

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（以下「傍線部分」という。）を加える。

改 正 後	改 正 前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・α 溶血性レンサ球菌症・類結節症混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン (略) <u>イリドウイルス病・β 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン</u> 1 定義 <u>マダイイリドウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液及びストレプトコッカス・イニエの培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合したワクチンである。</u> 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 マダイイリドウイルス 2.1.1.1 名称 <u>マダイイリドウイルスRIE-124株又はこれと同等と認められた株</u> 2.1.1.2 性状 <u>いさき鱈由来株化細胞（以下この項において「GF細胞」という。）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> 2.1.1.3 継代及び保存 <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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。</u> 2.1.2 <u>ストレプトコッカス・イニエ</u>	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・α 溶血性レンサ球菌症・類結節症混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン (略) (新設)

2.1.2.1 名称	<u>ストレプトコッカス・イニエSI7E株又はこれと同等と認められた株</u>
2.1.2.2 性状	<u>ストレプトコッカス・イニエに一致する性状を示し、β溶血性レンサ球菌症に対する免疫原性を有する。</u>
2.1.2.3 継代及び保存	<u>原株及び種菌は、適当と認められた培地により継代する。</u> <u>継代は、原株では3代以内、種菌では5代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。</u> <u>原株及び種菌は、凍結して-70°C以下で保存する。</u>
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	<u>GF細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。</u>
2.2.1.2 培養液	<u>製造に適当と認められた培養液を用いる。</u>
2.2.2 ストレプトコッカス・イニエ	
2.2.2.1 培地	<u>製造に適当と認められた培地を用いる。</u>
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	<u>1回に処理し、培養した細胞を個体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>個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。</u>
2.3.1.2 ウイルスの培養	<u>種ウイルスを培養細胞で培養し、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液又は培養液の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>
2.3.1.3 不活化	<u>ウイルス浮遊液にホルマリン又は製造に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ウイルス液とする。</u> <u>不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。</u>
2.3.1.4 原液	<u>不活化ウイルス液を混合したものを原液とする。</u> <u>原液について、3.6の試験を行う。</u>
2.3.2 ストレプトコッカス・イニエ	

<u>2.3.2.1 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> <u>2.3.2.2 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の試験を行う。</u> <u>2.3.2.3 原液</u> <u>不活化菌液を必要に応じて適当と認められた方法で集菌し、濃度調整したものを原液とする。</u> <u>原液について、3.6の試験を行う。</u> <u>2.4 最終バルク</u> <u>各原液を必要により適当と認められた方法で濃度調整した後混合し、最終バルクとする。</u> <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> <u>3 試験法</u> <u>3.1 培養細胞の試験</u> <u>個体別培養細胞の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> <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> <u>3.2 ウイルス浮遊液の試験</u> <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> <u>3.2.2 ウイルス含有量試験</u> <u>3.2.2.1 試験材料</u> <u>3.2.2.1.1 試料</u> <u>検体をウイルス含有量試験用培養液（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。</u> <u>3.2.2.1.2 培養細胞</u> <u>GF細胞をウイルス含有量試験用培養液又は適当と認められた培養液に適当な濃度で浮遊させ、96穴プレートに0.05mLずつ分注したものを用いる。</u> <u>3.2.2.2 試験方法</u>	
--	--

<u>試料0.05mLずつを、それぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、25℃で14日間培養して、CPEの有無を観察する。</u> <u>3.2.2.3 判定</u> <u>培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。</u> <u>検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.6}TCID₅₀以上でなければならない。</u> <u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その含量とする。</u> <u>3.3 培養菌液の試験</u> <u>3.3.1 夾雑菌否定試験</u> <u>3.3.1.1 試験材料</u> <u>3.3.1.1.1 試料</u> <u>検体を試料とする。</u> <u>3.3.1.1.2 培地</u> <u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。</u> <u>3.3.1.2 試験方法</u> <u>各試料0.2mLずつを培地10本以上に接種し、5本ずつ24～26℃又は36～38℃で7日間以上培養する。</u> <u>3.3.1.3 判定</u> <u>いずれの培養温度においても、ストレプトコッカス・イニエ以外の菌の発育を認めてはならない。</u> <u>3.3.2 生菌数試験</u> <u>3.3.2.1 試験材料</u> <u>3.3.2.1.1 試料</u> <u>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。</u> <u>3.3.2.1.2 培地</u> <u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。</u> <u>3.3.2.2 試験方法</u> <u>各試料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、24～26℃で24時間以上培養した後、生じた集落を数える。</u> <u>3.3.2.3 判定</u> <u>各段階の試料ごとの集落数から生菌数を算出する。</u> <u>検体中の生菌数は、1 mL中10⁸CFU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。</u> <u>3.4 不活化ウイルス液の試験</u> <u>3.4.1 不活化試験</u>	
---	--

3.4.1.1 試験材料

3.4.1.1.1 試料

検体 5 mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて 4℃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培養し、単層となったものを用いる。

3.4.1.2 試験方法

試料 3 mLにつき75cm²以上の培養細胞に接種し、24～26℃で1時間吸着させた後、試料を抜き取り、不活化試験用培養液（付記2）を15mL以上加えた後、24～26℃で7日間培養する。培養後、培養上清を採取し、その3 mLを新たな培養細胞に同様に接種し、24～26℃で7日間培養する。

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 試験材料

3.5.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.5.1.1.2 培地

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.5.1.2 試験方法

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、24～26℃で7日間以上培養した後、集落の有無を観察する。

3.5.1.3 判定

接種したいずれの培地にも集落を認めてはならない。

3.6 原液の試験

3.6.1 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。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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又は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。

3.7.2 pH試験

一般試験法のpH測定試験法を準用して試験するとき、pHは、固有の値を示さなければならない。

3.7.3 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。

3.7.4 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、0.3vol%以下でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その含有量とする。

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24～26℃、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5～50gのまだい80尾以上を用いる。

3.7.5.2 試験方法

試験動物は、12時間以上餌止めした後、1群40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を筋肉内に注射し、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24～26℃、循環式で飼育し、14日間観察する。なお、13日目に水温を27℃に上昇させる。

