4 (略)  付記5 <u>鶏伝染性コリーザ (C型) 赤血球凝集抗原</u>  <u>アビバクテリウム・パラガリナルムC型菌を適当な方法で処理し、1 vol%固定鶏赤血球を用いて反応を行うとき、赤血球凝集価が80倍以上のもの。</u>  (新設)  (新設)  (新設)</p>
--	--

<p>付記9 <u>参照陰性血清</u>  <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の鶏の血清で、鶏伝染性コリーザ赤血球凝集抑制試験を行うとき、A型及びC型においてHI抗体価5倍未満を示すもの。</u></p>	(新設)
<p>付記10 <u>酵素標識抗体</u>  <u>市販のペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗血清を用いる。</u></p>	(新設)
<p>付記11 <u>炭酸緩衝液</u>  <u>1,000mL中</u>  <u>炭酸ナトリウム</u> 1.59 g  <u>炭酸水素ナトリウム</u> 2.93 g  <u>水</u> 残量</p>	(新設)
<p>付記12 <u>洗浄液</u>  <u>1,000mL中</u>  <u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u> 2.9 g  <u>リン酸二水素カリウム</u> 0.2 g  <u>塩化ナトリウム</u> 8.0 g  <u>塩化カリウム</u> 0.2 g  <u>ポリソルベート20</u> 0.5 mL  <u>水</u> 残量</p>	(新設)
<p>付記13 <u>ブロッキング液</u>  <u>洗浄液に牛血清アルブミンを1 vol%になるように溶解したもの。</u></p>	(新設)
<p>付記14 <u>希釈液</u>  <u>洗浄液に牛血清アルブミンを1 vol%になるように溶解したもの。</u></p>	(新設)
<p>付記15 <u>基質溶液</u>  <u>3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを含む市販の基質溶液を用いる。</u></p>	(新設)
<p>付記16 <u>反応停止液</u>  <u>水に濃硫酸56.1mLを加え500mLとしたもの。</u></p>	(新設)
<p>付記17 (略)</p>	<p>付記6 (略)</p>

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>ジステンパー・犬アデノウイルス（2型） 感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボ ウイルス感染症混合生ワクチン（シード）</b></p> <p>1 （略） 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 ジステンパーウイルス 2.1.1.1～2.1.1.4 （略） 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス 2.1.1.5.1 増殖及び保存 プロダクションシードウイルスは、<u>適当と認められた培養細胞で増殖させる。</u> プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃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ウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。</p> <p>2.1.2 犬アデノウイルス（2型） 2.1.2.1～2.1.2.4 （略） 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス 2.1.2.5.1 増殖及び保存 プロダクションシードウイルスは、<u>適当と認められた培養細胞で増殖させる。</u> プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃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ウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p style="text-align: center;"><b>ジステンパー・犬アデノウイルス（2型） 感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボ ウイルス感染症混合生ワクチン（シード）</b></p> <p>1 （略） 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 ジステンパーウイルス 2.1.1.1～2.1.1.4 （略） 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス 2.1.1.5.1 増殖、<u>継代</u>及び保存 プロダクションシードウイルスは、<u>適当と認められた培養細胞で増殖する。</u> プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃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ウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。</p> <p>2.1.2 犬アデノウイルス（2型） 2.1.2.1～2.1.2.4 （略） 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス 2.1.2.5.1 増殖、<u>継代</u>及び保存 プロダクションシードウイルスは、<u>適当と認められた培養細胞で増殖する。</u> プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃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ウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を</p>



