

改正後	改正前
血清類の部 (削る)	血清類の部 <u>牛ロタウイルス感染症卵黄抗体</u> <u>牛ロタウイルスを産卵鶏に注射して得た卵黄を噴霧乾燥したものである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 サルモネラ否定試験</u> <u>試験品 5 g をリン酸緩衝食塩液（付記 1） 20mL で溶解したものを試料とし、一般試験法のサルモネラ否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地及びセレナイト培地の液量は、1 本当たり 400mL とする。</u> <u>1.2 一般細菌数試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品 1 g をリン酸緩衝食塩液 9 mL で溶解したものを 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培地</u> <u>ハートインフュージョン寒天培地を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>直径 90mm のシャーレ 4 枚に試料を 1 mL ずつ分注し、50℃ 以下の溶解した寒天培地 15mL ずつを加えてよく混和し、固める。4 枚の培地平板のうち 2 枚は 35～37℃ で 48 時間、他の 2 枚は 22～24℃ で 4 日間培養し、発育した集落を数える。各段階の希釈液のそれぞれの培養温度ごとに、その平均集落数及び希釈倍数から細菌数を算出する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>いずれの培養温度においても、細菌数は試験品 1 g に対し 1,000 個以下でなければならない。</u> <u>1.3 迷入ウイルス否定試験</u> <u>1.3.1 MA-104細胞接種試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試料</u> <u>100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、試験品 2 g をリン酸緩衝食塩液 8 mL で溶解した溶液を 2～5℃ で一夜透析したものを試料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 培養細胞</u> <u>MA-104細胞を小試験管に 4～6 日間培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u>

試料0.1mLずつを10本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着後、ウイルス増殖用培養液（付記2）を加え、37℃で7日間回転培養し、CPEの有無を観察する。

1.3.1.3 判定

観察期間中、培養細胞にCPEを認めてはならない。

1.4 力価試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 試料

試験品2gをリン酸緩衝食塩液18mLで溶解し、更にリン酸緩衝食塩液で10倍希釈したものを試料とする。

1.4.1.2 中和試験用ウイルス

MA-104細胞で増殖させた牛ロタウイルス島根株及びKK-3株を用いる。

1.4.1.3 培養細胞

MA-104細胞を小試験管に4～6日間培養し、単層となったものを用いる。

1.4.2 試験方法

試料をウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈液0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、35～37℃で5日間回転培養し、観察する。

1.4.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの阻止を認めた試験品の最高希釈倍数を中和抗体価とする。中和抗体価は、いずれの株に対しても6,400倍以上でなければならない。

付記1 リン酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム

8.0g

塩化カリウム

0.2g

無水リン酸水素二ナトリウム

1.15g

リン酸二水素カリウム

0.2g

水残量

pHを6.8～7.2に調整する。

付記2 ウイルス増殖用培養液

イーグルMEMを用いる。

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.4に調整する。

使用時にトリプシン液（付記3）を0.01vol%となるように加える。

付記3 トリプシン液

トリプシン

100mg

0.001mol/L塩酸

10mL

ろ過滅菌する。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
血清類の部 (削る)	血清類の部 <u>破傷風抗毒素</u> <u>動生剤基準の破傷風抗毒素の3.2.3、3.2.6及び3.2.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
血清類の部 (削る)	血清類の部 <u>馬パラチフス血清</u> <u>動生剤基準の馬パラチフス血清の3.3.2、3.3.4及び3.3.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
血清類の部 (削る)	血清類の部 犬伝染性肝炎血清 動生剤基準の犬伝染性肝炎血清の3.3.2、3.3.5、3.3.6及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
血清類の部 (削る)	血清類の部 <u>ジステンパー血清</u> <u>動生剤基準のジステンパー血清の3.3.2、3.3.5、3.3.6及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
血清類の部 (削る)	血清類の部 <u>ジステンパー・犬伝染性肝炎血清</u> <u>動生剤基準のジステンパー・犬伝染性肝炎血清の3.3.2、3.3.5、3.3.6及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
血清類の部 (削る)	血清類の部 乾燥犬プラズマ <u>健康な犬から得たプラズマを凍結乾燥したものである。</u> <u>1 小分け製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.2, 2.5.1及び2.6.1により試験を行い、これらに適合しなければならない。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
血清類の部 (削る)	血清類の部 <u>抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス・抗猫カリシウイルス混合抗体(組換え型)</u> <u>動生剤基準の抗猫ウイルス性鼻気管炎・抗猫カリシウイルス混合抗体（組換え型）の3.4.3、3.4.4、3.4.6、3.4.7及び3.4.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>アカバネ病生ワクチン</u> <u>動生剤基準のアカバネ病生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>アカバネ病(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <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、アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.3.1.3 中和試験用ウイルス</u> <u>HmLu-1細胞で増殖させたアカバネウイルスJaGAr39株を用いる。</u> <u>1.3.1.4 培養細胞</u> <u>HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>注射材料0.5mL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7日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。</u> <u>被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液（付記1）で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>培養細胞の2本以上に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。</u> <u>中和抗体価8倍以上を中和抗体陽性とする。</u> <u>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。</u> <u>2 中間製品の試験</u>

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 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℃ で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

2.1.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 3 cm 以上の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間静置吸着させた後、2 試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34℃ で 7 日間培養し、観察する。

2.1.3 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。

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 2.95g

グルタミン酸ナトリウム 4.0g

ブドウ糖 1.0g

酵母エキス 0.5g

牛血清 10mL

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検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>イバラキ病生ワクチン</u> <u>動生剤基準のイバラキ病生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛RSウイルス感染症生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛RSウイルス感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛アデノウイルス感染症生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛アデノウイルス感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛ウイルス性下痢－粘膜病生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛ウイルス性下痢－粘膜病生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛コロナウイルス感染症(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>牛コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を濃縮後、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> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.3.1.3 赤血球凝集 (HA) 抗原</u> <u>Hmlu-1細胞で増殖させた牛コロナウイルスNo.66/HL株で、赤血球凝集価は64倍以上のものを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>注射材料0.5mL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7日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制（以下「HI」という。）試験を行う。</u> <u>非働化した被検血清0.2mLに25w/v%カオリン生理食塩液（付記1）0.8mLを加え、常温で20分間処理した後、1,700G、10分間遠心し、その上清に0.1w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液（付記2）で調製した1 vol%マウス赤血球浮遊液を等量加え、よく混合した後、常温で20分間処理し、1,700G、10分間遠心し、その上清を試料とする。</u> <u>試料0.2mLを0.1w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液0.2mLで2倍階段希釈し、各希釈液に4単位のHA抗原を0.2mL加え、37℃で60分間処理する。それに0.1w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液に浮遊させた1 vol%マウス赤血球浮遊液を0.2mL加え、常温で1～2時間静置し、観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u>

赤血球の凝集を阻止した血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。
HI抗体価160倍以上をHI抗体陽性とする。
試験動物のHI抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 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℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

Hmlu-1細胞を培養びんに 1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

2.1.2 試験方法

試料の全量を 1 mLにつき3cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液（付記 3）を加え、37℃で 7日間培養し、観察する。

2.1.3 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。

付記 1 25w/v%カオリン生理食塩液

1,000mL中

カオリン

250g

塩化ナトリウム

8.75g

水

残 量

水酸化ナトリウム溶液でpHを7.2～7.4に調整する。

付記 2 0.1w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液

A液 5w/v%牛血清アルブミン溶液

100mL中

牛血清アルブミン

5.0g

水

残 量

使用時に、リン酸緩衝食塩液196mLにA液 4 mLを加えて調製する。

付記 3 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

2.95g

ブドウ糖

1.0g

グルタミン酸ナトリウム

5.0g

イースト・イクストラクト

0.5g

牛胎子血清

10～20mL

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。

牛胎子血清は、牛コロナウイルスに対する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。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛コロナウイルス感染症(油性アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛コロナウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.4及び3.5.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について、同基準の牛コロナウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の牛伝染性鼻気管炎（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛パラインフルエンザ生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛パラインフルエンザ生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛流行熱生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛流行熱生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛流行熱(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛流行熱（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の牛流行熱（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>チュウザン病(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のチュウザン病（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準のチュウザン病（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛流行熱・イバラキ病混合(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛流行熱・イバラキ病混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.3、3.5.6及び3.5.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の牛流行熱・イバラキ病混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>アカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症 混合(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のアカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.3、3.5.6及び3.5.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準のアカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病</u> <u>・牛パラインフルエンザ混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病・牛パラインフルエ</u> <u>ンザ混合生ワクチンの3.4.4、3.4.6、3.4.7、3.4.8及び3.4.9に規定するところにより、</u> <u>これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>アカバネ病・イバラキ病・牛流行熱・チュウザン病混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>アカバネウイルス、イバラキウイルス、牛流行熱ウイルス及びカスバウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、アジュバントを添加した後混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 アカバネ病力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.3.1.1.3 中和試験用ウイルス</u> <u>HmLu-1細胞で増殖させたアカバネウイルスJaGAr39株を用いる。</u> <u>1.3.1.1.4 培養細胞</u> <u>HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>注射材料0.5mL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。</u> <u>被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液-1（付記1）で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液-1を0.5mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。</u> <u>1.3.1.3 判定</u>

培養細胞の2本以上に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。

1.3.2 イバラキ病力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

約5週齢のマウスを用いる。

1.3.2.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させたイバラキウイルスNo.2株を用いる。

1.3.2.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.2.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを20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7日目に得られた血清について中和試験を行う。

マウス血清は、任意に4匹ずつプールし、5プールを用いる。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液-2（付記2）で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液-2を0.5mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

培養細胞の2本以上に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4倍以上を中和抗体陽性とする。

プール血清の中和抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

1.3.3 牛流行熱力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.3.1.2 試験動物

約4週齢のマウスを用いる。

1.3.3.1.3 中和試験用ウイルス

HmLu-1細胞で増殖させた牛流行熱ウイルスYHL株を用いる。

1.3.3.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.3.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを20匹の試験動物に2週間隔で2回筋肉内注射し、第2回目の注射後7日目に得られた血清について中和試験を行う。

マウス血清は、任意に4匹分ずつプールし、5プールを用いる。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液-1で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、34℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種

し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液-1を0.5mLずつ加え、34℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.3.3 判定

培養細胞の2本以上に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2倍以上を中和抗体陽性とする。

ブール血清の中和抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

1.3.4 チュウザン病力価試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 中和試験用ウイルス

BHK-21 (C-13) 細胞で増殖させたカスバウイルスK-47株を用いる。

1.3.4.1.2 培養細胞

Vero-T細胞を小試験管に2～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.4.2 試験方法

1.3.1.2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-1で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLとウイルス希釈用液（付記3）で調整した0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で90分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、細胞維持用培養液（付記4）を0.5mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.4.3. 判定

培養細胞の2本以上に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2倍以上を中和抗体陽性とする。

試験動物の中和抗体価陽性率は、80%以上でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、それぞれの検体5mLずつを4℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞及びVero-T細胞を培養びんに2～3日間培養し、単層となったものを用いる。

2.1.2 試験方法

2.1.2.1 不活化牛流行熱ウイルス中間製品の試験

試料の全量を1mLにつき3cm²以上のHmLu-1細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液-2を加え、34℃で7日間培養し、観察する。

2.1.2.2 不活化イバラキウイルス中間製品の試験

試料の全量を1mLにつき3cm²以上のHmLu-1細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液-2を加え、34℃で7日間培養後、その培養液をHmLu-1細胞に更に2代継代し、観察する。

2.1.2.3 不活化アカバネウイルス中間製品の試験

試料の全量を1mLにつき3cm²以上のHmLu-1細胞に接種し、37℃で60分間静置

吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液-2を加え、34～36℃で7日間培養し、観察する。

2.1.2.4 不活化カスバウイルス中間製品の試験

試料の全量を1 mLにつき3 cm²以上のVero-T細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液-2を加え、34～36℃で5日間培養後、細胞を次代に継代する。培養2日目に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液-2を加え、34～36℃で5日間培養後、更に次代に継代し、2代と同様の方法で培養し観察する。

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。
それぞれの検体に活性ウイルスを認めてはならない。

付記 1 ウイルス増殖用培養液-1

1,000mL中	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
グルタミン酸ナトリウム	4.0g
ブドウ糖	1.0g
酵母エキス	0.5g
牛血清	10mL
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、牛流行熱ウイルス及びカスバ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。

付記 2 ウイルス増殖用培養液-2

1,000mL中	
ラクトアルブミン水解物	5.0g
酵母エキス	1.0g
ハンクス液又はイーグルMEM	残 量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。

牛血清又はやぎ血清を1～2%となるように加えてもよい。

牛血清又はやぎ血清は、アカバネウイルス、イバラキウイルス、牛流行熱ウイルス及びカスバ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。

付記 3 ウイルス希釈用液

1,000mL中	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
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。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 細胞維持用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95g

子牛血清

10mL

イーグルMEM

残 量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.8～8.0に調整する。

子牛血清は、カスバ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検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>アカバネ病・イバラキ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>アカバネウイルス、イバラキウイルス、カスバウイルス及びアイノウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、アジュバントを添加した後混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.3.1.3 中和試験用ウイルス</u> <u>1.3.1.3.1 アカバネウイルス</u> <u>HmLu-1細胞で増殖させたアカバネウイルスJaGAr39株を用いる。</u> <u>1.3.1.3.2 イバラキウイルス</u> <u>HmLu-1細胞で増殖させたイバラキウイルスKSB-14/E/97株を用いる。</u> <u>1.3.1.3.3 カスバウイルス</u> <u>BHK-21（c-13）細胞で増殖させたカスバウイルスK-47株を用いる。</u> <u>1.3.1.3.4 アイノウイルス</u> <u>BHK-21（c-13）細胞で増殖させたアイノウイルスJaNAr28株を用いる。</u> <u>1.3.1.4 培養細胞</u> <u>HmLu-1細胞及びVero-T細胞を小試験管に2～3日間培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>注射材料0.5mL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</u>

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（付記1）で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを等量混合し、アカバネウイルス、イバラキウイルス及びアイノウイルスは37℃で60分間、カスバウイルスでは37℃で90分間処理する。この各混合液0.1mLずつをアカバネウイルス、イバラキウイルス及びアイノウイルスではHmLu-1細胞、カスバウイルスではVero-T細胞のそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、アカバネウイルス及びアイノウイルスは34～36℃で、イバラキウイルス及びカスバウイルスは37℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.3 判定

培養細胞の2本以上に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。

アカバネウイルス及びアイノウイルスでは中和抗体価8倍以上、イバラキウイルスでは中和抗体価2倍以上並びにカスバウイルスでは中和抗体価32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、それぞれのウイルスに対して80%以上でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、それぞれ検体5mLずつを4℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞及びVero-T細胞を培養瓶に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

2.1.2 試験方法

2.1.2.1 不活化アカバネウイルス中間製品及び不活化アイノウイルス中間製品の試験

それぞれの試料の全量を1mLにつき3cm²以上のHmLu-1細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で7日間培養し、観察する。

2.1.2.2 不活化イバラキウイルス中間製品の試験

試料の全量を1mLにつき3cm²以上のHmLu-1細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で5日間培養後、細胞を次代に継代する。単層形成後に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で5日間培養後、更に次代に継代し、2代と同様の方法で培養し、観察する。

2.1.2.3 不活化カスバウイルス中間製品の試験

試料の全量を1mLにつき3cm²以上のVero-T細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養後、細胞を次代に継代する。単層形成後に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養後、更に次代に継代し、2代と同様の方法で培養し、観察する。

2.1.3 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。
それぞれの検体に活性ウイルスを認めてはならない。

付記 1	<u>ウイルス増殖用培養液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95g</u>
	<u>グルタミン酸ナトリウム</u>	<u>5.0g</u>
	<u>ブドウ糖</u>	<u>1.0g</u>
	<u>酵母エキス</u>	<u>0.5g</u>
	<u>牛血清</u>	<u>10～20mL</u>
	<u>イーグルMEM</u>	<u>残 量</u>
<u>炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。</u>		
<u>牛血清は、アカバネウイルス、イバラキウイルス、カスバウイルス及びア</u>		
<u>イノウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。</u>		
<u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u>		

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症混合生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチンの3.4.4、3.4.6、3.4.7、3.4.8及び3.4.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前												
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症混合(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症混合(アジュバント加)不活化ワクチンの3.5.3、3.5.6及び3.5.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について次の試験を行うものとする。</u> 1 不活化試験 <u>1.1 試験材料</u> <u>1.1.1 試料</u> <u>試験品10mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液で4℃で一夜透析し、その2mLを細胞増殖用培養液（付記）で60倍に希釈したものを試料とする。</u> <u>1.1.2 培養細胞</u> <u>MDBK細胞を1～3日間培養し単層となったもの又はMDBK細胞及びVero細胞を1～3日間培養し単層となったものを用いる。</u> <u>1.2 試験方法</u> <u>試料60mLにつき175cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で90分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、細胞増殖用培養液で細胞面を3回洗浄し、ウイルス増殖用培養液を70mL以上加えた後、MDBK細胞に接種する場合は2群に分け34℃及び37℃で、MDBK細胞及びVero細胞に接種する場合はそれぞれ37℃で、7日間培養し、観察する。</u> <u>1.3 判定</u> <u>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。</u> <u>試料に活性ウイルスを認めてはならない。</u> <u>付記 細胞増殖用培養液</u> <table><tr><td>1,000mL中</td><td></td></tr><tr><td>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</td><td></td></tr><tr><td>牛血清</td><td>2.95g</td></tr><tr><td>イーグルMEM</td><td>50～100mL</td></tr><tr><td>炭酸水素ナトリウムを用いてpHを7.2～7.6に調整する。</td><td>残 量</td></tr><tr><td>牛血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢—粘膜病1型及び</td><td></td></tr></table>	1,000mL中		トリプトース・ホスフェイト・ブロス		牛血清	2.95g	イーグルMEM	50～100mL	炭酸水素ナトリウムを用いてpHを7.2～7.6に調整する。	残 量	牛血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢—粘膜病1型及び	
1,000mL中													
トリプトース・ホスフェイト・ブロス													
牛血清	2.95g												
イーグルMEM	50～100mL												
炭酸水素ナトリウムを用いてpHを7.2～7.6に調整する。	残 量												
牛血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢—粘膜病1型及び													

	<u>2型ウイルス、牛パラインフルエンザ3型ウイルス及び牛R S ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。</u> <u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u>
--	--

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>アカバネ病・イバラキ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症・ピートンウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>アカバネウイルス、イバラキウイルス、カスバウイルス、アイノウイルス及びピートンウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、混合した後、アジュバントを添加したワクチンである。</u> 1 小分製品の試験 <u>1.1 無菌試験</u> 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。 <u>1.2 異常毒性否定試験</u> 一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。 <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> 試験品を注射材料とする。 <u>1.3.1.2 試験動物</u> 体重約350gのモルモットを用いる。 <u>1.3.1.3 中和試験用ウイルス</u> <u>1.3.1.3.1 アカバネウイルス</u> HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたアカバネウイルスE-24TC株を用いる。 <u>1.3.1.3.2 イバラキウイルス</u> HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたイバラキウイルスIA-1TC株を用いる。 <u>1.3.1.3.3 カスバウイルス</u> BHK-21（C-13）細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたカスバウイルスK-47TC株を用いる。 <u>1.3.1.3.4 アイノウイルス</u> HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたアイノウイルスJaNAr28TC株を用いる。

1.3.1.3.5 ピートンウイルス

HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたピートンウイルスNS/3TC株を用いる。

1.3.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞及びVero-T細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.2 試験方法

注射材料0.5mL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（付記）で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを等量混合し、アカバナウイルス、イバラキウイルス、アイノウイルス及びピートンウイルスでは37℃で60分間、カスバウイルスでは90分間処理する。この各混合液0.1mLずつをアカバナウイルス、イバラキウイルス、アイノウイルス及びピートンウイルスではそれぞれ4本のHmLu-1細胞に、カスバウイルスではそれぞれ4本のVero-T細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、アカバナウイルス、イバラキウイルス、カスバウイルス及びピートンウイルスは37℃、アイノウイルスは34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.3 判定

培養細胞の2本以上に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。

アカバナウイルス及びピートンウイルスでは中和抗体価16倍以上、イバラキウイルスでは中和抗体価2倍以上、カスバウイルスでは中和抗体価32倍以上、アイノウイルスでは中和抗体価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、それぞれのウイルスに対して80%以上でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

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

2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞及びVero-T細胞を培養瓶に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

2.1.2 試験方法

2.1.2.1 不活化アカバナウイルス中間製品、不活化アイノウイルス中間製品及びピートンウイルス中間製品の試験

それぞれの試料の全量を1mLにつき3cm²以上のHmLu-1細胞に接種し、アカバナウイルス及びピートンウイルスでは37℃で、アイノウイルスでは34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、アカバナウイルス及びピートンウイルスでは37℃で、アイノウイルスでは34～36℃で7日間培養し、観察する。

2.1.2.2 不活化イバラキウイルス中間製品の試験

試料の全量を 1 mLにつき 3 cm²以上のHmLu-1細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で5日間培養した後、細胞を次代に継代する。単層形成後に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で5日間培養した後、更に次代に継代し、2代目と同様の方法で培養し、観察する。

2.1.2.3 不活化カスバウイルス中間製品の試験

試料の全量を 1 mLにつき 3 cm²以上のVero-T細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養した後、細胞を次代に継代する。単層形成後に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養した後、更に次代に継代し、2代目と同様の方法で培養し、観察する。

2.1.3 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。
それぞれの検体に活性ウイルスを認めてはならない。

付記

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

2.95g

グルタミン酸ナトリウム

5.0g

ブドウ糖

1.0g

酵母エキス

0.5g

牛血清

10～20mL

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、イバラキウイルス、カスバウイルス、アイノウイルス及びビートン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検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン</u> <u>弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス、弱毒牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス1型及び2型、弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス、弱毒牛RSウイルス並びに弱毒牛アデノウイルス（7型）を培養細胞でそれぞれ増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1、2.4.1及び2.4.2により試験を行い、これらに適合しなければならない。</u> <u>ただし、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清（付記1）、抗牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス血清（付記2及び3）、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（付記4）、抗牛RSウイルス血清（付記5）及び抗牛アデノウイルス（7型）血清（付記6）を非働化したものを用いる。</u> <u>1.3 ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試料</u> <u>試験品中の牛伝染性鼻気管炎ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記2から6まで）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（付記7）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 培養細胞</u> <u>牛精巣継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>試料0.1mLをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。</u> <u>1.3.1.3 判定</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。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試料

試験品中の牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型以外のウイルスを各抗血清（付記 1 及び 3 から 6 まで）を非働化したもので中和したものを細胞増殖用培養液（付記 8）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.2.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ小試験管に0.5mLずつ分注した培養細胞 4 本以上に接種し、37℃で5～7日間静置培養し、単層形成が良好であることを確認する。培養液を除き、1 mL中牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型Nose株を10^{5.0}TCID₅₀又は1 mL中ニューカッスル病ウイルスTCND株若しくは宮寺株を10^{4.0}EID₅₀含んだ細胞増殖用培養液を1 mLずつ加え、更に34～36℃で5～7日間回転培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

干渉法にあっては、培養細胞にCPEの抑制されたものを、また、END法にあっては、CPEの発現したものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.3 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型

1.3.2を準用して試験を行う。判定に当たっては、試験品のウイルス含有量は、

1頭分当たり10^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

ただし、試験品中の牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型以外のウイルスを各抗血清（付記 1、2 及び 4 から 6 まで）を非働化したもので中和したものを細胞増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.4 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試料

試験品中の牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 1 から 3 まで、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。

1.3.4.1.2 培養細胞

牛腎継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.4.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1 mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.4.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.5 牛RSウイルス

1.3.5.1 試験材料

1.3.5.1.1 試料

試験品中の牛RSウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記1から4まで及び6）を非働化したもので中和したものを牛RSウイルス増殖用培養液（付記12）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.5.1.2 培養細胞

Vero細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.5.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、牛RSウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34℃で14日間回転培養し、観察する。

1.3.5.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.6 牛アデノウイルス（7型）

1.3.6.1 試験材料

1.3.6.1.1 試料

試験品中の牛アデノウイルス（7型）以外のウイルスを各抗血清（付記1から5まで）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。

1.3.6.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.6.1.3 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液（以下この項において「VBS」という。）（付記9）に0.3vol%に浮遊させたものを用いる。

1.3.6.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。培養終了後、培養細胞を4℃に冷却し、これに4℃に冷却した赤血球浮遊液0.25mLを加え、4℃で1夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.6.3 判定

赤血球凝集が認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.5 安全試験

1.5.1 牛注射試験

1.5.1.1 試験材料

1.5.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

1.5.1.2 試験方法

注射材料1頭分を試験動物の筋肉内に注射し、14日間観察する。

1.5.1.3 判定

観察期間中、軽い発熱（40.5℃以下）を認めても3日間以上継続せず、その他の異常を認めてはならない。

1.5.2 乳のみマウス注射試験

1.5.2.1 試験材料

1.5.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

1.5.2.2 試験方法

注射材料0.01mLずつを10匹の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

1.5.2.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

事故のため試験動物が半数未満になった場合は、試験を反復する。

1.6 力価試験

1.6.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

1.6.1.1 試験材料

1.6.1.1.1 試験動物

1.5.1の試験に用いた動物を用いる。

1.6.1.1.2 中和試験用ウイルス

牛腎又は牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルスNo.758株を用いる。

1.6.1.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を約27cm²のシャーレに5mLずつ分注し、1～3日間培養し単層となったものを用いる。

1.6.1.2 試験方法

1.5.1の試験終了後、14日目に得られた血清について、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で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.2mL当たり約100PFUを含む中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この混合液0.2mLずつをそれぞれ2枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記10）

5mLを加え、37℃、5 vol%炭酸ガス下で3～5日間培養した後、第2次重層寒天培地（付記11）3mLを加え、更に24時間培養した後、ブラック数を算定する。

また、中和試験用ウイルス液0.2mLずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、ブラック数を算出する。

1.6.1.3 判定

ブラック数がウイルス対照の50%以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、2倍以上でなければならない。

1.6.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病力価試験

1.6.2.1 試験材料

1.6.2.1.1 試験動物

1.5.1の試験に用いた動物を用いる。

1.6.2.1.2 中和試験用ウイルス

牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス1型Nose

株及び牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型KZ-91-cp株を用いる。

1.6.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

1.6.2.2 試験方法

1.5.1の試験終了後、14日目に得られた血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、細胞増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL 当たり約200TCID₅₀を含む中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この混合液0.1mLずつを、小試験管に0.5mLずつ分注した細胞4本ずつに接種する。37℃で4～5日間静置培養し、観察する。

1.6.2.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス1型及び2型に対してそれぞれ2倍以上でなければならない。

1.6.3 牛パラインフルエンザ力価試験

1.6.3.1 試験材料

1.6.3.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

1.6.3.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

1.6.3.1.3 赤血球凝集抗原

牛腎継代細胞で増殖させた牛パラインフルエンザ3型ウイルスBNi-1株を用いる。

1.6.3.2 試験方法

接種材料0.2mLずつを5匹の試験動物の鼻腔内に接種し、21日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清0.2mLに25w/v%カオリン加生理食塩液0.6mLを加え、15～25℃で20分間処理した後、1,700Gで20分間遠心し、その上清をVBSを用いて2倍階段希釈する。各希釈血清0.2mLに4単位の赤血球凝集抗原0.2mLを加え、37℃で60分間処理した後、VBSで濃度を調整した0.3vol%モルモット赤血球浮遊液0.2mLを加え、4℃で1夜静置し、観察する。

1.6.3.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価8倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

1.6.4 牛RSウイルス感染症力価試験

1.6.4.1 試験材料

1.6.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.6.4.1.2 試験動物

体重約100gのハムスターを用いる。

1.6.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛RSウイルスNMK7株を用いる。

1.6.4.1.4 培養細胞

Vero細胞を小試験管に3～4日間培養し、単層となったものを用いる。

1.6.4.2 試験方法

注射材料 2 mL ずつを 5 匹の試験動物に 14 日間隔で 2 回腹腔内に注射し、第 2 回目の注射後 14 日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、牛RSウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。希釈血清 0.5 mL と 0.1 mL 当たり約 200 TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス 0.5 mL とを混合し、22℃ で 24 時間処理する。この混合液 0.1 mL ずつを 4 本の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間静置吸着させた後、牛RSウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34℃ で 10 日間回転培養し、観察する。

1.6.4.3 判定

培養細胞の 2 本以上に CPE の抑制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 2 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。

1.6.5 牛アデノウイルス感染症力価試験

1.6.5.1 試験材料

1.6.5.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

1.6.5.1.2 赤血球凝集抗原

牛精巢継代細胞で増殖させた牛アデノウイルス（7 型）袋井株を用いる。

1.6.5.1.3 赤血球浮遊液

1.3.6.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

1.6.5.2 試験方法

1.5.1 の試験終了後、14 日に得られた血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。
被検血清を非働化した後、VBS で 5 倍に希釈する。希釈血清に 25 w/v % カオリン加生理食塩液を等量加え、15～25℃ で 20 分間処理した後、1,700 G で 20 分間遠心し、その上清を VBS を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2 mL に 4 単位の赤血球凝集抗原 0.2 mL を加え、4℃ で 1 夜処理した後、4℃ に冷却した赤血球浮遊液 0.2 mL を加え、4℃ で 1 夜静置し、観察する。

1.6.5.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。
試験動物の赤血球凝集抑制抗体価は、20 倍以上でなければならない。

付記 1 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス No. 758 株で免疫した兎の血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 2 抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型血清

強毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス No. 12 株で免疫した兎の血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 3 抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型血清

強毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス KZ-91-ncp 株で免疫した兎の血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 4	抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清 <u>強毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルスBN₁-1株で免疫した兎の血清であ</u> <u>って、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。</u>
付記 5	抗牛RSウイルス血清 <u>強毒牛RSウイルスNMK7株で免疫した兎の血清であって、検体又は試験</u> <u>品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。</u>
付記 6	抗牛アデノウイルス（7 型）血清 <u>強毒牛アデノウイルス（7 型）袋井株で免疫した兎の血清であって、試験</u> <u>品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。</u>
付記 7	ウイルス増殖用培養液 1,000mL 中 <u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u> 2.95g <u>牛胎子血清</u> 20～100mL <u>イーグルMEM</u> 残 量 炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。 血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、牛RSウイルス及び牛アデノウイル ス（7 型）に対して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。
付記 8	細胞増殖用培養液 1,000mL 中 <u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u> 2.95g <u>牛胎子血清</u> 50～100mL <u>イーグルMEM</u> 残 量 炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.2に調整する。 血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、牛RSウイルス及び牛アデノウイル ス（7 型）に対して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。
付記 9	ゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液 A 液 <u>ペロナール緩衝食塩液</u> 1,000mL 中 <u>塩化ナトリウム</u> 8.5g <u>バルビタール</u> 0.575g <u>バルビタールナトリウム</u> 0.375g <u>無水塩化カルシウム</u> 0.028g <u>塩化マグネシウム六水和物</u> 0.168g <u>水</u> 残 量 B 液 <u>1 w/v%ゼラチン液</u> 100mL 中

	<u>精製ゼラチン</u> <u>水</u> <u>使用時加温溶解する。</u> <u>C液 5 w/v%牛血清アルブミン液</u> <u>100mL中</u> <u>牛血清アルブミン</u> <u>水</u> <u>5.0g</u> <u>残 量</u> 使用時に、A液200mLにB液0.2mL及びC液 4 mLを加えて調製し、用いる。
付記10	<u>第1次重層寒天培地</u> <u>1,000mL中</u> <u>イーグルMEM</u> <u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u> <u>寒天</u> <u>牛胎子血清</u> <u>水</u> <u>880mL</u> <u>2.95g</u> <u>8.0g</u> <u>20mL</u> <u>残 量</u> 血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。
付記11	<u>第2次重層寒天培地</u> <u>1,000mL中</u> <u>イーグルMEM</u> <u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u> <u>寒天</u> <u>ニュートラルレッド</u> <u>水</u> <u>900mL</u> <u>2.95g</u> <u>8.0g</u> <u>0.05g</u> <u>残 量</u>
付記12	<u>牛RSウイルス増殖用培養液</u> <u>1,000mL中</u> <u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u> <u>L-グルタミン</u> <u>ブドウ糖</u> <u>L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物</u> <u>酵母エキス</u> <u>牛胎子血清</u> <u>イーグルMEM</u> <u>炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。</u> <u>血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、</u> <u>牛パラインフルエンザ3型ウイルス、牛RSウイルス及び牛アデノウイルス</u> <u>(7型) に対して抗体陰性のものを用いる。</u> <u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチンの3.5.5、3.5.7、3.5.8、3.5.9、3.5.10、3.5.11及び3.5.12.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛サルモネラ症(サルモネラ・ダブリン・サルモネラ・ティフィムリウム)(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛サルモネラ症（サルモネラ・ダブリン・サルモネラ・ティフィムリウム）（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛大腸菌性下痢症（K99保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛大腸菌性下痢症（K99保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛大腸菌性下痢症（K99保有全菌体・FY保有全菌体・31A保有全菌体・O78保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛大腸菌性下痢症（K99保有全菌体・FY保有全菌体・31A保有全菌体・O78保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.6、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛ヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛ヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>気腫疽不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の気腫疽不活化ワクチンの3.3.3、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マンヘミア・ヘモリチカ（１型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）</u> <u>マンヘミア・ヘモリチカ１型菌の培養菌液を不活化し、凍結乾燥したもので、使用時に油性アジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。</u> <u>1.2.1.2 白血球浮遊液</u> <u>白血球浮遊液（付記１）を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試料をRPMI-1640培地（付記２）で２倍階段希釈する。試料の原液及び各段階の希釈液100μLを96穴マイクロプレートのそれぞれ３ウェルずつに移す。白血球浮遊液を90μLずつ加え、37℃で１時間培養した後、200Gで12分間遠心し、上清を捨てる。10vol%ホルマリン溶液（付記３）を100μLずつ加え30分間静置し、細胞沈渣を固定する。各ウェルの内容液を除去後、１w/v%クリスタルバイオレット溶液（付記４）50μLを加え、５分間染色する。流水で染色液を洗い流した後、各穴の底の紫色の細胞層の有無を観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>細胞層が紫色に一様に染まっていたとき、陰性と判定する。細胞層が完全に剥離あるいは濃く染まっていたとき、陽性と判定し、陽性を示した最高希釈倍数を毒素活性値とする。毒素活性値は２倍以下でなければならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法２により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>ただし、試験品の注射量は１mLとし、体重測定は５日目に行うものとする。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 ロイコトキソイド力価試験</u> <u>1.4.1.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1.1 試料</u> <u>試験品を溶解溶液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。</u>

1.4.1.2 試験方法

希釈液（付記5）で試料及び参照品（付記6）の各5段階の2倍階段希釈液を作成し、その希釈液を抗体固相化プレート（付記7）のウェルに100μLずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液（付記8）で洗浄後、マンヘミア・ヘモリチカロイコトキシノイドに対するマウスモノクローナル抗体（付記9）を各ウェルに100μLずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液で洗浄後、標識抗体1（付記10）を各ウェルに100μLずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液で洗浄後、基質液（付記11）を各ウェルに100μLずつ加え、常温で反応させる。参照品の最低希釈倍率の希釈液を加えたウェルの吸光度を主波長405nm、副波長490nmで測定し、その値が0.8～1.2となったときにすべてのウェルの吸光度を測定する。

1.4.1.3 判定

参照品のロイコトキシノイド量を1.0として、試料のロイコトキシノイド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(付記13)は1.0以上でなければならない。

1.4.2 莢膜抗原力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

1.4.2.2 試験方法

希釈・洗浄液（付記14）で試料及び参照品の各5段階の2倍階段希釈液を作成し、4℃で一晩反応させる。希釈・洗浄液で洗浄後、ブロッキング液1（付記15）を各ウェルに200μLずつ加えて常温で1時間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄後、マンヘミア・ヘモリチカ莢膜抗原に対するモノクローナル抗体（付記16）を100μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液で洗浄後、標識抗体2(付記17)を各ウェルに100μLずつ分注し、37℃で1時間反応させる。洗浄液で洗浄後、基質液を各ウェルに100μLずつ加え、常温で1時間反応させる。参照品の最低希釈倍率の希釈液を加えたウェルの吸光度を主波長405nm、副波長490nmで測定し、その値が0.8～1.2となったときにすべてのウェルの吸光度を測定する。

1.4.2.3 判定

参照品の莢膜抗原量を1.0として、試料中の莢膜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。

付記1 白血球浮遊液

健康な牛から採取した血液から白血球を調製し、細胞数が 1×10^7 個/mLとなるようにRPMI-1640培地で調整する。

付記2 RPMI-1640培地

1,000mL中	
RPMI-1640	10.39g
炭酸水素ナトリウム	2.0g
水	残量

付記3 10vol%ホルマリン溶液

	<u>100mL中</u> <u>ホルムアルデヒド</u> <u>水</u> <u>200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。</u>	<u>10mL</u> <u>残 量</u>
付記 4	<u>1 w/v%クリスタルバイオレット溶液</u> <u>100mL中</u> <u>クリスタルバイオレット</u> <u>水</u>	<u>1.0g</u> <u>残 量</u>
付記 5	<u>希釈液</u> <u>1,000mL中</u> <u>牛血清アルブミン</u> <u>0.38w/v%四ホウ酸ナトリウム溶液（付記18）</u> <u>200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。</u>	<u>20g</u> <u>残 量</u>
付記 6	<u>参照品</u> <u>動物医薬品検査所が適当と認めたもの</u>	
付記 7	<u>抗体固相化プレート</u> <u>希釈液 2 で適当な濃度に希釈したマンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対する牛ポリクロナル抗体（付記19）を100μLずつ96穴プレートに分注し、4℃で16時間反応させる。上清を捨て、ブロッキング液 2 （付記20）を100μLずつ加え、37℃で30分間反応させる。反応後、希釈・洗浄液で1回洗浄したもの</u>	
付記 8	<u>洗浄液</u> <u>1,000mL中</u> <u>ポリソルベート20</u> <u>希釈・洗浄液</u> <u>pHを7.2に調整する。</u>	<u>0.5mL</u> <u>残 量</u>
付記 9	<u>マンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対するマウスモノクローナル抗体</u> <u>マンヘミア・ヘモリチカロイコトキシンを用いてイムノブロットを行った場合、分子量約100kDaの単一バンドを認めるモノクローナル抗体で、中和能を有する。これを希釈・洗浄液で適当な希釈倍率に希釈したもの</u>	
付記10	<u>標識抗体 1</u> <u>ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)抗体を50v/v%グリセリン溶液（付記21）で溶解し、さらに希釈・洗浄液で希釈したもの</u>	
付記11	<u>基質液</u> <u>A液：0.6gの2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート）を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの</u>	

B液：0.02vol%過酸化水素水A液とB液を使用時に等量混合したもの

付記12 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 相対力価
動物用不活化ワクチン又はトキソイド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

付記14 希釈・洗浄液
1,000mL中
塩化ナトリウム 8.0g
塩化カリウム 0.2g
無水リン酸水素二ナトリウム 1.15g
リン酸二水素カリウム 0.2g
水 残 量
pHを7.2に調整し、200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記15 ブロッキング液 1
1,000mL中
牛血清アルブミン 10g
希釈・洗浄液 残 量
200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記16 マンヘミア・ヘモリチカ莢膜抗原に対するモノクローナル抗体
マンヘミア・ヘモリチカより精製した莢膜多糖体、ポリ多糖体及びロイコトキシンを用いて間接ELISAを行った場合、莢膜多糖体にのみ特異的に反応するモノクローナル抗体で、ブロッキング液 1 で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記17 標識抗体 2
ベルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgM(μ)抗体を50w/v%グリセリン溶液で適当な濃度になるように溶解したもの

付記18 0.38w/v%四ホウ酸ナトリウム溶液
1,000mL中
四ホウ酸ナトリウム 3.8g
水 残 量
pHを9.0に調整し、20nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記19 マンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対する牛ポリクローナル抗体
マンヘミア・ヘモリチカNADC615-8株又は同等の抗原性を有する株の培養菌液を気管内投与し、2週間後に得られた牛血清で、ロイコトキシンに対する中和抗体価が128～256倍になるように調整したもの

付記20	<u>ブロッキング液 2</u> <u>1,000mL中</u> <u>牛血清アルブミン</u> <u>希釈・洗浄液</u> <u>200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。</u>	<u>20g</u> <u>残 量</u>
付記21	<u>50vol/%グリセリン溶液</u> <u>滅菌精製水にグリセリンを等量混合したもの</u>	

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症・パスツレラ・ムルトシダ感染症・マンヘミア・ヘモリチカ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症・パスツレラ・ムルトシダ感染症・マンヘミア・ヘモリチカ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.6及び3.4.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>破傷風（アジュバント加）トキソイド</u> <u>動生剤基準の破傷風（アジュバント加）トキソイドの3.3.3、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の破傷風（アジュバント加）トキソイドの3.1.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛クロストリジウム感染症 3 種混合（アジュバント加）トキソイド</u> <u>動生剤基準の牛クロストリジウム感染症 3 種混合（アジュバント加）トキソイドの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛クロストリジウム感染症 5 種混合（アジュバント加）トキソイド</u> <u>動生剤基準の牛クロストリジウム感染症 5 種混合（アジュバント加）トキソイドの3.4.2、3.4.6及び3.4.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>乳房炎（黄色ブドウ球菌）・乳房炎（大腸菌） 混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>黄色ブドウ球菌の培養菌液及び大腸菌の培養菌液を不活化後混合し、油性アジュバントを加えたワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>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、注射量は 2 mL とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 黄色ブドウ球菌力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 試験動物</u> <u>体重 2 ～ 2.5kg のニュージーランドホワイト種 SPF 兔（付記 1）を用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>試験動物の 5 羽を試験群、2 羽を対照群とする。</u> <u>注射材料 1 mL を 0.5mL ずつ、試験群の頸部背側の 2 か所に 15 日間隔で 2 回皮下注射し、第 2 回注射後 15 日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、抗黄色ブドウ球菌スライム抗体価測定 ELISA キット（付記 2）を用いて酵素抗体反応試験を行う。</u> <u>被検血清をサンプル希釈液を用いて 20 倍に希釈し、ELISA プレートの精製スライム関連抗原複合体が固相化してある穴（以下この項において「(+) 穴」という。）及び固相化していない穴（以下この項において「(-) 穴」という。）の各 1 穴ずつに 1 穴当たり 100μL、また、陽性対照血清及び陰性対照血清は、(+) 穴及び (-) 穴の各 2 穴ずつに 1 穴当たり 100μL を加え、37℃ で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。</u> <u>コンジュゲート溶液を各穴に 100μL ずつ加え、37℃ で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質溶液を各穴に 100μL ずつ加え、遮光して 20 ～ 25℃ で 15 分反応させ、反応停止液を 100μL ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度 (OD) を波長 405nm で測定する。</u> <u>1.3.1.3 判定</u>