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5～20gのまだい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3）の培養ウイルス液をイーグル基礎培地で希釈し、対照群の死亡率が40～80%と予測される希釈と、その前後の希釈の3段階の希釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。

<u>3.7.6.1.2 試験方法</u> <u>試験動物は、12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ずつを筋肉内に注射し、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25℃で、循環式で10日間飼育する。</u> <u>試験後10日目に、試験群及び対照群は、12時間以上餌止めした後に、それぞれ30尾以上ずつの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。</u> <u>3.7.6.1.3 判定</u> <u>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、$P<0.05$）。</u> <u>3.7.6.2 β溶血性レンサ球菌症力価試験</u> <u>3.7.6.2.1 試験材料</u> <u>3.7.6.2.1.1 試験動物</u> <u>3.7.5の試験に用いた動物を用いる。又は3.7.5の試験を準用した試験群及び対照群の試験動物それぞれ40尾以上を用いる。</u> <u>3.7.6.2.1.2 攻撃用菌液</u> <u>ストレプトコッカス・イニエ強毒菌（付記4）の液体培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈し、対照群の死亡率がおおよそ60～80%と予想される希釈菌液を攻撃用菌液とする。</u> <u>3.7.6.2.2 試験方法</u> <u>3.7.5の試験最終日に12時間以上餌止めした試験群及び対照群に、攻撃用菌液0.1mLずつを腹腔内に注射して攻撃した後、飼育水温29～31℃で7日間観察して各群の生死を調べる。</u> <u>3.7.6.2.3 判定</u> <u>2段階の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、試験群の生残率は、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50%以上が死亡しなければならない。</u> <u>4 貯法及び有効期間</u> <u>有効期間は、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。</u> <u>付記1 ウイルス含有量試験用培養液</u> <u>1,000mL中</u> <u>L-15培地</u> <u>13.74 g</u>	
--	--

<u>L-グルタミン</u> <u>0.5 g</u> <u>塩化ナトリウム</u> <u>3.51 g</u> <u>牛胎子血清</u> <u>20 mL</u> <u>水</u> <u>残 量</u> <u>pHを7.2～7.6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>	
<u>付記2 不活化試験用培養液</u> <u>1,000mL中</u> <u>L-グルタミン</u> <u>0.5 g</u> <u>塩化ナトリウム</u> <u>3.51 g</u> <u>非必須アミノ酸溶液（100×</u> <u>10 mL</u> <u>牛胎子血清</u> <u>50～100 mL</u> <u>イーグル基礎培地又はイーグルMEM</u> <u>残 量</u> <u>pHを7.2～7.6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>	
<u>付記3 マダイイリドウイルス強毒株</u> <u>マダイイリドウイルスRIE-124株又はこれと同等以上の毒力を有する株</u>	
<u>付記4 ストレプトコッカス・イニエ強毒菌</u> <u>ストレプトコッカス・イニエSI12E株又はこれと同等以上の毒力を有する株</u>	

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
ワクチン（シードロット製剤）の部 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） 1 定義 シードロット規格に適合した線毛抗原K88、K99、987P及びF41を保有する大腸菌の培養菌液を不活化したもの及び同規格に適合したクロストリジウム・パーフリンゲンスC型菌の培養菌液を無毒化したものの遠心上清をそれぞれ混合し、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。 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1～2.1.4 （略） （削る）	ワクチン（シードロット製剤）の部 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） 1 定義 シードロット規格に適合した線毛抗原K88、K99、987P及びF41を保有する大腸菌の培養菌液を不活化したもの、<u>同規格に適合した易熱性エンテロトキシン産生大腸菌培養菌液の遠心上清及び同規格に適合したクロストリジウム・パーフリンゲンスC型菌の培養菌液を無毒化したものの遠心上清</u>をそれぞれ混合し、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。 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1～2.1.4 （略） <u>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_B」という。）産生大腸菌</u> <u>2.1.5.1 名称</u> <u>大腸菌NL-1001株又はこれと同等と認められた株</u> <u>2.1.5.2 性状</u> <u>グラム陰性桿菌で、運動性を認め、アラビノース利用能（+）、イノシトール利用能（-）、ソルビトール利用能（+）、硫化水素産生能（-）、インドール産生能（+）、ウレアーゼ活性（-）、β-ガラクトシダーゼ活性（+）及び硝酸塩還元性（+）の性状を示す。ST及びLTを産生しないが、LT_Bを産生する。また、本製造用菌株は、定着に必要な線毛をコードするプラスミドを欠損している。</u> <u>2.1.5.3 マスターシード菌</u> <u>2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数</u>

2.1.5 (略)

2.1.5.1～2.1.5.3 (略)

2.1.5.3.1 (略)

2.1.5.4 (略)

2.1.5.4.1 (略)

2.1.5.5 (略)

2.1.5.5.1 (略)

2.2 (略)

2.3 原液

2.3.1大腸菌pPS002株、NL-1005株、NADC1413株及びNADC1471株原液

2.3.1.1・2.3.1.2 (略)

2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、リン酸緩衝食塩液で再浮遊させ、チメロサル
ル又は適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

(削る)

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。

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℃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。

2.1.5.5 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℃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。

2.1.6 (略)

2.1.6.1～2.1.6.3 (略)

2.1.6.3.1 (略)

2.1.6.4 (略)

2.1.6.4.1 (略)

2.1.6.5 (略)

2.1.6.5.1 (略)

2.2 (略)

2.3 原液

2.3.1大腸菌pPS002株、NL-1005株、NADC1413株及びNADC1471株原液

2.3.1.1・2.3.1.2 (略)

2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、リン酸緩衝食塩液で再浮遊させ、チメロサル
ル又は適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

2.3.2 (略)

2.3.2.1～2.3.2.3 (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3.4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、3.5の試験を行う。

3 試験法

3.1 (略)

3.2 培養菌液の試験

3.2.1・3.2.2 (略)

(削る)

2.3.2 大腸菌NL-1001株原液

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を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 濃縮及び除菌

培養菌液を遠心分離し、上清液を中空糸フィルターで濃縮した後、透析して除菌する。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原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

2.3.3 (略)

2.3.3.1～2.3.3.3 (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 (略)

3.2 培養菌液の試験

3.2.1・3.2.2 (略)