<p>行う。</p> <p>2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス</p> <p>2.1.3.1 (略)</p> <p>2.1.3.2 性状 犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する、又はVero細胞でCPEを伴って増殖する。</p> <p>2.1.3.3・2.1.3.4 (略)</p> <p>2.1.3.5 プロダクションシードウイルス</p> <p>2.1.3.5.1 増殖及び保存 プロダクションシードウイルスは、<u>適当と認められた培養細胞で増殖させる。</u> プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃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ウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。</p> <p>2.1.4 犬パルボウイルス</p> <p>2.1.4.1 名称 弱毒犬パルボウイルス154株又は<u>これと同等と認められた株</u></p> <p>2.1.4.2～2.1.4.4 (略)</p> <p>2.1.4.5 プロダクションシードウイルス</p> <p>2.1.4.5.1 増殖及び保存 プロダクションシードウイルスは、<u>適当と認められた培養細胞で増殖させる。</u> プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃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ウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。</p> <p>2.2 製造用材料</p> <p>2.2.1 ジステンパーウイルス</p> <p>2.2.1.1～2.2.1.4 (略)</p> <p>2.2.1.5 プロダクションセルシード</p> <p>2.2.1.5.1 増殖及び保存 プロダクションセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させる。 プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保</p>	<p>行う。</p> <p>2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス</p> <p>2.1.3.1 (略)</p> <p>2.1.3.2 性状 犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する。</p> <p>2.1.3.3・2.1.3.4 (略)</p> <p>2.1.3.5 プロダクションシードウイルス</p> <p>2.1.3.5.1 増殖、<u>継代</u>及び保存 プロダクションシードウイルスは、<u>適当と認められた培養細胞で増殖する。</u> プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃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ウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。</p> <p>2.1.4 犬パルボウイルス</p> <p>2.1.4.1 名称 弱毒犬パルボウイルス154株又は<u>製造に適当と認められた株</u></p> <p>2.1.4.2～2.1.4.4 (略)</p> <p>2.1.4.5 プロダクションシードウイルス</p> <p>2.1.4.5.1 増殖、<u>継代</u>及び保存 プロダクションシードウイルスは、<u>適当と認められた培養細胞で増殖する。</u> プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃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ウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。</p> <p>2.2 製造用材料</p> <p>2.2.1 ジステンパーウイルス</p> <p>2.2.1.1～2.2.1.4 (略)</p> <p>2.2.1.5 プロダクションセルシード</p> <p>2.2.1.5.1 増殖、<u>継代</u>及び保存 プロダクションセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖する。 プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保</p>
---	---

<p>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。  <u>プロダクションセルシード</u>を保存する場合について、3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.2.2 犬アデノウイルス（2型）  2.2.2.1～2.2.2.4 （略）  2.2.2.5 プロダクションセルシード  2.2.2.5.1 増殖及び保存  プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させる。  プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃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。  <u>プロダクションセルシード</u>を保存する場合について、3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス  2.2.3.1～2.2.3.4 （略）  2.2.3.5 プロダクションセルシード  2.2.3.5.1 増殖及び保存  プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させる。  プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃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。  <u>プロダクションセルシード</u>を保存する場合について、3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.2.4 犬パルボウイルス  2.2.4.1～2.2.4.4 （略）  2.2.4.5 プロダクションセルシード  2.2.4.5.1 増殖及び保存  プロダクションセルシードは、2.2.4.2の培養液で増殖させる。  プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃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。  <u>プロダクションセルシード</u>を保存する場合について、3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.3 原液  2.3.1 ジステンパーウイルス原液  2.3.1.1 （略）</p>	<p>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。  <u>プロダクションシードウイルス</u>を保存する場合について、3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.2.2 犬アデノウイルス（2型）  2.2.2.1～2.2.2.4 （略）  2.2.2.5 プロダクションセルシード  2.2.2.5.1 増殖、<u>継代</u>及び保存  プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖する。  プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃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。  <u>プロダクションシードウイルス</u>を保存する場合について、3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス  2.2.3.1～2.2.3.4 （略）  2.2.3.5 プロダクションセルシード  2.2.3.5.1 増殖、<u>継代</u>及び保存  プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖する。  プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃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。  <u>プロダクションシードウイルス</u>を保存する場合について、3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.2.4 犬パルボウイルス  2.2.4.1～2.2.4.4 （略）  2.2.4.5 プロダクションセルシード  2.2.4.5.1 増殖、<u>継代</u>及び保存  プロダクションセルシードは、2.2.4.2の培養液で増殖する。  プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃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。  <u>プロダクションシードウイルス</u>を保存する場合について、3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.3 原液  2.3.1 ジステンパーウイルス原液  2.3.1.1 （略）</p>
--	---