以下の計算式からリレイティブインデックスパーセント（以下「IRPC」という。）値を算出する。

$$\text{IRPC値} = \frac{(\text{OD}_{(+)} - \text{OD}_{(-)}) - (\text{OD}_{\text{C-}(+)} - \text{OD}_{\text{C-}(-)})}{(\text{OD}_{\text{C+}(+)} - \text{OD}_{\text{C+}(-)}) - (\text{OD}_{\text{C-}(+)} - \text{OD}_{\text{C-}(-)})} \times 100$$

$\text{OD}_{(+)}$: (+) 穴に加えた被検血清の OD_{405}

$\text{OD}_{(-)}$: (-) 穴に加えた被検血清の OD_{405}

$\text{OD}_{\text{C+}(+)}$: (+) 穴に加えた陽性対照血清の平均 OD_{405}

$\text{OD}_{\text{C+}(-)}$: (-) 穴に加えた陽性対照血清の平均 OD_{405}

$\text{OD}_{\text{C-}(+)}$: (+) 穴に加えた陰性対照血清の平均 OD_{405}

$\text{OD}_{\text{C-}(-)}$: (-) 穴に加えた陰性対照血清の平均 OD_{405}

試験群の80%以上がIRPC値50.0以上でなければならない。この場合において、対照群の全てがIRPC値10.0以下でなければならない。

1.3.2 大腸菌力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.3.1の試験で用いた動物を用いる。

1.3.2.2 試験方法

1.3.1.2で得られた各個体の血清について、抗大腸菌J5株抗体価測定ELISAキット（付記3）を用いて酵素抗体反応試験を行う。

被検血清をサンプル希釈液を用いて200倍に希釈したもの、陽性対照血清及び陰性対照血清を、ELISAプレートの各2穴に100 μL ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。

コンジュゲート溶液を各穴に100 μL ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質溶液を各穴に100 μL ずつ加え、遮光して20～25℃で15分反応させ、反応停止液を100 μL ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長405nmで測定する。

1.3.2.3 判定

以下の計算式からIRPC値を算出する。

$$\text{IRPC値} = \frac{\text{OD}_{\text{M}} - \text{OD}_{\text{C-}}}{\text{OD}_{\text{C+}} - \text{OD}_{\text{C-}}} \times 100$$

OD_{M} : 被検血清の平均 OD_{405}

$\text{OD}_{\text{C-}}$: 陰性対照血清の平均 OD_{405}

$\text{OD}_{\text{C+}}$: 陽性対照血清の平均 OD_{405}

試験群の60%以上がIRPC値50.0以上でなければならない。この場合において、対照群の全てがIRPC値20.0以下でなければならない。

付記 1 ニュージーランドホワイต์種SPF兎

抗黄色ブドウ球菌スライム抗体及び抗大腸菌J5株抗体陰性のもの

付記 2	<u>抗黄色ブドウ球菌スライム抗体価測定ELISAキット</u> <u>適当と認められる抗黄色ブドウ球菌スライム抗体価測定ELISAキットで、ELISAプレート（(+) 穴と (-) 穴が交互に並んでいるもの）、洗浄液、サンプル希釈液、コンジュゲート溶液、基質溶液、反応停止液、陽性対照血清及び陰性対照血清で構成されるもの。</u>
付記 3	<u>抗大腸菌J5株抗体価測定ELISAキット</u> <u>適当と認められる抗大腸菌J5株抗体価測定ELISAキットで、ELISAプレート（大腸菌J5株抗原を固相化したもの）、洗浄液、サンプル希釈液、コンジュゲート溶液、基質溶液、反応停止液、陽性対照血清及び陰性対照血清で構成されるもの。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99精製線毛抗原）混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99 精製線毛抗原）混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.10.3、3.10.6及び3.10.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99精製線毛抗原）混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2及び3.8.1の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症・牛ヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症混合（アジュバント加）ワクチン</u> <u>弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス、弱毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス、弱毒牛RSウイルス及び弱毒牛アデノウイルス（7型）を培養細胞でそれぞれ増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチン（以下この項において「乾燥生ワクチン」という。）と、ヒストフィルス・ソムニ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加えたワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したもののについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1、2.4.1及び2.4.2により試験を行い、これらに適合しなければならない。ただし、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清（付記1）、抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス血清（付記2）、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（付記3）、抗牛RSウイルス血清（付記4）及び抗牛アデノウイルス（7型）血清（付記5）を非働化したものを用いる。</u> <u>1.3 ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試料</u> <u>乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液（付記6）で溶解したものを試験品とし、試験品中の牛伝染性鼻気管炎ウイルス以外のウイルスを各抗血清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。</u>

1.3.1.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.1.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.1.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試料

乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解したものを試験品とし、試験品中の牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス以外のウイルスを各抗血清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。

1.3.2.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試料0.1mLを、小試験管に0.5mLずつ分注した培養細胞4本以上にそれぞれ接種し、37℃で5～7日間静置培養し、単層形成が良好であることを確認する。培養液を除き、1mL中牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルスNose株を10^{5.0}TCID₅₀（以下この項においてこのウイルスを用いる方法を「干渉法」という。）又は1mL中ニューカッスル病ウイルスTCND株若しくは宮寺株を10^{4.0}EID₅₀（以下この項においてこのウイルスを用いる方法を「END法」という。）含んだ細胞増殖用培養液を1mLずつ加え、更に34～36℃で5～7日間回転培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

干渉法にあつては培養細胞にCPEの抑制されたものを、END法にあつてはCPEの発現したものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.3 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試料

乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解したものを試験品とし、試験品中の牛パラインフルエンザ3型ウイルス以外のウイルスを各抗血清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。

1.3.3.1.2 培養細胞

牛腎継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.3.2 試験方法

試料0.1mLを4本以上の培養細胞にそれぞれ接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.3.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.0}$ TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.4 牛RSウイルス

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試料

乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解したものを試験品とし、試験品中の牛RSウイルス以外のウイルスを各抗血清を非働化したもので中和したものを牛RSウイルス増殖用培養液（付記24）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.4.1.2 培養細胞

Vero細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.4.2 試験方法

試料0.1mLを4本以上の培養細胞にそれぞれ接種し、37℃で60分間吸着させた後、牛RSウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34℃で14日間回転培養し、観察する。

1.3.4.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.0}$ TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.5 牛アデノウイルス（7型）

1.3.5.1 試験材料

1.3.5.1.1 試料

乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解したものを試験品とし、試験品中の牛アデノウイルス（7型）以外のウイルスを各抗血清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。

1.3.5.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.5.1.3 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液（以下この項において「VBS」という。付記7）に0.3vol%に浮遊させたものを用いる。

1.3.5.2 試験方法

試料0.1mLを4本以上の培養細胞にそれぞれ接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。培養終了後、培養細胞を4℃に冷却し、これに4℃に冷却した赤血球浮遊液0.25mLを加え、4℃で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.5.3 判定

赤血球凝集が認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.0}$ TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 安全試験

1.4.1 牛注射試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.4.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛2頭を用いる。うち1頭は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス及び牛アデノウイルス（7型）に対する抗体

陰性の牛とする。

1.4.1.2 試験方法

注射材料 1 頭分を試験動物の臀部筋肉内に注射し、14日間観察する。

1.4.1.3 判定

観察期間中、軽い発熱（40.5℃以下）を認めても3日間以上継続せず、注射部位の腫脹・硬結以外の異常を認めてはならない。

1.4.2 乳のみマウス注射試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 注射材料

乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したものを注射材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

1.4.2.2 試験方法

注射材料0.01mLずつを10匹の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

1.4.2.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。
事故のため試験動物が半数未満になった場合は、試験を反復する。

1.5 力価試験

1.5.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

1.5.1.1 試験材料

1.5.1.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物で、注射時に牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する抗体陰性のものを用いる。

1.5.1.1.2 中和試験用ウイルス

牛腎又は牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルスNo.758株を用いる。

1.5.1.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を約27cm²のシャーレに5mLずつ分注し、1～3日間培養し単層となったものを用いる。

1.5.1.2 試験方法

1.4.1の試験終了後、14日目に得られた血清について、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で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.2mL当たり約100PFUを含む中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この混合液0.2mLずつをそれぞれ2枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記8）5mLを加え、37℃、5 vol%炭酸ガス下で3～5日間培養した後、第2次重層寒天培地（付記9）3mLを加え、更に24時間培養後、ブラック数を算出する。また、中和試験用ウイルス液0.2mLずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、ブラック数を算出する。

1.5.1.3 判定

ブラック数がウイルス対照の50%以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、2倍以上でなければならない。

1.5.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病力価試験

1.5.2.1 試験材料

1.5.2.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物で、注射時に牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルスに対する抗体陰性のものを用いる。

1.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

牛精巢継代細胞で増殖させた牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルスNose株を用いる。

1.5.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

1.5.2.2 試験方法

1.4.1の試験終了後、7日目に得られた血清について、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で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL当たり約200TCID₅₀を含む中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この混合液0.1mLずつを、小試験管に0.5mLずつ分注した培養細胞4本ずつに接種する。37℃で4～5日間静置培養し、観察する。

1.5.2.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、8倍以上でなければならない。

1.5.3 牛パラインフルエンザ力価試験

1.5.3.1 試験材料

1.5.3.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

1.5.3.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

1.5.3.1.3 赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ3型ウイルス赤血球凝集抗原（付記10）を用いる。

1.5.3.1.4 赤血球浮遊液

モルモットの赤血球をVBSに0.3vol%に浮遊したものを用いる。

1.5.3.2 試験方法

5匹の試験動物の左右の鼻腔内に接種材料を0.1mLずつ接種し、21日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清0.2mLに25w/v%カオリン加生理食塩液（付記11）0.6mLを加え、常温で20分間処理した後、1,700Gで20分間遠心し、その上清をVBSを用いて2倍階段希釈する。各希釈血清0.2mLに4単位の牛パラインフルエンザ3型ウイルス赤血球凝集抗原0.2mLを加え、37℃で60分間処理した後、赤血球浮遊液0.2mLを加え、4℃で一晩静置し、観察する。

1.5.3.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価8倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

1.5.4 牛RSウイルス感染症力価試験

1.5.4.1 試験材料

1.5.4.1.1 注射材料

乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したものを注射材料とする。

1.5.4.1.2 試験動物

体重約100gのハムスターを用いる。

1.5.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛RSウイルスNMK7株を用いる。

1.5.4.1.4 培養細胞

Vero細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.5.4.2 試験方法

注射材料2mLずつを5匹の試験動物の腹腔内に14日間隔で2回注射し、第2回目の注射後14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、牛RS用ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。希釈血清0.5mLと0.1mL当たり約200TCID₅₀を含む中和試験用ウイルス0.5mLとを混合し、22℃で24時間処理する。この混合液0.1mLずつを4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、牛RS用ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34℃で10日間回転培養し、観察する。

1.5.4.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの抑制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2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。

1.5.5 牛アデノウイルス感染症力価試験

1.5.5.1 試験材料

1.5.5.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物で、注射時に牛アデノウイルス（7型）に対する抗体陰性のものを用いる。

1.5.5.1.2 赤血球凝集抗原

牛アデノウイルス（7型）赤血球凝集抗原（付記12）を用いる。

1.5.5.1.3 赤血球浮遊液

1.3.5.1.3の赤血球浮遊液を用いる。

1.5.5.2 試験方法

1.4.1の試験終了後、14日目に得られた血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を非働化した後、VBSで5倍に希釈する。希釈血清に25w/v%カオリン加生理食塩液を等量加え、常温で20分間処理した後、1,700Gで20分間遠心し、その上清をVBSを用いて2倍階段希釈する。各希釈血清0.2mLに4単位の牛アデノウイルス（7型）赤血球凝集抗原0.2mLを加え、4℃で一夜処理した後、4℃に冷却した赤血球浮遊液0.2mLを加え、4℃で一夜静置し、観察する。

1.5.5.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体価は、20倍以上でなければならない。

1.5.6 ヒストフィルス・ソムニ感染症力価試験

1.5.6.1 試験材料

1.5.6.1.1 注射材料

液状不活化ワクチンを注射材料とする。

1.5.6.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

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

ヒストフィルス・ソムニELISA用抗原（付記13。以下この項において「OMC抗原」という。）を用いる。

1.5.6.2 試験方法

試験動物 8 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料を0.5mLずつ 2 週間間隔で 2 回、試験群の筋肉内に注射する。2 回目の注射をした 2 週間後に試験動物から得られた各個体の血清についてELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、ヒストフィルス・ソムニ参照陽性血清（付記14）並びにヒストフィルス・ソムニ参照陰性血清（付記15）をポリソルベートPBS（付記16）で100倍に希釈し、さらに、希釈用プレート上で2倍階段希釈したものをヒストフィルス・ソムニ抗原吸着プレート（付記17）の各穴に100 μ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間感作する。ポリソルベートPBSでよく洗浄した後、各穴にペルオキシダーゼ標識抗モルモットIgG液（付記18）を100 μ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、ポリソルベートPBSでよく洗浄する。その後、基質液（付記19）を各穴に100 μ Lずつ加え、遮光して30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、1 mol/L硫酸溶液を各穴に50 μ Lずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長492nm及び副波長630nmで測定し、これらの差をELISA値とする。

1.5.6.3 判定

ELISA値が0.5以上を示す血清の最高希釈倍数をELISA抗体価とする。

試験群では、ELISA抗体価の幾何平均値が300倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、100倍未満でなければならない。

付記 1 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルスNo.758株で免疫した兎の血清であって、乾燥生ワクチンに含まれるウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 2 抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス血清

強毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルスNo.12株で免疫した兎の血清であって、乾燥生ワクチンに含まれるウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 3 抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清

強毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルスBN₁-1株で免疫した兎の血清であって、乾燥生ワクチンに含まれるウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 4 抗牛RSウイルス血清

強毒牛RSウイルスNMK7株で免疫した兎の血清であって、乾燥生ワクチンに含まれるウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 5 抗牛アデノウイルス（7 型）血清

強毒牛アデノウイルス（7 型）袋井株で免疫した兎の血清であって、乾燥生ワクチンに含まれるウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 6	<u>ウイルス増殖用培養液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	2.95g
	<u>牛胎子血清</u>	20~100mL
	<u>イーグルMEM</u>	残 量
	<u>炭酸水素ナトリウムでpHを7.2~7.6に調整する。</u>	
	<u>血清は牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢ー粘膜病ウイルス、牛パラインフルエンザ3型ウイルス、牛RSウイルス及び牛アデノウイルス(7型) に対して抗体陰性のものを用いる。</u>	
	<u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u>	
付記 7	<u>ゼラチン・アルブミン加ベロナール緩衝食塩液</u>	
	<u>A液</u>	<u>ベロナール緩衝食塩液</u>
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>塩化ナトリウム</u>	8.5g
	<u>バルビタール</u>	0.575g
	<u>バルビタールナトリウム</u>	0.375g
	<u>無水塩化カルシウム</u>	0.028g
	<u>塩化マグネシウム六水和物</u>	0.168g
	<u>水</u>	残 量
	<u>B液</u>	<u>1 w/v%ゼラチン液</u>
	<u>100mL中</u>	
	<u>精製ゼラチン</u>	1g
	<u>水</u>	残 量
	<u>使用時加温溶解する。</u>	
	<u>C液</u>	<u>5 w/v%牛血清アルブミン液</u>
	<u>100mL中</u>	
	<u>牛血清アルブミン</u>	5g
	<u>水</u>	残 量
	<u>使用時に、A液200mLにB液0.2mL及びC液 4 mLを加えて調製し、用いる。</u>	
付記 8	<u>第1次重層寒天培地</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>イーグルMEM</u>	880mL
	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	2.95g
	<u>寒天</u>	8g
	<u>牛胎子血清</u>	20 mL水
	<u>血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。</u>	
付記 9	<u>第2次重層寒天培地</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>イーグルMEM</u>	900mL
	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	2.95g
	<u>寒天</u>	8g

<u>ニュートラルレッド</u>	<u>0.05g</u>
<u>水</u>	<u>残 量</u>

付記10 牛パラインフルエンザ3型ウイルス赤血球凝集抗原
牛パラインフルエンザ3型ウイルスBNi-1株を牛腎継代細胞で増殖させて
得た培養上清

付記11	<u>25w/v%カオリン加生理食塩液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>カオリン</u>	<u>250g</u>
	<u>塩化ナトリウム</u>	<u>8.75g</u>
	<u>水</u>	<u>残 量</u>

付記12 牛アデノウイルス（7型）赤血球凝集抗原
牛アデノウイルス（7型）袋井株を牛精巢継代細胞で増殖させて得た培養
上清

付記13 OMC抗原
ヒストフィルス・ソムニM-1 Br/B株を培養し、集菌し、洗浄した後、生理
食塩液に再浮遊し、吸光度を調整する。これを4℃で攪はんした後、遠心し
て採取した上清をメンブランフィルターでろ過したもの。
参照陽性血清の抗体価をELISAにより測定するとき、OMC抗原に対する
吸光度は、参照OMC抗原（付記20）に対するその吸光度比で1.0（±0.3）
でなければならない。

付記14 ヒストフィルス・ソムニ参照陽性血清
OMC抗原を用いてELISAを実施し、主波長492nm及び副波長630nmで測定
したとき、抗体価が400～800倍を示すもの。凍結して－20℃以下又は凍結乾
燥して5℃以下に保存する。

付記15 ヒストフィルス・ソムニ参照陰性血清
無処置のモルモット血清であって、56℃で30分間非動化し、参照OMC抗
原又はOMC抗原を用いてELISAを実施し、主波長492nm及び副波長630nmで
測定した吸光度が、100倍希釈で0.5未満を示すものを用いる。凍結して－20
℃以下又は凍結乾燥して5℃以下に保存する。

付記16	<u>ポリソルベートPBS</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u>	<u>2.9g</u>
	<u>塩化カリウム</u>	<u>0.2g</u>
	<u>リン酸二水素カリウム</u>	<u>0.2g</u>
	<u>塩化ナトリウム</u>	<u>8g</u>
	<u>ポリソルベート20</u>	<u>0.5mL</u>
	<u>水</u>	<u>残 量</u>

付記17	ヒストフィルス・ソムニ抗原吸着プレート OMC抗原を炭酸緩衝液（付記21）で至適濃度に調整したものを各穴に100 μ Lずつ滴下し、30℃で2時間固相化し、ポリソルベートPBSで洗浄し、その後、ブロッキング液（付記22）を各穴に300 μ Lずつ加え、4℃で18～24時間感作し、ポリソルベートPBSで洗浄したもの。	
付記18	ペルオキシダーゼ標識抗モルモットIgG液 西洋ワサビペルオキシダーゼを標識した抗モルモットIgGを、ポリソルベートPBSで至適濃度に調整したもの。	
付記19	基質液 O-フェニレンジアミン40mgを、リン酸クエン酸緩衝液（付記23）100mLに溶解し、使用直前に過酸化水素を40 μ L添加したもの。	
付記20	参照OMC抗原 ヒストフィルス・ソムニM-1 Br/B株を培養し、集菌し、洗浄した後、生理食塩液に再浮遊し、吸光度を調整する。これを4℃で攪拌した後、遠心して採取した上清をメンブランフィルターでろ過したもの。 参照OMC抗原を用いて参照陽性血清の抗体価をELISAにより測定するとき、参照陽性血清の400倍希釈の吸光度は0.6以上でなければならない。	
付記21	炭酸緩衝液 1,000mL中 炭酸ナトリウム 炭酸水素ナトリウム 水 4℃に保存し、1週間以内に使用する。 pHは9.6に調整する。	1.59g 2.93g 残量
付記22	ブロッキング液 オボアルブミンタイプVII 50mgをポリソルベートPBS100mLに使用直前に溶解したもの。	
付記23	リン酸クエン酸緩衝液 1,000mL中 無水クエン酸 リン酸水素二ナトリウム十二水和物 水	4.67g 19.95g 残量
付記24	牛RS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 L-グルタミン ブドウ糖 L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物	2.95g 0.292g 1.0g 5.0g

酵母エキス	0.5g
牛胎子血清	10～20mL
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。	
血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、牛パラインフルエンザ3型ウイルス、牛RSウイルス及び牛アデノウイルス（7型）に対して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。	

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>牛小型ピロプラズマ病スポロゾイト生ワクチン</u> <u>タイレリア・サージャンタイをフタトゲチマダニで継代して得られたスポロゾイトを含有する生ワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法のマイコプラズマ否定試験法及びサルモネラ否定試験法により試験を行い、これらに適合しなければならない。</u> <u>1.2 生菌数限度試験</u> <u>一般試験法の生菌数限度試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験1.1、2.4.1及び2.4.2を準用して試験をするとき、適合しなければならない。</u> <u>1.4 原虫含有量試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>試験品を遠心（4℃、約1,500G、30分間）した沈渣を原虫浮遊液（付記1）0.5mLに再浮遊させたものを試料とする。</u> <u>1.4.2 試験方法</u> <u>試料50μLをスライドグラスに直径約6mmに塗抹し、ギムザ染色をした後、顕微鏡下で20視野のスポロゾイト数を数える。</u> <u>1.4.3 判定</u> <u>1視野当たりの平均スポロゾイト数をスポロゾイト塗抹直径及び顕微鏡視野直径より換算し、検体中のスポロゾイト含有量を算出する。試験品のスポロゾイト含有量は、1mL中 $5 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^8$ 個でなければならない。</u> <u>1.5 安全試験</u> <u>1.5.1 試験材料</u> <u>1.5.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.5.1.2 試験動物</u> <u>体重100～200kgの牛を用いる。</u> <u>1.5.2 試験方法</u> <u>注射材料 1頭分を1頭の試験動物の頸側部皮下に注射し、8週間観察する。また、注射後7及び8週目に採取した血液についてタイレリア・サージャンタイの寄生率を測定する。</u>

1.5.3 判定

観察期間中、一般状態及び眼瞼結膜の色調に異常を認めてはならない。また、タイレリア・サージャンタイの寄生率の上昇を認めてはならない。

ただし、貧血が認められた場合は、血液検査を行い赤血球1,000個当たりの寄生率が8%以下及び赤血球数が $2.5 \times 10^6/\mu\text{L}$ 以上であるときは適合とする。また、寄生率の上昇があった場合は、注射後10及び12週目の寄生率を測定し、上昇していないときは適合とする。

1.6 力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 試験動物

1.5の試験に用いた動物を用いる。

1.6.2 試験方法

1.5の試験終了後5日目に得られた血清について試験を行う。

ピロプラズマ抗原（付記2）を抗原処理液（付記3）と等量混合し、4℃で3時間処理した後、抗原希釈液（付記4）で希釈し、酵素抗体法（ELISA）用マイクロプレートに分注し、4℃で約16時間固相化する。抗原を固相化したプレートを洗浄液（付記5）で洗浄し、洗浄液をよく除いた後、血清希釈液（付記6）で100倍に希釈した被検血清を添加し、37℃で1時間処理する。洗浄液で洗浄し、洗浄液をよく除いた後、ペルオキシダーゼ標識抗牛IgG抗体（付記7）を加え、37℃で1時間処理する。洗浄液で洗浄し、酵素基質液（付記8）を添加した後、37℃で1時間処理する。処理後1w/v%ラウリル硫酸ナトリウムを添加した後、すみやかに吸光度（ $\text{OD}_{405} - \text{OD}_{492}$ ）を測定し、抗体価算出法（付記9）により補正值を算出する。

なお、被検血清の代わりに血清希釈液を入れて同様の操作を加えたものをブランクとする。

1.6.3 判定

補正值は0.2以上でなければならない。

付記1 原虫浮遊液

600mL中

A液*

30mL

B液**

30mL

牛血清アルブミンフラクションV

6g

ベンジルペニシリンカリウム

2,400単位

硫酸ストレプトマイシン

2,400 μg （力価）

水

540mL

pHを7.0～7.4に調整した後、孔径220nmのメンブランフィルターでろ過滅菌する。

* A液

1,000mL中

塩化ナトリウム

160g

塩化カリウム

8g

水

残量

** B液

1,000mL中

無水リン酸水素二ナトリウム	3.04g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.2g
水	残 量

付記 2 ピロプラズマ抗原
タイレリア・サージャンタイ感染ダニを吸血させることにより作出した感染牛の寄生赤血球数がピークに達したとき、凝固防止した血液を採取する。採取した血液をリン酸緩衝食塩液で冷却遠心（4℃、約4,850G、35分間）により4回洗浄した後、沈渣をリン酸緩衝食塩液で再浮遊し、20vol%浮遊液を作製する。この20vol%浮遊液を窒素ガス破碎（1,000psi、1分:70kg/cm²）した後、冷却遠心（4℃、約4,850G、35分間）により3回洗浄したものをピロプラズマ抗原とし、凍結保存する。
これを用いて1.6.2の試験をするとき、抗体価算出法による参照陽性血清（付記10）のELISA値は0.8～1.2、参照陰性血清（付記11）のELISA値及び補正値はいずれも0.2未満となる希釈倍数を決定して使用する。

付記 3	<u>抗原処理液</u>	
	1,000mL中	
	塩化ナトリウム	8g
	塩化カリウム	0.2g
	無水リン酸水素二ナトリウム	2.9g
	リン酸二水素カリウム	0.2g
	TritonX-100	40g
	水	残 量

付記 4	<u>抗原希釈液</u>	
	1,000mL中	
	炭酸ナトリウム	1.59g
	炭酸水素ナトリウム	2.93g
	水	残 量
	pHを9.6に調整する。	

付記 5	<u>洗浄液</u>	
	1,000mL中	
	塩化ナトリウム	8g
	塩化カリウム	0.2g
	無水リン酸水素二ナトリウム	2.9g
	リン酸二水素カリウム	0.2g
	モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン（20E.O.）	0.2g
	水	残 量

付記 6	<u>血清希釈液</u>	
	1,000mL中	
	塩化ナトリウム	8g
	塩化カリウム	0.2g

無水リン酸水素二ナトリウム	2.9g
リン酸二水素カリウム	0.2g
モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E.O.)	1.5g
水	残 量

付記 7 ペルオキシダーゼ標識抗牛IgG抗体
西洋ワサビペルオキシダーゼを抗牛IgG抗体に標識したもので1.6.2の試験をするとき、参照陽性血清のELISA値は0.8～1.2、参照陰性血清のELISA値及び補正值はいずれも0.2未満となる希釈倍数を決定して使用する。－20℃以下に保存する。

付記 8 酵素基質液
A液
200mL中
クエン酸ナトリウム 5.88g
水 残 量
B液
200mL中
クエン酸 4.2g
水 残 量
C液
1 mL中
過酸化水素水 0.2mL
水 残 量
A液とB液をpH4.0になるよう混合（A液：B液＝1：1.3～1.6）したもの
を0.1mol/Lクエン酸溶液とする。0.1mol/Lクエン酸溶液40mLで、2,2'アジノ-ジ- [3-エチルベンツチアゾリンスルホン酸]を20mg溶解した後、C液
80μLを加えたもの

付記 9 抗体価算出法
次式により算出する。OD値は、2穴の平均値とする。

$$\text{OD値} = \text{OD}_{405} - \text{OD}_{492}$$

$$\text{ELISA値} = \text{O} - \text{B}$$

$$\text{補正值} = \text{S} / \text{P}$$

$$\text{OD}_{405} : 405\text{nm} \text{における吸光度}$$

$$\text{OD}_{492} : 492\text{nm} \text{における吸光度}$$

$$\text{O} : \text{測定した血清のOD値}$$

$$\text{B} : \text{ブランクのOD値}$$

$$\text{P} : \text{参照陽性血清のELISA値}$$

$$\text{S} : \text{被検血清のELISA値}$$

付記10 参照陽性血清
タイレリア・サージャンタイ感染ダニを吸血させることにより作出した感
染牛の発症極期に得られた血清を小分けして凍結乾燥したものであり、抗体
価算出法によるELISA値は0.8～1.2を示す。

付記11 参照陰性血清
血液塗抹の観察でタイレリア・サージンタイ原虫陰性である健康な牛から得られた血清を小分けして凍結乾燥したものであり、抗体価算出法によるELISA値はいずれも0.2未満を示す。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>馬インフルエンザ不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の馬インフルエンザ不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の馬インフルエンザ不活化ワクチンの3.2.2を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>馬ウイルス性動脈炎不活化ワクチン(アジュバント加溶解用液)</u> <u>動生剤基準の馬ウイルス性動脈炎不活化ワクチン（アジュバント加溶解用液）の3.4.4、3.4.8及び3.4.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の馬ウイルス性動脈炎不活化ワクチン（アジュバント加溶解用液）の3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。ただし、溶解前の試験品を 5 mLのリン酸緩衝食塩液で溶解し、200倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2～5℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>馬鼻肺炎生ワクチン</u> <u>糖たん白gE遺伝子を欠損した弱毒馬ヘルペスウイルス 1 型を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。</u> 1 小分製品の試験 1.1 <u>無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> 1.2 <u>迷入ウイルス否定試験</u> 1.2.1 <u>馬由来細胞接種試験</u> 1.2.1.1 <u>細胞観察</u> 1.2.1.1.1 <u>試験法</u> <u>ED細胞（付記1）を用いる。</u> <u>非働化した抗馬ヘルペスウイルス 1 型血清（付記 2）を用いて、試験品を完全に中和したものを試料とする。試料 1 mLにつき20cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着した後、ウイルス増殖用培養液（付記 3）を加えて37℃で 7 日間培養する。CPEの有無を観察した後、次代へ継代し、37℃で 7 日間培養してCPEの有無を観察する。</u> 1.2.1.1.2 <u>判定</u> <u>観察期間中、培養細胞にCPEを認めてはならない。</u> 1.2.1.2 <u>赤血球吸着試験</u> 1.2.1.2.1 <u>試験法</u> <u>1.2.1.1の観察最終日に細胞表面をリン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄後、培養細胞を 2 群に分け、モルモット及びがちょうの0.1vol%赤血球浮遊液をそれぞれの群に重層し、室温で60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察する。</u> 1.2.1.2.2 <u>判定</u> <u>培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。</u> 1.2.1.3 <u>馬伝染性貧血ウイルス否定試験</u> 1.2.1.3.1 <u>試験方法</u> <u>1.2.1.1の試料接種後 7 日目の細胞を次代へ継代し、37℃で 7 日間培養する。培養 7 日目に培養細胞をリン酸緩衝食塩液で洗浄した後、抗馬伝染性貧血ウイルス馬血清（付記 4）による蛍光抗体法を行い、観察する。</u> 1.2.1.3.2 <u>判定</u> <u>培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。</u> 1.3 <u>ウイルス含有量試験</u>

1.3.1	試料	試験品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。
1.3.2	培養細胞	BEK-1 細胞（付記5）を96穴プレートに培養して単層となったものを用いる。
1.3.3	試験方法	試料25 μ Lずつをそれぞれ4穴の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着した後、ウイルス増殖用培養液を75 μ L加え、37℃で5～7日間培養し、観察する。
1.3.4	判定	培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID ₅₀ を算出する。 試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10 ^{4.5} TCID ₅₀ 以上でなければならない。
1.4	異常毒性否定試験	一般試験法の異常毒性否定試験法により試験するとき、これに適合しなければならない。
1.5	力価試験	
1.5.1	試験材料	
1.5.1.1	注射材料	試験品並びにそれをリン酸緩衝食塩液で5倍及び25倍に希釈したものを注射材料とする。
1.5.1.2	試験動物	約6週齢のハムスターを用いる。
1.5.1.3	攻撃ウイルス	ハムスターに馴化させた攻撃用馬鼻肺炎ウイルスKyD株（付記6）を用いる。
1.5.1.4	試験方法	試験動物12匹を試験群、4匹を対照群とする。注射材料1 mLずつをそれぞれ4匹の試験群の腹腔内に注射する。注射後21日目に攻撃ウイルス1 mLずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射し、7日間観察する。
1.5.1.5	判定	試験群の生残動物数から試験品のED ₅₀ を算出する。 試験品のED ₅₀ は、16ED ₅₀ /mL以上でなければならない。この場合、対照群は、全て死亡しなければならない。
付記1	ED細胞	健康な妊娠馬から摘出された胎子の皮膚をトリプシン（1:250）を0.25w/v%含むリン酸緩衝食塩液で消化して調整した細胞を、細胞増殖用培養液に浮遊し、培養瓶に分注し、37℃で4～5日間静置培養して細胞層を形成させた後、次代に継代培養する方法で作出された継代35代以内のものである。
付記2	抗馬ヘルペスウイルス1型血清	馬ヘルペスウイルス1型で免疫した兔の血清であって、試験品の馬ヘルペスウイルス1型を完全に中和できるもの。
付記3	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
		2.95g

牛胎子血清又はやぎ血清

イーグルMEM

炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

5～10mL

残量

付記 4

抗馬伝染性貧血ウイルス馬血清

健康馬に馬伝染性貧血ウイルスを実験感染させて作製した馬血清であつて、蛍光抗体法により測定した力価が16倍以上のもの。

付記 5

BEK-1細胞

健康な牛胎子腎由来の株化細胞

付記 6

攻撃用馬鼻肺炎ウイルスKyD株

馬鼻肺炎ウイルスKyD株をハムスターの腹腔内に注射し、感染極期に肝臓を採取し、リン酸緩衝食塩液で10w/v%乳剤に調整する。攻撃には、 $10^{4.0}$ LD₅₀を用いる。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>馬鼻肺炎(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の馬鼻肺炎（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の馬鼻肺炎（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>馬ロタウイルス感染症(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の馬ロタウイルス感染症(アジュバント加)不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の馬ロタウイルス感染症(アジュバント加)不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ゲタウイルス感染症不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のゲタウイルス感染症不活化ワクチンの3.5.3、3.5.6及び3.5.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準のゲタウイルス感染症不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>化膿性レンサ球菌トキソイド</u> <u>ストレプトコッカス・ピオゲネスの培養液中に産生されたヘモトキシンをホルマリンで無毒化したトキソイドである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約2.5kgの兔を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料10mLずつを2匹の試験動物の静脈内に注射し、5日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>観察期間中、毒素による中毒症状その他の異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>腺疫トキソイド</u> <u>ストレプトコッカス・エクイの培養液中に産生されたヘモトキシンをホルマリンで無毒化したトキソイドである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約2.5kgの兔を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料10mLずつを2匹の試験動物の静脈内に注射し、5日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>観察期間中、毒素による中毒症状その他の異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚インフルエンザ(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚インフルエンザ(アジュバント加)不活化ワクチンの3.3.3及び3.3.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の豚インフルエンザ（アジュバント加）不活化ワクチンの3.2.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の一般試験法の異常毒性否定試験の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚インフルエンザ不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）</u> <u>豚インフルエンザ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た後凍結乾燥したもの（以下この項において「乾燥ワクチン」という。）で、使用時に油性アジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>乾燥ワクチンを溶解用液と同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したものを注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 発育鶏卵</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1の10～12日齢のものを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.2mLずつを4個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、36～37℃で培養し、3日間隔で尿膜腔液を2代まで継代する。2代目の尿膜腔液に0.5vol%の鶏の赤血球浮遊液を等量加え、室温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。</u> <u>ただし、赤血球凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量混合して3代まで継代し、3代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後、判定する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>赤血球凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。</u> <u>試験品に活性ウイルスを認めてはならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 注射材料</u> <u>試験品をリン酸緩衝食塩液で10倍に希釈したものを注射材料とする。</u>

1.4.1.2 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

1.4.1.3 赤血球凝集抗原

試験品に含まれるそれぞれのウイルス株と同一亜型のウイルスで調製した赤血球凝集抗原（付記）を用いる。

1.4.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを試験動物20匹の腹腔内に注射した後、4 群に分け、14日目に得られた血清を各群ごとにプールして、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清をRDE及び鶏赤血球処理又は適当と認められた方法で処理する。これをリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈液0.2mLに0.2mL中8単位の赤血球凝集抗原を等量加え、室温で60分間処理する。これに0.5vol%の鶏の赤血球浮遊液を0.4mLずつ加え、室温に60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.3 判定

赤血球凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。各群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、H1N1亜型及びH3N2亜型で8倍以上でなければならない。

付記 赤血球凝集抗原

豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/Iowa/08/00（H1N1）株及び A/swine/Iowa/06/00（H3N2）株又はこれらと同等と認められたウイルス株を用いて、それぞれ調製したもの。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚オーエスキー病(g Iー、tk+)生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚オーエスキー病(gIー、tk+) 生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8 及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚オーエスキー病(g Iー、tk+)生ワクチン(アジュバント加溶解用液)</u> <u>動生剤基準の豚オーエスキー病（gIー、 tk+）生ワクチン（アジュバント加溶解用液）の3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚オーエスキー病(g I ー、tkー)生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚オーエスキー病(gIー、tkー)生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚オーエスキー病（g Iー、tkー）生ワクチン（酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液）</u> <u>動生剤基準の豚オーエスキー病（gIー、tkー）生ワクチン（酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液）の3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚オーエスキー病(gⅢー、tkー)生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚オーエスキー病(gⅢー、tkー)生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚オーエスキー病(gXー、tkー)生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚オーエスキー病(gXー、tkー)生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚オーエスキー病（gI-、gX-）（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚オーエスキー病（gI-、gX-）（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.7.2、3.7.4、3.7.6及び3.7.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚サーコウイルス(2型)感染症(1型－2型キメラ)(デキストリン誘導体アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚サーコウイルス（2型）感染症（1型-2型キメラ）（デキストリン誘導体アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2、3.3.4、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚サーコウイルス(2型・組換え型)感染症(カルボキシビニルポリマーアジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2、3.3.4及び3.3.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚サーコウイルス(2型・組換え型)感染症(酢酸 トコフェロール・油性アジュバント加)不活化ワクチ ン</u> <u>動生剤基準の豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（酢酸トコフェロー ル・油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.6及び3.4.7に規定するところ により、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚サーコウイルス(2型)感染症不活化ワクチン</u> <u>(油性アジュバント加懸濁用液)</u> <u>豚サーコウイルス（2型）を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したもので、使用時に油性アジュバントを含む懸濁用液と混和して調製するワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品を試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培養細胞</u> <u>PPK-3F細胞を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>細胞増殖用培養液（付記1）で適当な濃度に調整した培養細胞浮遊液30mLに試料1.5mLを接種し、37℃で1日培養後グルコサミン処理培地（付記2）を7～8mL加え、37℃で15分間静置した後、上清を除去し、ウイルス増殖用培養液（付記3）を加えて処理し、3日間培養する。培養細胞を2～3回凍結融解し、遠心して得た上清15mLを細胞浮遊液に同様に接種、培養、処理した後、ろ過した液を新たな細胞浮遊液に等量加え、37℃で4日間培養した細胞について豚サーコウイルス（2型）（以下「PCV2」という。）モノクローナル抗体（付記4）による蛍光抗体法を行う。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。</u> <u>1.3 異常毒性否定試験</u> <u>動生剤基準の一般試験法の異常毒性否定試験を準用して試験するとき、適合しなければならない。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.4.1.2 試験動物</u>

6～7週齢のマウスを用いる。

1.4.2 試験方法

試験動物10匹のそれぞれの頸部皮下に注射材料を0.2mLずつ注射し、注射21日後に得られた各個体の血清についてELISAにより抗体価を測定する。

希釈用96穴プレートにDLE/SD緩衝液（付記5）を各穴に80 μ Lずつ分注し、DLE/SD緩衝液で5倍に希釈した各被検血清、参照陽性血清（付記6）及び参照陰性血清（付記7）をそれぞれ80 μ L加え、2倍階段希釈する。抗原液（付記8）を各穴に等量加え、4℃で一夜静置して処理する。この抗原・抗体反応液を100 μ Lずつ固相化プレート（付記9）の各穴に加え、37℃で3時間感作し、洗浄液（付記10）300 μ Lで洗浄後、抗体価測定ELISA用標識抗体（付記11）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液300 μ Lで3回洗浄し、各穴に基質液（付記12）を100 μ Lずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。0.5mol/L硫酸液を各穴に50 μ Lずつ加え、反応を停止させる。主波長450nm、副波長630nmの2波長で吸光度（OD）を測定し、以下の計算式によりOD₅₀を示した血清の希釈倍率を抗体価とする。

$$OD_{50} = (OD_{min} + OD_{max}) / 2$$

OD_{min}：参照陽性血清の最低希釈倍数におけるODの平均

OD_{max}：320倍から2,560倍まで希釈した参照陰性血清のODの平均

$$\text{抗体価} (\log_{10}) = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き：ODと血清希釈倍数の対数についてOD₅₀を挟む2点の回帰直線における定数及び傾き

1.4.3 判定

試験動物の抗体価の実数は幾何平均で72倍以上でなければならない。この際、参照陽性血清の抗体価は所定の値を示し、参照陰性血清のそれは20倍以下でなければならない

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

2.95g

牛胎子血清

100mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6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 グルコサミン処理培地

1,000mL中

d-グルコサミン

65g

ハンクス199培地

残量

付記3 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

2.95g

牛胎子血清

20mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記4 PCV2モノクローナル抗体
PCV2オープンリーディングフレーム2（以下「PCV2ORF2」という。）を
認識するモノクローナル抗体