3.2.3 大腸菌NL-1001株の試験

3.2.3.1 染色試験

3.2.3.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.3.1.2 試験方法

検体0.01mLをスライドガラス上の1 cm²の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約1,000倍に拡大し、30視野以上を観察する。

3.2.3.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.3.2 大腸菌LT_B確認試験

3.2.3.2.1 試料

検体を用いる。

3.2.3.2.2 試験方法

3.2.3 (略)
3.2.3.1 (略)
3.2.3.1.1～3.2.3.1.3 (略)
3.3 (略)
(削る)

3.4 最終バルクの試験
3.4.1 力価試験
(略)

大腸菌LT_B成分の参照品(付記5)を滅菌精製水で再溶解したもの及び試料の希釈・洗浄液1(付記6)による6段階の2倍階段希釈液を作製し、氷槽にて保存する。ガングリオシド固相化プレート(付記7)の各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。希釈・洗浄液2(付記8)で1回、希釈・洗浄液1で2回洗浄後、抗LT_B抗原兔ポリクローナル抗体(付記9)を各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液3(付記10)で洗浄後、標識抗体1(付記11)を各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液3で洗浄後、基質液1(付記12)を各穴に200μL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。

3.2.3.2.3 判定

参照品中のLT_B抗原量を1.0として、試料のLT_B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、1.62以上でなければならない。

3.2.3.3 吸光度測定試験

検体を波長420nmで吸光度を測定するとき、その値は、規定の値でなければならない。

3.2.4 (略)

3.2.4.1 (略)

3.2.4.1.1～3.2.4.1.3 (略)

3.3 (略)

3.4 原液の試験

3.4.1 大腸菌NL-1001株

3.4.1.1 無菌試験

3.4.1.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

3.4.1.1.2 試験方法

検体1mLを300mLの液状チオグリコール酸培地4本にそれぞれ接種し、2本は23℃で、他の2本は33℃で6～8日間一次培養する。次に各一次培養液1mLを新しい300mLの液状チオグリコール酸培地4本にそれぞれ接種し、2本は23℃で、他の2本は33℃で7日間培養して観察する。

3.4.1.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.5 最終バルクの試験

3.5.1 力価試験

(略)

3.4.1.1 大腸菌線毛抗原の力価試験
(略)

3.4.1.1.1 相対力価 (付記5) による力価試験

3.4.1.1.1.1 大腸菌線毛抗原K88の力価試験

3.4.1.1.1.1.1 試験材料

3.4.1.1.1.1.1.1 試料

検体を、必要に応じて希釈・洗浄液1 (付記6) で希釈したものを試料とする。

3.4.1.1.1.1.2 試験方法

線毛抗原K88成分の参照品 (付記7) 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 (付記8) 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9) の各穴に100μL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10) を各穴に100μL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11) を各穴に100μLずつ加え、常温で反応させる。主波長405nm、副波長490nmで参照品の規定の希釈倍率の吸光度を測定し、その値が参照品ごと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。

3.4.1.1.1.1.3 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12) 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。

3.4.1.1.1.2 大腸菌線毛抗原K99の力価試験

3.4.1.1.1.2.1 試験材料

3.4.1.1.1.2.1.1 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13) を加え、常温で60分間振とうしたものを試料とする。

3.4.1.1.1.2.2 試験方法

線毛抗原K99成分の参照品 (付記14) 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15) の各穴に100μLずつ加え、15～30℃で15±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16) を各穴に100μLずつ加え

3.5.1.1 大腸菌線毛抗原及び大腸菌LT_B成分の力価試験
(略)

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100μL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100μL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100μLずつ加え、常温で反応させる。主波長405nm、副波長490nmで参照品の規定の希釈倍率の吸光度を測定し、その値が参照品ごと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分間振とうしたものを試料とする。

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100μLずつ加え、15～30℃で15±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100μL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100μL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。

3.4.1.1.1.2.3 (略)

3.4.1.1.1.3 大腸菌線毛抗原987Pの力価試験

3.4.1.1.1.3.1 (略)

3.4.1.1.1.3.1.1 (略)

3.4.1.1.1.3.2 試験方法

線毛抗原987P成分の参照品（付記17）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18）の各穴に100μL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19）を各穴に100μL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1（付記20）を各穴に100μL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100μL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。

3.4.1.1.1.3.3 (略)

3.4.1.1.1.4 大腸菌線毛抗原F41成分の力価試験

3.4.1.1.1.4.1 (略)

3.4.1.1.1.4.1.1 (略)

3.4.1.1.1.4.2 試験方法

線毛抗原F41成分の参照品（付記21）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22）の各穴に100μL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、抗大腸菌線毛抗原F41マウスモノクローナル抗体1（付記23）を各穴に100μL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1を各穴に100μL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100μL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。

、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100μL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 (略)

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 (略)

3.5.1.1.1.3.1.1 (略)

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100μL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100μL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100μL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100μL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 (略)

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 (略)

3.5.1.1.1.4.1.1 (略)

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100μL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、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100μL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を各穴に100μL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100μL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。

3.4.1.1.4.3 (略)
(削る)

3.4.1.1.2 抗体測定法による力価試験

3.4.1.1.2.1 大腸菌線毛抗原K88の力価試験

3.4.1.1.2.1.1 試験材料

3.4.1.1.2.1.1.1 注射材料

検体を水酸化アルミニウムゲル（付記24）で10倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.1.1.2.1.1.2 (略)

3.4.1.1.2.1.2 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25）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26）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27）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28）の穴に100μL

3.5.1.1.4.3 (略)

3.5.1.1.5 大腸菌LT_Bの力価試験

3.5.1.1.5.1 試験材料

3.5.1.1.5.1.1 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。

3.5.1.1.5.2 試験方法

大腸菌LT_B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・洗浄液 1 による 2 倍階段希釈液を作製し、氷槽で保存する。ガングリオシド固相化プレートの各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間加温する。希釈・洗浄液 2 で1回、希釈・洗浄液 1 で2回洗浄した後、抗LT_B抗原兔ポリクローナル抗体を各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間加温する。洗浄液 3 で洗浄した後、標識抗体 1 を各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間加温する。洗浄液 3 で洗浄した後、基質液 1 を各穴に200μL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。