<p>2.3.1.2 ウイルスの培養  プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、<u>適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液又は遠心上清を原液とする。</u>必要に応じて<u>適当と認められた安定剤を添加してもよい。</u>  原液について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。</p> <p>2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液  2.3.2.1 （略）  2.3.2.2 ウイルスの培養  プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、<u>適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液又は遠心上清を原液とする。</u>  原液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。</p> <p>2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液  2.3.3.1 （略）  2.3.3.2 ウイルスの培養  プロダクションシードウイルスを2.3.3.1の細胞で培養し、<u>適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液又は遠心上清を原液とする。</u>必要に応じて<u>適当と認められた安定剤を添加してもよい。</u>  原液について、3.3.1及び3.3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.3.4 犬パルボウイルス原液  2.3.4.1 （略）  2.3.4.2 ウイルスの培養  プロダクションシードウイルスを2.3.4.1の細胞で培養し、<u>適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを原液とする。</u>  原液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。</p> <p>2.4・2.5 （略）</p> <p>3 試験法  3.1 製造用株の試験  3.1.1 マスターシードウイルスの試験  3.1.1.1 同定試験  シードロット規格の<u>1.4.2.1.1.1</u>を準用して試験するとき、<u>適合しなければならない。</u></p> <p>3.1.1.2～3.1.1.7 （略）  3.1.2・3.1.3 （略）  3.2・3.3 （略）  3.4 小分製品の試験</p>	<p>2.3.1.2 ウイルスの培養  プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、<u>適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。</u>  原液について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。</p> <p>2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液  2.3.2.1 （略）  2.3.2.2 ウイルスの培養  プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、<u>適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。</u>  原液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。</p> <p>2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液  2.3.3.1 （略）  2.3.3.2 ウイルスの培養  プロダクションシードウイルスを2.3.3.1の細胞で培養し、<u>適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。</u>  原液について、3.3.1及び3.3.2.3の試験を行う。</p> <p>2.3.4 犬パルボウイルス原液  2.3.4.1 （略）  2.3.4.2 ウイルスの培養  プロダクションシードウイルスを2.3.4.1の細胞で培養し、<u>適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを原液とする。</u>  原液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。</p> <p>2.4・2.5 （略）</p> <p>3 試験法  3.1 製造用株の試験  3.1.1 マスターシードウイルスの試験  3.1.1.1 同定試験  シードロット規格の<u>1.4.2.1.1.2</u>を準用して試験するとき、<u>適合しなければならない。</u></p> <p>3.1.1.2～3.1.1.7 （略）  3.1.2・3.1.3 （略）  3.2・3.3 （略）  3.4 小分製品の試験</p>
--	--

<p>3.4.1 (略)</p> <p>3.4.2 真空度試験  一般試験法の真空度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、窒素充填したものは、本試験の実施を省略することができる。</p> <p>3.4.3～3.4.5 (略)</p> <p>3.4.6 ウイルス含有量試験</p> <p>3.4.6.1 ジステンパーウイルス含有量試験</p> <p>3.4.6.1.1 試験材料</p> <p>3.4.6.1.1.1 試料  試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記3、4及び5）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液又は<u>適当と認められた培養液</u>で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>3.4.6.1.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.1.3 判定  培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。  試験品のウイルス含有量は、<u>1頭分当たり10<sup>3.5</sup>TCID<sub>50</sub></u>以上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、そのウイルス含有量とする。</p> <p>3.4.6.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験</p> <p>3.4.6.2.1 試験材料</p> <p>3.4.6.2.1.1 試料  試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスを各抗血清（付記4、5及び6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液又は<u>適当と認められた培養液</u>で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>3.4.6.2.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.2.2・3.4.6.2.3 (略)</p> <p>3.4.6.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験</p> <p>3.4.6.3.1 試験材料</p> <p>3.4.6.3.1.1 試料  試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記3、5及び6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液又は<u>適当と認められた培養液</u>で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p>	<p>3.4.1 (略)</p> <p>3.4.2 真空度試験  一般試験法の真空度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、窒素充填製品したものは、本試験の実施を省略することができる。</p> <p>3.4.3～3.4.5 (略)</p> <p>3.4.6 ウイルス含有量試験</p> <p>3.4.6.1 ジステンパーウイルス含有量試験</p> <p>3.4.6.1.1 試験材料</p> <p>3.4.6.1.1.1 試料  試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記3、4及び5）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>3.4.6.1.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.1.3 判定  培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。  試験品のウイルス含有量は、<u>1 mL中10<sup>3.5</sup>TCID<sub>50</sub></u>以上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、そのウイルス含有量とする。</p> <p>3.4.6.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験</p> <p>3.4.6.2.1 試験材料</p> <p>3.4.6.2.1.1 試料  試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスを各抗血清（付記4、5及び6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>3.4.6.2.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.2.2・3.4.6.2.3 (略)</p> <p>3.4.6.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験</p> <p>3.4.6.3.1 試験材料</p> <p>3.4.6.3.1.1 試料  試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記3、5及び6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p>
--	---