付記5 DLE/SD緩衝液
1,000mL中
トリス 1.21g
塩化ナトリウム 8.77g
EDTA 3.72g
ポリソルベート20 1mL
水 残 量
pHを7.0に調整する。

付記6 参照陽性血清
標準陽性血清（付記13）と同様の方法で作成した血清で、標準血清を用い
て1.4.2を準用したELISA（以下「力価試験のELISA」という。）で測定した
とき、2倍階段希釈の3段階目から5段階目にOD₅₀を示すようにDLE/SD緩
衝液で希釈して用いる。

付記7 参照陰性血清
SPFマウスから得られた血清で、力価試験のELISAで測定したとき抗体価
が20（1.30log₁₀）倍以下のもの

付記8 抗原液
PK15細胞で培養したPCV21010-25株を超音波処理し、遠心した後、β-ブ
ロピオラクトンで不活化したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の
ELISAで測定したとき、標準血清が所定の抗体価を示すようにDLE/SD緩衝
液で希釈して用いる。

付記9 固相化プレート
抗体価測定ELISA用捕捉抗体（付記14）を120μLずつ96穴ELISAプレート
に分注し、4℃で一夜静置する。洗浄液で3回洗浄し、ブロッキング液（付
記15）を200μLずつ加え、37℃で60分間反応させ、洗浄液で3回洗浄した
もの

付記10 洗浄液
1,000mL中
トリス 1.21g
塩化ナトリウム 8.77g
ポリソルベート20 1mL
水 残 量
pHを7.3～7.7に調整する。

付記11	抗体価測定ELISA用標識抗体 PCV2ORF2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PCV21902BIBCを接種したヌードマウスの腹水を精製し、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した後、15w/v%サッカリン加リン酸緩衝食塩液で調整したもので、標準陽性血清を用いて力価試験のELISAで測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すようにDLE/SD緩衝液で希釈して用いる。												
付記12	基質液 適当な規格のテトラメチルベンチジン溶液												
付記13	標準陽性血清 マウスをPCV2感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）で2回免疫後35日に得られたブール血清で、力価試験のELISAで測定したとき、抗体価4,000～10,000倍を示すもの												
付記14	抗体価測定ELISA用捕捉抗体 PCV2ORF2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PCV21903A8BCを接種したヌードマウスの腹水を精製し、15w/v%サッカリン加リン酸緩衝食塩液で調整したもので、標準陽性血清を用いて力価試験のELISAで測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように炭酸ナトリウム緩衝液（付記16）で希釈して用いる。												
付記15	ブロッキング液 リン酸緩衝食塩液に植物性ポリペプトンを1 w/v%加えたもの												
付記16	炭酸ナトリウム緩衝液 <table> <tr> <td>1,000mL中</td><td></td></tr> <tr> <td>塩化ナトリウム</td><td>1.59g</td></tr> <tr> <td>炭酸水素ナトリウム</td><td>2.93g</td></tr> <tr> <td>アジ化ナトリウム</td><td>0.2g</td></tr> <tr> <td>水</td><td>残 量</td></tr> <tr> <td>pHを9.6に調整する。</td><td></td></tr> </table>	1,000mL中		塩化ナトリウム	1.59g	炭酸水素ナトリウム	2.93g	アジ化ナトリウム	0.2g	水	残 量	pHを9.6に調整する。	
1,000mL中													
塩化ナトリウム	1.59g												
炭酸水素ナトリウム	2.93g												
アジ化ナトリウム	0.2g												
水	残 量												
pHを9.6に調整する。													

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚伝染性胃腸炎生ワクチン(子豚用)</u> <u>動生剤基準の豚伝染性胃腸炎生ワクチン（子豚用）の3.3.4、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>ただし、3.3.8に用いる試験動物は、試験群 2 頭及び対照群 1 頭とし、試験群の注射材料は60頭分とする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚伝染性胃腸炎生ワクチン(母豚用)</u> <u>動生剤基準の豚伝染性胃腸炎生ワクチン（母豚用）の3.3.4、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>ただし、3.3.8に用いる試験動物は、試験群 2 頭及び対照群 1 頭とし、試験群の注射材料は10頭分とする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚伝染性胃腸炎濃縮生ワクチン(母豚用)</u> <u>動生剤基準の豚伝染性胃腸炎濃縮生ワクチン（母豚用）の3.3.4、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>ただし、3.3.8に用いる試験動物は、試験群 2 頭及び対照群 1 頭とし、試験群の注射材料は10頭分とする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚伝染性胃腸炎(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚伝染性胃腸炎（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の豚伝染性胃腸炎（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚パルボウイルス感染症生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚パルボウイルス感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.6及び 3.3.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の一般試験法の異常毒性否定試験の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚パルボウイルス感染症不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚パルボウイルス感染症不活化ワクチンの3.5.3、3.5.5及び3.5.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の豚パルボウイルス感染症不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前												
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚パルボウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚パルボウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.3及び3.5.4.2に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について次の試験を行うものとする。</u> <u>1 不活化試験</u> <u>1.1 試験材料</u> <u>1.1.1 試料</u> <u>試験品10mLに等量のクロロホルムを加え、よく混和後、遠心分離した水層の5 mLを約100倍量以上のリン酸緩衝食塩液で4℃で一夜透析したものを試料とする。</u> <u>1.1.2 培養細胞</u> <u>PK-15細胞を培養びんで培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.2 試験方法</u> <u>試料の全量を1 mLにつき3 cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させる。試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液（付記1）を加え、37℃で10日間培養後、培養上清にベロナール緩衝食塩液（付記2）で調製した0.5vol%の非凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液を等量加え、室温で60分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。</u> <u>1.3 判定</u> <u>赤血球の凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。</u> <u>試料に活性ウイルスを認めてはならない。</u> <u>付記 1 ウイルス増殖用培養液</u> <table><tr><td><u>1,000mL中</u></td><td></td></tr><tr><td><u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u></td><td><u>2.95g</u></td></tr><tr><td><u>牛胎子血清又は牛血清アルブミン</u></td><td><u>20mL又は1.1g</u></td></tr><tr><td><u>イーグルMEM</u></td><td><u>残 量</u></td></tr><tr><td><u>炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。</u></td><td></td></tr><tr><td><u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u></td><td></td></tr></table> <u>付記 2 ベロナール緩衝食塩液（pH7.2）</u> <u>1,000mL中</u>	<u>1,000mL中</u>		<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95g</u>	<u>牛胎子血清又は牛血清アルブミン</u>	<u>20mL又は1.1g</u>	<u>イーグルMEM</u>	<u>残 量</u>	<u>炭酸水素ナトリウムで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>1,000mL中</u>													
<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95g</u>												
<u>牛胎子血清又は牛血清アルブミン</u>	<u>20mL又は1.1g</u>												
<u>イーグルMEM</u>	<u>残 量</u>												
<u>炭酸水素ナトリウムで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>													

バルビタール
バルビタールナトリウム
塩化ナトリウム
水

0.575g
0.375g
8.5g
残量

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚流行性下痢生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚流行性下痢生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>ただし、3.3.8に用いる試験動物は、試験群 2 頭及び対照群 1 頭とし、試験群の注射材料は10頭分とする</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚伝染性胃腸炎・豚流行性下痢混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚伝染性胃腸炎・豚流行性下痢混合生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>ただし、3.3.8に用いる試験動物は、試験群 2 頭及び対照群 1 頭とし、試験群の注射材料は10頭分とする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚丹毒生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚丹毒生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚丹毒（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚丹毒（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.3、3.3.7及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。なお、3.3.7の試験を適用しないものについては、同基準の豚丹毒（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.8に規定するところにより、これに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚丹毒（酢酸トコフェロールアジュバント加） 不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚丹毒（酢酸トコフェロールアジュバント加）不活化ワクチンの 3.3.3、3.3.6及び3.3.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものと する。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚丹毒（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚丹毒（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2及び3.4.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の一般試験法の異常毒性否定試験の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前								
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚丹毒（アジュバント加）ワクチン（組換え型）</u> <u>組換えブレヴィバチルス・チャーシネンシスで産生される豚丹毒菌の表層防御抗原たん白を精製したものに、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> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 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>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定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>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を生理食塩液で10倍に希釈したものを注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>4 週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.1.3 攻撃用菌液</u> <u>豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記 1）に接種し、37℃で18～24時間培養する。これを普通ブイヨンで 1 mL中10³個の菌量になるように希釈したものを攻撃用菌液とする。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物10匹を試験群とし、10匹を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを試験群の内股部皮下に注射する。注射後 3 週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、7 日間観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>試験群においては、70%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、90%以上が死亡しなければならない。</u> <u>付記 1 攻撃菌用培地</u> <table><tr><td><u>1,000mL中</u></td><td></td></tr><tr><td><u>ブレインハートインフュージョン</u></td><td><u>37g</u></td></tr><tr><td><u>トリスヒドロキシメチルアミノメタン</u></td><td><u>3g</u></td></tr><tr><td><u>ポリソルベート80</u></td><td><u>1mL</u></td></tr></table>	<u>1,000mL中</u>		<u>ブレインハートインフュージョン</u>	<u>37g</u>	<u>トリスヒドロキシメチルアミノメタン</u>	<u>3g</u>	<u>ポリソルベート80</u>	<u>1mL</u>
<u>1,000mL中</u>									
<u>ブレインハートインフュージョン</u>	<u>37g</u>								
<u>トリスヒドロキシメチルアミノメタン</u>	<u>3g</u>								
<u>ポリソルベート80</u>	<u>1mL</u>								

	<u>水</u> pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高圧滅菌する。<u>残 量</u>
--	--

改正後	改正前								
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚丹毒（油性アジュバント加）ワクチン（組換え型）</u> <u>組換えブレビバチルス・チャーシネンシスで産生される豚丹毒菌の表層防御抗原たん白を精製したものに、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 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>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定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>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品をリン酸緩衝食塩液で30倍に希釈したものを注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>4週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.1.3 攻撃用菌液</u> <u>豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記1）に接種し、37℃で18～24時間培養する。これを普通ブイヨンで1 mL中10⁷個の菌量になるように希釈したものを攻撃用菌液とする。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物10匹を試験群とし、10匹を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを試験群の内股部皮下に注射する。注射後3週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、7日間観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>試験群においては、70%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、90%以上が死亡しなければならない。</u> <u>付記1 攻撃菌用培地</u> <table><tr><td><u>1,000mL中</u></td><td></td></tr><tr><td><u>ブレインハートインフュージョン</u></td><td>37g</td></tr><tr><td><u>トリスヒドロキシメチルアミノメタン</u></td><td>3g</td></tr><tr><td><u>ポリソルベート80</u></td><td>1mL</td></tr></table>	<u>1,000mL中</u>		<u>ブレインハートインフュージョン</u>	37g	<u>トリスヒドロキシメチルアミノメタン</u>	3g	<u>ポリソルベート80</u>	1mL
<u>1,000mL中</u>									
<u>ブレインハートインフュージョン</u>	37g								
<u>トリスヒドロキシメチルアミノメタン</u>	3g								
<u>ポリソルベート80</u>	1mL								

水
pHを7.6に調整して、121℃で15分間高压滅菌する。

残 量

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（2型）感染症（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（2型）感染症（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（5型）感染症(アジュバント加) 不活化ワクチン</u> <u>アクチノバシラス・プルロニューモニエ（以下「App」という。）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ワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を希釈用液（付記 1）又は適当と認められた希釈用液で20倍に希釈したものを注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>約3週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.1.3 攻撃用菌液</u> <u>凍結乾燥したAppKN-1株又は適当と認められた株をハートインフュージョン培地で溶解し、試験用培地 1（付記 2）に移植し、37℃で16時間増殖させ、集落を鈎菌して試験用培地 2（付記 3）に移植し、37℃で6時間振盪培養したものを攻撃用菌液とする。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物30匹以上を試験群、30匹以上を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを、試験群の腹腔内に注射する。注射後 2 週間目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの 3 群計 6 群に分ける。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。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>対照群の80%以上が死亡した最少の攻撃菌量において、試験群では、80%以上が耐過生存しなければならない。</u> 付記 1 希釈用液

	1,000mL中 <table><tr><td><u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u></td><td><u>2.53g</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>0.45g</u></td></tr><tr><td><u>塩化ナトリウム</u></td><td><u>6.0g</u></td></tr><tr><td>水</td><td>残量</td></tr></table> pHを7.0に調整後、121℃で15分間高圧滅菌するか、又はろ過滅菌して用いる。	<u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u>	<u>2.53g</u>	<u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u>	<u>0.45g</u>	<u>塩化ナトリウム</u>	<u>6.0g</u>	水	残量
<u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u>	<u>2.53g</u>								
<u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u>	<u>0.45g</u>								
<u>塩化ナトリウム</u>	<u>6.0g</u>								
水	残量								
付記2	試験用培地1 市販の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3	試験用培地2 市販の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検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（2・5型）感染症（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（2・5型）感染症（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（１・２・５型）感染症（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（１・２・５型）感染症（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（１・２・５型）感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（１・２・５型）感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2及び3.4.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の一般試験法の毒性限度確認試験法 1 の規定を準用して試験を行うものとする。ただし、試験品の注射量は0.3mLとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <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（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の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）不活化ワクチンの3.6.3、3.6.7及び3.6.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <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</u> <u>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、組換え大腸菌で産生される無毒変異型App毒素（rApxⅠ、rApxⅡ及びrApxⅢ）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> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、注射量は0.2mLとし、注射後の体重測定は6日目とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>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。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>約3週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.1.3 攻撃用菌液</u> <u>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試験用培地1（付記1）に接種し、37℃で16時間培養する。集落を釣菌して試験用培地2（付記2）に接種し、37℃で3～6時間振盪培養したものを各攻撃用菌液とする。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物90匹以上を試験群、90匹以上を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを試験群の腹腔内に注射する。</u> <u>注射後2週目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。</u> <u>1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、さら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</u>

それぞれ0.5mLずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7日間臨床観察する。

また、同様に、注射後2週目に試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。

2型菌株攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で3段階に希釈し、さら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。

また、同様に、注射後2週目に試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。5型菌株攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で3段階に希釈し、さら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。

1.3.3 判定

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

付記1 試験用培地1

ハートインフュージョン寒天培地を121℃で15分間高压滅菌し、約50℃に冷却後、ろ過滅菌した鶏非働化血清を5 vol%及び0.1w/v%β-NAD液を1 vol%の割合で加えたもの

付記2 試験用培地2

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

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ感染症（1型部分精製・無毒化毒素）（酢酸トコフェロールアジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ感染症（1型部分精製・無毒化毒素）（酢酸トコフェロールアジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.6及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ストレプトコッカス・スイス（２型）感染症（酢酸トコフェロールアジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>ストレプトコッカス・スイス２型菌の培養菌液を不活化し、酢酸トコフェロールアジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>ただし、モルモット試験における観察期間は、８日間とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の４週齢の鶏で、３週齢時のストレプトコッカス・スイス２型菌に対する抗体価が20倍以下のものを用いる。</u> <u>1.3.1.3 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原</u> <u>ELISA用抗原（付記１）を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物の10羽を試験群、10羽を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを、試験群の脚部筋肉内に４週間隔で２回注射し、第２回目の注射後14日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、ELISAを行う。</u> <u>抗原吸着プレート（付記２）の各穴に血清希釈液（付記３）を100μLずつ加える。H行を除く各行の１列目に、予め血清希釈液で10倍に希釈した各個体の血清を100μLずつ加え、１列目から11列目にかけて２倍階段希釈し、最後の列から100μLを除去する。H行の１列目には予め血清希釈液で10倍に希釈した参照陽性血清（付記４）を100μL加え、１列目から11列目まで２倍階段希釈し、最後の列から100μLを除去する。また、各行の１列目はブランクとする。37℃で１時間反応後、水で３回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記５）を100μLずつ加え、37℃で１時</u>

間反応後、水で3回洗浄する。各穴に基質液（付記6）を100μLずつ加え、遮光して室温で15分間反応させる。各穴に2 mol/L硫酸を50μLずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

1.3.3 判定

参照陽性血清のH行の6列目（640倍）の吸光度以上の値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の抗体価の幾何平均値は588倍以上でなければならない。この場合、対照群の抗体価の幾何平均値は120倍以下でなければならない。参照陽性血清のH行の6列目（640倍）の吸光度はブランクの平均吸光度の2倍以上を示さなければならない。

付記1 ELISA用抗原

ストレプトコッカス・スイス2型菌P1/7株の濃縮菌液を超音波処理後、遠心分離し、蛋白濃度を4.8mg/mLに調製したもの

付記2 抗原吸着プレート

ELISA用抗原を抗原希釈液(付記7)で1,000倍希釈し、96穴プレートの各穴に100μLずつ分注し、4℃の暗所で16時間静置する。その後、液を捨て、各穴にブロッキング液（付記8）を200μLずつ加え、室温で1時間以上静置した後、水で3回洗浄したもの

付記3 血清希釈液

1,000mL中

リン酸水素二ナトリウム二水和物

35.58g

塩化ナトリウム

11.69g

ポリソルベート80

0.50g

水

残量

加温溶解後、カオリン処理30w/v%牛血清アルブミンを3.3mL加えて溶解し、pHを7.0に調整する。ろ過滅菌して保存する。

付記4 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1の鶏群由来の鶏をストレプトコッカス・スイス2型菌P1/7株で免疫して得た血清で、ELISAにより抗体価を測定するとき、抗体価は640倍を示すもの

付記5 標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗鶏IgG抗体を参照陽性血清の抗体価が640倍を示すように血清希釈液で希釈して調整したもの

付記6 基質液

UP緩衝液（付記9）を1.5、0.6w/v% TMB液（付記10）を0.2及び水を15の割合で混合したもの

付記7 抗原希釈液

1,000mL中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10g
塩化ナトリウム	8.50g
水	残 量
pHを7.2に調整後、121℃で15分間高压滅菌する。	

- 付記8 ブロッキング液
牛血清アルブミンを 1 w/v%になるように抗原希釈液（付記7）で溶解したもの
- 付記9 UP緩衝液
尿素過酸化水素140mgをTMB基質液（付記11）100mLに溶解したもの
- 付記10 0.6w/v%TMB液
テトラメチルベンジジン（TMB） 6 gをジメチルスルホキシド1,000mLに溶解したもの
- 付記11 TMB基質液
酢酸ナトリウム三水和物13.6gを80mLの水に溶解し、1.5mol/Lのクエン酸一水和物でpHを5.5に調整し、水を加え100mLとした後、ろ過滅菌したもの

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚増殖性腸炎生ワクチン</u> <u>ローソニア・イントラセルラリスを培養細胞で増殖させて得た菌液を凍結乾燥したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 夾雑菌否定試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.3.1及び2.3.2により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>ただし、試験品を試料として用いる。</u> <u>1.3 生菌数試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試料</u> <u>試験品を25ゲージ乳化用針付き注射器を用いて乳化した後、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。陽性対照品（付記2）を同様に希釈し、各段階の希釈液を陽性対照試料とする。</u> <u>1.3.1.2 培養細胞</u> <u>McCoy細胞（付記3）を96穴プレートに培養し、10～30%単層形成したものを</u> <u>用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試料及び陽性対照試料の100μLずつをそれぞれ6穴の培養細胞に接種する。</u> <u>80vol%窒素・10vol%炭酸ガス・10vol%水素の混合ガス下で、37℃で6日間培養後、培養液を除き、冷アセトン・メタノール液（付記4）100μLを加え2分間固定する。</u> <u>固定プレートの各穴に抗ローソニア・イントラセルラリスモノクローナル抗体（付記5）50μLずつを加え、5 vol%炭酸ガス下、37℃で30分間反応させる。リン酸緩衝食塩液（以下「PBS」という。）で洗浄後、各穴に抗マウスIgG蛍光標識抗体（付記6）50μLずつを加え、5 vol%炭酸ガス下、37℃で30分間反応させる。水で洗浄後、各穴にグリセロール液（付記7）50μLずつを加え、蛍光顕微鏡下で観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>細胞内又は細胞膜上に付着した5個以上の典型的な蛍光を示す細胞が1個以上認められた穴を感染とみなし、TCID₅₀を算出する。</u> <u>試験品の生菌数は、1頭分当たり10^{4.9}～10^{6.1}TCID₅₀の範囲内でなければならない、</u>

陽性対照品は既知の生菌数 $\pm 10^{0.5}$ TCID₅₀の範囲内でなければならない。

1.4 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.5 力価試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 注射材料

試験品を溶解用液で1 mL当たり1頭分となるように調整したものを注射材料とする。

1.5.1.2 試験動物

体重1.6～3.2 kgのニュージーランドホワイト種の兎（付記8）を用いる。

1.5.1.3 感染細胞

McCoy細胞を96穴マイクロプレートに培養したものに、ローソニア・イントラセルラリスN343株又はこれと同等と認められた株を1穴当たり30～50個接種する。80 vol% 血清・10 vol% 炭酸ガス・10 vol% 水素の混合ガス下で、37℃で6日間培養後、増殖用培養液を除き、冷アセトン・メタノール液で固定後乾燥させたものを感染細胞とする。

1.5.2 試験方法

試験動物の5羽を試験群、2羽を対照群とする。

注射材料1 mLずつを、試験群の脚部筋肉内に注射し、注射後21日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、間接蛍光抗体法を行う。

PBSで30倍に希釈した被検血清75 μ Lを感染細胞に加え、5 vol% 炭酸ガス下、37℃で30分間反応させる。PBSで洗浄後、各穴に抗兔IgG蛍光標識抗体（付記9）75 μ Lずつを加え、5 vol% 炭酸ガス下、37℃で30分間反応させる。水で洗浄後、各穴にグリセロール液50 μ Lを加え、蛍光顕微鏡下で観察する。

1.5.3 判定

細胞内又は細胞膜上に付着した5個以上の典型的な蛍光を示す細胞が1個以上認められた血清を陽性とみなす。

試験群の60%以上が陽性でなければならない。この場合、対照群はすべて陰性でなければならない。

付記1 増殖用培養液

1,000 mL中

イーグルMEM／ハムF12（付記10）

12g

重炭酸ナトリウム

2.44g

新生子牛血清又は牛胎子血清

50 mL

水

残量

イーグルMEM／ハムF12を適量の水に溶解後、重炭酸ナトリウムを加える。

pHを6.8～7.2に調整後、水を加え950 mLとし、ろ過滅菌する。非働化していない滅菌新生子牛血清又は牛胎子血清50 mLを加える。

付記2 陽性対照品

ローソニア・イントラセルラリスN343株の培養菌液を凍結したもので、生菌数試験の精度管理用として用いる。

付記 3	<u>McCoy細胞</u> <u>マウス繊維芽細胞由来の株化細胞</u>
付記 4	<u>冷アセトン・メタノール液</u> <u>アセトン 1 容にメタノール 2 容を混合した液で、$-30\sim-10^{\circ}\text{C}$で保存したもの</u>
付記 5	<u>抗ローソニア・イントラセルラリスモノクローナル抗体</u> <u>ローソニア・イントラセルラリスの27kDaの外膜蛋白を特異的に認識するモノクローナル抗体</u>
付記 6	<u>抗マウスIgG蛍光標識抗体</u> <u>FITC標識抗マウスIgG抗体で、PBSで至適濃度に希釈したもの</u>
付記 7	<u>グリセロール液</u> <u>グリセリン 1 容に水 2 容を混合したもので、室温保存する。</u>
付記 8	<u>兎</u> <u>間接蛍光抗体法により、抗体陰性のもの</u>
付記 9	<u>抗兎IgG蛍光標識抗体</u> <u>FITC標識抗兎IgG抗体で、PBSで至適濃度に希釈したもの</u>
付記10	<u>イーグルMEM／ハムF12</u> <u>適当と認められた品質の乾燥品</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚大腸菌性下痢症（K88保有全菌体・K99保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚大腸菌性下痢症（K88保有全菌体・K99保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚大腸菌性下痢症（K88ab・K88ac・K99・987P 保有全菌体）（アジュバント加）不活化ワクチ ン</u> <u>動生剤基準の豚大腸菌性下痢症（K88ab・K88ac・K99・987P保有全菌体）（アジ ュバント加）不活化ワクチンの3.4.3及び3.4.8に規定するところにより、これらに規 定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の一般試験法の毒性限度確認試験の規定を準用し て試験を行うものとする。ただし、試験品の注射量は0.3mLとし、体重測定は、4 日目に行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症生ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6及び3.3.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症(アジュバント加)不活化ワクチンの3.4.3、3.4.4、3.4.8及び3.4.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症精製（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症精製（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2、3.3.4及び3.3.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）の3.3.4、3.3.6及び3.3.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ヘモフィルス・パラスイス（5型）感染症（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のヘモフィルス・パラスイス（5型）感染症（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ヘモフィルス・パラスイス（2・5型）感染症（ア ジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のヘモフィルス・パラスイス（2・5型）感染症（アジュバント加） 不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する 試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（ア ジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（アジュバント加）不 活化ワクチンの3.3.3、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試 験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチンの3.3.3、3.3.6及び3.3.8、又は3.3.3、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.6及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（ア ジュバント・油性アジュバント加）不活化ワクチ ン</u> <u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化したもの又はこれを濃 縮したものに、アルミニウムゲルアジュバント及び油性アジュバントを添加したワ クチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければ ならない。ただし、注射量は0.4mLとし、体重測定は4 日目に行うものとする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品及び参照ワクチン（付記 1）を、試験品から培養菌体を除いた組成の溶 液又はこれと同等の溶液で希釈したものを注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>6 ～ 7 週齢の ddY 系マウスを用いる。</u> <u>1.3.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原</u> <u>ポリソルベート 20 抽出抗原（付記 2）を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物の 40 匹を試験群、 5 匹を対照群とする。</u> <u>試験群を 1 群 20 匹の 2 群に分け、 1 群（以下この項において「試験品群」とい う。）には試験品を、他の 1 群（以下この項において「参照ワクチン群」という。） には参照ワクチンをそれぞれ 0.2mL ずつ腹腔内に注射する。注射後 4 週後に、試 験品群、参照ワクチン群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。</u> <u>試験品群、参照ワクチン群及び対照群の血清を希釈液（付記 3）で 200 倍に希釈 したものを抗原吸着プレート（付記 4）の 2 穴ずつに 100 μ L ずつ加え、希釈液の みの穴をブランクとする。また、参照陽性血清（付記 5）を希釈液で 200 倍に希釈 したものを抗原吸着プレートの 4 穴に 100 μ L ずつ加える。 4 ℃で 18 時間反応させ た後、洗浄液（付記 6）で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記 7）を 100</u>

μ Lずつ加え、37℃で90分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。基質液（付記8）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を各穴に50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長405nmで各穴の吸光度を測定する。

1.3.3 判定

各被検血清の吸光度からブランクの平均吸光度を引いた値を各被検血清の吸光度値として平均吸光度値を算出する。

試験品群の血清の平均吸光度値は、参照ワクチン群の血清の平均吸光度値と同値以上を示さなければならない。また、参照ワクチン群と対照群の血清の平均吸光度値の差は0.7以上、対照群の血清の平均吸光度値は0.35未満、参照陽性血清の平均吸光度値は0.8～1.8でなければならない。

付記1 参照ワクチン

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株若しくはこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液又はこれを濃縮したものを不活化し、アルミニウムゲルアジュバント及び油性アジュバントを添加したワクチンであり、豚における攻撃試験において有効性が確認されたものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記2 ポリソルベート20抽出抗原

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、希釈液に懸濁後、4℃で24時間攪拌して菌体を洗浄する。洗浄菌体をトリス緩衝液（1）にたん白濃度1 mg/mLになるように懸濁後、2 vol%ポリソルベート20加トリス緩衝液（2）を等量加え、37℃で30分間振とうしながら加温する。遠心後の上清にジエチルエーテルを等量加えて振とう後、エーテル層を完全に除去したものに希釈液を加え、適当と認められるたん白濃度に調整したもの。

（1）トリス緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン3.03g、塩化ナトリウム14.61gを水に溶解し全量を1,000mLとしたもの。

（2）2 vol%ポリソルベート20加トリス緩衝液

ポリソルベート20 20mLとトリス緩衝液980mLを混合したもの。

付記3 希釈液

1,000mL中

塩化ナトリウム

8.0g

塩化カリウム

0.2g

リン酸二水素カリウム

0.2g

リン酸水素二ナトリウム

1.15g

水

残量

付記4 抗原吸着プレート

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫した兔免疫血清（付記9）を炭酸緩衝液（付記10）で10倍に希釈したものを、96穴マイクロプレートに100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。さ

らに、0.1w/v%ゼラチン液（付記11）を各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。これに、ポリソルベート20抽出抗原を100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記5 参照陽性血清
製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清で、希釈液で200倍に希釈してELISAを行うとき、平均吸光度値が0.8～1.8となるように濃度を調整したもの。

付記6 洗浄液
ポリソルベート20 0.5mLと希釈液1,000mLを混合したもの。

付記7 標識抗体
アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体を希釈液で希釈したもの。

付記8 基質液
p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム100mgを基質緩衝液（付記12）100mLに溶解したもの。

付記9 兎免疫血清
製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫した兎の血清であつて、マイコプラズマ・ハイオニューモニエと特異的に反応するもの。

付記10 炭酸緩衝液
A液：炭酸ナトリウム5.3gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。
B液：炭酸水素ナトリウム4.2gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。
A液とB液を混合し、pH9.6に調整する。

付記11 0.1w/v%ゼラチン液
ゼラチン1.0gを希釈液1,000mLで溶解したもの。

付記12 基質緩衝液
1,000mL中
塩化マグネシウム・六水和物 0.049g
ジエタノールアミン 96mL
水 残 量
pHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント・油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液又はこれを濃縮したものを不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバント及び油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 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>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、注射量は0.2mLとし、体重測定は4 日目に行うものとする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品及び参照ワクチン（付記 1）を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>6 ～ 7 週齢のICR系雌マウスを用いる。</u> <u>1.3.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原</u> <u>固相化抗原（付記 2）を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物の40匹を試験群、 5 匹を対照群とする。</u> <u>試験群を 1 群20匹の 2 群に分け、 1 群（以下この項において「試験品群」という。）には試験品を、他の 1 群（以下この項において「参照ワクチン群」という。）には参照ワクチンをそれぞれ0.2mLずつ皮下に注射する。注射後 2 週間目に、試験品群、参照ワクチン群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。</u> <u>試験品群、参照ワクチン群及び対照群の血清を希釈液（付記 3）で100倍に希釈したものを抗原吸着プレート（付記 4）の 2 穴ずつに100 μ Lずつ加え、希釈液のみの穴をブランクとする。また、参照陽性血清（付記 5）を希釈液で100倍に希釈したものを抗原吸着プレートの 4 穴に100 μ Lずつ加える。37℃で30分間反応させた後、洗浄液（付記 6）で 4 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記 7）を100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、洗浄液で 4 回洗浄する。基質液（付</u>

記8) を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で20分間遮光して反応させた後、1 w/v%
ドデシル硫酸ナトリウム溶液を各穴に100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長
405nmで各穴の吸光度を測定する。

1.3.3 判定

各被検血清の吸光度からブランクの平均吸光度を引いた値を各被検血清の吸光
度値として平均吸光度値を算出する。

試験品群の血清の平均吸光度値は、参照ワクチン群の血清の平均吸光度値と同
値以上を示さなければならない。ただし、試験品群の血清の平均吸光度値が参照
ワクチン群の血清の平均吸光度値を下回った場合であっても、両者に有意差がな
い場合は、適合とする（片側t検定、 $P \geq 0.05$ ）。

また、対照群の血清の平均吸光度値は0.1未満でなければならない、参照陽性血清
の平均吸光度値は0.5～1.0でなければならない。

付記1 参照ワクチン

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性
を有する株の培養菌液又はこれを濃縮したものを不活化し、カルボキシビニ
ルポリマーアジュバント及び油性アジュバントを添加したワクチンであり、
豚における攻撃試験において有効性が確認されたものであって、動物医薬品
検査所が適当と認めたもの。

付記2 固相化抗原

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性
を有する株の培養菌液を遠心集菌し、TNE液（付記9）で菌体を洗浄する。
洗浄菌体をたん白質濃度が200 μ g/mLとなるように濃度を調整したもの。凍
結して-20℃以下又は凍結乾燥して10℃以下で保存する。

付記3 希釈液

1,000mL中

トリス緩衝食塩液（付記10）

100mL

牛血清アルブミン

1.0g

ポリソルベート20

0.5mL

豚血清（付記11）

20mL

水

残 量

用時調製する。

付記4 抗原吸着プレート

固相化抗原を炭酸緩衝液（付記12）でたん白量が10 μ g/mLとなるように
濃度を調整したものを96穴マイクロプレートの各穴に100 μ Lずつ加え、37
℃で1時間反応させた後、2～7℃で18時間反応させ、洗浄液で4回洗浄し
たもの。

付記5 参照陽性血清

製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液又はこれを濃縮
したものを不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバント及び油性アジ
ュバントを添加したワクチンで免疫したマウスの血清であって、希釈液で100

倍に希釈してELISAを行うとき、平均吸光度値が0.5～1.0となるように濃度を調整したもの。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して10℃以下で保存する。

付記 6	<u>洗浄液</u> <u>1,000mL中</u> <u>塩化ナトリウム</u> <u>無水リン酸二水素ナトリウム</u> <u>無水リン酸水素二ナトリウム</u> <u>ポリソルベート20</u> <u>水</u> <u>pHを7.1～7.3に調整する。</u>	<u>8.5g</u> <u>0.253g</u> <u>1.19g</u> <u>3.0mL</u> <u>残 量</u>
付記 7	<u>標識抗体</u> <u>ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を希釈液で至適濃度に希釈したもの。</u>	
付記 8	<u>基質液</u> <u>A液：0.6gの2,2'-アジノージ（3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート）を1,000mLの0.3g/Lグリシン加クエン酸緩衝液で溶解したもの。</u> <u>B液：0.02w/v%過酸化水素溶液</u> <u>A液とB液を使用時に等量混合する。</u>	
付記 9	<u>TNE液</u> <u>1,000mL中</u> <u>トリスヒドロキシメチルアミノメタン</u> <u>エデト酸ナトリウム</u> <u>塩化ナトリウム</u> <u>水</u>	<u>3.94g</u> <u>3.72g</u> <u>14.6g</u> <u>残 量</u>
付記10	<u>トリス緩衝食塩液</u> <u>1,000mL中</u> <u>トリスヒドロキシメチルアミノメタン</u> <u>塩化ナトリウム</u> <u>無水エデト酸ナトリウム</u> <u>水</u> <u>pHを7.3～7.5に調整する。</u>	<u>60.55g</u> <u>87.66g</u> <u>3.72g</u> <u>残 量</u>
付記11	<u>豚血清</u> <u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエ補体結合反応の抗体価が64倍以下の豚血清。</u>	
付記12	<u>炭酸緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>炭酸ナトリウム</u> <u>炭酸水素ナトリウム</u>	<u>1.59g</u> <u>2.93g</u>

水
pHを9.6～9.8に調整する。

残 量

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ感染症（1型部分精製・無毒化毒素）・豚丹毒混合（酢酸トコフェロールアジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>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型菌の培養菌液を不活化した後、部分精製して得た菌体外膜たん白（以下この項において「OMP」という。）に、App 2型菌及び5型菌、又はApp 2型菌、7型菌及び10型菌を培養して得たApp 毒素（Apx I、Apx II 及びApx III）を無毒化した後、混合したものに、豚丹毒菌の培養菌液をアルカリ処理して可溶化した抗原液を不活化後したものを混合し、酢酸トコフェロールアジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、試験品の注射量は0.2mlとし、注射後の体重測定は4日目とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 豚App感染症力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を生理食塩液で250倍及び5,000倍に希釈したものを注射材料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 試験動物</u> <u>体重約1.5～2.0kgのダッチ種SPF兔を用いる。</u> <u>1.3.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原</u> <u>Apx I 抗原（付記 1）、Apx II 抗原（付記 2）、Apx III 抗原（付記 3）及びOMP抗原（付記 4）を用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>試験動物10匹を試験群とし、5匹ずつの2群に分ける。</u> <u>それぞれの注射材料 1 mLずつを3週間隔で2回、各群の筋肉内に注射する。第1回目注射時（以下この項において「T0」という。）及び第2回目の注射後7日目（以下この項において「T4」という。）に両群から採血する。250倍に希釈した</u>

注射材料で免疫した兎から得られた各個体の血清についてはApx I 抗原及びApx II 抗原を、5,000倍に希釈した注射材料で免疫した兎から得られた各個体の血清についてはApx III 抗原及びOMP抗原を用いて、ELISAを行う。

各試験群のT4血清及び参照陽性血清 1（付記 5）を希釈液（付記 6）でそれぞれ50倍に希釈したもの、参照陽性血清 2（付記 7）を1,000倍に希釈したものを、あらかじめ希釈液100 μ Lを入れた抗原吸着プレート（付記 8）に100 μ Lずつ加え、更に同希釈液で2倍段階希釈する。また、同様に各試験群のT0血清を希釈液で100倍に希釈したものを抗原吸着プレートに100 μ Lずつ加え、各兎の個体別陰性対照とし、希釈液のみの穴をバックグラウンドとする。37℃で1時間反応させた後、水で8回洗浄する。次に、標識抗体（付記 9）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、水で8回洗浄する。基質液（付記10）を各穴に100 μ Lずつ加え、15分間反応させた後、2 mol/L硫酸を各穴に50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで各穴の吸光度を測定する。

1.3.1.3 判定

同一個体の兎のT0血清の吸光度に対して1.5倍以上の吸光度を示すT4血清の最高希釈倍数を抗体価とし、100倍以上を陽性とする。

各試験群の血清の80%以上がそれぞれの抗原に対して陽性でなければならない。この場合、バックグラウンドの吸光度は0.1未満でなければならない。また、T0血清の吸光度は、Apx I、Apx II、Apx III 及びOMP抗原を用いたELISAにおいて、Apx I 抗原を用いた場合にあっては0.300未満、Apx II 抗原を用いた場合にあっては0.400未満、Apx III 抗原を用いた場合にあっては0.300未満、OMP抗原を用いた場合にあっては0.350未満でなければならない。また、参照陽性血清 1 のそれぞれの抗原に対する抗体価は、100～400倍を示さなければならない。参照陽性血清 2 は、抗Apx I 抗体価8,000～32,000倍、抗Apx II 抗体価16,000～64,000倍、抗Apx III 抗体価8,000～32,000倍及び抗OMP抗体価8,000～64,000倍を示さなければならない。

1.3.2 豚丹毒力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

試験品を生理食塩液で2倍希釈したものを注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

1.3.2.1.3 攻撃用菌液

豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記11）に接種し、37℃で18～22時間培養する。これを0.1mL中約100致死量の菌量となるように調整したものを攻撃用菌液とする。

1.3.2.2 試験方法

試験動物10匹を試験群とし、10匹を対照群とする。

注射材料0.5mLずつを試験群の皮下に注射する。注射後3週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、7日間観察する。

1.3.2.3 判定

試験群においては、80%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、90%以上が死亡しなければならない。

付記 1 Apx I 抗原

Apx I 毒素のみを産生するApp10型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、

ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、105kDaに特異なバンドを認めるもの。小分けし、凍結して-20℃で保存する。

付記2 Apx II 抗原
Apx II 毒素のみを産生するApp 7 型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、105kDaに特異なバンドを認めるもの。小分けし、凍結して-20℃で保存する。

付記3 Apx III 抗原
Apx III 毒素のみを産生するApp 2 型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、120kDaに特異なバンドを認めるもの。小分けし、凍結して-20℃で保存する。

付記4 OMP 抗原
App 2 型菌の培養菌液を不活化した後超音波処理し、その遠心上清をゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、42kDaに特異なバンドを認めるもの。小分けし、凍結して-20℃で保存する。

付記5 参照陽性血清 1
AppのApx I、Apx II、Apx III 及びOMP抗原を兎に免疫して得られた抗血清であって、免疫開始時に採取した血清（以下この項において「RT0」という。）で、それぞれの抗原を用いてELISAを行い、RT0の吸光度（バックグラウンドの吸光度の4倍未満であり、かつ、0.2以下のものに限る。）に対して1.5倍以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価としたとき、抗体価がそれぞれ100～400倍になるように濃度を調整したもの。小分けし、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記6 希釈液
1,000mL中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	35.58g
塩化ナトリウム	11.69g
ポリソルベート80	0.50g
水	残 量

加温溶解した後、カオリン処理済みの牛血清アルブミン 1 gを加えて溶解し、pHを7.0に調整する。ろ過滅菌して保存する。

付記7 参照陽性血清 2
AppのApx I、Apx II、Apx III 及びOMP抗原を兎に免疫して得られた抗血清であって、それぞれの抗原を用いてELISAを行い、バックグラウンドの吸光度の4倍以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価としたとき、抗体価がそれぞれ8,000～32,000倍、16,000～64,000倍、8,000～32,000倍及び8,000～64,000

倍となるように濃度を調整したもの。小分けし、凍結して-20℃で保存する。

付記8 抗原吸着プレート
Apx I、Apx II、Apx III 及びOMP抗原をそれぞれ 1 mL中約2.5, 0.38, 2.0及び0.03 μ g/mLになるように炭酸緩衝液（付記12）で希釈し、プレートの穴に0.1mLずつ加える。
Apx I、Apx II 及びApx III 抗原は37℃で、OMP抗原は15～25℃でそれぞれ16時間反応させた後、水でよく洗浄したもの。

付記9 標識抗体
ペルオキシダーゼ標識抗兔IgG抗体を希釈液で希釈したものであり、各参照陽性血清の抗体価が規定の値となるように濃度を調整して使用する。

付記10 基質液
A液：100mL中
酢酸ナトリウム三水和物 13.6g
水 残量
クエン酸でpHを5.5に調整した後、尿素過酸化水素140mgを溶解する。
B液：
テトラメチルベンジジン 6 gをジメチルスルホキシド1,000mLに溶解したもの。
A液、B液及び水を15：2：150の割合で使用直前に混合して用いる。