3.5.1.1.5.3 判定

参照品中のLT_B抗原量を1.0として、試料のLT_B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 (略)

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100μL

ずつ加え、37℃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29）を100μLずつ加え、37℃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100μL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。

3.4.1.1.2.1.3 （略）

3.4.1.1.2.2 大腸菌線毛抗原K99の力価試験

3.4.1.1.2.2.1 （略）

3.4.1.1.2.2.1.1・3.4.1.1.2.2.1.2 （略）

3.4.1.1.2.2.2 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30）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31）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32）の各穴に100μLずつ加え、37℃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100μLずつ加え、37℃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100μL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。

3.4.1.1.2.2.3 （略）

3.4.1.1.2.3 大腸菌線毛抗原987Pの力価試験

3.4.1.1.2.3.1 （略）

3.4.1.1.2.3.1.1 （略）

3.4.1.1.2.3.2 試験方法

3.4.1.1.2.2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。

ずつ加え、37℃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100μLずつ加え、37℃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100μL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 （略）

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 （略）

3.5.1.1.2.2.1.1・3.5.1.1.2.2.1.2 （略）

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100μLずつ加え、37℃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100μLずつ加え、37℃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100μL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 （略）

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 （略）

3.5.1.1.2.3.1.1 （略）

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33）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34）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35）の穴に100μLずつ加え、37℃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100μLずつ加え、37℃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100μL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。

3.4.1.1.2.3.3 （略）

3.4.1.1.2.4 大腸菌線毛抗原F41の力価試験

3.4.1.1.2.4.1 （略）

3.4.1.1.2.4.1.1・3.4.1.1.2.4.1.2 （略）

3.4.1.1.2.4.2 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36）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37）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38）の穴に100μLずつ加え、37℃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100μLずつ加え、37℃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100μL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。

3.4.1.1.2.4.3 （略）

（削る）

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100μLずつ加え、37℃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100μLずつ加え、37℃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100μL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 （略）

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 （略）

3.5.1.1.2.4.1.1・3.5.1.1.2.4.1.2 （略）

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100μLずつ加え、37℃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100μLずつ加え、37℃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100μL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 （略）

3.5.1.1.2.5 大腸菌LT_B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

3.4.1.2 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

3.4.1.2.1 (略)

3.4.1.2.1.1・3.4.1.2.1.2 (略)

3.4.1.2.2 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倍希釈液をバクトーペプトン液(付記39)で作製する。10L₀量(付記40)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β毒素液(付記41)と各希釈血清を等量混合後、25℃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10L₀量及び10L₊量(付記42)毒素液1 mLと10国際抗毒素単位(付記43。以下「IAU」という。)の標準抗毒素(

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_B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_B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100μLずつ加え、37℃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100μLずつ加え、37℃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100μL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_B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。

3.5.1.1.2.5.3 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_B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 (略)

3.5.1.2.1.1・3.5.1.2.1.2 (略)

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倍希釈液をバクトーペプトン液(付記52)で作製する。10L₀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β毒素液(付記54)と各希釈血清を等量混合後、25℃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10L₀量及び10L₊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。付記56)の標準

付記44) 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、10L₀群では全マウスが生存し、10L₊群では80%以上のマウスが死亡しなければならない。 3.4.1.2.3 (略) 3.5 (略) 3.5.1～3.5.9 (略) 4 貯法及び有効期間 有効期間は、製造後<u>12か月間</u>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 ～ 4 (略) 付記 5 <u>相対力価</u> <u>不活化ワクチンの力価試験において、酵素抗体反応によるin vitro抗原定量法を評価し、参照品との比較により、試験品の有効抗原量を数値化するために考案された単位</u> 付記 6 (略) 付記 7 <u>線毛抗原K88成分の参照品</u> <u>次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。</u> <u>(1) 大腸菌NL-1002株培養液から精製した線毛抗原K88成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。</u> <u>(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。</u> 付記 8 希釈・洗浄液 2 1,000mL 中 <u>ポリソルベート20</u> 5 mL 希釈・洗浄液 1 残 量 pHを7.2に調整する。 (削る)	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、10L₀群では全マウスが生存し、10L₊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 (略) 3.6 (略) 3.6.1～3.6.9 (略) 4 貯法及び有効期間 有効期間は、製造後<u>1年6か月間</u>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 ～ 4 (略) 付記 5 <u>大腸菌LT_B成分の参照品</u> <u>大腸菌NL-1001株培養液から精製したLT_B成分を凍結乾燥したもの。</u> 付記 6 (略) 付記 7 <u>ガングリオシド固相化プレート</u> <u>希釈・洗浄液 1 で溶解したガングリオシド溶液 (LT_B20ng以上を結合させるのに十分な量のGMガングリオシドを含む。) を100μLずつ96穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 1 で洗浄し、ブロッキング液 (付記58) を加え、更に反応させた後、希釈・洗浄液 1 を加えたもの。</u> 付記 8 希釈・洗浄液 2 1,000mL 中 <u>ポリソルベート200</u> 5 mL 希釈・洗浄液 1 残 量 pHを7.2に調整する。 付記 9 <u>抗LT_B抗原兔ポリクローナル抗体</u> <u>兔に精製LT_B成分を複数回筋肉内又は皮下注射した後、採取した血清を希釈・洗浄液 1 で適当な希釈倍率に希釈したもの。</u>
--	--

(削る)	付記10 洗浄液 3 1,000mL中 ブロッキング液 100 mL 希釈・洗浄液 1 残 量
(削る)	付記11 標識抗体 1 市販のプロテインAペルオキシダーゼとプロテインA溶解液を 9 : 1 の割合で混合し、希釈したもの。
(削る)	付記12 基質液 1 A液: 25mgの 4-アミノアンチピリンを50mLの0.17mol/Lフェノール で溶解したもの。 B液: 0.3%過酸化水素溶液をリン酸ナトリウム緩衝液 (付記59) で 希釈したもの。 A液とB液を使用時に等量混合したもの。
(削る)	付記13 相対力価 不活化ワクチンの力価試験において、酵素抗体反応による <i>in vitro</i> 抗 原定量法を評価し、参照品との比較により、試験品の有効抗原量を数 値化するために考案された単位
(削る)	付記14 線毛抗原K88成分の参照品 次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。 (1) 大腸菌NL-1002株培養液から精製した線毛抗原K88成分で、ペプ トントレハロースで希釈し、1回使用分に分注して、凍結乾燥し たもの。 (2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの 。
付記9 抗体固相化プレート 1 希釈液 5 (付記45) 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46) 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10 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 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