<p>料とする。</p> <p>3.4.6.3.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.3.2・3.4.6.3.3 (略)</p> <p>3.4.6.4 犬パルボウイルス含有量試験</p> <p>3.4.6.4.1 試験材料</p> <p>3.4.6.4.1.1 試料</p> <p>試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記3、4及び6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液又は<u>適当と認められた培養液</u>で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>3.4.6.4.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.4.2・3.4.6.4.3 (略)</p> <p>3.4.7・3.4.8 (略)</p> <p>3.4.9 力価試験</p> <p>3.4.9.1～3.4.9.3 (略)</p> <p>3.4.9.4 犬パルボウイルス感染症力価試験</p> <p>3.4.9.4.1 試験材料</p> <p>3.4.9.4.1.1 (略)</p> <p>3.4.9.4.1.2 <u>中和試験用ウイルス又は赤血球凝集抗原</u></p> <p>中和試験用ウイルスは、犬パルボウイルスY-1株又は適当と認められた犬パルボウイルスを用いる。</p> <p>赤血球凝集抗原は、犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記7）を用いる。</p> <p>4 (略)</p> <p>付記1～付記8 (略)</p>	<p>3.4.6.3.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.3.2・3.4.6.3.3 (略)</p> <p>3.4.6.4 犬パルボウイルス含有量試験</p> <p>3.4.6.4.1 試験材料</p> <p>3.4.6.4.1.1 試料</p> <p>試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記3、4及び6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>3.4.6.4.1.2 (略)</p> <p>3.4.6.4.2・3.4.6.4.3 (略)</p> <p>3.4.7・3.4.8 (略)</p> <p>3.4.9 力価試験</p> <p>3.4.9.1～3.4.9.3 (略)</p> <p>3.4.9.4 犬パルボウイルス感染症力価試験</p> <p>3.4.9.4.1 試験材料</p> <p>3.4.9.4.1.1 (略)</p> <p>3.4.9.4.1.2 <u>中和試験用ウイルス又は赤血球凝集抑制抗原</u></p> <p>中和試験用ウイルスは、犬パルボウイルスY-1株又は適当と認められた犬パルボウイルスを用いる。</p> <p>赤血球凝集抗原は、犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記7）を用いる。</p> <p>4 (略)</p> <p>付記1～付記8 (略)</p>
---	--