付記11 攻撃菌用培地
1,000mL中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 30g
ポリソルベート80 1mL
水 残量
pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高压滅菌する。

付記12 炭酸緩衝液
1,000mL中
炭酸ナトリウム 1.59g
炭酸水素ナトリウム 2.93g
水 残量
pHを9.6に調整する。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（１・２・５型）感染症・豚丹毒混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（１・２・５型）感染症・豚丹毒混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2及び3.5.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の一般試験法の毒性限度確認試験法 1 の規定を準用して試験を行うものとする。ただし、試験品の注射量は0.2mLとし、体重測定は4日目に行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <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・マイコプラズ マ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバン ト加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（１・２・５型、組換え 型毒素）感染症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバント 加）不活化ワクチンの3.6.3、3.6.7及び3.6.8に規定するところにより、これらに規定 する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症・豚パストツレラ症混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症・豚パストツレラ症混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.3、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）・豚パスツレラ症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）・豚パスツレラ症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.5、3.3.8、3.3.9及び3.3.10に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症精製・豚パスツレラ症混合 （油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症精製・豚パスツレラ症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3及び3.4.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の一般試験法の毒性限度確認試験法1の規定を準用して試験を行うものとする。ただし、試験品の注射量は0.3mLとし、体重測定は6日目に行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>クロストリジウム・パーフリンゲンス（アジュバント加）トキシイド</u> <u>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に、アルミニウムゲルアジュバントを添加したトキシイドである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、注射後の体重測定は、4 日目とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモット及び約 5 週齢のICR系又は適当と認められたマウスを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>注射材料の0.2mLを、3 週間隔で 2 回 8 匹のモルモットの大腿部筋肉内に注射し、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し、ブール血清の 1、2、3、4 及び 5 倍希釈液をバクトペプトン液（付記 1）で作製する。10L₀量（付記 2）に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 3）と各希釈血清を等量混合後、25℃で 1 時間反応させた後、氷水中に保存する。各混合液を 1 群 5 匹のマウスに0.2mLずつ尾静脈接種し、24時間後に観察する。</u> <u>同時に、試験に用いた付記 3 の毒素液（10L₀量）及び10L₀量（付記 4）のそれぞれの毒素液と10国際抗毒素単位（以下この項において「IAU」という。）（付記 5）の標準抗毒素（付記 6）の等量混合液を同様にマウスに接種し毒素量を定量する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>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するとき、ブール血清の抗毒素抗体価は10IAU以上でなければならない。また、毒素量の定量においては、10L₀群では全マウスが生存し、10L₀群では80%以上のマウスが死亡しなければならない。</u>

付記 1	<u>バクトペプトン液</u> <u>1,000mL中</u> <u>バクトペプトン</u> <u>塩化ナトリウム</u> <u>水</u> 溶解後、pHを7.2に調整し、121℃で25分間高压滅菌する。	<u>10g</u> <u>2.5g</u> <u>残量</u>
付記 2	<u>10L量</u> <u>10IAUの標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、死亡させない毒素の最大量</u>	
付記 3	<u>クロストリジウム・パーフリンゲンスC型β毒素液</u> <u>クロストリジウム・パーフリンゲンスC型菌MC18株又はこれと同等のβ毒素を産生する株の培養上清をろ過滅菌したもの</u>	
付記 4	<u>10L量</u> <u>10IAU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</u>	
付記 5	<u>IAU</u> <u>標準抗毒素（付記 6）を用いて測定したクロストリジウム・パーフリンゲンスβ毒素トキソイドに対する抗毒素の単位</u>	
付記 6	<u>標準抗毒素</u> <u>動物医薬品検査所が適当と認めた標準抗毒素、又は標準抗毒素と比較して標準化された抗毒素</u>	

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>パスツレラ・ムルトシダ（アジュバント加）トキシ</u> <u>ソイド</u> <u>動生剤基準のパスツレラ・ムルトシダ(アジュバント加)トキシソイドの3.4.3、3.4.6、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ・パスツレラ・ム ルトシダ混合（アジュバント加）トキシイド</u> <u>動生剤基準のボルデテラ・ブロンキセプチカ・パスツレラ・ムルトシダ混合（ア ジュバント加）トキシイドの3.4.3、3.4.6及び3.4.7に規定するところにより、これら に規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準のボルデテラ・ブロンキセプチカ・パスツレラ・</u> <u>ムルトシダ混合（アジュバント加）トキシイドの3.3.2.1の規定を準用して試験を行</u> <u>うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ・パスツレラ・ム ルトシダ混合（アジュバント加）トキシイド（組 換え型）</u> <u>組換え大腸菌で産生される無毒変異型ボルデテラ・ブロンキセプチカ皮膚壊死毒 素を精製したもの及び組換え大腸菌で産生される無毒変異型パスツレラ・ムルトシ ダ皮膚壊死毒素を精製したものにアルミニウムゲルアジュバントを添加し、混合し たワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければ ならない。ただし、注射後の体重測定は、4 日目とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 豚ボルデテラ感染症力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>水酸化アルミニウムゲル溶液（付記 1）で試験品を 9 倍に希釈したものを注射 材料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 試験動物</u> <u>5 週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.1.1.3 攻撃用毒素</u> <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ皮膚壊死毒素（付記 2）を用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>試験動物10匹以上を試験群とし、10匹以上を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の腹腔内に注射する。第 2 回目 の注射後 2 週目に、ボルデテラ・ブロンキセプチカ皮膚壊死毒素を約 50LD₅₀/0.5mL に調整し、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 日間観察する。</u> <u>1.3.1.3 判定</u> <u>試験群においては、80%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照 群においては、80%以上が死亡しなければならない。</u> <u>1.3.2 パスツレラ・ムルトシダ力価試験</u>

1.3.2.1	試験材料
1.3.2.1.1	注射材料
	水酸化アルミニウムゲル溶液で試験品を9倍に希釈したものを注射材料とする。
1.3.2.1.2	試験動物
	5週齢のマウスを用いる。
1.3.2.1.3	攻撃用毒素
	パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素（付記3）を用いる。
1.3.2.2	試験方法
	試験動物10匹以上を試験群とし、10匹以上を対照群とする。
	注射材料0.5mLずつを2週間隔で2回、試験群の腹腔内に注射する。第2回目の注射後2週目に、パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素を約50LD ₅₀ /0.5mLに調整し、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日間観察する。
1.3.2.3	判定
	試験群においては、80%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、80%以上が死亡しなければならない。
付記1	水酸化アルミニウムゲル溶液
	水酸化アルミニウムゲルを9.3mmol/Lリン酸緩衝食塩液（付記4）でアルミニウム量として0.6mg/mLになるように希釈したもの
付記2	ボルデテラ・ブロンキセプチカ皮膚壊死毒素
	ボルデテラ・ブロンキセプチカS611株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を、ボルデテラ・ブロンキセプチカ培養用培地（付記5）で37℃で15～24時間培養し、発育した菌体を遠心又はろ過により濃縮し、超音波処理によって菌体を破碎処理した後、その遠心上清をろ過滅菌し、マウスに対するLD ₅₀ 値が50LD ₅₀ /0.5mL以上となるように調整したもの。
付記3	パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素
	パスツレラ・ムルトシダS70株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を、ハートインフュージョン液体培地で37℃で18時間振とう培養し、発育した菌体を遠心又はろ過により濃縮し、超音波処理によって菌体を破碎処理した後、その遠心上清をろ過滅菌し、マウスに対するLD ₅₀ 値が50LD ₅₀ /0.5mL以上となるように調整したもの。
付記4	9.3mmol/Lリン酸緩衝食塩液
	1,000mL中
	リン酸二水素ナトリウム二水和物0.40g
	リン酸水素二ナトリウム十二水和物2.40g
	塩化ナトリウム7.4g
	水残量
	溶解した後、pHを7.0～7.5に調整して、121℃で15分間高压滅菌又はろ過滅菌する。
付記5	ボルデテラ・ブロンキセプチカ培養用培地

1,000mL中	
<u>カザミノ酸</u>	<u>5.0g</u>
<u>カゼイン製ペプトン</u>	<u>5.0g</u>
<u>でんぷん</u>	<u>1.5g</u>
<u>酵母エキス</u>	<u>1.0g</u>
<u>リン酸二水素カリウム</u>	<u>0.5g</u>
<u>塩化ナトリウム</u>	<u>2.5g</u>
水	残量
<u>溶解した後、pHを6.8～7.6に調整して、121℃で15分間高圧滅菌又はろ過滅菌する。</u>	

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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</u> <u>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の遠心上清、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、並びにクロストリジウム・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。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>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、これに適合しなければならない。ただし、試験品の注射量は0.3mLとし、体重測定は4日目に行うものとする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 大腸菌線毛抗原及び大腸菌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。）の力価試験</u> <u>1.3.1.1 又は1.3.1.2の試験を行う。</u> <u>1.3.1.1 相対力価（付記 1）による力価試験</u> <u>1.3.1.1.1 大腸菌線毛抗原K88の力価試験</u> <u>1.3.1.1.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1.1.1 試料</u> <u>試験品を、希釈・洗浄液 1（付記 2）で希釈後、又は適当と認められた温度で凍結し融解後、等量の溶出緩衝液（付記 3）を加え、常温で60分間振とうする。</u> <u>1.3.1.1.1.2 試験方法</u> <u>線毛抗原K88成分の参照品（付記 4）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時間振とう後、希釈・洗浄液 2（付記 5）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 1（付記 6）の各穴に100 μ 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 7）を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄後、基質液 1（付記 8）を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長405nm、副波長490nmで</u>

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。

1.3.1.1.1.3 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9）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。

1.3.1.1.2 大腸菌線毛抗原K99の力価試験

1.3.1.1.2.1 試験材料

1.3.1.1.2.1.1 試料

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

1.3.1.1.2.2 試験方法

線毛抗原K99成分の参照品（付記10）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11）の各穴に100 μ Lずつ加え、15～30℃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マウスモノクロナール抗体（付記12）を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄後、基質液1を各穴に100 μ 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。

1.3.1.1.2.3 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。

1.3.1.1.3 大腸菌線毛抗原987Pの力価試験

1.3.1.1.3.1 試験材料

1.3.1.1.3.1.1 試料

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

1.3.1.1.3.2 試験方法

線毛抗原987P成分の参照品（付記13）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3（付記14）の各穴に100 μ Lずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄後、抗大腸菌線毛抗原987Pマウスモノクロナール抗体1（付記15）を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄後、標識抗体1（付記16）を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄後、基質液1を各穴に100 μ 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。

1.3.1.1.3.3 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1.0以上でなければならない。

1.3.1.1.4 大腸菌線毛抗原F41成分の力価試験

1.3.1.1.4.1 試験材料

1.3.1.1.4.1.1 試料

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

1.3.1.1.4.2 試験方法

線毛抗原F41成分の参照品（付記17）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18）の各穴に100 μ 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19）を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄後、標識抗体1を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄後、基質液1を各穴に100 μ 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。

1.3.1.1.4.3 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。

1.3.1.1.5 大腸菌LT_Bの力価試験

1.3.1.1.5.1 試験材料

1.3.1.1.5.1.1 試料

試験品を滅菌精製水で希釈した後、水酸化ナトリウム溶液（付記20）でpHを12.0に調整する。硫酸アンモニウム溶液（付記21）を混合し、中和する。混合液を遠心し、その上清を試料とする。

1.3.1.1.5.2 試験方法

大腸菌LT_B成分の参照品（付記22）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（付記23）の各穴に50 μ L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回洗浄後、抗LT_B抗原兔ポリクローナル抗体（付記24）を各穴に50 μ Lずつ加え、37℃で1時間加温する。洗浄液3（付記25）で洗浄後、標識抗体2（付記26）を各穴に50 μ Lずつ加え、37℃で1時間加温する。洗浄液3で洗浄後、基質液2（付記27）を各穴に200 μ 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、全穴の吸光度を測定する。

1.3.1.1.5.3 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。

1.3.1.2 抗体測定法による力価試験

1.3.1.2.1 大腸菌線毛抗原K88の力価試験

1.3.1.2.1.1 試験材料

1.3.1.2.1.1.1 注射材料

試験品を水酸化アルミニウムゲル（付記28）で10倍に希釈したものを注射材料

とする。

1.3.1.2.1.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

1.3.1.2.1.2 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29）を512倍、対照群血清を2倍から希釈液 3（付記30）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31）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32）の穴に100 μ L 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33）を100 μ L 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 1 を各穴に100 μ 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。

得られた被験血清の吸光度値が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。

1.3.1.2.1.3 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。

1.3.1.2.2 大腸菌線毛抗原K99の力価試験

1.3.1.2.2.1 試験材料

1.3.1.2.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.1.2.2.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

1.3.1.2.2.2 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34）を8倍、対照群血清を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35）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36）の各穴に100 μ L 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100 μ L 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 1 を各穴に100 μ 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。

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

1.3.1.2.2.3 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。

1.3.1.2.3 大腸菌線毛抗原987Pの力価試験

1.3.1.2.3.1 試験材料

1.3.1.2.3.1.1 試験動物

1.3.1.2.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.1.2.3.2 試験方法

1.3.1.2.2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。

試験群血清を4倍、対照群血清及び線毛抗原987P参照陽性血清1（付記37）を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38）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39）の穴に100 μ L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100 μ L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1を各穴に100 μ 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。

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

1.3.1.2.3.3 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。

1.3.1.2.4 大腸菌線毛抗原F41の力価試験

1.3.1.2.4.1 試験材料

1.3.1.2.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.1.2.4.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

1.3.1.2.4.2 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40）を64倍、対照群血清を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41）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42）の穴に100 μ L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100 μ L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1を各穴に100 μ 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。

得られた被験血清の吸光度値が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。

1.3.1.2.4.3 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25～512倍を示さなければならない。

1.3.1.2.5 大腸菌LT_Bの力価試験

1.3.1.2.5.1 試験材料

1.3.1.2.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.1.2.5.1.2 試験動物

約6週齢の雄ddY系マウスを用いる。

1.3.1.2.5.2 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43）を128倍、対照群血清を8倍から希釈液4（付記44）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45）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46）の穴に100 μ L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47）を100 μ L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1を各穴に100 μ 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_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。

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

1.3.1.2.5.3 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。

1.3.2 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

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

体重1.8～3.6kgのSPFニュージーランドホワイト兔及び約5週齢のICR系又は適当と認められたマウスを用いる。

1.3.2.2 試験方法

注射材料の1mL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48)で作製する。10L₀量(付記49)に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50)と各希釈血清を等量混合後、25℃で1時間反応させた後、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51）毒素液 1 mLと10国際抗毒素単位（以下この項において「IAU」という。）（付記52）の標準抗毒素（付記53） 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。

1.3.2.3 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IAUとするとき、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。

付記 1 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

付記 2 希釈・洗浄液 1

<u>1,000mL中</u>	
<u>塩化ナトリウム</u>	<u>8.0g</u>
<u>塩化カリウム</u>	<u>0.2g</u>
<u>無水リン酸水素二ナトリウム</u>	<u>1.15g</u>
<u>リン酸二水素カリウム</u>	<u>0.2g</u>
<u>水</u>	<u>残 量</u>

pHを7.2に調整して200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 3 溶出緩衝液

<u>リン酸二水素カリウム</u>	<u>8.2g</u>
<u>水</u>	<u>94mL</u>

pHを9.3に調整する。

付記 4 線毛抗原K88成分の参照品

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、又はワクチンの製造方法で作製し凍結保存したもので、動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記 5 希釈・洗浄液 2

<u>1,000mL中</u>	
<u>ポリソルベート20</u>	
<u>希釈・洗浄液 1</u>	<u>0.5mL</u>

pH7.2に調整する。

付記 6 抗体固相化プレート 1

希釈液 5（付記54）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55）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 7 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56）で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記 8 基質液 1
A液：0.6gの2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート）を1,000mLのグリシン緩衝液で希釈したもの
B液：0.02vol%過酸化水素溶液
A液とB液を使用時に等量混合したもの

付記 9 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10 線毛抗原K99成分の参照品
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、又はワクチンの製造方法で作製し凍結保存したもので、動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記11 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抗原K99マウスモノクローナル抗体 1（付記57）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12 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
抗大腸菌線毛抗原K99マウスモノクローナル抗体 1 をペルオキシダーゼで標識したものを希釈・洗浄液 2 で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記13 線毛抗原987P成分の参照品
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、又はワクチンの製造方法で作製し凍結保存したもので、動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記14 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抗原987P兎ポリクローナル抗体（付記58）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開発したハイブリドーマ1BB6-3D6を使ったマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7（付記59）で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記16 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60）で溶解し、さらに希釈液 8（付記61）で希釈したもの

付記17	線毛抗原F41成分の参照品 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、又はワクチンの製造方法で作製し凍結保存したもので、動物医薬品検査所が適当と認めたもの	
付記18	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抗原F41兔ポリクロナール抗体(付記62)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F41マウスモノクロナール抗体 1 精製線毛抗原F41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開発したハイブリドーマSDSU56/85を使ったマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7 で適当な希釈倍率に希釈したもの	
付記20	水酸化ナトリウム溶液 1,000mL中 水酸化ナトリウム 水	30.0g 残 量
付記21	硫酸アンモニウム溶液 1,000mL中 硫酸アンモニウム 水	132.0g 残 量
付記22	大腸菌LT _B 成分の参照品 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	
付記23	ガングリオシド固相化プレート 希釈・洗浄液 1 で溶解したガングリオシド溶液 (LT _B 20ng以上を結合させるのに十分な量のGM-1ガングリオシドを含む。)を100 μ L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63)を加え、更に反応後、希釈・洗浄液 1 で反応させたもの	
付記24	抗LT _B 抗原兔ポリクロナール抗体 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	
付記25	洗浄液 3 1,000mL中 ブロッキング液 希釈・洗浄液 1	100mL 残 量

付記26	<u>標識抗体 2</u> <u>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</u>				
付記27	<u>基質液 2</u> <u>C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</u> <u>D液：0.3%過酸化水素溶液をリン酸ナトリウム緩衝液（付記64）で希釈したもの</u> <u>C液とD液を等量混合したもの</u>				
付記28	<u>水酸化アルミニウムゲル</u> <u>硫酸アルミニウム18水和物33.3gを精製水50mLに溶解し、これに1.0mol/L水酸化ナトリウム300mLを加え攪拌する。精製水で沈殿物を洗浄し、この沈殿物に適当量の精製水を加え、ブレンダーで碎細する。水酸化アルミニウム含量が2.0w/v%となるように精製水で調整し、最終濃度が0.15mol/Lとなるように塩化ナトリウム水溶液を加え、121℃で15分間高压滅菌する。これを希釈・洗浄液 1 で水酸化アルミニウム含量が0.35w/v%となるように調整したもの</u>				
付記29	<u>線毛抗原K88参照陽性血清 1</u> <u>精製線毛抗原K88（付記65）で免疫したモルモットの血清で、酵素抗体反応で2,048～4,096倍の抗体価を示すように調整し、凍結乾燥したもの</u>				
付記30	<u>希釈液 3</u> <u>1,000mL中</u> <table> <tr> <td><u>牛血清アルブミン</u></td><td><u>1.0g</u></td></tr> <tr> <td><u>希釈・洗浄液 2</u></td><td><u>残 量</u></td></tr> </table>	<u>牛血清アルブミン</u>	<u>1.0g</u>	<u>希釈・洗浄液 2</u>	<u>残 量</u>
<u>牛血清アルブミン</u>	<u>1.0g</u>				
<u>希釈・洗浄液 2</u>	<u>残 量</u>				
付記31	<u>線線毛抗原K88参照陽性血清 2</u> <u>精製線毛抗原K88で免疫したモルモットの血清で、精製線毛抗原K88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、1,024倍希釈で0.9～1.1となるように調整し、凍結乾燥したもの</u>				
付記32	<u>抗原吸着プレート 1</u> <u>希釈液 5 で0.5 μ g/mLに希釈した抗線毛抗原K88マウスモノクローナル抗体 2（付記66）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</u> <u>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用いて反応させた場合、その吸光度は0.9～1.1となることとする。</u>				
付記33	<u>ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1</u> <u>ペルオキシダーゼ標識山羊抗モルモットIgG(H+L)を希釈液 3 で希釈した</u>				

もの

- 付記34 線毛抗原K99参照陽性血清 1
精製線毛抗原K99（付記67）で免疫したモルモットの血清で、酵素抗体反応で32～64倍の抗体価を示すように調整し、凍結乾燥したもの
- 付記35 線毛抗原K99参照陽性血清 2
精製線毛抗原K99で免疫したモルモットの血清で、精製線毛抗原K99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となるように調整し、凍結乾燥したもの
- 付記36 抗原吸着プレート 2
希釈液 5 で1 μ g/mLに希釈した抗線毛抗原K99マウスモノクローナル抗体 2（付記68）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用いて反応させた場合、その吸光度は0.9～1.1となる
ところとする。
- 付記37 線毛抗原987P参照陽性血清 1
精製線毛抗原987P（付記69）で免疫したモルモットの血清で、酵素抗体反応で8～16倍の抗体価を示すように調整し、凍結乾燥したもの
- 付記38 線毛抗原987P 参照陽性血清 2
精製線毛抗原987Pで免疫したモルモットの血清で、精製線毛抗原987P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、128倍希釈で0.9～1.1となるように調整し、凍結乾燥したもの
- 付記39 抗原吸着プレート 3
希釈液 5 で1 μ g/mLに希釈した抗線毛抗原987P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 で洗浄後、精製線毛抗原987Pを洗浄液 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、その吸光度は0.9～1.1となる
ところとする。
- 付記40 線毛抗原F41参照陽性血清 1
精製線毛抗原F41（付記71）で免疫したモルモットの血清で、酵素抗体反応で256～ 512倍の抗体価を示すように調整し、凍結乾燥したもの
- 付記41 線毛抗原F41参照陽性血清 2
精製線毛抗原F41で免疫したモルモットの血清で、精製線毛抗原F41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となるように調整し、凍結乾燥したもの

付記42 抗原吸着プレート4
希釈液5で1 μ g/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72）100 μ 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で洗浄後、精製線毛抗原987Pを洗浄液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、その吸光度は0.9～1.1となる
ところとする。

付記43 LT_B参照陽性血清1
精製大腸菌LT_B（付記73）で免疫したマウスの血清で、酵素抗体反応で256～512倍の抗体価を示すように調整し、凍結乾燥したもの

付記44 希釈液4
100mL中
カゼイン
希釈・洗浄液2
1.0g
残量

付記45 LT_B参照陽性血清2
精製大腸菌LT_Bで免疫したマウスの血清で、精製大腸菌TL_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となるように調整し、凍結乾燥したもの

付記46 抗原吸着プレート5
希釈・洗浄液1で希釈したガングリオシド（付記74）100 μ Lずつを96穴プレートの各穴に加え、希釈・洗浄液2で洗浄後、精製大腸菌LT_Bを希釈・洗浄液1で希釈し、プレートに50 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、その吸光度は0.9～1.1となる
ところとする。

付記47 ペルオキシダーゼ標識2次抗体液2
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

付記48 バクト-ペプトン液
1,000mL中
バクト-ペプトン
塩化ナトリウム
水
溶解後、pHを7.2に調整し、121℃で25分間滅菌する。
10g
2.5g
残量

付記49 10L₀量
10IAUの標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、死亡させない毒素

の最大量

付記50 クロストリジウム・パーフリンゲンスC型β毒素液
クロストリジウム・パーフリンゲンスC型NL-1003株又はこれと同等のβ毒素を産生する株の培養上清をろ過滅菌し、滅菌グリセロールを最終濃度10vol%となるように添加したもの

付記51 10L+量
10国際抗毒素単位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52 IAU
動物医薬品検査所が適当と認めた標準抗毒素を用いて測定したクロストリジウム・パーフリンゲンスβ毒素トキソイドに対する抗毒素の単位

付記53 標準抗毒素
動物医薬品検査所が適当と認めた標準抗毒素、又は標準抗毒素と比較して標準化された抗毒素

付記54 希釈液 5
1,000mL中
無水炭酸ナトリウム 1.59g
炭酸水素ナトリウム 2.93g
水 残 量
pHを9.6に調整する。

付記55 抗大腸菌線毛抗原K88マウスモノクローナル抗体 1
K88ac、ab及びadの3種類の線毛抗原で免疫した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開発したハイブリドーマ21BA1-1H1を使ったマウスモノクローナル抗体

付記56 希釈液 6
1,000mL中
オボアルブミン 10.0g
希釈・洗浄液 2 残 量
200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記57 抗大腸菌線毛抗原K99マウスモノクローナル抗体 1
線毛抗原K99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開発したハイブリドーマ2BD4E4を使ったマウスモノクローナル抗体

付記58 抗大腸菌線毛抗原987P兎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後、採取した血清を線毛抗原非産生性のNADA138株で吸収を行ったもの

付記59	<u>希釈液 7</u> <u>1,000mL中</u> <u>牛血清アルブミン</u> <u>希釈・洗浄液 2</u> <u>200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。</u>	<u>20.0g</u> <u>残 量</u>
付記60	<u>50 %グリセリン溶液</u> <u>滅菌精製水とグリセリンを等量混合したもの</u>	
付記61	<u>希釈液 8</u> <u>兔血清 1 mL当たり 100mLの希釈・洗浄液を混合したもの</u>	
付記62	<u>抗大腸菌線毛抗原F41 兔ポリクローナル抗体</u> <u>F41を産生する大腸菌1839株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫後、採取した血清を線毛抗原非産生性の1839株で吸収を行ったもの</u>	
付記63	<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>希釈・洗浄液 1</u> <u>200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。</u>	<u>10.0g</u> <u>残 量</u>
付記64	<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>無水リン酸水素二ナトリウム</u> <u>水</u> <u>pHを7.0に調整する。</u>	<u>10.76g</u> <u>17.37g</u> <u>残 量</u>
付記65	<u>精製線毛抗原K88</u> <u>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75）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ったとき、約29kDaの位置に単一のバンドを検出する。</u>	
付記66	<u>抗大腸菌線毛抗原K88マウスモノクローナル抗体 2</u> <u>大腸菌線毛抗原K88に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原K88を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行った場合、約29kDaの位置に単一のバンドを認めるもの</u>	
付記67	<u>精製線毛抗原K99</u> <u>線毛抗原K99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</u>	

酸緩衝液に懸濁した後、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K99を保有する大腸菌抽出物で免疫した兎血清を用いて免疫染色を行ったとき、約19kDaの位置に単一のバンドを検出する。

付記68 抗大腸菌線毛抗原K99マウスモノクローナル抗体 2
大腸菌線毛抗原K99に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原K99を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行った場合、約19kDaの位置に単一のバンドを認めるもの

付記69 精製線毛抗原987P
線毛抗原987P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に懸濁した後、ホモジナイザーによる細胞破碎、超遠心及び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987Pを保有する大腸菌抽出物で免疫した兎血清を用いて免疫染色を行ったとき、約23kDaの位置に単一のバンドを検出する。

付記70 抗大腸菌線毛抗原987Pマウスモノクローナル抗体 2
大腸菌線毛抗原987Pに対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原987Pを有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行った場合、約23kDaの位置に単一のバンドを認めるもの

付記71 精製線毛抗原F41
線毛抗原F41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に懸濁した後、ホモジナイザーによる細胞破碎、超遠心及び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F41を保有する大腸菌抽出物で免疫した兎血清を用いて免疫染色を行ったとき、約30kDaの位置に単一のバンドを検出する。

付記72 抗大腸菌線毛抗原F41マウスモノクローナル抗体 2
大腸菌線毛抗原F41に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原F41を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行った場合、約30kDaの位置に単一のバンドを認めるもの。

付記73 精製大腸菌LT_B
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ったとき、約10kDaの位置に単一のバンドを認める。

付記74 ガングリオシド
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。

付記75	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（付記76） 120g 残 量
付記76	0.05mol/Lリン酸緩衝液、pH7.2 0.2mol/Lリン酸二水素ナトリウム約35mLと0.2mol/Lリン酸水素二ナトリウム約90mLを混合し、pHを7.2に調整し、この液100mLに水を加え400mLとしたもの

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症不活化・パスツレラ・ムルト シダトキソイド混合（アジュバント加）ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症不活化・パスツレラ・ムルトシダトキソイド混 合（アジュバント加）ワクチンの3.7.3、3.7.4、3.7.8及び3.7.9に規定するところによ り、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症不活化・パスツレラ・ムルトシダトキソイド混合（油性アジュバント加）ワクチン</u> <u>ボルデテラ・ブロンキセプトチカ（以下「Bb」という。）の培養菌液を不活化し、油性アジュバントを添加したもの及びパスツレラ・ムルトシダ（以下「Pm」という）の培養菌体より得た皮膚壊死毒素を部分精製した後不活化したものに油性アジュバントを添加したものを混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.1mLずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、10日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>注射反応は、無視しうる程度以下でなければならない、試験動物は、すべて生存しなければならない。</u> <u>1.3 安全試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>5 週齢の豚を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物 2 頭を試験群、 1 頭を対照群とする。</u> <u>注射材料 2 mLずつを 4 週間隔で 2 回、試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに 7 週間観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>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。また、試</u>

験群の注射反応は、無視しうる程度以下でなければならない。

1.4 力価試験

1.4.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 試験動物

1.3の試験に用いた動物を用いる。

1.4.1.1.2 Bb 凝集反応用抗原

Bb凝集反応用抗原（付記1）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

1.3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、凝集反応を行う。

各血清をリン酸緩衝食塩液（付記2）で5倍に希釈し、更に2倍階段希釈した後、凝集反応用抗原を用いて試験管内凝集反応を行う。

1.4.1.3 判定

試験管内に凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集価とする。

試験群では、いずれも凝集価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10倍以下でなければならない。

1.4.2 豚パスツレラ症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.3の試験に用いた動物を用いる。

1.4.2.1.2 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

組換え皮膚壊死毒素蛋白質（以下「rToxA」という。付記3）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

1.3の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各血清について、ELISAを行う。

試験群と対照群の血清を血清希釈液（付記4）で100倍に希釈したもの、指示陽性血清（付記5）及び指示陰性血清（付記6）をrToxA吸着プレート（付記7）の4穴（偶数列2穴と奇数列2穴）に50μLずつ加える。37℃で30分間反応させた後、洗浄液（付記8）で3回洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体液（付記9）を50μLずつ加え、37℃で15分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。発色基質液（付記10）を各穴に50μLずつ加え、遮光して30℃で20分間反応させた後、2mol/L硫酸水溶液を50μLずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長492nm副波長630nmで測定する。

1.4.2.3 判定

試験群と対照群の血清、指示陽性血清及び指示陰性血清について、奇数列穴の吸光度値より偶数列の吸光度値を差し引いた値を算出し、平均したものを各血清の吸光度値とする。指示陽性血清の吸光度値が0.8～1.3、指示陰性血清の吸光度値が0.1未満の場合、試験成立とし、次の式に基づいて試験群と対照群の血清のE値を算出したとき、0.1以上を陽性とする。

$$E \text{ 値} = S - N / P - N$$

S：試験群と対照群の吸光度値

N：指示陰性血清の吸光度値

P：指示陽性血清の吸光度値

試験群のE値は、すべて陽性でなければならない。この場合、対照群では、す

べて0.1未満でなければならない。

付記 1 Bb凝集反応用抗原
Bb I 相菌のホルマリン死菌を適当と認められた希釈用液に 1 mL中 1×10^{10}
個となるように浮遊させたもので、既知抗体価の陽性血清に対して所定の凝
集価を示し、陰性血清に対して凝集しないことを確認したもの

付記 2 リン酸緩衝食塩液
1,000mL中
塩化ナトリウム 6.8g
無水リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.4g
リン酸二水素カリウム 0.7g
水 残 量
pHを6.8～7.2に調整して121℃で15分間高压滅菌する。

付記 3 組換え皮膚壊死毒素蛋白質 (rToxA)
大腸菌k-12株由来XL-1BlueにtoxA遺伝子をクローン化したプラスミド
pSN131を形質転換して作出したrToxA産生組換え大腸菌を培養する。培養菌
液より集菌・洗浄して得た菌体を超音波処理、硫酸塩析の後、カラムクロマ
トグラフィーで精製して調製する。rToxA液は、SDSポリアクリルアミド電
気泳動で分析したとき、約140kDaの位置に特異的なバンドを認め、他にバ
ンドを認めない。ELISA抗原は、rToxA液をホルマリンで不活化して使用す
る。

付記 4 血清希釈液
1,000mL中
ゼラチン 10.0g
10倍濃度リン酸緩衝食塩液 100mL
ポリソルベート80 1mL
水 残 量
ゼラチンを水に加温・溶解後、冷却し、これに10倍濃度リン酸緩衝食塩液
及びポリソルベート80を添加する。

付記 5 指示陽性血清
不活化した精製Pm皮膚壊死毒素で免疫した豚の血清で、血清希釈液で
ELISAでの吸光度値が約1.0を示すように調整し、凍結したもの
ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記 6 指示陰性血清
Pm皮膚壊死毒素に対する抗体を保有しない豚の血清で、ELISAでの吸光
度値が0.1以下を示すもの

付記 7 rToxA吸着プレート
rToxAを0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液(付記11)により、蛋白質濃度が 1μ
g/mLとなるように希釈し、この抗原液をプレートの奇数列に、0.05mol/L炭

酸重炭酸緩衝液をプレートの偶数列にそれぞれ50 μ Lずつ加え、4℃で一夜固相化する。固相化したプレートを洗浄液で1回洗浄し、ブロッキング液(付記12)を50 μ Lずつ各穴に加え、常温で60分間反応させた後、プレートを洗浄液で1回洗浄したもの

付記8	<u>洗浄液</u> <u>1,000mL中</u> <u>塩化ナトリウム</u> <u>ポリソルベート80</u> <u>水</u>	<u>8.5g</u> <u>0.5mL</u> <u>残 量</u>
付記9	<u>酵素標識抗体液</u> <u>1,000mL中</u> <u>ペルオキシダーゼ標識プロテインA</u> <u>(蛋白質濃度 2.0 mg/mL)</u> <u>10倍濃度リン酸緩衝食塩液</u> <u>ポリソルベート80</u> <u>水</u> <u>使用直前に調製する。</u>	<u>1 mL</u> <u>100mL</u> <u>1 mL</u> <u>残 量</u>
付記10	<u>発色基質液</u> <u>1,000mL中</u> <u>o-フェニレンジアミン二塩酸塩</u> <u>過酸化水素(30)</u> <u>基質緩衝液(付記13)</u> <u>使用直前に調製する。</u>	<u>0.40g</u> <u>0.2mL</u> <u>残 量</u>
付記11	<u>0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>炭酸水素ナトリウム</u> <u>炭酸ナトリウム</u> <u>水</u> <u>pHを9.6に調整する。</u>	<u>3.0g</u> <u>1.5g</u> <u>残 量</u>
付記12	<u>ブロッキング液</u> <u>1,000mL中</u> <u>ゼラチン</u> <u>水</u> <u>ゼラチンを加温・溶解し、冷却後使用する。</u>	<u>10.0g</u> <u>残 量</u>
付記13	<u>基質緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>クエン酸</u> <u>無水リン酸水素二ナトリウム</u> <u>水</u>	<u>2.55g</u> <u>3.65g</u> <u>残 量</u>

pHを5.0に調整する。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（全菌体・部分精製トキソイド）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（全菌体・部分精製トキソイド）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.3、3.3.4、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症不活化・パスツレラ・ムルトシダトキソイド・豚丹毒不活化混合（アジュバント加）ワクチン</u> <u>動生剤基準の豚ボルデテラ感染症不活化・パスツレラ・ムルトシダトキソイド・豚丹毒不活化混合（アジュバント加）ワクチンの3.6.3、3.6.4、3.6.8及び3.6.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）・パスツレラ・ムルトシダトキソイド・豚丹毒（組換え型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>ボルデテラ・ブロンキセプトチカの培養ろ液を牛赤血球膜結合カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで部分精製し、得られたシアル酸結合型赤血球凝集素を不活化したもの、パスツレラ・ムルトシダの培養菌体より得た皮膚壊死毒素を部分精製した後不活化したもの、及び組換えプレバチルス・チョーシネンシスで産生される豚丹毒菌の表層防御抗原たん白質を精製したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 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>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.1mLずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、7 日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>注射反応は無視し得る程度以下でなければならない、試験動物は全て生存しなければならない。</u> <u>1.3 安全試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>体重10～40kgの豚を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物の 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。</u> <u>試験群の 2 頭に注射材料 1 mLをそれぞれ頸部筋肉内に 4 週間隔で 2 回注射し、</u>

対照群と共に第2回目注射後2週間まで臨床観察する。なお、2回目の注射部位は、初回の注射部位の反対側とする。

1.3.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。注射により一過性の発熱を認めても3日以内に回復しなければならず、また、注射反応は、無視し得る程度以下でなくてはならない。

1.4 力価試験

1.4.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 試験動物

1.3の試験に用いた動物を用いる。

1.4.1.1.2 赤血球凝集抗原

牛赤血球凝集抗原（付記1）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

1.3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非働化した血清について、マイクロタイター法で赤血球凝集抑制（以下この項において「HI」という。）試験を行う。

血清1容に25w/v%カオリン加PBS2容及びPBS1容を加え、30分間処理した後、遠心上清を採取する（4倍希釈血清）。96穴V底プレートを用いて、4倍希釈血清25 μ LをPBSで2倍階段希釈する。各希釈血清に320HA単位/mLの牛赤血球凝集抗原を25 μ Lずつ加えて、4℃で一夜静置する。これに0.5vol%グルタルアルデヒド固定牛赤血球浮遊液（付記2）を50 μ Lずつ加え、37℃で2時間反応させ、更に4℃で一夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。

1.4.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。

試験群のHI抗体価は、全て8倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、全て4倍以下でなければならない。

1.4.2 パスツレラ・ムルトシダ力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.3の試験に用いた動物を用いる。

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

パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素（付記3）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

1.3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非働化した血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の血清、パスツレラ参照陽性血清（付記4）並びにパスツレラ参照陰性血清（付記5）を、各々、血清希釈液1（付記6）で10倍から2倍階段希釈し、パスツレラ抗原吸着プレート（付記7）に100 μ Lずつ加える。37℃で60分間反応させた後、洗浄液1（付記8）で3回洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体（付記9）を100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。基質液（付記10）を各穴に100 μ Lずつ加え、遮光して25℃で15分間反応させた後、0.5mol/L硫酸水溶液を100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長450nmで測定する。

1.4.2.3 判定

吸光度値が1.000以上を示す血清の最高希釈倍数をELISA抗体価とする。
試験群では、ELISA抗体価は、いずれも40倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、20倍以下でなければならない。また、パスツレラ参照陽性血清は80～160倍、パスツレラ参照陰性血清は10倍以下でなければならない。

1.4.3 豚丹毒力価試験

1.4.3.1.1 試験動物

1.3の試験に用いた動物を用いる。

1.4.3.1.2 ELISA用抗原

精製豚丹毒菌表層防御たん白質（付記11）を用いる。

1.4.3.2 試験方法

1.3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非働化した血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の血清、豚丹毒参照陽性血清（付記12）並びに豚丹毒参照陰性血清（付記13）を、各々、血清希釈液2（付記14）で100倍に希釈し、豚丹毒抗原吸着プレート（付記15）の2穴に100 μ Lずつ加える。37℃で45分間反応させた後、洗浄液2（付記16）で3回洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体を100 μ Lずつ加え、37℃で45分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、遮光して25℃で25分間反応させた後、1 mol/L硫酸水溶液を100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長450nmで測定する。

1.4.3.3 判定

各血清の平均吸光度値を算出する。豚丹毒参照陽性血清の平均吸光度値が0.850～1.350、豚丹毒参照陰性血清の平均吸光度値が0.250以下の場合、試験成立とし、次式に基づいて試験群と対照群の血清のELISA抗体価を算出したとき、0.340以上を陽性とする。

$$\text{ELISA抗体価} = (S - N) / (P - N)$$

S：被験血清の平均吸光度値

N：豚丹毒参照陰性血清の平均吸光度値

P：豚丹毒参照陽性血清の平均吸光度値

試験群では、ELISA抗体価は、いずれも陽性でなければならない。この場合において、対照群では、0.280未満でなければならない。

付記 1 牛赤血球凝集抗原

牛赤血球に対して強い凝集活性を有するボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の培養液を、牛赤血球膜結合セルロースカラムを用いたアフィニティークロマト法により精製し、得られた牛赤血球凝集素の赤血球凝集価が1,280～2,560HA単位/mLになるように濃度を調整したもの。

付記 2 0.5vol% グルタルアルデヒド固定牛赤血球浮遊液

牛赤血球をグルタルアルデヒドで固定後、10vol%赤血球液となるように調整したもので、使用時に、0.01w/v%ゼラチン加PBSで0.5vol%赤血球液となるように希釈する。

付記 3 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素

皮膚壊死毒素を産生するパスツレラ・ムルトシダ菌の培養菌液を超音波処理後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより部分精製したもの。SDSポリ

アクリルアミドゲル電気泳動で分析したとき、分子量約140kDaの位置に特異的なバンドを認める。

付記 4 パスツレラ参照陽性血清
無毒化したパスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素で免疫した豚の血清であって、1.4.2.2の試験を準用して試験するとき、ELISA抗体価が80～160倍示すように調整したもの。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記 5 パスツレラ参照陰性血清
パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素に対する抗体を保有しない豚の血清であって、1.4.2.2の試験を準用して試験するとき、ELISA抗体価が10倍以下を示すもの。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記 6 血清希釈液 1
1,000mL中
塩化ナトリウム 50g
ゼラチン 0.20g
ポリソベート80 1.0mL
リン酸緩衝食塩液 残 量
加温・溶解後、ろ過滅菌を行う。

付記 7 パスツレラ抗原吸着プレート
パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素を、たん白質濃度が0.5 μ g/mLとなるように炭酸緩衝液（付記17）で希釈し、ELISAプレートの各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で一夜固相化する。固相化したプレートを洗浄液で3回洗浄し、ブロッキング液（付記18）を150 μ Lずつ各穴に加え、37℃で1時間反応させた後、プレートを洗浄液で3回洗浄したもの。