大腸菌線毛抗原K88に対するマウスモノクローナル抗体をペルオキシダーゼで標識したものを希釈液6（付記47）で適当な希釈倍率に希釈したもの。	大腸菌線毛抗原K88に対するマウスモノクローナル抗体をペルオキシダーゼで標識したものを希釈液6（付記62）で適当な希釈倍率に希釈したもの。
付記11 （略）	付記17 （略）
付記12 統計学的計算方法 農林水産大臣が適当と認めたもの。	付記18 統計学的計算方法 動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
付記13 （略）	付記19 （略）
付記14 線毛抗原K99成分の参照品 次に掲げるものであって、農林水産大臣が適当と認めたもの。 （1）大腸菌NL-1008株培養液から精製した線毛抗原K99成分で、ペプトンで希釈し、1回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。 （2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。	付記20 線毛抗原K99成分の参照品 次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。 （1）大腸菌NL-1008株培養液から精製した線毛抗原K99成分で、ペプトンで希釈し、1回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。 （2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。
付記15 抗体固相化プレート2 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48）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21 抗体固相化プレート2 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。
付記16 （略）	付記22 （略）
付記17 線毛抗原987P成分の参照品 次に掲げるものであって、農林水産大臣が適当と認めたもの。 （1）大腸菌NADC1413株培養液から精製した線毛抗原987P成分で、ペプトン・トレハロースで希釈し、1回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。 （2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。	付記23 線毛抗原987P成分の参照品 次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。 （1）大腸菌NADC1413株培養液から精製した線毛抗原987P成分で、ペプトン・トレハロースで希釈し、1回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。 （2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。
付記18 抗体固相化プレート3 希釈液5で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原987P兔ポリクローナル抗体（付記49）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24 抗体固相化プレート3 希釈液5で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原987P兔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。

付記19 抗大腸菌線毛抗原987Pマウスモノクローナル抗体 1
精製線毛抗原987Pで免疫したBALB/cマウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ1BB6-3D6が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7 (付記50) で適当に希釈したもの。

付記20 標識抗体 1
ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)抗体を50%グリセリン溶液 (付記51) で溶解し、更に希釈液 8 (付記52) で希釈したもの。

付記21 線毛抗原F41成分の参照品
次に掲げるものであって、農林水産大臣が適当と認めたもの。
(1) 大腸菌NADC1471株培養液から精製した線毛抗原F41成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1回使用分に分注して凍結乾燥したもの。
(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記22 抗体固相化プレート 4
希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原F41兔ポリクローナル抗体 (付記53) 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23 (略)

(削る)

(削る)

付記24 (略)

付記25 抗大腸菌線毛抗原987Pマウスモノクローナル抗体 1
精製線毛抗原987Pで免疫したBALB/cマウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ1BB6-3D6が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7 (付記65) で適当に希釈したもの。

付記26 標識抗体 2
ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)抗体を50%グリセリン溶液 (付記66) で溶解し、更に希釈液 8 (付記67) で希釈したもの。

付記27 線毛抗原F41成分の参照品
次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
(1) 大腸菌NADC1471株培養液から精製した線毛抗原F41成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1回使用分に分注して凍結乾燥したもの。
(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記28 抗体固相化プレート 4
希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原F41兔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。

付記29 (略)

付記30 水酸化ナトリウム溶液
1,000mL中
水酸化ナトリウム 30.0 g
水 残 量

付記31 硫酸アンモニウム溶液
1,000mL中
硫酸アンモニウム 132.0 g
水 残 量

付記32 (略)

付記25 線毛抗原K88 参照陽性血清 1
精製線毛抗原K88 (付記54) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で2,048～4,096倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記26・付記27 (略)

付記28 抗原吸着プレート 1
希釈液 5 で0.5 μ g/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55) 100 μ 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 μ Lずつ加え、37℃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29 (略)

付記30 線毛抗原K99 参照陽性血清 1
精製線毛抗原K99 (付記56) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で32～64倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記31 (略)

付記32 抗原吸着プレート 2
希釈液 5 で 1 μ g/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57) 100 μ 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 μ Lずつ加え、37℃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33 線毛抗原K88 参照陽性血清 1
精製線毛抗原K88 (付記69) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で2,048～4,096倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記34・付記35 (略)

付記36 抗原吸着プレート 1
希釈液 5 で0.5 μ g/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 μ 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 μ Lずつ加え、37℃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 (略)

付記38 線毛抗原K99 参照陽性血清 1
精製線毛抗原K99 (付記71) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で32～64倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記39 (略)

付記40 抗原吸着プレート 2
希釈液 5 で 1 μ g/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 μ 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 μ Lずつ加え、37℃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。

<u>付記33</u> 線毛抗原987P参照陽性血清 1 精製線毛抗原987P（付記58）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で8～16倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。 <u>付記34</u> （略） <u>付記35</u> 抗原吸着プレート 3 希釈液 5 で 1 µg/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59）100µL 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100µL ずつ加え、37℃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。 <u>付記36</u> 線毛抗原F41参照陽性血清 1 精製線毛抗原F41（付記60）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で256～512倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。 <u>付記37</u> （略） <u>付記38</u> 抗原吸着プレート 4 希釈液 5 で 1 µg/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61）100µL 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F41を洗浄液 2 で希釈し、プレートに100µL ずつ加え、37℃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。 （削る）	<u>付記41</u> 線毛抗原987P参照陽性血清 1 精製線毛抗原987P（付記73）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で8～16倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。 <u>付記42</u> （略） <u>付記43</u> 抗原吸着プレート 3 希釈液 5 で 1 µg/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）100µL 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100µL ずつ加え、37℃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。 <u>付記44</u> 線毛抗原F41参照陽性血清 1 精製線毛抗原F41（付記75）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で256～512倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。 <u>付記45</u> （略） <u>付記46</u> 抗原吸着プレート 4 希釈液 5 で 1 µg/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）100µL 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100µL ずつ加え、37℃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。 <u>付記47</u> <u>LT_B参照陽性血清 1</u> <u>精製大腸菌LT_B（付記77）で免疫したマウスの血清であって、酵素抗体反応で256～512倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。</u>
---	---