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月3日農林水産省告示第1567号）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
<p>一般試験法の部</p> <p style="text-align: center;"><b>サルモネラ否定試験法</b></p> <p>（略）</p> <p>1 培地 別に規定する場合を除き、<u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液体培地（SCD液体培地）、ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地（RVS液体培地）及びキシロース・リシン・デソキシコール酸寒天培地（XLD寒天培地）</u>を用いる。</p> <p>1.1 <u>SCD液体培地</u></p> <p>1.1.1 組成 適当な品質の乾燥製品を記載に従い溶解し、<u>高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHを7.1～7.5とする。あるいは適当な品質の市販品を用いてもよい。</u></p> <p>1.1.2 性能 <u>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium（以下この項において「サルモネラ・ティフィムリウム」という。）又はSalmonella enterica subsp. enterica serovar Abony（以下この項において「サルモネラ・アボニー」という。）の100CFU以下を100mLに接種し、30～35℃で18～24時間培養するとき、十分に増殖しなければならない。</u></p> <p>1.2 <u>RVS液体培地</u></p> <p>1.2.1 組成 適当な品質の乾燥製品を記載に従い溶解し、<u>高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHを5.0～5.4とする。あるいは適当な品質の市販品を用いてもよい。</u></p> <p>1.2.2 性能 <u>サルモネラ・ティフィムリウム又はサルモネラ・アボニーの100CFU以下を10mLに接種し、30～35℃で18～24時間培養するとき、十分に増殖しなければならない。また、同条件で少なくとも100CFUの黄色ブドウ球菌を培養するとき、発育してはならない。</u></p>	<p>一般試験法の部</p> <p style="text-align: center;"><b>サルモネラ否定試験法</b></p> <p>（略）</p> <p>1 培地 別に規定する場合を除き、<u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地（SCD液状培地）、セレナイト培地、BTB乳糖寒天培地（ドリガルスキー改良培地）及びDHL寒天培地</u>を用いる。</p> <p style="text-align: center;"><u>液状培地の液量は、通常1本当たり100mLとする。</u></p> <p>1.1 <u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地</u></p> <p>1.1.1 組成 適当な品質の乾燥製品を記載に従い溶解し、<u>121℃で15分間高圧滅菌する。滅菌後のpHを7.1～7.3とする。</u></p> <p>1.1.2 性能 <u>大腸菌及びネズミチフス菌それぞれ100個未満を接種し、35～37℃で18～24時間培養するとき、十分に増殖しなければならない。</u></p> <p>1.2 <u>セレナイト培地</u></p> <p>1.2.1 組成 適当な品質の乾燥製品を記載に従い溶解する。<u>pHを7.1～7.3とする。</u></p> <p>1.2.2 性能 <u>ネズミチフス菌100個未満を接種し、35～37℃で18～24時間培養するとき、十分に増殖しなければならない。</u></p>

### 1.3 XLD寒天培地

#### 1.3.1 組成

適当な品質の乾燥製品を記載に従い加熱溶解する。pHを7.2～7.6とする。  
あるいは適当な品質の市販品を用いてもよい。

#### 1.3.2 性能

サルモネラ・ティフィムリウム又はサルモネラ・アボニーの100CFU以下を接種し、30～35℃で18～24時間培養するとき、固有の集落を形成しなければならない。

(削る)

2・3 (略)

#### 4 培養及び観察

検体等をSCD液体培地100mLに5 mL接種し、十分に混和し、30～35℃で18～24時間増菌培養する。培養液0.1mLをRVS液体培地10mLに接種する。30～35℃で18～24時間培養後、XLD寒天培地に移植する。30～35℃で18～48時間培養し、サルモネラの集落の有無を調べる。

5・6 (略)

### 1.3 BTB乳糖寒天培地

#### 1.3.1 組成

適当な品質の乾燥製品を記載に従い溶解し、121℃で15分間高压滅菌する。滅菌後のpHを7.3～7.5とする。

#### 1.3.2 性能

大腸菌、ひな白痢菌及びネズミチフス菌それぞれ100個未満を接種し、35～37℃で18～24時間培養するとき、それぞれ固有の集落を形成しなければならない。

### 1.4 DHL寒天培地

#### 1.4.1 組成

適当な品質の乾燥製品を記載に従い溶解する。pHを6.9～7.1とする。

#### 1.4.2 性能

大腸菌、ひな白痢菌及びネズミチフス菌それぞれ100個未満を接種し、35～37℃で18～24時間培養するとき、それぞれ固有の集落を形成しなければならない。

2・3 (略)

#### 4 培養及び観察

検体等をSCD液状培地及びセレナイト培地に5 mLずつ接種し、十分に混和し、35～37℃で18～24時間増菌培養する。それぞれの培養液0.1mLをBTB乳糖寒天培地及びDHL寒天培地に接種し、35～37℃で18～24時間培養し、サルモネラの集落の有無を調べる。

5・6 (略)