付記 8 洗浄液 1
1,000mL中
塩化ナトリウム 8.50g
りん酸二水素ナトリウム・二水和物 3.12g
ポリソルベート80 0.2mL
水 残 量
pHを7.2に調整する。

付記 9 酵素標識抗体
ペルオキシダーゼ標識抗豚IgGを血清希釈液 1 で至適濃度に希釈したもの。

付記10 基質液
液中に3,3',5,5'テトラメチルベンジジン (TMB) 及び過酸化水素を含むもの。

付記11 精製豚丹毒菌表層防御たん白質

組換えブレヴィバチルス・チャーシネンシスで産生される豚丹毒菌の表層防御抗原たん白質を陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製したもの。
SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したとき、分子量約46.5kDaの位置に特異的なバンドを認める。

付記12 豚丹毒参照陽性血清
精製豚丹毒菌表層防御たん白質で免疫した豚の血清であって、1.4.3.2の試験を準用して試験するとき、ELISAの吸光度値が0.850～1.350を示すように調整したもの。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記13 豚丹毒参照陰性血清
精製豚丹毒菌表層防御たん白質に対する抗体を保有しない豚の血清で、1.4.2.2の試験を準用して試験するとき、ELISA抗体価が0.250以下を示すもの。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記14 血清希釈液 2
1,000mL中
塩化ナトリウム 8.75g
りん酸水素ナトリウム・12水和物 2.76g
りん酸二水素ナトリウム・二水和物 0.49g
ゼラチン 1.08g
ポリソベート20 0.54mL
水 残 量
加温・溶解後、ろ過滅菌を行う。

付記15 豚丹毒抗原吸着プレート
精製豚丹毒菌表層防御たん白質を、たん白質濃度が1 µg/mLとなるように炭酸緩衝液で希釈し、ELISAプレートの各穴に100 µLずつ加え、4℃で一夜固相化する。固相化したプレートを洗浄液で3回洗浄し、ブロッキング液を150 µLずつ各穴に加え、37℃で1時間反応させた後、プレートを洗浄液で3回洗浄したもの。

付記16 洗浄液 2
1,000mL中
ポリソベート20 0.5mL
生理食塩液 残 量

付記17 炭酸緩衝液
A液：1,000mL中
炭酸ナトリウム 3.18g
水 残 量
B液：1,000mL中
炭酸水素ナトリウム 5.86g
水 残 量
A液とB液を使用時に等量混合する。

付記18 ブロッキング液
適当と認められた溶液。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症・豚パストツレラ症・豚丹毒混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ（以下この項において「Bb」という。）、パストツレラ・ムルトシダ（以下この項において「Pm」という。）及び豚丹毒菌の各々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を混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.1mLずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、14日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>注射反応は、無視し得る程度以下でなければならない。試験動物は、全て生存しなければならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、試験品の注射材料は0.2mLとし、体重測定は4日目に行うものとする。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 豚ボルデテラ感染症力価試験</u> <u>1.4.1.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.4.1.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.4.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原</u> <u>Bbトキシン（付記 1）を用いる。</u> <u>1.4.1.2 試験方法</u>

試験動物10匹を試験群、5匹を対照群とする。

注射材料0.5mLずつを4週間隔で2回、試験群の皮下に注射する。第2回目の注射後2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、ELISAを行う。

試験群と対照群の各血清、Bbトキシン参照陽性血清（付記2）及び参照陰性血清（付記3）を希釈液（付記4）で8倍～8,192倍まで希釈したものをBbトキシン抗原吸着プレート（付記5）に100μLずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。37℃で2時間反応させた後、洗浄液（付記6）で5回洗浄する。次に各穴に標識抗体（付記7）を100μLずつ加え、37℃で2時間反応させた後、洗浄液で5回洗浄する。発色基質（付記8）を各穴に100μLずつ加え、遮光して、30℃で30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を50μLずつ加えて反応を停止させ、波長405nmで各穴の吸光度を測定する。

1.4.1.3 判定

各被検血清の測定値から血清対照の測定値を差し引いた吸光度値が0.2以上を陽性とし、陽性を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価256倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て16倍以下でなければならない。また、Bbトキシン参照陽性血清は、抗体価256～1,024倍を示さなければならない、参照陰性血清は、16倍以下でなければならない。

1.4.2 豚バズツレラ症力価試験

1.4.2.1 Pmトキシン抗体価測定試験

1.4.2.1.1 試験材料

1.4.2.1.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

1.4.2.1.1.2 ELISA用抗原

Pmトキシン（付記9）を用いる。

1.4.2.1.2 試験方法

1.4.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、Pmトキシン参照陽性血清（付記10）並びに参照陰性血清を、希釈液で8倍～8,192倍まで希釈したものをPmトキシン抗原吸着プレート（付記11）に100μLずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。37℃で2時間反応させた後、洗浄液で5回洗浄する。次に、各穴に標識抗体を100μLずつ加え、37℃で2時間反応させた後、洗浄液で5回洗浄する。発色基質を各穴に100μLずつ加え、遮光して30℃で30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を50μLずつ加えて反応を停止させ、波長405nmで各穴の吸光度を測定する。

1.4.2.1.3 判定

各被検血清の測定値から血清対照の測定値を差し引いた吸光度値が0.1以上を陽性とし、陽性を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価512倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て16倍以下でなければならない。また、Pmトキシン参照陽性血清は、抗体価512～2,048倍を示さなければならない、参照陰性血清は、16倍以下でなければならない。

1.4.2.2 PmA型荚膜抗体価測定試験

1.4.2.2.1 試験材料

1.4.2.2.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる

1.4.2.2.1.2 ELISA用抗原

PmA型莢膜抗原（付記12）を用いる。

1.4.2.2.2 試験方法

1.4.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、PmA型莢膜抗原参照陽性血清（付記13）並びに参照陰性血清を、希釈液で8～8,192倍まで希釈したものをPmA型莢膜抗原吸着プレート（付記14）に100μLずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。37℃で2時間反応させた後、洗浄液で5回洗浄する。次に、各穴に標識抗体を100μLずつ加え、37℃で2時間反応させた後、洗浄液で5回洗浄する。発色基質を各穴に100μLずつ加え、遮光して30℃で30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を50μLずつ加えて反応を停止させ、波長405nmで各穴の吸光度を測定する。

1.4.2.2.3 判定

各被検血清の測定値から血清対照の測定値を差し引いた吸光度値が0.1以上を陽性とし、陽性を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価512倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて16倍以下でなければならない。また、PmA型莢膜抗原参照陽性血清は、抗体価512～2,048倍を示さなければならない、参照陰性血清は、16倍以下でなければならない。

1.4.3 豚丹毒力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で3倍に希釈したものを注射材料とする。

1.4.3.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

1.4.3.1.3 攻撃菌液

凍結乾燥した豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記15）に接種し、37℃で14～20時間培養する。これを普通ブイヨンで10⁴CFU/mLの菌量となるように希釈したものを攻撃菌液とする。

1.4.3.2 試験方法

試験動物10匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.1mLずつを試験群の内股部皮下に注射する。注射後10日目に、攻撃菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、10日間観察する。

1.4.3.3 判定

試験群では、70%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群では、90%以上が死亡しなければならない。

付記1 Bbトキシン

BbS798株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を動物医薬品検査所が適当と認めた培地で、37℃で16時間培養後、培養菌液の超音波処理により得られた粗毒素をクロマトカラムで精製したものであり、SDSポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、140～160kDaに特異バンドを認め、毒素活性を

有するもの

付記 2 Bbトキシン参照陽性血清
BbS798株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株から抽出したBbトキシ
ンをホルマリンで不活化し、アジュバントと混合し、モルモットに注射して
得られた血清で、Bbトキシンに対する抗体価が256～1,024倍となるように調
整し、小分けして、凍結保存したもの

付記 3 参照陰性血清
健康なモルモット血清で、Bbトキシン、Pmトキシン及びPmA型莢膜抗原
に対する抗体価がいずれも16倍以下を示すもので、小分けして、凍結保存し
たもの

付記 4 希釈液
1,000mL中
塩化ナトリウム 8.0g
リン酸二水素カリウム 0.2g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9g
塩化カリウム 0.2g
アジ化ナトリウム 0.2g
馬血清 30mL
水 残 量
pHを7.4に調整する。

付記 5 Bbトキシン抗原吸着プレート
Bbトキシンを用いて、Bbトキシン参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体
価を測定するとき、各血清が規格値を示すように、炭酸緩衝液（付記16）で
希釈したBbトキシンを、プレートの各穴に100μLずつ加え、プレートを4℃
で一夜反応させた後、洗浄液で1回洗浄し、更に各穴に希釈液150μLずつ加
え、37℃で30分間静置後、洗浄液で5回洗浄したもの

付記 6 洗浄液
1,000ml中
塩化ナトリウム 8.0g
リン酸二水素カリウム 0.2g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9g
塩化カリウム 0.2g
ポリソルベート20 0.5mL
アジ化ナトリウム 0.2g
水 残 量
pHを7.4に調整する。

付記 7 標識抗体
アルカリフォスファターゼ標識抗モルモットIgG抗体を希釈液で至適濃度
に希釈したもの

- 付記8 発色基質
p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物100mgを使用直前に基質緩衝液（付記17）100mLに溶解したもの
- 付記9 Pmトキシン
Pm82株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を動物医薬品検査所が適当と認めた培地で、37℃で16時間培養後、培養菌液の超音波処理により得られた粗毒素をクロマトカラムで精製したものであり、SDSポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、125～145kDaに特異バンドを認め、毒素活性を有するもの
- 付記10 Pmトキシン参照陽性血清
Pm82株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株から抽出したトキシンをホルマリンで不活化し、アジュバントと混合し、モルモットに注射して得られた血清で、Pmトキシンに対する抗体価が512～2,048倍となるように調整し、小分けして、凍結保存したもの
- 付記11 Pmトキシン抗原吸着プレート
Pmトキシンを用いて、Pmトキシン参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価を測定するとき、各血清が規格値を示すように、炭酸緩衝液で希釈したPmトキシンを、プレートの各穴に100μLずつ加え、4℃で一夜反応させた後、洗浄液で1回洗浄し、さらに各穴に希釈液150μLずつ加え、37℃で30分間静置後、洗浄液で5回洗浄したもの
- 付記12 PmA型莢膜抗原
Pm86株又はこれと同等の莢膜抗原を有する株を動物医薬品検査所が適当と認めた培地で37℃で18時間培養した後、培養菌液の加熱処理により得られた莢膜抗原であり、SDSポリアクリルアミド電気泳動にかけてクマシーブリリアントブルー染色した場合、バンドを認めず、過ヨウ素酸シッフ染色した場合、スメア像を示すもの
- 付記13 PmA型莢膜抗原参照陽性血清
Pm86株又はこれと同等の莢膜抗原を有する株から抽出したPmA型莢膜抗原をアジュバントと混合し、モルモットに注射して得られた血清で、PmA型莢膜抗原に対する抗体価が512～2,048となるように調整し、小分けして、冷凍保存したもの
- 付記14 PmA型莢膜抗原吸着プレート
PmA型莢膜抗原を用いて、PmA型莢膜抗原参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価を測定するとき、各血清が規格値を示すように炭酸緩衝液で希釈したPmA型莢膜抗原を、プレートの各穴に100μLずつ加え、プレートを4℃で一夜反応させた後、洗浄液で1回洗浄し、更に各穴に希釈液を150μLずつ加え、37℃で30分間静置後、洗浄液で5回洗浄したもの

<u>付記15</u>	<u>攻撃菌用培地</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>30.0g</u>
	<u>プロテオーゼペプトン</u>	<u>10.0g</u>
	<u>ポリソルベート80</u>	<u>1.0mL</u>
	水	残 量
	<u>pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高压滅菌する。</u>	
<u>付記16</u>	<u>炭酸緩衝液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>炭酸水素ナトリウム</u>	<u>2.93g</u>
	<u>炭酸ナトリウム</u>	<u>1.59g</u>
	水	残 量
	<u>pHを9.6に調整する。</u>	
<u>付記17</u>	<u>基質緩衝液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>ジエタノールアミン</u>	<u>97.0mL</u>
	<u>塩化マグネシウム</u>	<u>0.1g</u>
	<u>アジ化ナトリウム</u>	<u>0.2g</u>
	水	残 量
	<u>pHを10.2に調整する。冷所で遮光して保存する。</u>	

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカトキソイド・ パスツレラ・ムルトシダトキソイド・豚丹毒 混合（アジュバント加）ワクチン（組換え型）</u> <u>組換え大腸菌で産生される無毒変異型ボルデテラ・ブロンキセプチカ皮膚壊死毒 素を精製したもの、組換え大腸菌で産生される無毒変異型パスツレラ・ムルトシダ 皮膚壊死毒素を精製したもの及び組換え大腸菌で産生される豚丹毒菌の欠損型表層 防御抗原たん白を精製したものにアルミニウムゲルアジュバントを添加し、混合し たワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければ ならない。ただし、注射後の体重測定は、4 日目とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 豚ボルデテラ感染症力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>水酸化アルミニウムゲル溶液（付記 1）で試験品を 9 倍に希釈したものを注射 材料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 試験動物</u> <u>5 週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.1.1.3 攻撃用毒素</u> <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ皮膚壊死毒素（付記 2）を用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>試験動物10匹以上を試験群とし、10匹以上を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の腹腔内に注射する。第 2 回目 の注射後 2 週目に、ボルデテラ・ブロンキセプチカ皮膚壊死毒素を約50LD₅₀/0.5mL に調整し、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日間観察する。</u> <u>1.3.1.3 判定</u> <u>試験群においては、80%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照 群においては、80%以上が死亡しなければならない。</u>

1.3.2 パスツレラ・ムルトシダ力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

水酸化アルミニウムゲル溶液で試験品を9倍に希釈したものを注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

5週齢のマウスを用いる。

1.3.2.1.3 攻撃用毒素

パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素（付記3）を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試験動物10匹以上を試験群とし、10匹以上を対照群とする。

注射材料0.5mLずつを2週間隔で2回、試験群の腹腔内に注射する。第2回目の注射後2週目に、パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素を約50LD₅₀/0.5mLに調整し、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日間観察する。

1.3.2.3 判定

試験群においては、80%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、80%以上が死亡しなければならない。

1.3.3 豚丹毒力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.3.1.2 試験動物

5週齢のマウスを用いる。

1.3.3.1.3 攻撃用菌液

豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記4）に接種し、37℃で18～22時間培養する。これを1mL中10⁸個の菌量になるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

1.3.3.2 試験方法

試験動物10匹以上を試験群とし、10匹以上を対照群とする。

注射材料0.1mLずつを試験群の内股部皮下内に注射する。注射後3週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、7日間観察する。

1.3.3.3 判定

試験群においては、80%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、90%以上が死亡しなければならない。

付記1 水酸化アルミニウムゲル溶液

水酸化アルミニウムゲルを9.3mmol/Lリン酸緩衝食塩液（付記5）でアルミニウム量として0.6mg/mLになるように希釈したもの

付記2 ボルデテラ・ブロンキセプチカ皮膚壊死毒素

ボルデテラ・ブロンキセプチカS611株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を、ボルデテラ・ブロンキセプチカ培養用培地（付記6）で37℃、15～24時間培養し、発育した菌体を遠心又はろ過により濃縮し、超音波処理によって菌体を破碎処理した後、その遠心上清をろ過滅菌し、マウスに対する

LD₅₀値が50LD₅₀/0.5mL以上となるように調整したもの。

付記3 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素
パスツレラ・ムルトシダS70株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株
を、ハートインフュージョン液体培地で37℃、18時間振とう培養し、発育した
菌体を遠心又はろ過により濃縮し、超音波処理によって菌体を破碎処理した
後、その遠心上清をろ過滅菌し、マウスに対するLD₅₀値が50LD₅₀/0.5mL以上
となるように調整したもの。

付記4 攻撃菌用培地
1,000mL中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 30g
プロテオーゼペプトン 10g
ポリソルベート80 1mL
水 残量
溶解した後、pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高压滅菌する。

付記5 9.3mmol/Lリン酸緩衝食塩液
1,000mL中
リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.40g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.40g
塩化ナトリウム 7.4g
水 残量
溶解した後、pHを7.0～7.5に調整して、121℃で15分間高压滅菌又はろ過
滅菌する。

付記6 ボルデテラ・ブロンキセプチカ培養用培地
1,000mL中
カザミノ酸 5.0g
カゼイン製ペプトン 5.0g
でんぷん 1.5g
酵母エキス 1.0g
リン酸二水素カリウム 0.5g
塩化ナトリウム 2.5g
水 残量
溶解した後、pHを6.8～7.6に調整して、121℃で15分間高压滅菌又はろ過
滅菌する。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚ボルデテラ感染症・豚パストツレラ症（粗精製トキシイド）・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>ボルデテラ・ブロンキセプトチカ（以下「Bb」という。）の菌体破碎上清濃縮液、パストツレラ・ムルトシダ（以下「Pm」という。）の粗精製濃縮液及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエ（以下「Mhp」という。）の培養菌液の培養濃縮粗る液をそれぞれ不活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ワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.2.1.3 試験方法</u> <u>注射材料0.1mLずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、10日間観察する。</u> <u>1.2.1.4 判定</u> <u>注射反応は、無視し得る程度以下でなければならない。試験動物は、すべて生存しなければならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、注射量は0.3mLとし、体重測定は3 日目に行うものとする。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 Bb感染症力価試験</u> <u>1.4.1.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.4.1.1.2 試験動物</u> <u>6 ～ 7 週齢のddY系SPFマウスを用いる。</u>

1.4.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用Bb抗原
Bb精製抗原（付記1）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

試験動物10匹を試験群、5匹を対照群とする。

注射材料1.0mLずつを試験群の腹腔内に注射する。注射後4週間目に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清及びBb参照陽性血清（付記2）を希釈液（付記3）で40～10,240倍まで2倍階段希釈したものをBb精製抗原吸着プレート（付記4）に100 μ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4℃で18時間反応させた後、洗浄液（付記5）で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体（付記6）を100 μ Lずつ加え、37℃で2時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液（付記7）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を各穴に50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長405nmで各穴の吸光度を測定する。

1.4.1.3 判定

対照の各穴の測定値の平均値+0.5以上の測定値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価320倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて80倍以下でなければならない。また、Bb参照陽性血清は、抗体価320～640倍を示さなければならない。

1.4.2 Pm症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

1.4.2.1.2 ELISA用Pm抗原

Pm精製抗原（付記8）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

1.4.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清及びPm参照陽性血清（付記9）を希釈液で40倍～10,240倍まで2倍階段希釈したものをPm精製抗原吸着プレート（付記10）に100 μ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4℃で18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体を100 μ Lずつ加え、37℃で2時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を各穴に50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長405nmで各穴の吸光度を測定する。

1.4.2.3 判定

対照の各穴の測定値の平均値+0.5以上の測定値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価1,280倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて320倍以下でなければならない。また、Pm参照陽性血清は、抗体価640～1,280倍を示さなければならない。

1.4.3 Mhp感染症力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

1.4.3.1.2 ELISA用Mhp抗原

ポリソルベート20抽出抗原（付記11）を用いる。

1.4.3.2 試験方法

1.4.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清及びMhp参照陽性血清（付記12）を希釈液で40倍～10,240倍まで2倍階段希釈したものをMhp抗原吸着プレート（付記13）に100 μ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4℃で18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体を100 μ Lずつ加え、37℃で90分間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を各穴に50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長405nmで各穴の吸光度を測定する。

1.4.3.3 判定

対照の各穴の測定値の平均値+0.5以上の測定値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価2,560倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて320倍以下でなければならない。また、Mhp参照陽性血清は、抗体価2,560～5,120倍を示さなければならない。

付記 1 Bb精製抗原

Bb製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素であり、SDSポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、分画の主成分は、分子量約140～160kDaを示し、モルモットの皮内に注射すると貧血斑を示す。

付記 2 Bb参照陽性血清

Bb製造用株又はこれと同等の抗原性を示す株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素で免疫したマウスの血清であり、ELISA抗体価が320～640倍となるよう調整し、凍結乾燥したもの

付記 3 希釈液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.0g
塩化カリウム	0.2g
リン酸二水素カリウム	0.2g
リン酸水素二ナトリウム	1.15g
水	残 量

付記 4 Bb精製抗原吸着プレート

Bb精製抗原を炭酸緩衝液（付記14）で40倍に希釈し、96穴マイクロプレートに100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応後、洗浄液で10回洗浄し、さらにゼラチン液（付記15）を各穴に150 μ Lずつ加え、37℃2時間反応後、洗浄液で10回洗浄したもの

- 付記 5 洗浄液
ポリソルベート20 0.5mLと希釈液1,000mLを混合したもの
- 付記 6 標識抗体
アルカリフォスファターゼ標識マウスIgG抗体を希釈液で希釈したもの
- 付記 7 基質液
p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム100mgを基質緩衝液（付記16）100mLに溶解したもの
- 付記 8 Pm精製抗原
Pm製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、
ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素であり、SDSポリア
クリルアミド電気泳動で分析したとき、分画の主成分は、分子量約125～
145kDaを示し、モルモットの皮内に注射すると壊死斑を示す。
- 付記 9 Pm参照陽性血清
Pm製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、
ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素で免疫したマウスの
血清であり、ELISA抗体価が640～1,280倍になるように調整し、凍結乾燥し
たもの
- 付記10 Pm精製抗原吸着プレート
Pm精製抗原を炭酸緩衝液で40倍に希釈し、96穴マイクロプレートに100 μ L
ずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄し、さらにゼラチ
ン液を各穴に150 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ C 2時間反応後、洗浄液で10回洗浄した
もの
- 付記11 ポリソルベート20抽出抗原
Mhp製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の振盪培養菌液を遠心集
菌し、希釈液に懸濁後、4 $^{\circ}$ Cで24時間攪拌して菌体を洗浄する。洗浄菌体を
トリス緩衝液（1）に蛋白濃度 1 mg/mLになるように懸濁後、2 vol%ポリ
ソルベート20加トリス緩衝液（2）を等量加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間振盪しながら
加温する。遠心後の上清にジエチルエーテルを等量加えて振盪後、エーテル
層を完全に除去したもの
（1）トリス緩衝液
トリスヒドロキシメチルアミノメタン3.03g、塩化ナトリウム14.61gを
水に溶解し、全量を1,000mLとしたもの
（2）2 vol%ポリソルベート20加トリス緩衝液
ポリソルベート20 20mLとトリス緩衝液980mLを混合したもの
- 付記12 Mhp参照陽性血清
Mhp J株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清で
あり、ELISA抗体価が2,560～5,120倍となるように調整し、凍結乾燥したも
の

- 付記13 Mhp抗原吸着プレート
Mhp J株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫した兔免疫血清（付記17）を炭酸緩衝液で100倍に希釈したものを、96穴マイクロプレートに100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させ、洗浄液で10回洗浄する。さらに、ゼラチン液を各穴に150 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させ、洗浄液で10回洗浄する。これに、ポリソルベート20抽出抗原を希釈液で蛋白量12.5 μ g/mLになるように希釈したものを100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄したもの
- 付記14 炭酸緩衝液
A液：炭酸ナトリウム5.3gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。
B液：炭酸水素ナトリウム4.2gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。
A液とB液を混合し、pH9.6に調整する。
- 付記15 ゼラチン液
ゼラチン1.0gを希釈液1,000mLで溶解したもの
- 付記16 基質緩衝液
1,000mL中

<u>塩化マグネシウム・六水和物</u>	<u>0.049g</u>
<u>ジエタノールアミン</u>	<u>96mL</u>
<u>水</u>	<u>残 量</u>

pHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの
- 付記17 兔免疫血清
Mhp J株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫した兔の血清であり、発育阻止試験において直径3 mm以上の阻止帯を示すもの

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚インフルエンザ・豚丹毒混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>豚インフルエンザ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後凍結乾燥したもの（以下「乾燥ワクチン」いう。）と、豚丹毒菌の培養菌液を不活化し、その遠心上清を濃縮したものに油性アジュバントを添加したもの（以下「液状ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>乾燥ワクチンを液状ワクチンで溶解したもの（以下「混合ワクチン」という。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>乾燥ワクチンを液状ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したものを注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 発育鶏卵</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1の10～12日齢のものを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.2mLずつを4個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、36～37℃で培養し、3日間隔で尿膜腔液を2代まで継代する。2代目の尿膜腔液に0.5vol%の鶏の赤血球浮遊液を等量加え、室温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。</u> <u>ただし、赤血球凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量に混合して3代まで継代し、3代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後、判定する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>赤血球凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。</u> <u>試験品に活性ウイルスを認めてはならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.4 力価試験</u>

1.4.1 豚インフルエンザ力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 注射材料

混合ワクチンをリン酸緩衝食塩液で10倍に希釈したものを注射材料とする。

1.4.1.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

1.4.1.1.3 赤血球凝集抗原

試験品に含まれるそれぞれのウイルス株と同一タイプのウイルスで調製した赤血球凝集抗原（付記1）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを試験動物20匹の腹腔内に注射した後、4群に分け、14日目に得られた血清を各群ごとにプールして、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清をRDE及び鶏赤血球処理又は適当と認められた方法で処理する。これをリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈液0.2mLに0.2mL中8単位の赤血球凝集抗原を等量ずつ加え、室温で60分間処理する。これに0.5vol%の鶏の赤血球浮遊液を0.4mLずつ加え、室温に60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.1.3 判定

赤血球凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

各群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、H1N1亜型では16倍以上、H3N2亜型では32倍以上でなければならない。

1.4.2 豚丹毒力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

5週齢のマウスを用いる。

1.4.2.1.3 攻撃用菌液

豚丹毒藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記2）に接種し、37℃で14～20時間培養する。これを普通ブイヨンで1mL中10⁶個の菌量となるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

1.4.2.2 試験方法

試験動物の10匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.5mLずつを2週間隔で2回、試験群の内股部皮下に注射する。第2回目注射後2週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、7日間観察する。

1.4.2.3 判定

試験群では、80%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群では90%以上が死亡しなければならない。

付記1 赤血球凝集抗原

豚インフルエンザウイルスA型 A/swine/Iowa/08/00（H1N1）株及び A/swine/Iowa/06/00（H3N2）株又はこれらと同等と認められたウイルス株を用いて、それぞれ調製した赤血球凝集抗原

付記2 攻撃菌用培地

1,000mL中	
<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>30g</u>
<u>プロテオーゼペプトン</u>	<u>10g</u>
<u>ポリソルベート80</u>	<u>1mL</u>
水	残 量
<u>pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高压滅菌する。</u>	

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚サーコウイルス(2型・組換え型)感染症(カルボキシビニルポリマーアジュバント加)不活化ワクチン・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症(カルボキシビニルポリマーアジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>組換えDNA技術を応用して製造された豚サーコウイルス2型オープンリーディングフレーム2（以下この項において「PCV2ORF2」という。）遺伝子を挿入したバキュロ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、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「PCV2ワクチン」という。）とマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「Mhpワクチン」という。）を組み合わせたワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>PCV2ワクチンとMhpワクチンそれぞれを試験品として一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>PCV2ワクチンとMhpワクチンそれぞれを注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>3～5週齢の豚を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料2頭分ずつを2頭の試験動物の左右の頸部筋肉内にそれぞれ注射し、21日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 豚サーコウイルス2型感染症力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>PCV2ワクチン、参照ワクチン（付記1）、陰性対照（付記2）、陽性対照（付</u>

記3)、抗PCV2ORF2豚IgG(付記4)、抗PCV2ORF2モノクローナル抗体(付記5)及び酵素標識抗体(付記6)を用いる。

1.3.1.2 試験方法

1.3.1.2.1 酵素抗体反応(以下この項において「ELISA」という。)用固相化プレート

の作製

抗PCV2ORF2豚IgGを吸着用緩衝液(付記7)で希釈したものを100 μ Lずつ96穴ELISAプレートに分注し、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで1夜静置する。洗浄・希釈液(付記8)で3回洗浄し、ブロッキング液(付記9)を250 μ Lずつ加え、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。この固相化プレートを洗浄・希釈液で3回洗浄し、固相化プレートとする。

1.3.1.2.2 試料等の調整

PCV2ワクチン、参照ワクチン、陰性対照及び陽性対照を洗浄・希釈液でそれぞれ30倍から2倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

1.3.1.2.3 反応

各試料100 μ Lずつを固相化プレートの3穴に加え、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で3回洗浄する。洗浄・希釈液で希釈した抗PCV2ORF2モノクローナル抗体を各穴に100 μ Lずつ分注し、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で3回洗浄する。1 vol%ウサギ血清加希釈用緩衝液(付記10)で希釈した酵素標識抗体を各穴に100 μ Lずつ分注し、35 $\sim$ 39 $^{\circ}$ Cで45分間反応させる。反応後、洗浄・希釈液で3回洗浄する。基質液(付記11)を100 μ 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 μ Lずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

1.3.1.2.4 吸光度測定

波長450nmで吸光度を測定する。

1.3.1.3 判定

参照ワクチンの力価を1.0として、PCV2ワクチンの相対力価を統計学的計算方法(付記12)により算出するとき、PCV2ワクチンの相対力価は、1.0 $\sim$ 3.75でなければならない。この際、陽性対照の480倍希釈液の平均吸光度は0.998 $\sim$ 2.500でなければならない。陰性対照の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。

1.3.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

Mhpワクチンをワクチン希釈液(付記13)で90倍に希釈した後、更に生理食塩液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

6 $\sim$ 7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

1.3.2.1.3 ELISA用抗原

固相化抗原(付記14)を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.1mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後3週間目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清(付記15)をブロッキング液(付記16)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

积液を抗原吸着プレート（付記17）の穴に100μLずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37℃で1時間反応させた後、洗浄液（付記18）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100μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100μLずつ加えて反応させた後、各穴に1mol/L塩酸を100μLずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

1.3.2.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。
 試験群では、70%以上が抗体価320倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清は、抗体価320～640倍でなければならない。

付記 1	参照ワクチン <u>PCV2ワクチンであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。</u>
付記 2	陰性対照 <u>Spodoptera frugiperda細胞培養液にPCV2ワクチンのアジュバントを20vol%含むもの。</u>
付記 3	陽性対照 <u>PCV2ワクチンの製造方法で製造されたもので、PCV2ORF2抗原液を80vol%及びアジュバントを20vol%含むもの。</u>
付記 4	抗PCV2ORF2豚IgG <u>PCV2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。</u>
付記 5	抗PCV2ORF2モノクローナル抗体 <u>PCV2ORF2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細胞6C4-2-4A3-5D10の培養上清</u>
付記 6	酵素標識抗体 <u>ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG（H+L）山羊血清</u>
付記 7	吸着用緩衝液 1,000mL中 炭酸水素ナトリウム 2.93g 炭酸ナトリウム 1.59g 水 残 量 <u>pHを9.5～9.7に調整する。</u>
付記 8	洗浄・希釈液 1,000mL中 塩化ナトリウム 8.0g

塩化カリウム	0.2g
リン酸水素二ナトリウム、無水	1.15g
リン酸二水素カリウム	0.2g
ポリソルベート20	0.5mL
水	残 量
pHを7.2～7.4に調整する。	

付記9 ブロッキング液
洗淨・希釈液に脱脂粉乳を5.0w/v%になるように加えたもの。

付記10 1 vol%ウサギ血清加希釈用緩衝液
洗淨・希釈液にウサギ正常血清を1 vol%になるように加えたもの。

付記11 基質液
A液：テトラメチルベンチジン0.4gを26vol% N.N.-ジメチルホルムアミド1,000mLで溶解したもの。
B液：クエン酸緩衝液に0.02vol%過酸化水素水を含む液
使用時にA液とB液を等量混合して用いる。

付記12 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 ワクチン希釈液
0.5w/v%カルボキシビニルポリマー液（付記19）を生理食塩液で5倍に希釈したもの。

付記14 固相化抗原
マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、菌体を洗淨した後、超音波処理をして調製した抗原。

付記15 参照陽性血清
マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチンで免疫したマウスの血清であって、1.3.2の試験により抗体価が320～640倍となるように濃度を調整したもの。凍結して－50℃以下で保存する。

付記16 ブロッキング液
1,000mL中
スキムミルク
洗淨液
必要に応じ、200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記17 抗原吸着プレート

マイコプラズマ固相化抗原をトリス緩衝食塩液（付記20）で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記18	洗浄液 1,000mL中 ポリソルベート20 トリス緩衝食塩液 pHを7.2～7.4に調整する。	0.5mL 残 量
------	--	--------------

付記19 0.5w/v%カルボキシビニルポリマー液
1,000mL中
カルボキシビニルポリマー
水 5g
残量
 pHを7.2～7.5に調整して、121℃で30分間高圧滅菌する。

付記20	トリス緩衝食塩液 1,000mL中 トリスヒドロキシメチルアミノメタン 塩化ナトリウム 水 pHを7.2～7.4に調整する。	2.42g 8.77g 残量
------	---	----------------------

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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</u> <u>組換えDNA技術を応用して製造された豚サーコウイルス２型オープンリーディ ングフレーム２（以下この項において「PCV2ORF2」という。）遺伝子を挿入した バキュロ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、カルボキ シビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「PCV2 ワクチン」という。）とマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化 し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項に おいて「Mhpワクチン」という。）を使用時に混合するワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>PCV2ワクチンとMhpワクチンを等量混合したもの（以下この項において「混合 ワクチン」という。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、こ れに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>混合ワクチンを注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>3～5週齢の豚を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料２頭分ずつを２頭の試験動物の左右の頸部筋肉内に半量ずつ注射し、 21日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 豚サーコウイルス２型感染症力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>混合ワクチンをワクチン希釈液（付記１）で10倍に希釈した後、更に生理食塩</u>

液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

1.3.1.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

1.3.1.1.3 ELISA用抗原

固相化抗原1（付記2）を用いる。

1.3.1.2 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、ELISA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3）をブロッキング液（付記4）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5）の穴に100 μ Lずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37℃で1時間反応させた後、洗浄液（付記6）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（付記7）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液（付記8）を各穴に100 μ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

1.3.1.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価640倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清1は、抗体価640～1280倍でなければならない。

1.3.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

混合ワクチンをワクチン希釈液で90倍に希釈した後、更に生理食塩液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

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

固相化抗原2（付記9）を用いる。

1.3.2.2 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、ELISA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10）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11）の穴に100 μ Lずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、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 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100 μ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

1.3.2.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価320倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清2は、抗体価320～640倍でなければならない。

付記1 ワクチン希釈液
0.5w/v%カルボキシビニルポリマー液（付記12）を生理食塩液で5倍に希釈したもの。

付記2 固相化抗原1
適当と認められたクロマトグラフィーによって精製したPCV2ORF2画分。

付記3 参照陽性血清1
試験品で免疫したddy系マウスの血清であって、1.3.1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4 ブロッキング液
洗浄液にスキムミルクを5.0w/v%になるように加えたもの。

付記5 抗原吸着プレート1
固相化抗原1をトリス緩衝食塩液（付記13）で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記6 洗浄液
1,000mL中
ポリソルベート20
トリス緩衝食塩液
pHを7.2～7.4に調整する。
0.5mL
残量

付記7 酵素標識抗体
ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG（H+L）山羊血清

付記8 基質液
3,3',5,5'テトラメチルベンチジンを含むペルオキシダーゼ基質液

付記9 固相化抗原2
マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、菌体を洗浄した後、超音波処理をして調製した抗原。

付記10 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、
13.2の試験により抗体価が320～640倍となるように濃度を調整したもの。凍
結して－50℃以下で保存する。

付記11 抗原吸着プレート2
固相化抗原2をトリス緩衝食塩液で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に
100μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。その後、
ブロッキング液を各穴に100μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗
浄液で洗浄したもの。

付記12 0.5w/v%カルボキシビニルポリマー液
1,000mL中
カルボキシビニルポリマー 5g
水 残 量
pHを7.2～7.5に調整して、121℃で30分間高圧滅菌する。

付記13 トリス緩衝食塩液
1,000mL中
トリスヒドロキシメチルアミノメタン 2.42g
塩化ナトリウム 8.77g
水 残 量
pHを7.2～7.4に調整する。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）・豚繁殖・呼吸障害症候群・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）混合ワクチン</u> <u>組換えDNA技術を応用して製造された豚サーコウイルス2型オープンリーディングフレーム2（以下この項において「PCV2ORF2」という。）遺伝子を挿入したバキュロ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、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「PCV2ワクチン」という。）、弱毒豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「PRRSワクチン」という。）及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「Mhpワクチン」という。）を使用時に混合するワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>PCV2ワクチンとMhpワクチンを等量混合したものでPRRSワクチンを溶解したもの（以下この項において「混合ワクチン」という。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 ウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>PRRSワクチン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。</u> <u>1.2.1.2 細胞</u> <u>MA-104細胞又は適当と認められた培養細胞を96穴プレートに培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試料0.1mLずつをそれぞれ6穴以上の培養細胞に接種し、37℃で8日間培養し観察する。</u> <u>1.2.3 判定</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。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.9}～10^{6.7}/TCID₅₀の範囲内でなければならない。

1.3 安全試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

1.3.1.2 試験動物

3～5週齢の豚を用いる。

1.3.2 試験方法

注射材料1頭分ずつを2頭の試験動物の筋肉内に注射し、21日間観察する。

1.3.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。

1.4 力価試験

1.4.1 豚サーコウイルス2型感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 注射材料

混合ワクチンをワクチン希釈液（付記2）で10倍に希釈した後、更に生理食塩液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

1.4.1.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

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

固相化抗原1（付記3）を用いる。

1.4.1.2 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、ELISA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4）をブロッキング液（付記5）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6）の穴に100μLずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37℃で1時間反応させた後、洗浄液（付記7）で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で全濃度に希釈した酵素標識抗体（付記8）を各穴に100μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液（付記9）を各穴に100μLずつ加えて反応させた後、各穴に1mol/L塩酸を100μLずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

1.4.1.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価640倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清1は、抗体価640～1280倍でなければならない。

1.4.2 豚繁殖・呼吸障害症候群力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.3の試験に用いた動物を用いる。

1.4.2.1.2 感染細胞

MA-104細胞を8チャンバースライドに37℃で培養し、単層を形成させたものに豚繁殖・吸障害症候群ウイルスJJ1882株を1チャンバー当たり $10^{3.5}$ TCID₅₀以上接種する。37℃で1～2日間培養した後、生理食塩液及び蒸留水で洗浄し、乾燥する。その後、冷アセトン・エタノール（1：1）液で固定後乾燥させたものを感染細胞とし、8℃以下で密封保存する。

1.4.2.2 試験方法

1.3の試験終了後7日目に得られた各個体の血清について、蛍光抗体法を行う。被検血清を生理食塩液で20倍希釈した後、更に2倍階段希釈する。感染細胞に各希釈液を加え、37℃で60分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、抗豚IgG蛍光標識抗体（付記10）を加え、37℃で60分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、UV励起方式で観察する。

1.4.2.3 判定

特異蛍光が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。
試験動物の抗体価は、40倍以上でなければならない。

1.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 注射材料

混合ワクチンをワクチン希釈液で90倍に希釈した後、更に生理食塩液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

1.4.3.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

1.4.3.1.3 ELISA用抗原

固相化抗原2（付記11）を用いる。

1.4.3.2 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、ELISA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12）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13）の穴に100μLずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、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100μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100μLずつ加えて反応させた後、各穴に1mol/L塩酸を100μLずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

1.4.3.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価320倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清2は、抗体価320～640倍でなければならない。

付記1 ウイルス増殖用培養液
1,000mL中

牛胎子血清
イーグルMEM
炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.0に調整する。
必要最小量の抗生物質を加えてもよい。

20～50mL
残 量

付記2 ワクチン希釈液
0.5w/v%カルボキシビニルポリマー液（付記14）を生理食塩液で5倍に希釈したもの。

付記3 固相化抗原1
適当と認められたクロマトグラフィーによって精製したPCV2ORF2画分。

付記4 参照陽性血清1
試験品で免疫したddy系マウスの血清であって、1.4.1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5 ブロッキング液
洗浄液にスキムミルクを5.0w/v%になるように加えたもの。

付記6 抗原吸着プレート1
固相化抗原1をトリス緩衝食塩液（付記15）で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記7 洗浄液
1,000mL中
ポリソルベート20
トリス緩衝食塩液
pHを7.2～7.4に調整する。

0.5mL
残 量

付記8 酵素標識抗体
ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG（H+L）山羊血清

付記9 基質液
3,3',5,5'-テトラメチルベンチジンを含むペルオキシダーゼ基質液

付記10 抗豚IgG蛍光標識抗体
抗豚IgG血清から γ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもの。

付記11 固相化抗原2
マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、菌体を洗浄した後、超音波処理をして調製した抗原。

付記12	<u>参照陽性血清 2</u> 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、1.4.3の試験により抗体価が320～640倍となるように濃度を調整したもの。凍結して－50℃以下で保存する。
付記13	<u>抗原吸着プレート 2</u> 固相化抗原 2 をトリス緩衝食塩液で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に100 μ L ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100 μ L ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。
付記14	<u>0.5w/v%カルボキシビニルポリマー液</u> 1,000mL カルボキシビニルポリマー 水 pHを7.2～7.5に調整して、121℃で30分間高压滅菌する。 残 量 5g
付記15	<u>トリス緩衝食塩液</u> 1,000mL 中 トリスヒドロキシメチルアミノメタン 塩化ナトリウム 水 pHを7.2～7.4に調整する。 2.42g 8.77g 残 量

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚インフルエンザ・豚パストツレラ症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>豚インフルエンザウイルスを発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を不活化したもの、パストツレラ・ムルトシダ（以下「Pm」という。）の培養上清を濃縮し、遠心して得た上清を不活化したもの及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエ（以下「Mhp」という。）の培養菌液を不活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ワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.1mLずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、10日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>注射反応は、無視し得る程度以下でなければならない。試験動物がすべて生存しなければならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、注射量は0.2mLとし、注射後の体重測定は 6 日目とする。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 豚インフルエンザ力価試験</u> <u>1.4.1.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.4.1.1.2 試験動物</u> <u>5 週齢のマウスを用いる。</u>