(削る)	付記48 <u>希釈液 4</u> <u>100mL中</u> <u>カゼイン</u> <u>1.0</u> g <u>希釈・洗浄液 2</u> <u>残 量</u>
(削る)	付記49 <u>LT_B参照陽性血清 2</u> <u>精製大腸菌LT_Bで免疫したマウスの血清であって、精製大腸菌LT_Bを固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512倍希釈で0.9～1.1となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。</u>
(削る)	付記50 <u>抗原吸着プレート 5</u> <u>希釈・洗浄液 1 で希釈したガングリオシド (付記78) 100μLずつを96穴プレートの各穴に加え、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製大腸菌LT_Bを希釈・洗浄液 1 で希釈し、プレートに50μLずつ加え、37℃で1時間反応させたもの。</u> <u>なお、至適の精製LT_B濃度は、LT_B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。</u>
(削る)	付記51 <u>ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 2</u> <u>ペルオキシダーゼ標識山羊抗マウスIgG(H+L)を希釈液 4 で希釈したもの。</u>
付記39～付記41 (略)	付記52～付記54 (略)
付記42 <u>10L+量</u> <u>10IAU</u> の標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、80%以上を死亡させる毒素の最小量	付記55 <u>10L+量</u> <u>10国際抗毒素単位</u> の標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、80%以上を死亡させる毒素の最小量
付記43 (略)	付記56 (略)
付記44 <u>標準抗毒素</u> <u>農林水産大臣</u> が適当と認めた標準抗毒素又はこれと比較して標準化された抗毒素	付記57 <u>標準抗毒素</u> <u>動物医薬品検査所</u> が適当と認めた標準抗毒素又はこれと比較して標準化された抗毒素
(削る)	付記58 <u>ブロッキング液</u> <u>1,000mL中</u> <u>牛血清アルブミン</u> <u>10.0</u> g

(削る) 付記45～付記48 (略) 付記49 抗大腸菌線毛抗原987P兔ポリクローナル抗体 987Pを産生する大腸菌987株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の<u>NADC138株</u>で吸収を行ったもの。 付記50～付記53 (略) 付記54 精製線毛抗原K88 線毛抗原K88を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L尿素加リン酸緩衝液(付記62)に懸濁した後、加熱抽出し、硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生成させた後、陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDSポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原K88を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約29kDaの位置に単一のバンドを検出する。 付記55～付記61 (略) (削る) (削る)	<u>希釈・洗浄液 1</u> <u>残 量</u> <u>200nm以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。</u> 付記59 <u>リン酸ナトリウム緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>リン酸二水素ナトリウム一水和物</u> <u>10.76 g</u> <u>無水リン酸水素二ナトリウム</u> <u>17.37 g</u> <u>水</u> <u>残 量</u> <u>pHを7.0に調整する。</u> 付記60～付記63 (略) 付記64 抗大腸菌線毛抗原987P兔ポリクローナル抗体 987Pを産生する大腸菌987株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の<u>NADA138株</u>で吸収を行ったもの。 付記65～付記68 (略) 付記69 精製線毛抗原K88 線毛抗原K88を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L尿素加リン酸緩衝液(付記79)に懸濁した後、加熱抽出し、硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生成させた後、陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDSポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原K88を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約29kDaの位置に単一のバンドを検出する。 付記70～付記76 (略) 付記77 <u>精製大腸菌LT_B</u> <u>LT_Bを保有する大腸菌培養液を遠心し、上清を濃縮、精製したもので、SDSポリアクリルアミド電気泳動を行うとき、約10kDaの位置に単一のバンドを認める。</u> 付記78 <u>ガングリオシド</u>
--	--

		市販のGMガングリオシドを希釈・洗浄液 1 で50 μ g/mLの濃度に調整して使用する。	
<u>付記62</u>	2 mol/L尿素加リン酸緩衝液 1,000mL中 尿素 0.05mol/Lリン酸緩衝液（pH7.2）（ <u>付記63</u> ）	120 残	g 量
<u>付記63</u>	（略）		
<u>付記79</u>	2 mol/L尿素加リン酸緩衝液 1,000mL中 尿素 0.05mol/Lリン酸緩衝液（pH7.2）（ <u>付記80</u> ）	120 残	g 量
<u>付記80</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
ワクチン（シードロット製剤）の部 鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード） 1 （略） 2 製法 2.1～2.4 （略） 2.5 小分製品 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。 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、 <u>その 1 錠ずつを小分容器に封入し、小分製品とする。</u> <u>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。</u> 小分製品について、3.6の試験を行う。 <u>なお、最終バルクを錠剤に成型し、その 1 錠ずつを小分容器に封入した製剤及び粒状に凍結乾燥した最終バルクを小分容器に充填した製剤については、3.6.2の試験を行わない。</u> 3 試験法 3.1～3.5 （略） 3.6 小分製品の試験 3.6.1 特性試験 一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥塊でなければならない。 <u>完全に溶解したものは、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならない</u> 、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。 3.6.1～3.6.9 （略） (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード） 1 （略） 2 製法 2.1～2.4 （略） 2.5 小分製品 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。 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、3.6の試験を行う。 3 試験法 3.1～3.5 （略） 3.6 小分製品の試験 3.6.1 特性試験 一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥塊でなければならない。溶解したものは、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。 3.6.1～3.6.9 （略） 3.6.10 <u>崩壊試験</u> <u>小分製品が錠剤である製剤について次の試験を行う。</u>