1.4.1.1.3 赤血球凝集抗原

試験品に含まれるそれぞれのウイルス株と同一タイプのウイルスで調製した赤血球凝集抗原（付記1）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

試験動物30匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料の0.2mLずつを2週間隔で2回、試験群の脚部筋肉内に注射する。2回目の注射後2週間目に得られた各個体の血清を群ごとに5匹分ずつプールし、試験群として6プール血清を得るとともに、及び対照群として2プール血清を得る。

得られた各プール血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清をRDE及び鶏赤血球で処理する。これをリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈液0.2mLに0.2mL中8単位の赤血球凝集抗原を等量ずつ加え、室温で60分間処理する。これに0.5vol%鶏赤血球浮遊液を0.4mLずつ加え、室温に60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.1.3 判定

赤血球の凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、6プール血清中4プール血清以上が8倍以上でなければならない。この場合、対照群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、4倍未満でなければならない。

1.4.2 豚バスタツレラ症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

1.4.2.1.2 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

Pm皮膚壊死毒素（以下「PMT」という。）抗原（付記2）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

1.4.1.2の試験で得られた各プール血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、PMT参照陽性血清（付記3）及びPMT参照陰性血清（付記4）を希釈・洗浄液（付記5）で4倍希釈したものを2倍階段希釈し、各段階の希釈液をPMT抗原吸着プレート（付記6）の各ウェルに100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体（付記7）を各ウェルに100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液（付記8）を各ウェルに100 μ Lずつ加え、遮光して30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。停止液（付記9）を各ウェルに50 μ Lずつ加え、反応を停止させる。主波長492nm、副波長630nmの2波長で吸光度を測定し、これらの差をELISA値とする。

1.4.2.3 判定

ELISA値が0.5以上を示す血清の最高希釈倍数を抗PMT抗体価とする。

試験群のプール血清の抗PMT抗体価は、6プール血清中4プール血清以上がPMT参照陽性血清の示す抗PMT抗体価以上でなければならない。この場合、対照群のプール血清の抗PMT抗体価は、4倍未満でなければならない。また、PMT参照陽性血清の抗PMT抗体価は、8～32倍を示さなければならず、PMT参照陰性血清の抗PMT抗体価は、4倍未満でなければならない。

1.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

1.4.3.1.2 ELISA用抗原

Mhp-ELISA抗原（付記10）を用いる。

1.4.3.2 試験方法

1.4.1.2の試験で得られた各プール血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各プール血清、Mhp参照陽性血清（付記11）及びMhp参照陰性血清（付記12）を希釈・洗浄液で100倍希釈したものを、Mhp-ELISA抗原吸着プレート（付記13）のそれぞれ6ウェルに100 μ Lずつ加え、37℃で1時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体を各ウェルに100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液を各ウェルに100 μ Lずつ加え、遮光して30℃で30分間反応させる。停止液を各ウェルに50 μ Lずつ加えて反応を停止させる。主波長492nm、副波長630nm 2波長で吸光度を測定し、これらの差をELISA値とする。

1.4.3.3 判定

それぞれ6穴のELISA値の平均を抗Mhp抗体価とする。

試験群のプール血清の抗Mhp抗体価は、6プール血清中4プール血清がMhp参照陽性血清の示す抗Mhp抗体価以上の値を示さなければならない。この場合、対照群のプール血清の抗Mhp抗体価は、0.15未満でなければならない。また、Mhp参照陽性血清の抗Mhp抗体価は、0.45以上を示さなければならず、Mhp参照陰性血清の抗Mhp抗体価は、0.15未満でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 注射材料

不活化した2種類の豚インフルエンザウイルスの混合液を注射材料とする。

2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の10～12日齢のものを用いる。

2.1.2 試験方法

注射材料0.2mLずつを4個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、36～37℃で培養し、3日間隔で尿膜腔液を2代まで継代する。2代目の尿膜腔液に0.5vol%の鶏の赤血球浮遊液を等量加え、室温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

ただし、赤血球凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量に混合して3代まで継代し、3代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後、判定する。

2.1.3 判定

赤血球凝集を認めない場合には、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。

付記1 赤血球凝集抗原

豚インフルエンザウイルスA型A/swine/京都/3/79（H1N1）株及び豚インフルエンザウイルスA型A/swine/和田山/5/69（H3N2）株を用いて、それぞれ調製した赤血球凝集抗原

付記2 PMT抗原

パスツレラ・ムルトシダB-45株の培養上清を限外ろ過により濃縮した後、
ハイドロキシアパタイトカラムで分画し、ホルマリンで不活化し、得られた
皮膚壊死毒素活性を持つ抗原であって、B-45株培養上清免疫モルモットの血
清を用いてウェスタンブロッティングを行う場合に、150kDa付近に単一な
バンドを認め、そのたん白量を測定するとき、30～100 μ g/mLを示すもの

付記3 PMT参照陽性血清
PmB-45株の培養上清濃縮液をマウスに免疫して得られた血清であって、
抗PMT抗体価8～32倍を示すものであり、凍結保存する。

付記4 PMT参照陰性血清
健康なマウスから採血した血清であって、抗PMT抗体価4倍未満を示す
ものであり、凍結保存する。

付記5 希釈・洗浄液
1,000mL中
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9g
リン酸二水素カリウム 0.2g
塩化ナトリウム 8.0g
塩化カリウム 0.2g
ポリソルベート20 0.5mL
水 残量
pHを7.2～7.4に調整する。

付記6 PMT抗原吸着プレート
PMT抗原を炭酸緩衝液（付記14）でたん白濃度0.005～0.01mg/mLに希釈
し、ELISA用プレート（U字型）の各ウェルに100 μ Lずつ加え、4℃で18時
間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2w/v%牛血清アルブミン溶液
（付記15）を各ウェルに250 μ Lずつ加え、37℃で1時間感作させた後、希
釈・洗浄液で洗浄したもの

付記7 標識抗体
西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を希釈・洗浄液で希釈
したもの

付記8 基質液
o-フェニレンジアミン二塩酸塩40mgをリン酸クエン酸緩衝液（付記16）
100mLに溶解し、遮光したものに、使用直前に過酸化水素水を0.04mL添加
したもの

付記9 停止液
濃硫酸56.1mLを正確に量り、精製水440mL中に攪拌冷却しながら溶解し、
更に水を加えて500mLとしたもの

付記10 Mhp-ELISA抗原

MhpM-21株の振とう培養菌液を遠心集菌し、TNF液（付記17）で菌体を洗淨した後、洗淨菌体をたん白濃度が10mg/mLとなるように調整したもの

付記11 Mhp参照陽性血清
MhpM-21株の不活化全菌体をマウスに免疫して得られた血清であって、抗Mhp抗体価0.45以上を示すものであり、凍結保存する。

付記12 Mhp参照陰性血清
健康なマウスから採血した血清であって、抗Mhp抗体価0.15未満を示すものであり、凍結保存する

付記13 Mhp-ELISA抗原吸着プレート
Mhp-ELISA抗原を炭酸緩衝液で蛋白濃度が0.05～0.1mg/mLとなるように希釈し、ELISA用プレート（U字型）の各ウェルに100μLずつ加え、4℃で18時間以上感作させた後、希釈・洗淨液で洗淨し、2w/v%牛血清アルブミン溶液を各ウェルに250μLずつ加え、37℃で1時間感作させた後、希釈・洗淨液で洗淨したもの

付記14 炭酸緩衝液
1,000mL中
炭酸ナトリウム 1.59g
炭酸水素ナトリウム 2.93g
水 残 量
pHを9.6に調整し、4℃に保存する。

付記15 2w/v%牛血清アルブミン溶液
牛血清アルブミン2gを希釈・洗淨液100mLで使用直前に溶解したもの

付記16 リン酸クエン酸緩衝液
1,000mL中
無水クエン酸 4.67g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95g
水 残 量
pHを5.0に調整する。

付記17 TNF液
1,000mL中
塩化ナトリウム 14.6g
エデト酸ナトリウム 3.72g
トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.94g
水 残 量

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>豚パルボウイルス感染症・豚丹毒・豚レプトスピラ病（イクテロヘモラジー・カニコーラ・グリッポチフォーサ・ハージョ・ブラティスラーバ・ポモナ）混合（アジュバント・油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>豚パルボ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たものにアルミニウムゲルアジュバントを添加したもの、豚丹毒菌の培養菌液を不活化し、その遠心上清を濃縮したものにアルミニウムゲルアジュバントを添加したもの並びにレプトスピラ・インテロガンس血清型イクテロヘモラジー（以下この項において「レプトスピラ・イクテロヘモラジー」という。）、レプトスピラ・インテロガンス血清型カニコーラ（以下この項において「レプトスピラ・カニコーラ」という。）、レプトスピラ・インテロガンス血清型グリッポチフォーサ（以下この項において「レプトスピラ・グリッポチフォーサ」という。）、レプトスピラ・インテロガンス血清型ハージョ（以下この項において「レプトスピラ・ハージョ」という。）、レプトスピラ・インテロガンス血清型ブラティスラーバ（以下この項において「レプトスピラ・ブラティスラーバ」という。）及びレプトスピラ・インテロガンス血清型ポモナ（以下この項において「レプトスピラ・ポモナ」という。）の培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 豚パルボウイルス不活化試験</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 試料</u> <u>試験品を2,000Gで10分間遠心し、その上清を－70℃で一夜凍結する。これを溶解した後、11,000Gで、又は用法・用量として1回2 mL注射の試験品（以下「2 mL試験品」という。）では44,300Gで60分間遠心し、その後、水相5 mL、又は2 mL試験品では2 mLを採取し、100倍以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。</u> <u>1.2.1.1.2 培養細胞</u>

NLST-1細胞を培養びんに培養し、単層となったものを用いる。

1.2.1.2 試験方法

試料の全量を175cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、リン酸緩衝食塩液で3回洗浄した後、ウイルス増殖用培養液（付記1）を加え、37℃で10日間培養し、観察する。

観察最終日の培養上清を96穴丸底マイクロプレートの4穴以上に50μLずつ採取し、これに等量のリン酸緩衝食塩液を加え、この混合液にリン酸緩衝食塩液で調整した0.5vol%の鶏又はモルモット赤血球浮遊液を50μLずつ加え、室温で60分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

1.2.1.3 判定

赤血球の凝集を認めない場合には、活性ウイルス陰性と判定する。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

1.2.2 レプトスピラ不活化試験

1.2.2.1 試験動物

1.4.3の試験に用いた動物を用いる。

1.2.2.2 試験方法

1.4.3の試験期間中観察する。

1.2.2.3 判定

観察期間中、いずれの試験動物にも発熱、黄疸、結膜充血、著しい体重減少その他の異常を認めてはならない。

1.3 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法2により試験を行い、これに適合しなければならぬ。ただし、試験品の注射量は4mLとし、体重測定は5日目に行う。2mL試験品では、毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならぬ。ただし、体重測定は4日目に行う。

1.4 力価試験

1.4.1 豚バルボウイルス感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

試験品25mLを水酸化ナトリウムでpHを11.0～11.2に調整した後、740Gで20分間遠心し、その上清を試料とし、参照不活化抗原（付記2）を同様に処理したものを対照とする。

1.4.1.2 試験方法

試料、陽性対照及び陰性対照を96穴丸底マイクロプレートを用いてリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各段階の希釈液50μLに力価試験用赤血球浮遊液（付記3）を等量加え、4℃で一夜反応させた後、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた最高希釈倍数を赤血球凝集価とする。

試料の赤血球凝集価は、128倍又は2mL試験品では320倍以上でなければならず、対照の赤血球凝集価は、128倍でなければならない。

1.4.2 豚丹毒力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

5週齢（2mL試験品にあつては、4週齢）のマウスを用いる。

1.4.2.1.3 攻撃用菌液

凍結乾燥した豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記4）に接種し、37℃で14～20時間培養する。これを普通ブイヨンで 10^8 CFU/mLの菌量となるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

1.4.2.2 試験方法

試験動物10匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.5mLずつを2週間隔で2回、試験群の内股部皮下に注射する。2回目の注射をした後2週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、7日間観察する。

2mL試験品では注射材料0.5mLずつを1回、試験群の内股部皮下に注射する。注射後10日目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、7日間観察する。

1.4.2.3 判定

試験群では、70%以上が耐過生存しなければならず、2mL試験品では80%以上が耐過生存しなければならない。対照群では、いずれも、90%以上が死亡しなければならない。

1.4.3 豚レプトスピラ病力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 注射材料

試験品及び試験品をリン酸緩衝食塩液で10倍希釈したものを注射材料とする。

2mL試験品では、試験品を5 vol% レシチン加軽質流動パラフィン（付記5）で2.5倍希釈したもの及びこれを更にリン酸緩衝食塩液で10倍希釈したものを注射材料とする。

1.4.3.1.2 試験動物

体重60～100gのハムスター及び体重約300gのモルモットを用いる。

1.4.3.1.3 凝集反応用菌液

レプトスピラ凝集反応用菌液（付記6）を用いる。

1.4.3.1.4 参照陽性血清

抗レプトスピラ・イクテロヘモラジー参照陽性血清（付記7）、抗レプトスピラ・カニコラ参照陽性血清（付記8）、抗レプトスピラ・グリッポチフォーサ参照陽性血清（付記9）、抗レプトスピラ・ハージョ参照陽性血清（付記10）、抗レプトスピラ・ブラディスラーバ参照陽性血清（付記11）及び抗レプトスピラ・ボモナ参照陽性血清（付記12）を用いる。

1.4.3.1.5 参照陰性血清

ハムスター参照陰性血清（付記13）及びモルモット参照陰性血清（付記14）を用いる。

1.4.3.2 試験方法

試験品1mLずつを10匹のハムスターの内股部皮下に、試験品をリン酸緩衝食塩液で10倍に希釈したもの1mLずつを10匹のモルモットの頸部皮下にそれぞれ7日間隔で2回注射する。2mL試験品では、試験品を5 vol% レシチン加軽質流動パラフィンで2.5倍希釈したもの1mLずつを10匹のハムスターの内股部皮下に、試験品を5 vol% レシチン加軽質流動パラフィンで2.5倍希釈し、さらにリン酸緩衝食塩液で10倍に希釈したもの1mLずつを10匹のモルモットの頸部皮下にそれぞれ7日間隔で2回注射する。2回目の注射をした後14日目に得られたハムスターの各個体の血清について、レプトスピラ・イクテロヘモラジーに対する凝集価を、モ

ルモットの各個体の血清について、レプトスピラ・カニコラ、レプトスピラ・グリッポチフォーサ、レプトスピラ・ハージョ、レプトスピラ・ブラティスラーバ及びレプトスピラ・ボモナに対する凝集価を、それぞれ各レプトスピラ凝集反応用菌液を用いて、マイクロプレート生菌凝集反応により測定する。

被検血清、参照陽性血清及び参照陰性血清を56℃で30分間処理する。これを96穴平底マイクロプレートを用いて、豚レプトスピラ病力価試験用EMJH基礎培地（付記15）で2倍階段希釈し、各段階の希釈液50μLに凝集反応用菌液を等量ずつ加え、30℃で2～4時間処理する。

1.4.3.3 判定

プレートの各穴を暗視野顕微鏡で観察し、菌の凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集価とする。凝集価が、レプトスピラ・イクテロヘモラジーの場合は8倍以上、レプトスピラ・カニコラの場合は16倍以上、レプトスピラ・グリッポチフォーサの場合は64倍以上、レプトスピラ・ハージョの場合は32倍以上、レプトスピラ・ブラティスラーバの場合は128倍以上、レプトスピラ・ボモナの場合は16倍以上のとき、凝集抗体陽性とする。ただし、2mL試験品では、レプトスピラ・イクテロヘモラジーに対する凝集価は、16倍以上のとき、凝集抗体陽性とする。

試験動物の各血清型に対する凝集抗体陽性率は、いずれも70%以上でなければならない。

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	2.95g
牛胎子血清	20mL
イーグルMEM	残量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6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 参照不活化抗原

豚バルボウイルスNADL-7株又は適当と認められた株を用いて調製した不活化抗原で、力価試験用赤血球浮遊液を用いた赤血球凝集反応において、赤血球凝集価128倍を示すように調整したもの。小分けして－70℃以下で保存する。

付記3 力価試験用赤血球浮遊液

非凝集性のモルモット赤血球を用いて、以下のとおり調製したもの

(1) 2 vol%赤血球浮遊液の調製
リン酸緩衝食塩液で3回遠心洗浄した後、沈渣をリン酸緩衝食塩液に再浮遊させ、2 vol%赤血球浮遊液を25mL調製する。

(2) 2 vol%赤血球浮遊液の標準化
2 vol%赤血球浮遊液を赤血球溶解緩衝液（付記16）で5倍希釈したものについて、波長540nmにおける吸光度を測定し、0.98～1.02となるように下表のとおりに調整したものを標準2 vol%赤血球浮遊液とする。

吸光度	調整方法
0.98～1.02	調整不要

>1.02	25×吸光度－25
	上記で算出された量のリン酸緩衝食塩液（mL）を加える。
<0.98	$(2.0/\text{吸光度}-2.0) \times 1.2$
	上記で算出された量の赤血球（mL）を加える。
	又は、
	25×吸光度－25
	上記で算出された量のリン酸緩衝食塩液（mL）を再遠心により除去する。

(3) 力価試験用赤血球浮遊液の調製

40mLの牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液（付記17）に、標準2 vol%赤血球浮遊液を10mL加え、0.4vol%としたものを力価試験用赤血球浮遊液とする。

付記 4	攻撃菌用培地
	1,000mL中
	トリプトース・ホスフェイト・ブロス
	30g
	プロテオーゼペプトン
	10g
	ポリソルベート80
	1 mL
	水
	残 量
	pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高压滅菌する。

付記 5	5 vol%レシチン加軽質流動パラフィン
	1,000mL中
	レシチン加軽質流動パラフィン
	50mL
	リン酸緩衝食塩液
	950mL
	混合した後、ろ過滅菌する。

付記 6	レプトスピラ凝集反応用菌液
	レプトスピラ・イクテロヘモラジ－NADL11403株凍結保存菌液（付記18）、
	レプトスピラ・カニコラC-51株凍結保存菌液（付記19）、レプトスピラ・グ
	リッボチフォーサMAL1540株凍結保存菌液（付記20）、レプトスピラ・ハー
	ジョ WHO株凍結保存菌液（付記21）、レプトスピラ・ブラティスラーバJEZ
	株凍結保存菌液（付記22）及びレプトスピラ・ボモナT262株凍結保存菌液（付
	記23）からそれぞれ調製したものを新鮮生菌浮遊液とする。
	凍結保存菌液を速やかに融解し、豚レプトスピラ病力価試験用EMJH培地
	（付記24）に接種し、30℃、40回転/分で4～8日間振とう培養する。当該
	培養後、265Gで10分間遠心した上清を採取し、波長600nmで透過率を測定
	する。豚レプトスピラ病力価試験用EMJH基礎培地で透過率87～88T%（約
	2×10^8 個/mL）に調整したものを生菌浮遊液とする。
	各凍結保存菌液（付記18～23）は、いずれも病原性レプトスピラであるレ
	プトスピラ・インテロガンズに分類される菌株の浮遊液であり、試験者の安
	全性を確保し、また、環境への漏出を防止するため、取扱いには注意するこ
	と。

付記 7	抗レプトスピラ・イクテロヘモラジ－参照陽性血清
------	-------------------------

レプトスピラ・イクテロヘモラジーNADL11403株をハムスターに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・イクテロヘモラジーNADL11403株に対して凝集価16倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記8 抗レプトスピラ・カニコラ参照陽性血清
レプトスピラ・カニコラC-51株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・カニコラC-51株に対して凝集価16倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記9 抗レプトスピラ・グリッポチフォーサ参照陽性血清
レプトスピラ・グリッポチフォーサMAL1540株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・グリッポチフォーサMAL1540株に対して凝集価32～64倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記10 抗レプトスピラ・ハージョ参照陽性血清
レプトスピラ・ハージョWHO株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・ハージョWHO株に対して凝集価16～32倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記11 抗レプトスピラ・ブラティスラーバ参照陽性血清
レプトスピラ・ブラティスラーバJEZ株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・ブラティスラーバJEZ株に対して凝集価64～128倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記12 抗レプトスピラ・ポモナ参照陽性血清
レプトスピラ・ポモナT262株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・ポモナT262株に対して凝集価16倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記13 ハムスター参照陰性血清
非免疫のハムスター血清で、レプトスピラ・イクテロヘモラジーに対して抗体陰性のものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記14 モルモット参照陰性血清
非免疫のモルモット血清で、レプトスピラ・カニコラ、レプトスピラ・グリッポチフォーサ、レプトスピラ・ハージョ、レプトスピラ・ブラティスラーバ及びレプトスピラ・ポモナのいずれに対しても抗体陰性のものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記15 豚レプトスピラ病力価試験用EMJH基礎培地
900mL中
レプトスピラ・メディウムベースEMJH
水
2.3g
900mL

pHを7.5±0.2に調整した後、121℃で15分間高压滅菌する。

付記16 赤血球溶解緩衝液

100mL中

NP-40

水

1.25g
残 量

NP-40を徐々に添加し、溶解する。

付記17 牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液

40mL中

牛胎子血清

1.5mL

リン酸緩衝食塩液

38.5mL

牛胎子血清は、モルモットの赤血球を凝集しないことを確認したものを
用いる。

付記18 レプトスピラ・イクテロヘモラジ－NADL11403株凍結保存菌液

レプトスピラ・イクテロヘモラジ－NADL11403株を豚レプトスピラ病力価
試験用EMJH培地で培養した培養菌液に、グリセリンを10vol%加えたもので
あり、1 mLずつ小分けして-70℃以下で保存する。

付記19 レプトスピラ・カニコーラC-51株凍結保存菌液

レプトスピラ・カニコーラC-51株を豚レプトスピラ病力価試験用EMJH培
地で培養した培養菌液に、グリセリンを10vol%加えたものであり、1 mLず
つ小分けして-70℃以下で保存する。

付記20 レプトスピラ・グリッポチフォーサMAL1540株凍結保存菌液

レプトスピラ・グリッポチフォーサMAL1540株を豚レプトスピラ病力価試
験用EMJH培地で培養した培養菌液に、グリセリンを10vol%加えたものであ
り、1 mLずつ小分けして-70℃以下で保存する。

付記21 レプトスピラ・ハージョWHO株凍結保存菌液

レプトスピラ・ハージョWHO株を豚レプトスピラ病力価試験用EMJH培地
で培養した培養菌液に、グリセリンを10vol%加えたものであり、1 mLず
つ小分けして-70℃以下で保存する。

付記22 レプトスピラ・ブラティスラーバJEZ株凍結保存菌液

レプトスピラ・ブラティスラーバJEZ株を豚レプトスピラ病力価試験用
EMJH培地で培養した培養菌液に、グリセリンを10vol%加えたものであり、
1 mLずつ小分けして-70℃以下で保存する。

付記23 レプトスピラ・ボモナT262株凍結保存菌液

レプトスピラ・ボモナT262株を豚レプトスピラ病力価試験用EMJH培地で
培養した培養菌液に、グリセリンを10vol%加えたものであり、1 mLず
つ小分けして-70℃以下で保存する。

付記24	豚レプトスピラ病力価試験用EMJH培地	
	<u>1,000mL中</u>	
	豚レプトスピラ病力価試験用EMJH基礎培地	<u>900mL</u>
	アルブミン添加溶液（付記25）	<u>100mL</u>
	無菌的に混合する。	
付記25	アルブミン添加溶液	
	<u>1,000 mL中</u>	
	アルブミン溶液（付記26）	<u>667mL</u>
	硫酸鉄溶液（付記27）	<u>100mL</u>
	塩化カルシウム-塩化マグネシウム溶液（付記28）	<u>10mL</u>
	ビタミンB12溶液（付記29）	<u>10mL</u>
	ポリソルベート80溶液（付記30）	<u>62.5mL</u>
	硫酸亜鉛溶液（付記31）	<u>10mL</u>
	チアミン溶液（付記32）	<u>5mL</u>
	各溶液を混合した後、水を加えて1,000mLとし、ろ過滅菌する。	
付記26	アルブミン溶液	
	半アルブミン分画V	<u>100g</u>
	水	<u>667mL</u>
	4℃で攪拌し、完全に溶解する。	
付記27	硫酸鉄溶液	
	硫酸鉄七水和物	<u>5g</u>
	水	<u>1,000mL</u>
付記28	塩化カルシウム-塩化マグネシウム溶液	
	塩化カルシウム二水和物	<u>20g</u>
	塩化マグネシウム六水和物	<u>20g</u>
	水	<u>1,000mL</u>
付記29	ビタミンB12溶液	
	ビタミンB12（シアノコバラミン）	<u>0.2g</u>
	水	<u>1,000mL</u>
付記30	ポリソルベート80溶液	
	ポリソルベート80	<u>200mL</u>
	水	<u>800mL</u>
付記31	硫酸亜鉛溶液	
	硫酸亜鉛七水和物	<u>4g</u>
	水	<u>1,000mL</u>
付記32	チアミン溶液	
	塩酸チアミン	<u>10g</u>

水

1,000mL

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏痘生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏痘生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6及び3.3.10に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>産卵低下症候群—1976(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の産卵低下症候群—1976不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>産卵低下症候群—1976（油性アジュバント加） 不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の産卵低下症候群—1976（油性アジュバント加）不活化ワクチンの 3.6.2、3.6.5及び3.6.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うもの とする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>トリニューモウイルス感染症生ワクチン</u> <u>動生剤基準のトリニューモウイルス感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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</u> <u>動生剤基準のトリニューモウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.3及び3.5.4に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>トリレオウイルス感染症生ワクチン</u> <u>動生剤基準のトリレオウイルス感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>トリレオウイルス感染症(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のトリレオウイルス感染症(アジュバント加)不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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</u> <u>動生剤基準の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 の3.5.2、3.5.4及び3.5.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うも のとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性気管支炎生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性気管支炎生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性気管支炎(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性気管支炎（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性喉頭気管炎生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性喉頭気管炎生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.8、3.3.9及び3.3.10に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性喉頭気管炎凍結生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性喉頭気管炎凍結生ワクチンの3.3.2、3.3.3、3.3.4（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.5、3.3.6及び3.3.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン(大ひな用)</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン(大ひな用)の3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン（ひな用）</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン（ひな用）の3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.8及び3.3.10に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン(ひな用中等毒)</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン(ひな用中等毒)の3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性ファブリキウス嚢病（抗血清加）生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性ファブリキウス嚢病（抗血清加）生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性ファブリキウス嚢病(アジュバント加)不 活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性ファブリキウス嚢病（アジュバント加）不活化ワクチン の3.5.3、3.5.7及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うも のとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏脳脊髄炎生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏脳脊髄炎生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏貧血ウイルス感染症生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏貧血ウイルス感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マレック病(七面鳥ヘルペスウイルス)生ワクチン</u> <u>動生剤基準のマレック病（七面鳥ヘルペスウイルス）生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2、2.2.2.1、2.2.2.2及び2.2.2.3を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マレック病(マレック病ウイルス1型)凍結生ワクチン</u> <u>動生剤基準のマレック病（マレック病ウイルス1型）凍結生ワクチンの3.3.2、3.3.3、3.3.4（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2、2.2.2.1、2.2.2.2及び2.2.2.3を除く。）、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マレック病（マレック病ウイルス 1 型・七面鳥ヘルペスウイルス）凍結生ワクチン</u> <u>動生剤基準のマレック病（マレック病ウイルス 1 型・七面鳥ヘルペスウイルス）凍結生ワクチンの3.3.2、3.3.3、3.3.4（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2、2.2.2.1、2.2.2.2及び2.2.2.3を除く。）、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マレック病(マレック病ウイルス2型・七面鳥ヘルペスウイルス)凍結生ワクチン</u> <u>動生剤基準のマレック病2価（マレック病ウイルス2型・七面鳥ヘルペスウイルス）凍結生ワクチンの3.3.2、3.3.3、3.3.4（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2、2.2.2.1、2.2.2.2及び2.2.2.3を除く。）、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏脳脊髄炎・鶏痘混合生ワクチン</u> <u>鶏脳脊髄炎ウイルス及び弱毒鶏痘ウイルスをそれぞれ発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 マイコプラズマ否定試験</u> <u>一般試験法のマイコプラズマ否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 鶏脳脊髄炎ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試料</u> <u>試験品をリン酸緩衝食塩液で、0.1mL当たり 1 羽分となるように溶解した後、10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.3.1.2 発育鶏卵</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1の 4 ～ 6 日齢のものを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試料0.1mLをそれぞれ10個以上の発育鶏卵の卵黄嚢内に注射して培養し、ふ化させる。ふ化した鶏について、運動失調、ふるえ等の症状の有無を 3 日間観察する。発症した鶏を感染とみなし、EID₅₀を算出する。</u> <u>症状の疑わしい鶏がいる場合には、中枢神経の病理組織検査によって感染の有無を判定する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>試験品のウイルス含有量は、1 羽分当たり 10^{2.5}EID₅₀以上でなければならない。</u> <u>1.4 安全及び発痘試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 接種材料</u> <u>試験品を溶解用液（付記 1）を用いて0.01mL当たり10羽分となるように溶解したものを接種材料とする。</u> <u>1.4.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の 8 週齢の鶏を用いる。</u> <u>1.4.1.3 試験方法</u> <u>試験動物10羽を試験群とし、5 羽を対照群とする。</u> <u>接種材料0.01mLずつを試験群の翼膜に穿刺接種し、対照群とともに 3 週間観察</u>

する。試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

1.4.1.4 判定

観察期間中、痘疱の転移や重度の痂皮の形成を認めてはならない。

対照群においては、試験動物に臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、試験動物に発痘以外の臨床的な異常を認めてはならない。

試験群は、接種後5～7日で善感発痘し、痘疱は21日以内に完全に消退しなければならない。

1.5 鶏脳脊髄炎力価試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 接種材料

試験品を溶解用液で溶解したものを接種材料とする。

1.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の8週齢の鶏を用いる。

1.5.1.3 沈降反応抗原

鶏脳脊髄炎ウイルス沈降反応抗原（付記2）を用いる。

1.5.2 試験方法

試験動物10羽に接種材料1羽分ずつをそれぞれ翼膜に穿刺接種し、4週間後に得られた各個体の血清について沈降反応を行う。また、非接種鶏3羽を対照群とし、接種群と隔離して飼育し、4週間後に得られた各個体の血清について沈降反応を行う。

4単位の沈降反応抗原を寒天ゲル（付記3）の中心の穴に、被験血清、4単位の参照陽性血清（付記4）及び参照陰性血清（付記5）を周囲の穴に分注した後、乾燥を防ぎながら室温で48～72時間反応させ、沈降線の有無を観察する。

1.5.3 判定

抗原と各血清との間に特異的沈降線を認めたものを陽性とし、認めないものを陰性とする。

試験群の血清の80%以上が陽性でなければならず、対照群の血清は全て陰性でなければならない。

付記1

溶解用液

1,000mL中

白糖

2.6g

リン酸二水素カリウム

0.676g

リン酸二水素ナトリウム二水和物

1.664g

塩化ナトリウム

7.397g

水

残量

付記2

鶏脳脊髄炎ウイルス沈降反応抗原

鶏脳脊髄炎ウイルス鶏胚馴化VanRoekel株に感染した鶏胚脳乳剤を精製濃縮したもの。

付記3

寒天ゲル

寒天及び塩化ナトリウムをそれぞれ0.9～1.0w/v%及び12～15w/v%となるようにリン酸緩衝食塩液又はペロナル緩衝食塩液に溶かした後、適当と認められた防腐剤を加える。スライドガラス(26×76mm)にこれを5mL注ぎ、

固める。固まった後、寒天スライドに直径 3 mm の穴を中心に、その周囲に相互に 3 mm の間隔で 6 個の穴をあける。

付記 4 参照陽性血清
生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を鶏脳脊髄炎ウイルスで免疫して得た血清

付記 5 参照陰性血清
生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マレック病（マレック病ウイルス 2 型・七面鳥ヘルペスウイルス）・鶏痘混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準のマレック病（マレック病ウイルス 2 型・七面鳥ヘルペスウイルス）・鶏痘混合生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2、2.2.2.1、2.2.2.2及び2.2.2.3を除く。）、3.3.8.1、3.3.9及び3.3.11に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏オルニソバクテリウム・ライノトラケアレ 感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチ ン</u> <u>オルニソバクテリウム・ライノトラケアレの培養菌液を不活化し、油性アジュバ ントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の 4 週齢の鶏を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物の10羽を試験群、 5 羽を対照群とする。</u> <u>注射材料 2 羽分ずつを、試験群の胸部筋肉内に注射する。対照群とともに 3 週 間観察を行い、観察終了時に注射部位を剖検する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。また、剖 検したとき、注射局所に著しい異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の 4 週齢の鶏を用いる。</u> <u>1.3.1.3 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原</u> <u>ELISA用抗原（付記 1）を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物の10羽を試験群、 5 羽を対照群とする。</u> <u>注射材料 1 羽分ずつを、試験群の胸部筋肉内に注射する。注射後 3 週目に試験</u>

群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。
2枚の抗原吸着プレート（付記2）の11列目を除くすべての列の穴に血清希釈液（付記3）を100 μ L加える。一方の抗原吸着プレートの1～10列のA行の穴に、あらかじめ血清希釈液で32倍に希釈した試験群の各個体の血清を100 μ Lずつ加え、A行からH行にかけて2倍階段希釈する。
もう一方の抗原吸着プレートの1～5列のA行の穴に、あらかじめ血清希釈液で32倍に希釈した対照群の各個体の血清を100 μ Lずつ加え、A行からH行にかけて2倍階段希釈する。両プレートの12列のA行目の穴にあらかじめ血清希釈液で3,200倍に希釈した参照陽性血清（付記4）を100 μ L加え、A行からH行まで2倍階段希釈する。また、11列目の各穴に血清希釈液であらかじめ64倍に希釈した参照陰性血清（付記5）を100 μ L加える。両プレートを37℃で1時間反応後、洗浄用緩衝液（付記6）で7回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記7）を100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、洗浄用緩衝液で7回洗浄する。各穴に基質液（付記8）を100 μ Lずつ加え、遮光して室温で15分間反応させる。さらに、すべての穴に2 mol/L硫酸を50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

1.3.3 判定

参照陰性血清の吸光度の平均値に1.5を乗じた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の抗体価の幾何平均値は $2^{10.6}$ 以上でなければならない、対照群の抗体価の幾何平均値は $2^{7.0}$ 以下でなければならない。ただし、試験成立条件として、1）参照陰性血清の吸光度の平均値が0.3以下であること、2）参照陽性血清の抗体価が $2^{17\sim19}$ であることを満たしていなければならない。

付記1 ELISA用抗原

20倍希釈したときの波長OD660nmでの吸光度値が、0.15～0.3となるように調整したオルニソバクテリウム・ライノトラケアレB3263/91株の菌液を100℃で1時間煮沸した後、遠心上清をろ過滅菌したもの

付記2 抗原吸着プレート

ELISA用抗原を固相化用緩衝液（付記9）で参照陽性血清及び参照陰性血清が規格値を示すように希釈した後、100 μ Lをプレートの全穴に分注し、37℃で約16時間反応させる。その後、液を捨て、各穴にブロッキング緩衝液（付記10）を0.2mLずつ加え、37℃で20分間反応させた後、洗浄用緩衝液で7回洗浄したもの

付記3 血清希釈液

1,000mL中	
リン酸水素二ナトリウム2水和物	35.58g
塩化ナトリウム	11.69g
ポリソルベート80	0.5g
牛血清アルブミン	1g
精製水	残 量
pH7.0に調整後、ろ過滅菌する。	

付記 4	<u>参照陽性血清</u> <u>オルニソバクテリウム・ライノトラケアレ抗体陰性鶏をオルニソバクテリウム・ライノトラケアレB3263/91株又はこれと同等な免疫原性を有する株で免疫して得た血清であって、ELISAにより抗体価を測定するとき、抗体価は$2^{17.0\sim 19.0}$であるもの</u>
付記 5	<u>参照陰性血清</u> <u>オルニソバクテリウム・ライノトラケアレ抗体陰性鶏から得た血清であって、ELISAを行うとき、平均吸光度値は0.3以下であるもの</u>
付記 6	<u>洗浄用緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>リン酸水素二ナトリウム二水和物</u> 1.15g <u>リン酸二水素カリウム無水</u> 0.2g <u>塩化カリウム</u> 0.2g <u>塩化ナトリウム</u> 37.2g <u>ポリソルベートン20</u> 1.5g <u>精製水</u> 残 量 <u>pH7.2に調整後、ろ過滅菌する。</u>
付記 7	<u>標識抗体</u> <u>ベルオキシダーゼ標識抗鶏IgG抗体を血清希釈液で希釈したものであって、参照陽性血清の抗体価が$2^{17\sim 19}$となるように調整したもの</u>
付記 8	<u>基質液</u> <u>UP緩衝液（付記11）を1.5、0.6w/v%TMB溶液（付記12）を0.2及び水を15の割合で混合したもの</u>
付記 9	<u>固相化用緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>炭酸ナトリウム</u> 1.59g <u>炭酸水素ナトリウム</u> 2.93g <u>精製水</u> 残 量 <u>pH9.6に調整後、ろ過滅菌する。</u>
付記10	<u>ブロッキング緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u> 1.43g <u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u> 12.09g <u>塩化ナトリウム</u> 8.5g <u>牛血清アルブミン</u> 10g <u>精製水</u> 残 量 <u>pH7.2に調整後、ろ過滅菌する。</u>
付記11	<u>UP緩衝液</u>

尿素過酸化水素140mgを、TMB基質液（付記13）100mLに溶解したもの

付記12 0.6w/v%TMB溶液
テトラメチルベンジジン（TMB） 6 gをジメチルスルホキシド1,000mL
で溶解し、窒素で飽和状態にしたもの

付記13 TMB基質液
酢酸ナトリウム三水和物13.6gを80mLの水に溶解し、1.5mol/Lクエン酸一
水和物でpH5.5に調整し、水を加えて100mLとした後、ろ過滅菌したもの

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティ ディス）（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）（アジュバン ト加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.6及び3.4.7に規定するところにより、これらに規 定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティ デス）（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティデイス）（油性アジュ バント加）不活化ワクチンの3.3.2、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これら に規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティ デイス・サルモネラ・ティフィムリウム）（ア ジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティデイス・サルモネラ・テ ィフィムリウム）（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.3、3.3.6及び3.3.7に規定 するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティ デイス・サルモネラ・ティフィムリウム）（油 性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティデイス・サルモネラ・ ティフィムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2、3.4.4及び3.4.5 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏サルモネラ症（サルモネラ・インファンティス・サルモネラ・エンテリティディス・サルモネラ・ティフィムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>サルモネラ・インファンティス（以下この項において「SI」という。）、サルモネラ・エンテリティディス（以下この項において「SE」という。）及びサルモネラ・ティフィムリウム（以下この項において「ST」という。）のそれぞれの培養菌液を不活化し、濃縮したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5～7週齢の鶏を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。</u> <u>注射材料1羽分ずつを試験群の頸背部中央皮下に注射する。対照群と共に4週間観察を行い、観察終了時に注射部位を剖検する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。また、剖検したとき、注射局所に著しい異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 鶏サルモネラ症（SI）力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試験動物</u> <u>1.2の試験に使用した試験動物を用いる。</u> <u>1.3.1.1.2 凝集反応用抗原</u> <u>SI凝集反応用抗原（付記1）を用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u>

1.2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、56℃で30分間非働化した後、マイクロタイター法で凝集反応を行う。

試験群の血清、SI参照陽性血清（付記2）、SE参照陽性血清（付記3）及びST参照陽性血清（付記4）を25w/v%カオリン加里ン酸緩衝食塩液（付記5）と等量混合し、37℃で1時間反応させた後、9,500Gで5分間遠心して採取した上清、未処理の対照群の血清及び未処理の参照陰性血清（付記6）を試料とする。各々の試料を生理食塩液で5倍に希釈した後、更に生理食塩水で2倍階段希釈し、各希釈血清にSI凝集反応用抗原を等量加え、振とう混合後、37℃で2時間感作する。感作終了後、4℃で1夜静置した後、凝集像を観察する。

1.3.1.3 判定

完全凝集の認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は、100倍以上でなければならない。この場合、対照群の抗体価は、いずれも5倍未満でなければならない。また、SI参照陽性血清の抗体価は640～1,280倍、SE参照陽性血清及びST参照陽性血清の抗体価はいずれも10倍以下で、参照陰性血清の抗体価は5倍未満でなければならない。

1.3.2 鶏サルモネラ症（SE）力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に使用した試験動物を用いる。

1.3.2.1.2 凝集反応用抗原

「ひな白痢急速診断用菌液」を用いる。

1.3.2.2 試験方法

1.2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、56℃で30分間非働化した後、マイクロタイター法で凝集反応を行う。

試験群の血清、対照群の血清、SI参照陽性血清、SE参照陽性血清、ST参照陽性血清及び参照陰性血清を生理食塩液で5倍に希釈した後、更に生理食塩水で2倍階段希釈し、各希釈血清に100倍に希釈した「ひな白痢急速診断用菌液」を等量加え、振とう混合後、37℃で2時間感作する。感作終了後、4℃で1夜静置した後、凝集像を観察する。

1.3.2.3 判定

完全凝集の認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は、100倍以上でなければならない。この場合、対照群の抗体価は、いずれも5倍未満でなければならない。また、SE参照陽性血清の抗体価は640～1,280倍、ST参照陽性血清の抗体価は160倍以下で、SI参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価はいずれも5倍未満でなければならない。

1.3.3 鶏サルモネラ症（ST）力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試験動物

1.2の試験に使用した試験動物を用いる。

1.3.3.1.2 凝集反応用抗原

ST凝集反応用抗原（付記7）を用いる。

1.3.3.2 試験方法

1.2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非働化された血清について、1.3.1.2と同様の方法で凝集反応を行う。ただし、凝集反応用抗原にはST凝集反応用抗原を用いる。

1.3.3.3 判定

完全凝集の認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。
試験群の血清の抗体価の幾何平均値は、100倍以上でなければならない。この場合、対照群の抗体価は、いずれも5倍未満でなければならない。また、ST参照陽性血清の抗体価は640～1,280倍、SE参照陽性血清の抗体価は160倍以下、SI参照陽性血清の抗体価は10倍未満で、参照陰性血清の抗体価は5倍未満でなければならない。

付記1 SI凝集反応用抗原

SI KUVZ-0005株又はこれと同等の抗原性を有する株のホルマリン不活化菌液を100℃で15分間加熱処理し、0.2vol%ホルマリン加里ン酸緩衝食塩液に浮遊させたもので、波長650nmの吸光度値が0.15程度になるように生理食塩液で希釈して1.3.1.2の凝集反応試験を行うとき、SI、SE及びST参照陽性血清並びに参照陰性血清の凝集抗体価が所定の値を示すことを確認したもの。

付記2 SI参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をSI KUVZ-0005株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫して得た血清を非働化したものであって、1.3.1.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は640～1,280倍を示し、1.3.2.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は5倍未満を示し、1.3.3.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は10倍未満を示す。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して10℃以下で保存する。

付記3 SE参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をSE KUVZ-0792株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫して得た血清を非働化したものであって、1.3.1.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は10倍以下を示し、1.3.2.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は640～1,280倍を示し、1.3.3.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は160倍以下を示す。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して10℃以下で保存する。

付記4 ST参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をST KUVZ-0301株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫して得た血清を非働化したものであって、1.3.1.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は10倍以下を示し、1.3.2.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は160倍以下を示し、1.3.3.2の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は640～1,280倍を示す。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して10℃以下で保存する。

付記5 25w/v%カオリン加里ン酸緩衝食塩液

1,000mL中

カオリン
リン酸緩衝食塩液

250.0g
残 量

付記6 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏の血清を非働化したものであって、1.3.1.2、1.3.2.2及び1.3.3.2の試験により凝集反応試験を行うとき、抗体価がいずれも5倍未満を示すもの。凍結して－20℃以下又は凍結乾燥して10℃以下で保存する。

付記7 ST凝集反応用抗原
ST KUVZ-0301株又はこれと同等の抗原性を有する株のホルマリン不活化菌液を100℃で15分間加熱処理し、0.2vol%ホルマリン加リン酸緩衝食塩液に浮遊させたもので、波長650nmの吸光度値が0.15程度になるように生理食塩液で希釈して1.3.3.2の凝集反応試験を行うとき、SI参照陽性血清、SE参照陽性血清及びST参照陽性血清並びに参照陰性血清の凝集抗体価が所定の値を示すことを確認したもの。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏大腸菌症生ワクチン</u> <u>サイクリックAMPレセプターたん白質をコードする遺伝子（CRP遺伝子）の一部を欠損した大腸菌血清型O78菌の培養菌液を凍結乾燥したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 夾雑菌否定試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行うとき、大腸菌以外の菌の発育を認めてはならない。</u> <u>1.2 生菌数試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品を1,000羽分当たり300mLの滅菌生理食塩液で溶解し、更に滅菌生理食塩液で10倍階段希釈したものを試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培地</u> <u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地（付記1）又は適当と認められた培地を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試料0.1mLずつを、それぞれ2枚以上の培地に接種し、37℃で24時間培養後、発育した集落数を数える。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>集落数が30以上300以下の範囲に入る平板培地の集落数を計測し、その平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出するとき、試験品の生菌数は、1 mL中3.3×10^7CFU以上3.3×10^9CFU以下でなければならない。</u> <u>1.3 安全試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試料</u> <u>試験品を1,000羽分当たり300mLの滅菌生理食塩液で溶解したものを試料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の4日齢の鶏を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験群及び対照群共に10羽以上とする。試料1羽分を、4週間隔で2回、試験群に噴霧投与し、対照群と共に第2回投与後2週まで観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u>

	<u>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。</u>	
1.4	<u>力価試験</u>	
1.4.1	<u>試験材料</u>	
1.4.1.1	<u>試験動物</u>	
	<u>1.3の試験に用いた動物を用いる。</u>	
1.4.1.2	<u>攻撃用菌液</u>	
	<u>大腸菌O78型菌J46株又はこれと同等の毒力を有する株をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地に接種して、37℃で15～20時間静置培養する。発育した集落をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地（付記2）に接種して37℃で15～20時間静置培養した後、更に同培地に移植し、37℃で約4時間振とう培養し、滅菌生理食塩液で適宜希釈したものを攻撃用菌液とする。</u>	
1.4.2	<u>試験方法</u>	
	<u>1.3の試験最終日に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の翼下静脈に0.5mLずつ接種して7日間観察する。</u>	
1.4.3	<u>判定</u>	
	<u>試験群では70%以上が生存しなければならない。この場合、対照群では80%以上が死亡しなければならない。</u>	
付記 1	<u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地</u> <u>1,000mL中</u> <u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェストブロス</u> <u>寒天</u> <u>水</u> <u>加温溶解後、121℃で15分間高压滅菌する。</u>	<u>30g</u> <u>15g</u> <u>残 量</u>
付記 2	<u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地</u> <u>1,000mL中</u> <u>ソイビーン・カゼイン・ダイジェストブロス</u> <u>水</u> <u>121℃で15分間高压滅菌する。</u>	<u>30g</u> <u>残 量</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏大腸菌症（O78全菌体破碎処理）（脂質アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏大腸菌症（O78全菌体破碎処理）（脂質アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.5及び3.4.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏大腸菌症（組換え型F11線毛抗原・ベロ細胞 毒性抗原）（油性アジュバント加）不活化ワク チン</u> <u>動生剤基準の鶏大腸菌症（組換え型F11線毛抗原・ベロ細胞毒性抗原）（油性ア ジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2、3.4.4及び3.4.5に規定するところにより、こ れらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性コリーザ（A型）（アジュバント加） 不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性コリーザ（A型）（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性コリーザ（C型）（アジュバント加） 不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性コリーザ（C型）（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、 3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性コリーザ（A・C型）（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性コリーザ（A・C型）（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症生ワ クチン</u> <u>動生剤基準のマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.5、 3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症凍結生ワクチン</u> <u>動生剤基準のマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症凍結生ワクチンの3.2.2、3.2.3、3.2.4及び3.2.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・シノビエ感染症凍結生ワクチン</u> <u>弱毒マイコプラズマ・シノビエの培養菌液を凍結したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 夾雑菌否定試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 生菌数試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 培地</u> <u>試験用培地（付記 1）を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>96穴の平底マイクロプレートの各穴に培地を225 μ Lずつ分注する。最初の列（縦列）の 8 穴に</u> <u>それぞれ試験品を25 μ Lずつ分注後、10倍階段希釈し、10⁻¹から10⁻¹⁰の希釈列を作製する。11及び12列は無接種対照とする。プレートをシールし、33℃で2週間培養する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>培地の色調変化を示した穴を有する行（横列）の希釈の高い方から連続した 3 つの希釈列又は連続した 2 つの希釈列と最初の色調変化した穴が全く認められない希釈列の合計 3 希釈列のいずれかを用いて判定する。これら 3 希釈列より最確数表（付記 2）から最確数を求め、3 希釈列の最初の希釈倍数を乗じて25 μ L当たりの色調変化単位（以下「CCU」という。）を算出し、さらに、それに1.2を乗じて生菌数を算出する。試験品の生菌数は、1羽分当り10^{7.35}CCU以上でなければならない。</u> <u>1.3 マーカー試験</u> <u>1.2を準用して試験するとき、33℃培養の生菌数は39.5℃培養の生菌数より、100倍以上多くななければならない。ただし、マイクロプレート 4 枚を用い、2 枚は33℃で、残りの 2 枚は39.5℃で培養する。</u> <u>1.4 安全試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 接種材料</u> <u>試験品を接種材料とする。</u> <u>1.4.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の 3 ～ 4 週齢の鶏を用いる。</u>

1.4.2 試験方法
試験動物の10羽を試験群、5羽を対照群とする。
接種材料10羽分を試験群に点眼接種し、対照群とともに3週間観察する。試験最終日に剖検し、鼻腔、眼窩下洞、気管、気嚢及び関節（滑膜）の病変の有無を観察する。

1.4.3 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。また、剖検で異常を認めてはならない。

1.5 力価試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 接種材料
試験品を接種材料とする。

1.5.1.2 試験動物
生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～4週齢の鶏を用いる。

1.5.2 試験方法
試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。
接種材料1羽分を試験群に点眼接種する。接種6週間後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「マイコプラズマ・シノビエ感染症急速診断用菌液」を用いて凝集反応を行う。

1.5.3 判定
試験群の70%以上が凝集抗体陽性でなければならず、対照群では、すべて凝集抗体陰性でなければならない。

付記1 試験用培地

1,000mL中	
マイコプラズマ用基礎培地（PPLO培地）＊	22.5g
塩酸システイン＊	0.1g
酢酸タリウム＊	0.1g
ブドウ糖＊	1g
0.6w/v％フェノールレッド液	5mL
正常豚血清	100mL
新鮮イーストエキス	10mL
0.2w/v％DNA液	10mL
1w/v％β－NAD液	10mL
ベンジルペニシリンカリウム	5,000単位
水	残量

＊印の成分を加温溶解した後、121℃で15分間高圧滅菌する。これに、あらかじめろ過滅菌してある他の成分を無菌的に添加する。

付記2 最確数表

連続した3つの希釈列に認められた培地色調変化の穴の数				最確数 (MPN)	連続した3つの希釈列に認められた培地色調変化の穴の数				最確数 (MPN)
8	8	7		208	7	0	1		1.83
8	8	6		139	7	0	0		1.55

8	8	5	98.2	6	6	1	3.08
8	8	4	70.2	6	6	0	2.77
8	8	3	51.0	6	5	1	2.73
8	8	2	38.5	6	5	0	2.44
8	8	1	30.1	6	4	2	2.69
8	8	0	24.0	6	4	1	2.41
8	7	8	59.6	6	4	0	2.14
8	7	7	50.8	6	3	2	2.38
8	7	6	43.3	6	3	1	2.11
8	7	5	36.9	6	3	0	1.86
8	7	4	31.4	6	2	2	2.09
8	7	3	26.7	6	2	1	1.84
8	7	2	22.6	6	2	0	1.60
8	7	1	19.1	6	1	2	1.82
8	7	0	15.9	6	1	1	1.58
8	6	6	28.4	6	1	0	1.35
8	6	5	25.0	6	0	2	1.56
8	6	4	21.8	6	0	1	1.34
8	6	3	18.9	6	0	0	1.13
8	6	2	16.3	5	5	1	2.07
8	6	1	13.8	5	5	0	1.85
8	6	0	11.5	5	4	1	1.84
8	5	6	21.3	5	4	0	1.63
8	5	5	18.9	5	3	2	1.82
8	5	4	16.6	5	3	1	1.61
8	5	3	14.4	5	3	0	1.41
8	5	2	12.3	5	2	2	1.60
8	5	1	10.30	5	2	1	1.40
8	5	0	8.42	5	2	0	1.21
8	4	5	14.8	5	1	2	1.39
8	4	4	13.0	5	1	1	1.20
8	4	3	11.1	5	1	0	1.01
8	4	2	9.40	5	0	2	1.19
8	4	1	7.74	5	0	1	1.01
8	4	0	6.22	5	0	0	0.83
8	3	5	11.8	4	4	0	1.28
8	3	4	10.2	4	3	1	1.27
8	3	3	8.67	4	3	0	1.10
8	3	2	7.18	4	2	1	1.09
8	3	1	5.82	4	2	0	0.93
8	3	0	4.67	4	1	2	1.08
8	2	4	8.07	4	1	1	0.92
8	2	3	6.72	4	1	0	0.76
8	2	2	5.50	4	0	2	0.91
8	2	1	4.45	4	0	1	0.75

8	2	0	3.62	4	0	0	0.60
8	1	3	5.22	3	4	0	1.01
8	1	2	4.27	3	3	1	1.00
8	1	1	3.50	3	3	0	0.85
8	1	0	2.87	3	2	1	0.85
8	0	2	3.38	3	2	0	0.70
8	0	1	2.80	3	1	2	0.84
8	0	0	2.31	3	1	1	0.70
7	7	1	5.47	3	1	0	0.56
7	7	0	4.84	3	0	2	0.69
7	6	2	5.30	3	0	1	0.55
7	6	1	4.71	3	0	0	0.41
7	6	0	4.15	2	4	0	0.79
7	5	2	4.58	2	3	1	0.79
7	5	1	4.04	2	3	0	0.66
7	5	0	3.55	2	2	1	0.65
7	4	3	4.46	2	2	0	0.52
7	4	2	3.95	2	1	1	0.52
7	4	1	3.47	2	1	0	0.39
7	4	0	3.04	2	0	2	0.51
7	3	3	3.86	2	0	1	0.38
7	3	2	3.40	2	0	0	0.26
7	3	1	2.98	1	3	0	0.49
7	3	0	2.59	1	2	1	0.49
7	2	3	3.33	1	2	0	0.36
7	2	2	2.92	1	1	1	0.36
7	2	1	2.55	1	1	0	0.24
7	2	0	2.20	1	0	2	0.36
7	1	3	2.87	1	0	1	0.24
7	1	2	2.51	1	0	0	0.12
7	1	1	2.17	0	2	0	0.23
7	1	0	1.86	0	1	1	0.23
7	0	2	2.14	0	1	0	0.11
				0	0	1	0.11

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症（ア ジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症（アジュバント加）不活化 ワクチンの3.4.3、3.4.7及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を 行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2、3.4.5及び3.4.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症・マ イコプラズマ・シノビエ感染症混合生ワクチ ン</u> <u>弱毒マイコプラズマ・ガリセプチカムの培養菌液を凍結乾燥したワクチン（以下「マイコプラズマ・ガリセプチカム乾燥ワクチン」という。）と、弱毒マイコプラズマ・シノビエの培養菌液を凍結乾燥したワクチン（以下「マイコプラズマ・シノビエ乾燥ワクチン」という。）とを組み合わせたワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 夾雑菌否定試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 生菌数試験</u> <u>1.2.1 マイコプラズマ・ガリセプチカム</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 試料</u> <u>試験品のマイコプラズマ・ガリセプチカム乾燥ワクチン1,000羽分を30mLの希釈用培地 1（付記 1）で溶解し、10倍階段希釈したものを試料とする。</u> <u>1.2.1.1.2 培地</u> <u>希釈用培地 1 と寒天培地 1（付記 2）を用いる。</u> <u>1.2.1.2 試験方法</u> <u>試料の25μLを 2 枚の寒天培地 1 に接種し、37℃、5 vol%炭酸ガス下で14日間培養する。</u> <u>1.2.1.3 判定</u> <u>形成された集落数から生菌数を算出する。試験品の生菌数は、1 羽分当たり 10^{6.9} 個以上でなければならない。</u> <u>1.2.2 マイコプラズマ・シノビエ</u> <u>1.2.2.1 試験材料</u> <u>1.2.2.1.1 試料</u> <u>試験品のマイコプラズマ・シノビエ乾燥ワクチン1,000羽分を30mLの希釈用培地 2（付記 3）で溶解し、10倍階段希釈したものを試料とする。</u> <u>1.2.2.1.2 培地</u> <u>希釈用培地 2 と寒天培地 2（付記 4）を用いる。</u> <u>1.2.2.2 試験方法</u> <u>試料の25μLを 2 枚の寒天培地 2 に接種し、37℃、5 vol%炭酸ガス下で14日間</u>

培養する。

1.2.2.3 判定

形成された集落数から生菌数を算出する。試験品の生菌数は、1羽分当たり $10^{6.6}$ 個以上でなければならない。

1.3 安全試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で0.1mL当たり10羽分となるように調整したものを接種材料とする。

1.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1 由来の2～3週齢の鶏を用いる。

1.3.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、5羽を対照群とする。

接種材料0.1mLを試験群に点眼接種し、対照群とともに3週間観察する。試験最終日に剖検し、鼻腔、眼窩下洞、気管及び気嚢の病変の有無を観察する。

1.3.3 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。また、剖検で異常を認めてはならない。

1.4 力価試験

1.4.1 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で0.03mL当たり1羽分となるように調整したものを接種材料とする。

1.4.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の2～3週齢の鶏を用いる。

1.4.1.1.3 凝集反応抗原

マイコプラズマ・ガリセプチカム不活化抗原（付記5）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

試験動物10羽を試験群とし、3羽を対照群とする。

接種材料0.03mLずつを試験群に点眼接種する。4週間後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、凝集反応抗原を用いて凝集反応を行う。

1.4.1.3 判定

試験群の70%以上が3分以内に凝集反応陽性を示さなければならない。この場合、対照群は、全て凝集反応陰性でなければならない。

1.4.2 マイコプラズマ・シノビエ感染症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で0.03mL当たり1羽分となるように調整したものを接種材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の2～3週齢の鶏を用いる。

1.4.2.1.3 凝集反応抗原

マイコプラズマ・シノビエ不活化抗原（付記6）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

試験動物10羽を試験群とし、3羽を対照群とする。
接種材料0.03mLずつを試験群に点眼接種する。4週間後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、凝集反応抗原を用いて凝集反応を行う。

1.4.2.3 判定
試験群の70%以上が3分以内に凝集反応陽性を示さなければならない。この場合、対照群は、全て凝集反応陰性でなければならない。

付記1 希釈用培地1
1,000mL中
プロテオーゼ・ペプトン 7.4g
イーストエキストラクト 2.5g
デキストロース 4.0g
塩化ナトリウム 5.0g
リン酸水素二ナトリウム二水和物 1.8g
フェノールレッド 15mg
水 残量
pHを8.2に調整した後、ろ過滅菌する。

付記2 寒天培地1
100mL中
付記1からフェノールレッドを除いたもの 90mL
バクタアガー 1.0g
高压滅菌後冷却し、正常豚血清を10mL加える。

付記3 希釈用培地2
1,000mL中
プロテオーゼ・ペプトン 7.4g
イーストエキストラクト 2.5g
デキストロース 4.0g
塩化ナトリウム 5.0g
リン酸水素二ナトリウム二水和物 1.8g
フェノールレッド 15mg
ニコチンアミド 100mg
水 残量
pHを8.2に調整した後、ろ過滅菌する。

付記4 寒天培地2
100mL中
付記3からフェノールレッド及びニコチンアミドを除いたもの 90mL
バクタアガー 1.0g
高压滅菌後冷却し、ニコチンアミド10mg及び正常豚血清を10mL加える。

付記5 マイコプラズマ・ガリセプチカム不活化抗原
マイコプラズマ・ガリセプチカムS6株の液体培養菌液から集菌し、生菌数が約10¹⁰個/mLとなるようにリン酸緩衝食塩液で調整した後、チメロサー

ルで不活化してクリスタルバイオレットで染色したもの。
マイコプラズマ・ガリセプチカムS6株又はこれと同等と認められた株の免疫血清を用いて血清平板凝集反応を行うとき、3分以内に凝集を認め、非免疫対照鶏及びマイコプラズマ・シノビエで免疫した鶏の血清では3分以内に凝集を認めない。

付記6 マイコプラズマ・シノビエ不活化抗原
マイコプラズマ・シノビエSG株の液体培養菌液から集菌し、生菌数が約 10^{10} 個/mLとなるようにリン酸緩衝食塩液で調整した後、チメロサルで不活化してクリスタルバイオレットで染色したもの。
マイコプラズマ・シノビエSG株又はこれと同等と認められた株の免疫血清を用いて血清平板凝集反応を行うとき、3分以内に凝集を認め、非免疫対照鶏及びマイコプラズマ・ガリセプチカムで免疫した鶏の血清では3分以内に凝集を認めない。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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（アジュバント・油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性コリーザ（A・C型）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（アジュバント・油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2、3.4.4及び3.4.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏コクシジウム感染症（ネカトリックス）生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏コクシジウム感染症（ネカトリックス）生ワクチンの3.2.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.6（迷入ウイルス否定試験法2.1及び2.2.2を除く。）及び3.2.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ロイコチトゾーン病（油性アジュバント加）</u> <u>ワクチン（組換え型）</u> <u>動生剤基準のロイコチトゾーン病（油性アジュバント加）ワクチン(組換え型)の3.5.2、3.5.4及び3.5.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ）混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ）混合生ワクチンの3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.6、3.2.7（迷入ウイルス否定試験法2.1及び2.2.2を除く。）及び3.2.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏コクシジウム感染症(アセルブリナ・テネラ・マキシマ・ミチス)混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ・ミチス）混合生ワクチンの3.4.3、3.4.4、3.4.5、3.4.6（迷入ウイルス否定試験法2.1及び2.2.2を除く。）及び3.4.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ(A型)混合(アジュバント加)不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ（A型）混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.7.3、3.7.7及び3.7.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>イリドウイルス病不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のイリドウイルス病不活化ワクチンの3.5.3、3.5.5及び3.5.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>イリドウイルス病（油性アジュバント加）不 活化ワクチン</u> <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を不活化したも のに油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品に等量の希釈用液を加えたものを注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>水温24℃、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30～50g のふり110尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物は、24時間以上餌止めした後、1 群55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24℃、循環式で飼育し、21日間観察する。試験最終日に試験群及び対照 群からそれぞれ10尾取り上げ、注射部位を剖検する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群におい ては一過性の摂餌不良を認めることがあっても、その他の臨床的な異常を認めて はならない。また、剖検した時に、注射局所に著しい異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試験動物</u> <u>1.2の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>1.3.1.2 攻撃用ウイルス液</u> <u>マダイイリドウイルス強毒株（付記）の培養ウイルス液をリン酸緩衝食塩液又 は適当と認められた希釈液で階段希釈し、対照群の死亡率が80%と予測される希 釈とそれ以下の適切な3段階の希釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。</u> <u>1.3.2 試験方法</u>

1.2の試験最終日の前日から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、攻撃用ウイルス液を0.1mLずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温26℃で21日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.3 判定

対照群の50%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、 $P < 0.05$ ）。

付記 マダイイリドウイルス強毒株
マダイイリドウイルスIJF245株又はこれと同等以上の毒力を有する株

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>まはたウイルス性神経壊死症不活化ワクチン</u> <u>ウイルス性神経壊死症ウイルス（C型）を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>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10～100gのまはた30尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>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 群は無接種の対照群とする。その後、それぞれ水温25℃、循環式で飼育し、20日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試験動物</u> <u>1.2の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>1.3.1.2 中和試験用ウイルス</u> <u>ウイルス性神経壊死症ウイルスSGEhi00-N株又は適当と認められた株を用いる。</u> <u>1.3.1.3 培養細胞</u> <u>E-11細胞浮遊液を96穴マイクロプレートに0.1mLずつ分注し、25℃で1～2日間培養した後、細胞単層が40～60％に形成されたものを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>1.2.2の試験最終日の前日から24時間以上餌止めをする。1.2.2の試験最終日に試験群及び対照群のそれぞれ10尾ずつを無作為に取り上げて採血を行い、得られた血清について中和試験を行う。</u>

試験群と対照群の血清、参照陽性血清（付記 1）及び参照陰性血清（付記 2）をハンクス平衡食塩液（付記 3）で40倍希釈した後、更に 2 倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀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、25℃で1 時間処理する。この各混合液0.1mLずつを1.3.1.3の培養細胞のそれぞれ 4 穴に接種し、25℃で10日間培養し、観察する。

1.3.3 判定

CPEの完全阻止が認められた穴を数え、血清希釈倍率の50%終末点をBehrens&Kerber法で求め、この値を中和抗体価とする。試験群の中和抗体価の幾何平均値は、115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の幾何平均値は、57倍未満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。

付記 1 参照陽性血清
ウイルス性神経壊死症ウイルス（C 型）の不活化ウイルス液をまはたに注射して得た血清であって、中和抗体価320～640倍に濃度を調整したものを凍結又は凍結乾燥したもの。

付記 2 参照陰性血清
健康なまはたの血清であって、中和抗体価が40倍未満のものを凍結又は凍結乾燥したもの。

付記 3 ハンクス平衡食塩液

1000mL中	
塩化ナトリウム	8,000mg
塩化カリウム	400mg
リン酸一水素ナトリウム（無水）	47.9mg
リン酸二水素カリウム（無水）	60mg
硫酸マグネシウム（無水）	48.8mg
塩化マグネシウム（無水）	46.8mg
塩化カルシウム（無水）	140mg
ブドウ糖	1,000mg
炭酸水素ナトリウム	0.35g
フェノールレッド	5mg
精製水	残 量

溶解した後、直ちにろ過滅菌する。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>あゆビブリオ病不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のあゆビブリオ病不活化ワクチンの3.3.2、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>さけ科魚類ビブリオ病不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のさけ科魚類ビブリオ病不活化ワクチンの3.3.2、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ひらめエドワジェラ症（多糖アジュバント加） 不活化ワクチン</u> <u>エドワジェラ・タルダの培養菌液を不活化した後、多糖アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>水温20℃、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20～50gのひらめ30尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>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14日間隔で2回、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20℃、循環式で飼育し、初回注射後28日間観察する。ただし、安全試験最終日の前日から水温を約1日かけて25℃に上昇させる。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試験動物</u> <u>1.2の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>1.2の試験最終日に、試験群及び対照群のそれぞれ15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。</u> <u>試験群の血清、対照群の血清、参照陽性血清（付記1）及び参照陰性血清（付記2）を、リン酸緩衝食塩液で10倍に希釈した後、更に2倍階段希釈した各希釈血清に凝集反応用抗原（付記3）を等量加えて、25℃で2時間反応させ、更に4℃で18～24時間静置した後、管底の凝集の有無を観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u>

凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。
試験群の血清の抗体価の幾何平均値は210倍以上でなければならない。対照群では、抗体価の幾何平均値は10倍未満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。

付記 1 参照陽性血清
エドワジエラ・タルダM-1G-3株のホルマリン不活化菌体とアジュバントとしてフコイタンを混合したものをひらめに注射して得た血清で、凝集抗体価が2,560～5,120倍となるように濃度を調整したもの。

付記 2 参照陰性血清
健康な無処置のひらめの血清で、凝集抗体価が10倍未満のもの。

付記 3 凝集反応用抗原
エドワジエラ・タルダM-1G-3株のホルマリン不活化菌体を、リン酸緩衝食塩液で遠心洗浄した後、再浮遊し、波長600nmの吸光度が0.4～0.6になるように調製したもので、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。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ひらめβ溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のひらめβ溶血性レンサ球菌症不活化ワクチンの3.3.3、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ぶりα溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のぶりα溶血性レンサ球菌症不活化ワクチンの3.4.3、3.4.5及び3.4.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ぶりα溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン(注射型)</u> <u>動生剤基準のぶりα溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン（注射型）の3.4.3、3.4.5及び3.4.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ぶりα溶血性レンサ球菌症（酵素処理）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のぶりα溶血性レンサ球菌症（酵素処理）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.5及び3.4.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ぶりα溶血性レンサ球菌症2価不活化ワクチン</u> <u>ラクトコッカス・ガルビエKG－型菌及びKG－・KG＋非凝集型菌の培養菌液を不活化したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>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20～100gのぶり60尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物は24時間以上餌止めした後、1群30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℃、循環式で飼育し、14日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試験動物</u> <u>1.2の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>1.3.1.2 攻撃用菌液</u> <u>KG－型ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記1）及びKG－・KG＋非凝集型ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記2）の液体培養菌液を、それぞれリン酸緩衝食塩液で希釈し、対照群の死亡率が80～90%と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>1.2の試験最終日の前日から24時間餌止めした試験群及び対照群をそれぞれ15尾以上の2群ずつに分け、一方の試験群及び対照群にはKG－型ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌の攻撃用菌液を、もう一方の試験群及び対照群にはKG－・KG＋非凝集型ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌の攻撃菌液を0.1mLずつ腹腔内に注射し</u>

て攻撃した後、水温25℃で14日間観察して各群の生死を調べる。

1.3.3 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、KG-型ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌で攻撃したものは60%以上が、KG-・KG+非凝集型ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌で攻撃したものは50%以上が死亡しなければならない。

付記1 KG-型ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌
ラクトコッカス・ガルビエKS-7C株又はこれと同等以上の毒力を有する
KG-型ラクトコッカス・ガルビエ株

付記2 KG-・KG+非凝集型ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌
ラクトコッカス・ガルビエLC1311株又はこれと同等以上の毒力を有する
KG-・KG+非凝集型ラクトコッカス・ガルビエ株

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ぶりビブリオ病不活化ワクチン</u> <u>ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型菌の培養菌液を不活化したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 接種材料</u> <u>試験品を人工海水で10倍に希釈したものを接種材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>水温22℃、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1.0～10.7gのぶり40尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物は24時間以上餌止めした後、1群20尾以上ずつの2群に分ける。接種材料1,000mL当たり、試験動物の総体重370g以下となる割合で1群の試験動物を通気しながら30秒間浸漬し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の操作で人工海水に浸漬する。その後、それぞれ水温22℃、循環式で飼育し、21日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試験動物</u> <u>1.2の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>1.3.1.2 攻撃用菌液</u> <u>ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型強毒菌（付記1）の液体培養菌液を人工海水で希釈し、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。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>1.2の試験最終日の前日から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ20尾以上を攻撃用菌液に通気しながら2分間浸漬して攻撃した後、14日間観察して各群の生死を調べる。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>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、対照群では、60%以上が死亡し</u>

なければならない。

付記1 ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型強毒菌
ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型菌NUF482Y1株又はこれと同等以上の
毒力を有する株

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ひらめストレプトコッカス・パラウベリス（Ⅰ型・Ⅱ型）感染症・β溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン</u> <u>ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌及びⅡ型菌並びにストレプトコッカス・イニエの培養菌液を不活化後混合したワクチンである。</u> <u>Ⅰ 小分製品の試験</u> <u>Ⅰ.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>Ⅰ.2 安全試験</u> <u>Ⅰ.2.1 試験材料</u> <u>Ⅰ.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>Ⅰ.2.1.2 試験動物</u> <u>水温20℃、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30～150gのひらめ40尾以上を用いる。</u> <u>Ⅰ.2.2 試験方法</u> <u>試験動物は24時間以上餌止めした後、1群20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20℃、循環式で飼育し、14日間観察する。ただし、安全試験最終日の前日から水温を約1日かけて25℃に上昇させる。</u> <u>Ⅰ.2.3 判定</u> <u>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。</u> <u>Ⅰ.3 力価試験</u> <u>Ⅰ.3.1 ストレプトコッカス・パラウベリス感染症力価試験</u> <u>Ⅰ.3.1.1 試験材料</u> <u>Ⅰ.3.1.1.1 試験動物</u> <u>水温20℃、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30～150gのひらめ160尾以上を用いる。</u> <u>Ⅰ.3.1.1.2 攻撃用菌液</u> <u>ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型強毒菌（付記1）及びⅡ型強毒菌（付記2）の液体培養菌液を、それぞれ対照群の死亡率が35%以上と予測される2段階の濃度に調整したものを攻撃用菌液とする。</u>

1.3.1.2 試験方法

試験動物は24時間以上餌止めした後、1群80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20℃、循環式で飼育し、13日目に水温を約1日かけて25℃に上昇させる。飼育13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20尾以上の4群ずつに分ける。各2群ずつの腹腔内にⅠ型菌の攻撃用菌液を、他の各2群ずつの腹腔内にⅡ型菌の攻撃用菌液を、それぞれ0.1mLずつ注射して攻撃する。攻撃後、飼育水温を2～4時間かけて27℃に上昇させ、21日間飼育観察して各群の生死を調べる。なお、この際、攻撃後4日目から48時間以上餌止めするとともに、攻撃5日目から観察期間終了時まで各水槽の溶存酸素量を約4～5 mg/Lとなるように調整する。

1.3.1.3 判定

それぞれの攻撃菌により、それぞれの対照群の35%以上が死亡した攻撃菌液のうち少なくとも1段階において、試験群の生残率は、対照群の生残率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、 $P<0.05$ ）。

1.3.2 β溶血性レンサ球菌症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.1.2 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・イニエ強毒菌（付記3）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80%以上と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

1.3.2.2 試験方法

1.2の試験最終日の前日から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ20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、飼育水温25℃を2～4時間かけて27℃に上昇させ、14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.2.3 判定

次式により試験品の有効率を求めるとき、有効率は60%以上でなければならない。この場合、対照群は、80%以上が死亡しなければならない。

$$\text{有効率 (\%)} = \{1 - (\text{試験群の死亡率} / \text{対照群の死亡率})\} \times 100$$

付記1 ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型強毒菌

ストレプトコッカス・パラウベリスM4Y株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記2 ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型強毒菌

ストレプトコッカス・パラウベリスM5E株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記3 ストレプトコッカス・イニエ強毒菌

ストレプトコッカス・イニエC1N株又はこれと同等以上の毒力を有する株

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ぶり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</u> <u>動生剤基準のぶり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)不活化ワクチンの3.3.2、3.3.4及び3.3.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合 不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチンの 3.4.3、3.4.5及び3.4.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものと する。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ぶりビブリオ病・α 溶血性レンサ球菌症・ストレプトコッカス・ジスガラクチエ感染症混合不活化ワクチン</u> <u>ビブリオ・アンゲイラルムJ-O-3型、ラクトコッカス・ガルビエ及びストレプトコッカス・ジスガラクチエの培養菌を不活化後混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 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>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>水温23又は25℃、循環式で7日以上飼育し、異常のないことを確認した体重20～100gのかんばち30尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>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滅菌水を注射する。その後、それぞれ水温25℃、循環式で飼育し、14日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 ビブリオ病力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 試験動物</u> <u>水温23℃、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20～100gのかんばち20尾以上を用いる。</u> <u>1.3.1.1.3 試験方法</u> <u>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0.1mLを腹腔内に注射し、試験群とする。他の1 群は対</u>

照群とし、試験群と同様の方法で滅菌水を注射する。その後、それぞれ水温23℃、循環式で飼育し、13日目から水温を25℃に上昇させる。

飼育14日目に試験群及び対照群のそれぞれ10尾を取り上げて採血し、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1）及び参照陰性血清（付記2）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3）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。

1.3.1.1.4 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。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は16倍以上でなければならない。対照群では、抗体価の幾何平均値は4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。

1.3.2 α溶血性レンサ球菌症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.1.2 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（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80%と予想される希釈液を攻撃用菌液とする。

1.3.2.2 試験方法

1.2の試験最終日の前日から24時間餌止めした試験群及び対照群それぞれ15尾以上に、攻撃用菌液0.1mLずつを腹腔内に注射して攻撃した後、水温25℃で14日間観察して各群の生死を調べる。

1.3.2.3 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。

1.3.3 ストレプトコッカス・ジスガラクチエ感染症力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.3.1.2 試験動物

水温23℃、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20～100gのかんばち180尾以上を用いる。

1.3.3.1.3 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・ジスガラクチエ強毒菌（付記5）の液体培養菌液をソイビン・カゼイン・ダイジェスト液体培地（付記6）で階段希釈し、対照群の死亡率が50～90%と予想される希釈とその前後の希釈の3段階の希釈菌液を攻撃用菌液とする。

1.3.3.2 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滅菌水を注射する。その後、それぞれ水温23℃、循環式で飼育し、13日目水温を25℃に上昇させる。

飼育13日目から24時間餌止めした試験群及び対照群それぞれ90尾以上をそれぞれ30尾以上の3群に分け、それぞれの攻撃用菌液0.1mLを腹腔内に注射して攻撃する。その後、水温を25℃から数時間～半日かけて29℃に上昇させ、14日間観察して各群の生死を調べる。

1.3.3.3 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、30%以上が死亡しなければならない。

付記 1 参照陽性血清

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型の死菌をかんぱち又はぶりに注射して得た血清で、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

付記 2 参照陰性血清

健康なぶりの血清で、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

付記 3 凝集反応用抗原

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、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

付記 4 ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌

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

付記 5 ストレプトコッカス・ジスガラクチエ強毒菌

ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシズ・ジスガラクチエ04K01株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記 6 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液体培地

1,000mL 中	
カゼイン製ペプトン	17.0g
大豆製ペプトン	3.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸一水素カリウム	2.5g
ブドウ糖	2.5g
水	残 量
pHを7.1～7.5に調整する。	

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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</u> <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・ピシシダの培養菌液を不活化後混合したものに油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>水温22℃、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30～100gのぶり110尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物は24時間以上餌止めした後、1群55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22℃、循環式で飼育し、21日間観察する。試験最終日に試験群及び対照群からそれぞれ10尾取上げ注射部位を剖検する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の摂餌不良を認めることはあっても、その他の臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検した時に、注射局所に著しい異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 ビブリオ病力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試験動物</u> <u>1.2の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>1.3.1.1.2 攻撃用菌液</u> <u>ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型強毒菌（付記1）の培養菌液を1.5w/vol%塩</u>

化ナトリウム液で希釈し、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。

1.3.1.2 試験方法

1.2の試験最終日の前日から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ずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.1.3 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。

1.3.2 α溶血性レンサ球菌症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.1.2 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記2）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。

1.3.2.2 試験方法

1.2の試験最終日の前日から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ずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.2.3 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。

1.3.3 類結節症力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.3.1.2 攻撃用菌液

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3）の培養菌液を1.5w/vol%塩化ナトリウム液で希釈し、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。

1.3.3.2 試験方法

1.2の試験最終日の前日から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ずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.3.3 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。

付記1 ビブリオ・アンギラルムJ-O-3型強毒菌

ビブリオ・アンギラルムINS222株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記2	<u>ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌</u> <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</u>
付記3	<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> <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INS197株又はこれと同等以上の毒力を有する株</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <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> <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> 1 小分製品の試験 1.1 無菌試験 <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> 1.2 安全試験 1.2.1 試験材料 1.2.1.1 注射材料 <u>試験品を注射材料とする。</u> 1.2.1.2 試験動物 <u>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5～50gのまだい80尾以上を用いる。</u> 1.2.2 試験方法 <u>試験動物は、12時間以上餌止めた後、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25℃、循環式で飼育し、14日間観察する。</u> <u>なお、13日目に水温を27℃に上昇させる。</u> 1.2.3 判定 <u>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。</u> 1.3 力価試験 1.3.1 イリドウイルス病力価試験 1.3.1.1 試験材料 1.3.1.1.1 注射材料 <u>試験品を注射材料とする。</u> 1.3.1.1.2 試験動物 <u>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。</u> 1.3.1.1.3 攻撃用ウイルス液 <u>マダイイリドウイルス強毒株（付記1）の培養ウイルス液を希釈液（付記2）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</u>

釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。

1.3.1.2 試験方法

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。

注射後10日目、試験群及び対照群は、12時間以上餌止めした後、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。

1.3.1.3 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、 $P < 0.05$)。

1.3.2 β 溶血性レンサ球菌症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.1.2 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・イニエ強毒菌 (付記3) 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60～80%と予測される2段階の希釈菌液を攻撃用菌液とする。

1.3.2.2 試験方法

12時間以上餌止めした後、試験群及び対照群それぞれ40尾以上を、それぞれ20尾以上の2群に分け、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た後、飼育水温30℃で7日間観察して各群の生死を調べる。

1.3.2.3 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、 $P < 0.05$)。

付記1 マダイイリドウイルス強毒株

マダイイリドウイルスRIE12-1株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記2 希釈液

イーグル基礎培地又は動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
121℃で15分間高圧滅菌又はろ過滅菌する。

付記3 ストレプトコッカス・イニエ強毒菌

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

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>イリドウイルス病・ぶりα溶血性レンサ球菌 症混合不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のイリドウイルス病・ぶりα溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチ ンの3.5.3、3.5.5及び3.5.6に規定するところにより、試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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混合不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のイリドウイルス病・ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチンの3.7.3、3.7.5及び3.7.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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(多糖アジュバント加)不活化ワクチン</u> <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> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>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20尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>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（以下この項において「PBS」という。）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。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては一過性の摂餌不良を認めることがあっても、その他の臨床的な異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 イリドウイルス病力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u>

1.3.1.1.2 試験動物

水温20℃、循環式で維持していたかんばち又はぶりを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のかんばち又はぶり180尾以上を用いる。

1.3.1.1.3 攻撃用ウイルス液

マダイイリドウイルス強毒株（付記1）の感染まだい脾臓乳剤（付記2）を2vol%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。

1.3.1.2 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PBS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。

1.3.1.3 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、 $P<0.05$ ）。

1.3.2 ビブリオ病力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.2.1.2 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のかんばち又はぶり20尾以上を用いる。

1.3.2.2 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0.1mL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PBS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尾を取り上げて採血し、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3）及び参照陰性血清（付記4）をPBSで2倍階段希釈し、各希釈血清に凝集反応用抗原（付記5）を等量加えて25℃で2時間反応させ、更に4℃で1夜静置した後、管底の凝集の有無を観察する。

1.3.2.3 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。

試験群の血清の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。

1.3.3 α溶血性レンサ球菌症力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.3.1.2 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のかんばち又はぶり30尾以上を用いる。

1.3.3.1.3 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記6）の培養菌液をPBS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。

1.3.3.2 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PBS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ずつ注射して攻撃する。攻撃した後、水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.3.3 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。

1.3.4 類結節症力価試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.4.1.2 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。

1.3.4.1.3 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・ピシンダ強毒菌（付記7）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。

1.3.4.2 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PBS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群ずつに分けて、それぞれの攻撃用菌液0.1mL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。

1.3.4.3 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、 $P<0.05$ ）。

- 付記 1 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
- 付記 2 感染まだい脾臓乳剤
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10倍乳剤とし、これを2,000rpmで10分間遠心した上清
- 付記 3 参照陽性血清
ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型の死菌をかんぱち又はぶりに注射して
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。
- 付記 4 参照陰性血清
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。
- 付記 5 凝集反应用抗原
ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型の加熱死菌をPBS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。
- 付記 6 ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌
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
- 付記 7 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
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