4 (略) 付記 1 ～17 (略)	3.6.10.1 試験方法 <u>試験品 1 錠を15～25℃の水200mLの入ったビーカーに入れ、崩壊するまでの時間を測定する。</u> <u>6 錠についてこの操作を繰り返す。</u> 3.6.10.2 判定 <u>ガスの発生が終了し、水中において溶解又は分散して粒子の塊を認めなくなったとき、崩壊したものとする。</u> <u>6 錠全てがそれぞれ5分以内に崩壊しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その時間以内とする。</u> 4 (略) 付記 1 ～17 (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
ワクチン（シードロット製剤）の部 鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン(ひな用) (シード) 1 （略） 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1～2.1.3 （略） 2.1.4 ワーキングシードウイルス 2.1.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵、同規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び <u>継代する</u> 。 ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。 ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。 2.1.5 （略） 2.2～2.5 （略） 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 3.1.1.1～3.1.1.3 （略） 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験 一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の <u>1.1、2.1</u> 及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。	ワクチン（シードロット製剤）の部 鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン(ひな用) (シード) 1 （略） 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1～2.1.3 （略） 2.1.4 ワーキングシードウイルス 2.1.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵、同規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び <u>継代させる</u> 。 ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。 ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。 2.1.5 （略） 2.2～2.5 （略） 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 3.1.1.1～3.1.1.3 （略） 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験 一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験 鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の<u>1.1及び3.1.2</u>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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて<u>3.1.1.4.2.2</u>に規定する製剤については、本試験を実施しなくてよい。 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験 鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の<u>1.1、3.2.1、3.2.2及び3.2.10</u>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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する製剤については、3.2.10の試験を実施しなくてもよい。 3.1.1.5～3.1.1.7 （略） 3.1.2・3.1.3 （略） 3.2～3.7 （略） 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乾燥物でなければならない。<u>完全に溶解したもの</u>は、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。 3.8.2～3.8.9 （略） 3.8.10 力価試験 3.8.10.1 試験材料 3.8.10.1.1～3.8.10.1.3 （略） 3.8.10.1.4 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<u>シャーレ</u>で培養し、単層となったものを用いる。 3.8.10.2 （略） 3.8.10.3 判定 ブラック数を50%減少させる血清の<u>最高血清希釈倍数</u>を中和抗体価とする。 試験群の80%以上が中和抗体価200倍以上でなければならない。この場合	3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験 鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.1.2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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて<u>3.1.1.4.2.2</u>に規定する製剤については、本試験を実施しなくてよい。 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験 鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.1、3.2.2及び3.2.10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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する製剤については、3.2.10の試験を実施しなくてもよい。 3.1.1.5～3.1.1.7 （略） 3.1.2・3.1.3 （略） 3.2～3.7 （略） 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乾燥物でなければならない。溶解したものは、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。 3.8.2～3.8.9 （略） 3.8.10 力価試験 3.8.10.1 試験材料 3.8.10.1.1～3.8.10.1.3 （略） 3.8.10.1.4 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<u>シャーレ</u>で培養し、単層となったものを用いる。 3.8.10.2 （略） 3.8.10.3 判定 ブラック数を50%減少させる血清の<u>最高血清希釈倍数</u>で中和抗体価とする。 試験群の80%以上が中和抗体価200倍以上でなければならない。この場合
---	--

、対照群の中和抗体価は10倍以下でなければならない。 3.8.11 （略） （削る） 4 （略） 付記 1 ～ 3 （略）	、対照群の中和抗体価は10倍以下でなければならない。 3.8.11 （略） 3.8.12 崩壊試験 <u>小分製品が錠剤である製剤について次の試験を行う。</u> 3.8.12.1 試験方法 <u>試験品 1 錠を15～25℃の水200mLの入ったビーカーに入れ、ガスの発生が終了するまでの時間を測定する。</u> <u>6 錠についてこの操作を繰り返す。</u> 3.8.12.2 判定 <u>ガスの発生が終了し、水中において溶解又は分散して粒子の塊を認めない場合を崩壊したものとする。</u> <u>全てが10分以内に崩壊しなければならない。</u> 4 （略） 付記 1 ～ 3 （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
ワクチン（シードロット製剤）の部 狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード） 1 （略） 2 製法 2.1 （略） 2.2 製造用材料 2.2.1・2.2.2 （略） 2.2.3 マスターセルシード 2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数 マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。 分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して <u>－70℃</u> 以下で保存する。 マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。 マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。浮遊培養を使う場合は、細胞数の増加で集団ダブリングタイムの約3倍で継代1代とみなす。 2.2.4 ワーキングセルシード 2.2.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。 ワーキングセルシードは、凍結して <u>－70℃</u> 以下で保存する。 ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。 2.2.5 プロダクションセルシード 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 <u>－70℃</u> 以下で保存する。 プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。	ワクチン（シードロット製剤）の部 狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード） 1 （略） 2 製法 2.1 （略） 2.2 製造用材料 2.2.1・2.2.2 （略） 2.2.3 マスターセルシード 2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数 マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。 分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して <u>－100℃</u> 以下で保存する。 マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。 マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。浮遊培養を使う場合は、細胞数の増加で集団ダブリングタイムの約3倍で継代1代とみなす。 2.2.4 ワーキングセルシード 2.2.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。 ワーキングセルシードは、凍結して <u>－100℃</u> 以下で保存する。 ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。 2.2.5 プロダクションセルシード 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 <u>－100℃</u> 以下で保存する。 プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

2.3～2.5 （略） 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 3.1.1.1～3.1.1.4 （略） 3.1.1.5 効力及び免疫原性確認試験 <u>ワーキングシードウイルスにおいて、効力及び免疫原性確認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。</u> 3.1.1.5.1 <u>モルモットでの試験</u> 3.1.1.5.1.1 <u>試験材料</u> 3.1.1.5.1.1.1 <u>試料</u> <u>検体をリン酸緩衝食塩液で溶解し、1 mL中のウイルス含有量を約$10^{7.0}$TCID₅₀となるように濃度を調整後、β-プロピオラク톤を0.0125vol%になるように加えて、4℃で48時間感作し、ウイルスを不活化したものを試料とする。</u> 3.1.1.5.1.1.2 <u>試験動物</u> <u>体重約400gのモルモットを用いる。</u> 3.1.1.5.1.1.3 <u>攻撃ウイルス</u> <u>狂犬病ウイルスCVS株（付記1）を用いる。モルモット咬筋内注射法で、0.2mL中10LD₅₀のウイルスを含むように、2 vol%馬血清加生理食塩液を用いて濃度を調整し、攻撃ウイルスとする。</u> 3.1.1.5.1.2 <u>試験方法</u> <u>試料を0.5mLずつ試験動物10匹の内股部皮下に注射し、試験群とする。10匹を無処置対照群とする。注射後21日目に、両群のそれぞれに攻撃ウイルスを0.2mLずつ咬筋内注射し、14日間臨床観察する。</u> 3.1.1.5.1.3 <u>判定</u> <u>発症しなかったものを耐過とみなし、耐過率を算出する。</u> <u>試験群の耐過率は、70%以上でなければならない。この場合、対照群の耐過率は、20%以下でなければならない。</u> 3.1.1.5.2 <u>犬での試験</u> 3.1.1.5.2.1 <u>試験材料</u> 3.1.1.5.2.1.1 <u>試料</u> <u>3.1.1.5.1.1.1の試料を用いる。</u> 3.1.1.5.2.1.2 <u>試験動物</u> <u>狂犬病ウイルスに対する抗体陰性の約4か月齢の犬を用いる。</u> 3.1.1.5.2.2 <u>試験方法</u> <u>試料1 mLずつを試験動物3頭の皮下に注射し、1か月後にそれぞれから</u>	2.3～2.5 （略） 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 3.1.1.1～3.1.1.4 （略） （新設）
--	---

<u>採血し、中和抗体価を狂犬病培養細胞馴化ウイルスRC・HL株を用いて測定する。</u> <u>3.1.1.5.2.3 判定</u> <u>試験群の中和抗体価は、幾何平均値10倍以上でなければならない。</u> 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験 3.1.2.1・3.1.2.2 (略) 3.1.2.3 効力及び免疫原性確認試験 <u>3.1.1.5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、マスターシードウイルスにおいて、効力及び免疫原性確認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。</u> (削る)	3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験 3.1.2.1・3.1.2.2 (略) 3.1.2.3 効力及び免疫原性確認試験 3.1.2.3.1 <u>モルモットでの試験</u> 3.1.2.3.1.1 <u>試験材料</u> 3.1.2.3.1.1.1 <u>試料</u> <u>新旧の検体をリン酸緩衝食塩液でそれぞれ溶解し、1 mL中のウイルス含有量を約$10^{7.0}$TCID₅₀となるように濃度を調整する。それぞれにβ-プロピオラクトンを0.0125vol%になるように加えて、4℃で48時間感作し、ウイルスを不活化したものを試料とする。</u> 3.1.2.3.1.1.2 <u>試験動物</u> <u>体重約400gのモルモットを用いる。</u> 3.1.2.3.1.1.3 <u>攻撃ウイルス</u> <u>狂犬病ウイルスCVS株（付記1）を用いる。モルモット咬筋内注射法で、0.2mL中10LD₅₀のウイルスを含むように、2 vol%馬血清加生理食塩液を用いて濃度を調整し、攻撃ウイルスとする。</u> 3.1.2.3.1.2 <u>試験方法</u> <u>新旧の試料を0.5mLずつ各試験動物10匹の内股部皮下に注射し、試験群とする。10匹を無処置対照群とする。注射後21日目に、3群のそれぞれに攻撃ウイルスを0.2mLずつ咬筋内注射し、14日間臨床観察する。</u> 3.1.2.3.1.3 <u>判定</u> <u>発症しなかったものを耐過とみなし、耐過率を算出する。</u> <u>両試験群の耐過率は、いずれも70%以上でなければならない。この場合、対照群の耐過率は、20%以下でなければならない。</u> 3.1.2.3.2 <u>犬での試験</u> 3.1.2.3.2.1 <u>試験材料</u> 3.1.2.3.2.1.1 <u>試料</u> <u>3.1.2.3.1.1.1の試料を用いる。</u> 3.1.2.3.2.1.2 <u>試験動物</u> <u>狂犬病ウイルスに対する抗体陰性の約4か月齢の犬を用いる。</u>
---	--

3.1.3 (略) 3.2 (略) 3.3 ウイルス培養液の試験 3.3.1 ウイルス含有量試験 3.3.1.1 試験材料 3.3.1.1.1 (略) 3.3.1.1.2 培養細胞 鶏胚初代細胞又は<u>適当と認められた培養細胞</u>を用いる。 3.3.1.2・3.3.1.3 (略) 3.4 不活化ウイルス液の試験 3.4.1 (略) 3.4.2 不活化試験 3.4.2.1 試験材料 3.4.2.1.1 (略) 3.4.2.1.2 試験動物及び培養細胞 3日齢以内の乳のみマウス及び鶏胚初代細胞<u>又は適当と認められた培養細胞</u>を用いる。 ただし、鶏胚初代細胞は、培養瓶に10mLずつ分注し、面積が約36cm²の単層となったものを用いる。 3.4.2.2・3.4.2.3 (略) 3.5・3.6 (略) 4 (略) 付記1～13 (略)	3.1.2.3.2.2 試験方法 <u>新旧の試料1mLずつを各試験動物3頭の皮下に注射し、1か月後にそれぞれから採血し、中和抗体価を狂犬病培養細胞馴化ウイルスRC・HL株を用いて測定する。</u> 3.1.2.3.2.3 判定 <u>両試験群の中和抗体価は、それぞれ幾何平均値10倍以上でなければならない。</u> 3.1.3 (略) 3.2 (略) 3.3 ウイルス培養液の試験 3.3.1 ウイルス含有量試験 3.3.1.1 試験材料 3.3.1.1.1 (略) 3.3.1.1.2 培養細胞 鶏胚初代細胞を用いる。 3.3.1.2・3.3.1.3 (略) 3.4 不活化ウイルス液の試験 3.4.1 (略) 3.4.2 不活化試験 3.4.2.1 試験材料 3.4.2.1.1 (略) 3.4.2.1.2 試験動物及び培養細胞 3日齢以内の乳のみマウス及び鶏胚初代細胞を用いる。 ただし、鶏胚初代細胞は、培養瓶に10mLずつ分注し、面積が約36cm²の単層となったものを用いる。 3.4.2.2・3.4.2.3 (略) 3.5・3.6 (略) 4 (略) 付記1～13 (略)
---	--