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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</u> <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それぞれ不活化して混合したものに油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>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15～100gのぶり80尾以上を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物は、24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。試験最終日に試験群及び対照群からそれぞれ10尾を取り上げて採血するとともに、注射部位を剖検する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の摂餌不良を認めることはあっても、その他の臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したときに、注射局所に著しい異常を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 イリドウイルス病力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試験動物</u>

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.1.1.2 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原
イリドウイルス固相化抗原（付記1）を用いる。

1.3.1.2 試験方法

1.2の試験最終日に、剖検用に取り上げた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、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、イリドウイルス参照陽性血清（付記2）並びにイリドウイルス参照陰性血清（付記3）を吸収用抗原液（付記4）で10倍に希釈し、25℃で1時間反応させた後、イリドウイルス固相化抗原吸着プレート（付記5）のそれぞれ4穴に50μLずつ加える。吸収用抗原液のみの穴をブランクとする。25℃で2時間反応させた後、洗浄液（付記6）で3回洗浄する。次に酵素標識抗体（付記7）を各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。基質液（付記8）を各穴に50μLずつ加え、25℃で15分間反応させた後、各穴に2mol/L硫酸を50μLずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長450nmで測定する。

1.3.1.3 判定

各穴の吸光度からブランク穴の平均吸光度を引いた値を各穴の吸光度値とする。それぞれの血清の4穴の吸光度値を比較し、最高値と最低値を除いた2穴の平均吸光度値を、それぞれの血清の平均吸光度値とする。試験群及び対照群の各血清の平均吸光度値をT、参照陰性血清の平均吸光度値をN、参照陽性血清の平均吸光度値をPとし、 $(T-N)/(P-N)$ によりそれぞれの血清のELISA抗体価を求める。

試験群のELISA抗体価は、10尾中4尾以上において0.250以上でなければならない、かつ、平均値が0.250以上でなければならない。対照群のELISA抗体価は、いずれも0.250以下でなければならない、かつ、平均値が0.125以下でなければならない。また、参照血清は、所定の平均吸光度値を示さなければならない。

1.3.2 ビブリオ病力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.2 試験方法

1.2の試験最終日に、剖検用に取り上げた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、ビブリオ用参照陽性血清（付記9）及びビブリオ用参照陰性血清（付記10）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11）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。

1.3.2.3 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。

試験群の血清の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4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。

1.3.3 α溶血性レンサ球菌症力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.3.1.2 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記12）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。

1.3.3.2 試験方法

1.2の試験最終日の前日から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ずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.3.3 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、 $P<0.05$ ）。この場合において、対照群は、60%以上が死亡しなければならない。

1.3.4 類結節症力価試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.4.1.2 攻撃用菌液

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13）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。

1.3.4.2 試験方法

1.2の試験最終日の前日から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ずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.4.3 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、 $P<0.05$ ）。この場合において、対照群は、60%以上が死亡しなければならない。

付記 1 イリドウイルス固相化抗原

マダイイリドウイルス製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養ウイルス液を不活化した後、不活化前のウイルス含有量が $10^{6.35}$ TCID₅₀程度になるように調整したもの。

付記 2 イリドウイルス参照陽性血清

マダイイリドウイルスの不活化ウイルス液をぶりに注射して得た血清で、1.3.1.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.4～0.5となるように濃度調整したもの。凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記 3 イリドウイルス参照陰性血清

健康なぶりの血清であって、1.3.1.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.06以下のもの。凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記 4 吸収用抗原液

10w/v%スキムミルク加リン酸緩衝食塩液と牛胎子血清を混合したもの。

付記5 イリドウイルス固相化抗原吸着プレート
イリドウイルス固相化抗原を96穴ELISAプレートの各穴に50 μ Lずつ加え、固相化した後、10w/v%スキムミルク加リン酸緩衝食塩液を各穴に300 μ Lずつ加え、25℃で2～3時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記6 洗浄液
0.05v/v%ポリソルベート20加リン酸緩衝食塩液

付記7 酵素標識抗体
ペルオキシダーゼ標識抗ぶりIgMウサギ抗体を1 w/v%スキムミルク加リン酸緩衝食塩液で至適濃度に希釈したもの。

付記8 基質液
液中に3,3',5,5'テトラメチルベンジジン (TMB) 及び過酸化水素を含むもの。

付記9 ビブリオ用参照陽性血清
ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型の死菌をかんばち又はぶりに注射して得た血清であって、1.3.2.2の試験により凝集反応試験を行うとき、抗体価が256～512倍となるように濃度調整したもの。凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記10 ビブリオ用参照陰性血清
健康なぶりの血清であって、1.3.2.2の試験により凝集反応試験を行うとき、抗体価が2倍未満のもの。凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

付記11 凝集反応用抗原
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、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。

付記12 ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌
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

付記13 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
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P09A14株又はこれと同等以上の毒力を有する株

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>犬コロナウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>犬コロナ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、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品の2 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、不活化剤を除去したものを試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培養細胞</u> <u>猫腎継代細胞を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試料を25cm²以上の培養細胞2本に1 mLずつ接種し、37℃で1時間吸着した後、リン酸緩衝食塩液で細胞面を洗浄する。ウイルス増殖用培養液（付記1）を加えて、37℃で5日間培養した後、接種した培養細胞を継代し、更に37℃で7日間培養し、観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>培養細胞にCPEを認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。</u> <u>試料に活性ウイルスを認めてはならない。</u> <u>1.3 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.4.1.2 試験動物</u> <u>体重約300gのモルモットを用いる。</u> <u>1.4.1.3 中和試験用ウイルス</u> <u>CRFK細胞で増殖させた犬コロナウイルス（付記2）を用いる。</u>

<u>1.4.1.4 試験方法</u>	
<u>試験動物の5匹を試験群、2匹を対照群とする。</u>	
<u>注射材料1mLずつを試験群の筋肉内に21日間隔で2回注射する。2回注射後7</u>	
<u>日に両群から採血し、各個体の血清について中和試験を行う。</u>	
<u>非働化した被検血清はウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清</u>	
<u>0.125mlと0.05mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.125mLを混合し、37℃で</u>	
<u>60分間処理する。各混合液0.05mLずつを96穴マイクロプレートのそれぞれ4穴に</u>	
<u>接種し、更にCRFK細胞浮遊液を0.1mLずつ加え、37℃5vol%炭酸ガス下で6日間</u>	
<u>培養し、観察する。</u>	
<u>1.4.1.5 判定</u>	
<u>培養細胞の2穴以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数で中和抗体価を</u>	
<u>表す。</u>	
<u>試験群の抗体価は80%以上が8倍以上を示さなければならない。この場合、対</u>	
<u>照群では、いずれも2倍未満でなければならない。</u>	
<u>付記1</u>	<u>ウイルス増殖用培養液</u>
	<u>1,000mL中</u>
	<u>トシブトース・ホスフェイト・ブロス</u>
	<u>2.95g</u>
	<u>牛胎子血清</u>
	<u>100mL</u>
<u>付記2</u>	<u>イーグルMEM</u>
	<u>残量</u>
	<u>炭酸水素ナトリウムでpHを6.8~7.2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>犬コロナウイルス</u>	
<u>動物医薬品検査所が適当と認めたもの</u>	

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>犬伝染性肝炎生ワクチン</u> <u>動生剤基準の犬伝染性肝炎生ワクチンの3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法の2.8.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>犬パルボウイルス感染症生ワクチン</u> <u>動生剤基準の犬パルボウイルス感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.6.1及び2.8.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>犬パルボウイルス感染症不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の犬パルボウイルス感染症不活化ワクチンの3.5.3、3.5.6及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の犬パルボウイルス感染症不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>犬パルボウイルス感染症（アジュバント加） 不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の犬パルボウイルス感染症(アジュバント加)不活化ワクチンの3.5.3、3.5.7及び3.5.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の犬パルボウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ジステンパー生ワクチン</u> <u>動剤基準のジステンパー生ワクチンの3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ジステンパー・犬アデノウイルス（２型）感 染症混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・犬アデノウイルス（２型）感染症混合生ワクチン の3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く）、3.3.7及び3.3.8に規定する ところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ジステンパー・犬伝染性肝炎混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・犬伝染性肝炎混合生ワクチンの3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ジステンパー・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン</u> <u>弱毒ジステンパーウイルス及び弱毒犬パルボウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルスの混合液を凍結乾燥したワクチンである。</u> <u>1. 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1及び2.5.1により試験を行い、これらに適合しなければならない。</u> <u>ただし、中和用血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記1）及び抗犬パルボウイルス血清（付記2）をそれぞれ非働化したものを用いる。</u> <u>1.3 ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試料</u> <u>試験品中の犬パルボウイルスを抗犬パルボウイルス血清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（付記3）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 培養細胞</u> <u>Vero 細胞を用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>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、37℃で7～10日間培養し、観察する。</u> <u>1.3.1.3 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。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。</u> <u>1.3.2 犬パルボウイルス含有量試験</u> <u>1.3.2.1 試験材料</u> <u>1.3.2.1.1 試料</u> <u>試験品中のジステンパーウイルスを抗ジステンパーウイルス血清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。</u>

1.3.2.1.2	培養細胞	
	猫腎継代細胞を用いる。	
1.3.2.2	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、37℃で24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に37℃で6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量のホウ酸緩衝食塩液（付記4）を加え、更にこの混合液と等量の0.3vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で静置後、観察する。	
1.3.2.3	判定	
	培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID ₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10 ⁴ TCID ₅₀ 以上でなければならない。	
1.4	異常毒性否定試験	
	一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。	
付記 1	抗ジステンパーウイルス血清	
	ジステンパーウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの	
付記 2	抗パルボウイルス血清	
	パルボウイルスで免疫した兎の血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの	
付記 3	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	2.95g
	牛胎子血清	20mL
	イーグルMEM	残 量
	炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6に調整する。	
	必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	
付記 4	ホウ酸緩衝食塩液	
	1,000mL中	
	塩化ナトリウム	10.52g
	ホウ酸	3.09g
	水酸化ナトリウム	0.96g
	水	残 量
	水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整する。	

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染・犬パラインフル エンザ混合生ワクチンの3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.3.7 及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ジステンパー・犬アデノウイルス(2型)感染症・ 犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・犬アデノウイルス(2型)感染症・犬パルボウ イルス感染症混合生ワクチンの3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス試験法2.6.1及び2.8.2 を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を 行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ジステンパー・犬伝染性肝炎・犬パルボウイルス 感染症混合(アジュバント加)ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・犬伝染性肝炎・犬パルボウイルス感染症混合（ア ジュバント加）ワクチンの3.5.5、3.5.7(迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.5.8、 3.5.12及び3.5.14.3に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものと する。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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の3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス 否定試験法2.6.1及び2.8.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これ らに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・ 犬コロナウイルス感染症混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合生ワクチンの 3.3.4、3.3.6（迷入 ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定すると ころにより、これらに規 定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・犬コロナウイルス感染症混合（アジュバント加）ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合（アジュバント加）ワクチンの3.3.5、3.3.7(迷入ウイルス否定試験法2.6.1及び2.8.2を除く。)、3.3.8、3.3.11及び3.3.13.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品の液状不活化ワクチンについて同基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合（アジュバント加）ワクチンの3.2.4の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・犬コロナウイルス感染症混合（コポリマーアジュバント加）ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合（コポリマーアジュバント加）ワクチンの3.3.4、3.3.6（一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.3.7、3.3.9及び3.3.11.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品の液状不活化ワクチンについては、同基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合（コポリマーアジュバント加）ワクチンの3.2.4の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>犬レプトスピラ病不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の犬レプトスピラ病不活化ワクチンの3.3.3及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病 混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>犬コロナ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たものとレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・イクテロヘモロジーの全培養菌液を不活化したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品の2mL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、不活化剤を除去したものを試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培養細胞</u> <u>猫腎継代細胞を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試料を25cm²以上の培養細胞 2 本に 1 mLずつ接種し、37℃で 1 時間吸着した後、リン酸緩衝食塩液で細胞面を洗浄する。ウイルス増殖用培養液（付記 1）を加えて、37℃で 5 日間培養した後、接種した培養細胞を継代し、更に37℃で 7 日間培養し、観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>培養細胞にCPEを認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。</u> <u>試料に活性ウイルスを認めてはならない。</u> <u>1.3 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.4.1.2 試験動物</u> <u>体重約300gのモルモットを用いる。</u> <u>1.4.1.3 中和試験用ウイルス</u>

CRFK細胞で増殖させた犬コロナウイルス（付記2）を用いる。

1.4.1.4 試験方法

試験動物の5匹を試験群、2匹を対照群とする。

注射材料1mLずつを試験群の筋肉内に21日間隔で2回注射する。2回注射後7日目に両群から採血し、各個体の血清について中和試験を行う。

非働化した検験血清をウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清0.125mlと0.05mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.125mLを混合し、37℃で60分間処理する。各混合液0.05mLずつを96穴マイクロプレートのそれぞれ4穴に接種し、更にCRFK細胞浮遊液を0.1mLずつ加え、37℃5vol%炭酸ガス下で6日間培養し、観察する。

1.4.1.5 判定

培養細胞の2穴以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数で中和抗体価を表す。

試験群の抗体価は、80%以上が8倍以上を示さなければならない。この場合、対照群では、いずれも2倍未満でなければならない。

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

2.95g

牛胎子血清

100mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを6.8~7.2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 犬コロナウイルス

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ジステンパー・犬伝染性肝炎・犬レプトスピラ病混合ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・犬伝染性肝炎・犬レプトスピラ病混合ワクチンの3.4.5、3.4.7（迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.4.8及び3.4.11に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・犬レプトスピラ病混合ワクチ ン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフ ルエンザ・犬レプトスピラ病混合ワクチンの3.4.5、3.4.7（迷入ウイルス否定試験 法2.8.2を除く。）、3.4.8及び3.4.10に規定するところにより、これらに規定する試験 を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・ 犬レプトスピラ病混合ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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・犬レプトスピラ病混合ワクチンの3.4.5、3.4.7 （迷入ウイルス否定試験法2.6.1及び2.8.2を除く。）、3.4.8及び3.4.11に規定するところ により、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・ 犬レプトスピラ病(カニコーラ・コペンハーゲニー・ ヘブドマデイス)混合ワクチン</u> 動生剤基準のジステンパー・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・犬レプトスピラ病（カニコーラ・コペンハ ーゲニー・ヘブドマデイス)混合ワクチン3.4.5、3.4.7(迷入ウイルス否定試験法2.6.1 及び2.8.2を除く。）、3.4.8及び3.4.10に規定するところにより、これらに規定する試 験を行うものとする。

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・ 犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病(カニ コーラ・イクテロヘモラジー)混合(アジュバント加) ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ 病(カニコーラ・イクテロヘモラジー)混合(アジュバント加)ワクチンの3.4.5、3.4.7 (迷入ウイルス否定試験法2.6.1及び2.8.2を除く。)、3.4.8、3.4.11及び3.4.13.5に規 定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品の液状不活化ワクチンについて同基準のジステンパー・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・ 犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病(カニコーラ・イクテロヘモラジー) 混合(アジュバント加)ワクチンの3.2.4.1の規定を準用して試験を行うものとす る。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・ 犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病(カニ コーラ・イクテロヘモラジー)混合(コポリマーアジ ュバント加)ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ 病（カニコーラ・イクテロヘモラジー）混合（コポリマーアジュバント加）ワク チンの3.4.4、3.4.6（一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.4.7、3.4.9 及び3.4.11.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品の液状不活化ワクチンについて同基準のジステンパー・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・ 犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ・イクテロヘモラジー） 混合（コポリマーアジュバント加）ワクチンの3.3.4.1の規定を準用して試験を行 うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・ 犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病(カニ コーラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス)混合 ワクチン</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ 病（カニコーラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチン3.4.5、3.4.7 （迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.4.8及び3.4.10に規定するところにより、 これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>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・犬コロナウイルス感染症・犬レ プトスピラ病（カニコーラ・イクテロヘモラ ジー・グリッポチフォーサ・ポモナ）混合（ア ジュバント加）ワクチン</u> <u>弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフル エンザウイルス及び弱毒犬パルボウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウ イルス液とレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・イクテロヘモラジー、レプ トスピラ・グリッポチフォーサ及びレプトスピラ・ポモナの全培養菌液を濃縮し、 不活化したものの混合液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「混合乾燥 ワクチン」という。）並びに犬コロナ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、アルミニウムアジュバントを添加したワクチン（以下この項にお いて「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>液状不活化ワクチンと同量の精製水で混合乾燥ワクチンを溶解したものについ て、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1、2.5.1及び2.6.1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、中和用抗血清は、抗ジステンパーウ イルス血清（付記1）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記2）、抗犬パライ ンフルエンザウイルス血清（付記3）及び抗犬パルボウイルス血清（付記4）を それぞれ非働化したものを用いる。</u> <u>1.3 ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試料</u> <u>混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の精製水で溶解したものを試験 品とし、各抗血清（付記2から4まで）を非働化したもので試験品中のジステン パーウイルス以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液（付記5）</u>

で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.1.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。

1.3.1.3 判定

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。試験品のウイルス含有量は、

1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の精製水で溶解したものを試験品とし、各抗血清（付記1、3及び4）を非働化したもので試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスを中和する。これ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。

1.3.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.2.2 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、37℃で10日間培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

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。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の精製水で溶解したものを試験品とし、各抗血清（付記1、2及び4）を非働化したもので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中和する。これ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。

1.3.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.3.2 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、37℃で10日間培養し、観察する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の0.5vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、4℃で60分間静置し、観察する。

1.3.3.3 判定

培養細胞に赤血球の吸着を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の精製水で溶解したものを試験

品とし、各抗血清（付記 1 から 3 まで）を非働化したもので試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを中和する。これ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。

1.3.4.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.4.2 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、37℃で24時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に37℃で 6 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 6）を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液（付記 7）で濃度を調整した0.5vol %豚赤血球浮遊液を加え、4℃で 1 夜静置後、赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.4}TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 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。

1.5 不活化試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 試料

液状不活化ワクチン 2 mLを100倍以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

1.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.5.2 試験方法

試料を25cm²以上の培養細胞 2 本に 1 mLずつ接種し、37℃で 1 時間吸着させた後、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄する。ウイルス増殖用培養液を加えて37℃で 5 日間培養した後、接種した培養細胞を継代し、7 日間培養し観察する。

1.5.3 判定

培養細胞にCPEを認めてはならない。

1.6 犬コロナウイルス感染症力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 注射材料

液状不活化ワクチンを注射材料とする。

1.6.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

1.6.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

1.6.1.4 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.6.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。試験群に注射材料 1 mLずつを 3 週間間隔で 2 回筋肉内注射し、2 回目注射後 7 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で 2 倍階段希釈する。各希釈

血清と50 μ L中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液を混合し、37℃で60分間処理する。各混合液50 μ Lずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞浮遊液に接種し、37℃で6日間培養し、観察する。

1.6.3 判定

培養細胞の4穴中2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。

試験群の抗体価は、80%以上が8倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍未満でなければならない。

付記1 抗ジステンパーウイルス血清

ジステンパーウイルスで免疫した兎、モルモット又はフェレットの血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記2 抗犬アデノウイルス（2型）血清

犬アデノウイルス（2型）で免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記3 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記4 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記5 ウイルス増殖用培養液

1,000mL中	
牛血清	10～20mL
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
イーグルMEM	残量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.6に調整する。	
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記6 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	7.01g
ホウ酸	3.09g
水酸化ナトリウム	0.96g
水	残量
牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えたのち、	
水酸化ナトリウムでpH9.0に調整する。	

付記7 VAD6.0液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.77g

リン酸水素二ナトリウム	5.68g
リン酸二水素ナトリウム(二水和物)	40.56g
水	残量
牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して	
<u>pH6.0に調整する。</u>	

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫白血病（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫白血病（アジュバント加）不活化ワクチンの3.2.3、3.2.4、3.2.7及び3.2.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫白血病（アジュバント加）ワクチン（組換え型）</u> <u>動生剤基準の猫白血病(アジュバント加) ワクチン(組換え型) の3.2.3、3.2.6、3.2.8 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫汎白血球減少症不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫汎白血球減少症不活化ワクチンの3.5.3、3.5.6及び3.5.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の猫汎白血球減少症不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫免疫不全ウイルス感染症（アジュバント加） 不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫免疫不全ウイルス感染症(アジュバント加)不活化ワクチンの3.4.3、3.4.4、3.4.6及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感 染症・猫汎白血球減少症混合生ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減 少症混合生ワクチンの3.3.4、3.3.6(迷入ウイルス試験法2.8.2を除く。)、3.3.7及び3.3.8 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感 染症・猫汎白血球減少症混合ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減 少症混合ワクチンの3.5.4、3.5.6(迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。)、3.5.7、3.5.10 及び3.5.12.3に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品の液状不活化ワクチンについて同基準の猫ウイルス性鼻気管炎 ・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症混合ワクチンの3.3.2の規定を準用 して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症2価・猫汎白血球減少症混合ワクチン</u> <u>弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液並びに2種類の猫カリシウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合し、凍結乾燥したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない</u> <u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1及び2.6.1により試験を行い、これらに適合しなければならない。</u> <u>ただし、中和用抗血清は、抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清（付記1）、抗猫汎白血球減少症ウイルス血清（付記2）をそれぞれ非働化したものを用いる。</u> <u>1.3 ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試料</u> <u>試験品中の猫汎白血球減少症ウイルスを抗猫汎白血球減少症ウイルス血清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（付記3）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 培養細胞</u> <u>猫腎継代細胞を用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>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、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間培養し、観察する。</u> <u>1.3.1.3 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>試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.9}TCID₅₀以上でなければならない。</u> <u>1.3.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.2.1 試験材料</u> <u>1.3.2.1.1 試料</u> <u>試験品中の猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清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、</u>

各段階の希釈液を試料とする。

1.3.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注した4本(穴)以上に接種し、37℃で24時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に37℃で6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液(付記4)を加え、更にこの混合液とVAD6.0液(付記5)により調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を等量加え、2～5℃で静置した後、観察する。

1.3.2.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.5 力価試験

1.5.1 猫カリシウイルス感染症力価試験

1.5.1.1 試験材料

1.5.1.1.1 試料

試験品を試料とする。

1.5.1.2 試験方法

96穴ELISA用マイクロプレート各穴に捕捉用抗猫カリシウイルス抗体(付記6)を120μLずつ加え、5℃で一夜静置後、TNE緩衝液(付記7)300μLで1回洗浄して固相化プレートとする。

固相化プレートの各穴にELISA用緩衝液(付記8)を100μLずつ加える。最初の列の2穴ずつに試料及び猫カリシウイルス抗原量定量ELISA参照品(付記9)を100μLずつ加えて2倍階段希釈し、37℃で3時間反応させる。TNE緩衝液300μLで1回洗浄後、猫カリシウイルス抗原量ELISA用標識モノクローナル抗体(付記10)を100μLずつ各穴に加え、37℃で1時間静置する。TNE緩衝液300μLで3回洗浄した後、全穴に基質液(付記11)を100μLずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。反応停止液(付記12)を50μLずつ加え、主波長450nm及び補正波長630nmの2波長で吸光度(OD)を測定する。

以下の計算式によりOD₅₀を算出し、OD₅₀を示す検体の希釈倍数を抗原量としてELISA単位(log10)で表す。

$$OD_{50} = (OD_{max} + OD_{min}) / 2$$

OD_{max}：参照品の最大ODの平均

OD_{min}：参照品の最低ODの平均

抗原量(log2) = (OD₅₀ - 定数) / 傾き

定数及び傾き：ODと抗原希釈倍数の対数についてOD₅₀を挟む2点の回帰直線の定数及び傾き

上記の計算式で算出した抗原量(log2)の値をELISA単位(log10)に換算する。

1.5.1.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は2.0log10ELISA単位以上でなければならない。

付記 1	抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの
付記 2	抗猫汎白血球減少症ウイルス血清 猫汎白血球減少症ウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの
付記 3	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 2.95g 牛胎子血清 0~20mL イーグル培養液 (MEM) 残 量 炭酸水素ナトリウムでpHを7.4~7.6に調整する。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。
付記 4	牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液 1,000mL中 塩化ナトリウム 7.01g ホウ酸 3.09g 水酸化ナトリウム 0.96g 水 残 量 牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。
付記 5	VAD6.0液 1,000mL中 塩化ナトリウム 8.77g 無水リン酸水素二ナトリウム 5.68g リン酸水素二ナトリウム二水和物 40.56g 水 残 量 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合してpHを6.0に調整する。
付記 6	捕捉用抗猫カリシウイルス抗体 猫を猫カリシウイルスG1株で免疫して得た血清で、炭酸ナトリウム緩衝液 (付記13) で至適濃度に希釈して使用する。-20℃に保存し、凍結融解は避ける。
付記 7	TNE緩衝液 1,000mL中 塩化ナトリウム 8.77g トリス 1.21g ポリソルベート20 1mL チメロサル 0.02g

	<u>水</u> <u>pHを7.5±0.2に調整する。</u>	<u>残 量</u>
付記 8	<u>ELISA用緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>トリス</u> <u>塩化ナトリウム</u> <u>牛血清アルブミン</u> <u>ポリソルベート20</u> <u>水</u> <u>pHを7.2に調整する。</u>	<u>2.42g</u> <u>8.77g</u> <u>10.0g</u> <u>0.5mL</u> <u>残 量</u>
付記 9	<u>猫カリシウイルス抗原定量ELISA参照品</u> <u>猫カリシウイルスG1株又は431株を含有する濃縮精製抗原、又は凍結乾燥</u> <u>ワクチン（G1株及び431株）を注射用水で溶解したもので、抗原量が明らか</u> <u>なもの</u> <u>本ELISAで抗原量を測定するとき、所定の抗原量を示さなければならない。</u>	
付記10	<u>猫カリシウイルス抗原定量ELISA用標識モノクローナル抗体</u> <u>ペルオキシダーゼ標識抗猫カリシウイルスp66モノクローナル抗体。ハイ</u> <u>ブリドーマH3-21012E2Eを接種したマウスの腹水を精製し、ペルオキシダー</u> <u>ゼで標識したもので、ELISA用緩衝液で希釈して使用する。－20℃に保存し、</u> <u>凍結融解は避ける。</u>	
付記11	<u>基質液</u> <u>本ELISAに適当なテトラメチルベンジジン溶液</u>	
付記12	<u>反応停止液</u> <u>1 mol/L硫酸液</u>	
付記13	<u>炭酸ナトリウム緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>炭酸ナトリウム</u> <u>炭酸水素ナトリウム</u> <u>アジ化ナトリウム</u> <u>水</u> <u>pHを9.6に調整する。</u>	<u>1.59g</u> <u>2.93g</u> <u>0.2g</u> <u>残 量</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感 染症・猫汎白血球減少症混合（アジュバント 加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減 少症混合（アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.6、3.5.7及び3.5.9に規定 するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感 染症・猫汎白血球減少症（油性アジュバント 加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減 少症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.4、3.5.5及び3.5.7に規定 するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感 染症・猫汎白血球減少症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を 準用して試験を行うものとする。ただし、小分製品で実施できない場合は中間製 品にて試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感 染症・猫汎白血球減少症・猫白血病（組換え 型）混合（油性アジュバント加）不活化ワク チン</u> <u>動生剤基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減 少症・猫白血病(組換え型)混合(油性アジュバント加)不活化ワクチンの3.7.2、3.7.4 及び3.7.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感 染症・猫汎白血球減少症・猫白血病（組換え型）混合（油性アジュバント加）不 活化ワクチンの3.5.2.3の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 2 価・猫汎白血球減少症・猫白血病（猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白遺伝子導入カナリア痘ウイルス）混合ワクチン</u> <u>弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び弱毒猫汎白血球減少症ウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液と 2 種類の猫カリシウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合し、凍結乾燥したもの（以下この項において「混合ワクチン」という。）と、猫白血病ウイルスのenvたん白、gagたん白及びpolたん白をコードする遺伝子の一部を組み込んだ弱毒カナリア痘ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液（以下この項において「液状ワクチン」という。）を組み合わせたワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1及び2.6.1を準用して試験するとき、これらに適合しなければならない。</u> <u>ただし、試料作製には中和用抗血清として抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清（付記 1）及び抗猫汎白血球減少症ウイルス血清（付記 2）をそれぞれ非働化したものを用いる。</u> <u>1.3 ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1.1 試料</u> <u>混合ワクチンを液状ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したもの（以下この項において「溶解ワクチン」という。）を抗猫汎白血球減少症ウイルス血清を非働化したものを加えて37℃ 1 時間反応させたものをウイルス増殖用培養液（付記 3）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.3.1.2 培養細胞</u> <u>猫腎継代細胞を用いる。</u> <u>1.3.1.3 試験方法</u> <u>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、37℃で60分吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間培養し、観察する。</u>

1.3.1.4 判定

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。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

1.3.2.1 試料

溶解ワクチンを抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清を非働化したものを加えて37℃で1時間反応させ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。

1.3.2.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.2.3 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注した4本(穴)以上に接種し、37℃で24時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に37℃で6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液(付記4)を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液(付記5)により濃度を調整した0.3~0.5%豚血球浮遊液を加え、2~5℃で静置した後、観察する。

1.3.2.4 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.3 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス含有量試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試料

液状ワクチン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。

1.3.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

1.3.3.2 試験方法

試料の0.1mLずつを96穴プレートの5穴以上の鶏胚細胞浮遊液に接種し、37℃で7日間培養する。

1.3.3.3 判定

特徴的なCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.2}TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス同定試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 試料

液状ワクチンを牛胎子血清無添加の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。

1.4.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

1.4.2 試験方法

試料の0.1mLずつを96穴プレートの2穴の鶏胚細胞に接種し、37℃で3日間培養する。アセトン固定した後、これにリン酸緩衝食塩液で希釈したFITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体(付記6)及びローダミン標識抗猫白血病

ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体（付記7）の混合液を0.08mL加え、37℃で30分間静置する。蒸留水で洗浄後、490nm及び550nm励起フィルターを用いて蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察する。

1.4.3 判定

カチリア痘ウイルス及び猫白血病ウイルスgp70たん白に対する特異蛍光が認められなければならない。

1.5 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定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。

1.6 猫カリシウイルス感染症力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 試料

混合ワクチンを液状ワクチンと同量の注射用水で溶解したものを試料とする。

1.6.2 試験方法

96穴ELISA用プレート各穴に捕捉用抗猫カリシウイルス抗体（付記8）を120μLずつ加え、5℃で1夜静置後、TNE緩衝液（付記9）300μLで1回洗浄して固相化プレートとする。

固相化プレートの各穴にELISA用緩衝液（付記10）を100μLずつ加える。最初の列の2穴ずつに試料及び猫カリシウイルス抗原定量ELISA参照品（以下この項において「参照品」という。）（付記11）を100μLずつ加えて2倍階段希釈し、37℃で3時間反応させる。TNE緩衝液300μLで1回洗浄した後、猫カリシウイルス抗原定量ELISA用モノクローナル抗体（付記12）を100μLずつ各穴に加え、37℃で1時間静置する。TNE緩衝液300μLで3回洗浄した後、全穴に基質液（付記13）を100μLずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。反応停止液（付記14）を50μLずつ加え、主波長450nm及び補正波長630nmの2波長で吸光度（OD）を測定する。

以下の計算式によりOD₅₀を算出し、OD₅₀を示す検体の希釈倍数を抗原量としてELISA単位（log₁₀）で表す。

$$OD_{50} = (OD_{max} + OD_{min}) / 2$$

OD_{max}: 参照品の最大ODの平均

OD_{min}: 参照品の最小ODの平均

$$\text{抗原量}(\log_2) = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き：ODと抗原希釈倍数の対数についてOD₅₀を挟む2点の回帰直線の定数及び傾き

上記の計算式で算出した抗原量(log₂)の値をELISA単位(log₁₀)に換算する。

1.6.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は、2.0log₁₀ELISA単位以上でなければならない。

付記1 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスで免疫した血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記2 抗猫汎白血球減少症ウイルス血清

猫汎白血球減少症ウイルスで免疫した血清であって、試験品のウイルス

を完全に中和する力価を有するもの。

付記 3	<u>ウイルス増殖用培養液</u>	
	<u>1000mL中</u>	
	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95g</u>
	<u>牛胎子血清</u>	<u>0~20mL</u>
	<u>イーグルMEM</u>	<u>残 量</u>
<u>炭酸水素ナトリウムでpHを7.2~7.6に調整する。</u>		
<u>必要最小限の抗生物質を加えてもよい。</u>		
付記 4	<u>牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>塩化ナトリウム</u>	<u>7.01g</u>
	<u>ホウ酸</u>	<u>3.09g</u>
	<u>水酸化ナトリウム</u>	<u>0.96g</u>
	<u>水</u>	<u>残 量</u>
	<u>牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。</u>	
付記 5	<u>VAD6.0液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>塩化ナトリウム</u>	<u>8.77g</u>
	<u>無水リン酸水素二ナトリウム</u>	<u>5.68g</u>
	<u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u>	<u>40.56g</u>
	<u>水</u>	<u>残 量</u>
付記 6	<u>牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して、pHを6.0に調整する。</u>	
付記 6	<u>FITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体</u>	
	<u>FITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩液で濃度を調整して使用する。</u>	
付記 7	<u>ローダミン標識抗猫白血病ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体</u>	
	<u>ローダミン標識抗白血病ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩液で濃度を調整して使用する。</u>	
付記 8	<u>捕捉用抗猫カリシウイルス抗体</u>	
	<u>猫を猫カリシウイルスGI株で免疫して得た血清であって、炭酸ナトリウム緩衝液（付記15）で至適濃度に希釈して使用する。-20℃で保存し、凍結融解は避ける。</u>	
付記 9	<u>TNE緩衝液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>塩化ナトリウム</u>	<u>8.77g</u>
	<u>トリス</u>	<u>1.21g</u>

ポリソルベート20
精製水
pHを7.5±0.2に調整する。

1mL
残 量

付記10 ELISA用緩衝液
1,000mL中
トリス
塩化ナトリウム
牛血清アルブミン
ポリソルベート200
pHを7.2に調整する。

2.42g
8.77g
10g
5mL

付記11 猫カリシウイルス抗原定量ELISA参照品
猫カリシウイルスG1株又は431株を含有する濃縮精製抗原又は凍結乾燥ワ
クチン（G1株及び431株）を注射用水で溶解したものであって、抗原量が明
らかなもの。
本ELISAで抗原量を測定するとき、所定の抗原量を示さなければならない。

付記12 猫カリシウイルス抗原定量ELISA用モノクローナル抗体
ペルオキシダーゼ標識抗猫カリシウイルスp66モノクローナル抗体

付記13 基質液
本ELISAに適当なテトラメチルベンジジン溶液

付記14 反応停止液
0.5mol/L硫酸液

付記15 炭酸ナトリウム緩衝液
1,000mL中
炭酸ナトリウム
炭酸水素ナトリウム
水
pHを9.6に調整する。
アジ化ナトリウム0.2gを加えてもよい。

1.59g
2.93g
残 量

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 3 価・猫汎白血球減少症・猫白血病（組換え型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、3 種類の猫カリシウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したもの及び組換えDNA技術を応用して製造された猫白血病ウイルスのエンベロープ糖蛋白70（以下「gp70」という。）を精製したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.1.2 試験動物</u> <u>体重約100gのラットを用いる。</u> <u>1.3.1.1.3 培養細胞</u> <u>猫腎継代細胞を用いる。</u> <u>1.3.1.1.4 中和試験用ウイルス</u> <u>猫腎継代細胞で増殖させた猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを試験群の殿部筋肉内に注射し、3 週間隔で2 回注射する。</u> <u>第2 回注射後 7 日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中和試験を行う。</u> <u>血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液（付記 1）で4 倍階段希釈する。各希</u>

積血清と0.2mL中に約100PFUを含む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。別に中和試験用ウイルスとウイルス増殖用培養液とを等量混合し、希釈血清と同様に処理したものをウイルス対照とする。各混合液0.2mLずつを2枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記2）を重層し、37℃ 5 vol%炭酸ガス下で3～4日間培養する。培養後、更に第2次重層寒天培地（付記3）を重層し、37℃で24時間培養する。

1.3.1.3 判定

被検血清のブラック数の平均値がウイルス対照のブラック数の平均値の50%以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の中和抗体価は、幾何平均値で16倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4倍未満でなければならない。

1.3.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.3.1の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.2.1.3 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた猫カリシウイルスのそれぞれの製造用株を用いる。

1.3.2.2 試験方法

1.3.1.2の試験方法で得られた各個体の血清について、それぞれの中和試験用ウイルスで中和試験を行う。

各個体の血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約

200TCID₅₀を含む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。

各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、混合液を除き、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

CPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群のそれぞれの株に対する中和抗体価は、すべての個体で16倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍未満でなければならない。

1.3.3 猫汎白血球減少症力価試験

1.3.3.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.3.1.1 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

1.3.3.1.2 赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原（付記4）を用いる。

1.3.3.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料の0.5mLずつを試験群の殿部筋肉内に注射し、3週後に試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を25w/v%カオリン液及び豚赤血球で処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記5）で2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の赤血

球凝集抗原を混合し、常温で1時間処理し、VAD6.0液（付記6）で調整した0.5vol %豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で一夜処理し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.3.3 判定

赤血球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とする。
試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、幾何平均値128倍以上でなければならない。
この場合、対照群では、8倍未満でなければならない。

1.3.4 猫白血病力価試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試験動物

1.3.1の試験に用いた動物を用いる。

1.3.4.1.2 抗原固相化プレート

gp70精製抗原（付記7）を炭酸緩衝液（付記8）で希釈し、96穴プレートの各穴に50μLずつ加え、37℃で60分間反応させ、洗浄液（付記9）で洗浄し、更に2w/v%牛血清アルブミン加洗浄液を各穴へ200μLずつ加え、37℃で60分間反応させ、洗浄液で洗浄したものを用いる。

1.3.4.2 試験方法

1.3.1.2の試験方法で得られた各個体の血清について酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）を行う。

2w/v%牛血清アルブミン加洗浄液で100倍に希釈した非働化被検血清と、参照陽性血清（付記10）及び参照陰性血清（付記11）を抗原固相化プレートの穴にそれぞれ4穴、50μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記12）を50μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液（付記13）を各穴に100μLずつ加え、遮光して25℃で30分間反応させた後、反応停止液（付記14）を50μLずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長492nm、副波長630nmで測定する。

1.3.4.3 判定

4穴の吸光度の最高値と最低値を除いた2穴の値の平均値を吸光度値とする。参照陽性血清の吸光度値をO.D. p、参照陰性血清の吸光度値をO.D. n、試験群の血清の吸光度値をO.D. v、対照群の血清の吸光度値をO.D. cとすると、試験群の80%以上が $1 < O.D. v / O.D. p$ でなければならない。また、対照群では $O.D. c / O.D. n \leq 2$ でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、猫カリシウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルス不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

各ウイルス原液の混合液をトライトン除去処理（付記15）し、これを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

2.1.2 試験方法

試料の全量及び細胞増殖用培養液（付記16）に浮遊させた猫腎継代細胞を同時に培養面積25cm²以上の培養びんで37℃で培養する。細胞が単層を形成した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に10日間観察する。観察最終日に培養びんの培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加える。さ

らに、この混合液と等量のVAD6.0液で調整した0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、凝集の有無を観察する。

2.1.3 判定

培養細胞にCPE、培養液に赤血球の凝集を認めない場合、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。

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	2.95g
牛胎子血清	20mL
イーグルMEM	残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6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 第1次重層寒天培地

1,000mL中	
寒天	7g
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
牛胎子血清	20mL
F12培地（付記17）	残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.1～7.3に調整する。	
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記 3 第2次重層寒天培地

第1次重層寒天培地に0.5w/v%のニュートラルレッドを2 vol%となるように加えたもの

付記 4 猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルスを猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清又はこれを不活化したもので、赤血球凝集価128倍以上のもの

付記 5 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	10.52g
ホウ酸	3.09g
水酸化ナトリウム	0.96g
水	残 量
牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。	

付記 6 VAD6.0液

1,000mL中	
無水リン酸二ナトリウム	5.68g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	40.56g

水
牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合してpHを6.0に調整する。

付記7 gp70精製抗原
組換え大腸菌で発現させたgp70を精製したものであり、-20℃に保存する。
本抗原を用いてELISAを実施したときの吸光度値が、参照陽性血清で0.6
～0.9、参照陰性血清で0.1以下の実測値を示すように炭酸緩衝液で希釈して
使用する。

付記8 炭酸緩衝液
1,000mL中
炭酸ナトリウム 1.59g
炭酸水素ナトリウム 2.93g
水 残量
pHは9.6であり、4℃に保存し、1週間以内に使用する。

付記9 洗浄液
1,000mL中
塩化ナトリウム 8.0g
塩化カリウム 0.2g
リン酸二ナトリウム 0.2g
リン酸水素二ナトリウム、無水 1.15g
ポリソルベート20 0.5mL
水 残量

付記10 参照陽性血清
gp70精製抗原で免疫したラットの血清を100倍に希釈したもので、抗原固
相化プレートを用いてELISAを実施したとき、吸光度値が0.6～0.9を示すも
の

付記11 参照陰性血清
非免疫ラットの血清を100倍に希釈したもので、抗原固相化プレートを用
いてELISAを実施したとき、吸光度値が0.1以下を示すもの

付記12 酵素標識抗体
ペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG(H+L)抗体で抗原固相化プレートを用
いてELISAを実施したとき、参照陽性血清の吸光度値が0.6～1.0、参照陰性
血清の吸光度値が0.1以下を示すように調整したもの

付記13 基質液
o-フェニレンジアミン二塩酸塩10mgをリン酸クエン酸緩衝液（付記18）
25mLに溶解したものであり、遮光保存する。使用直前に過酸化水素水を10
μL添加して使用する。

付記14 反応停止液

濃硫酸56.1mLを水440mL中に攪拌しながら溶解し、最終的に全体量を500mLに調整したもの

付記15 トライトン除去処理
(1) ビーズの洗浄
ビーズ30gにメタノール200mLを加え、室温で15分間攪拌洗浄後、ガラス過器上にビーズを集め、500mLのメタノールと水1,000mLで洗浄する。さらに、ビーズをカラムに入れ、2,000mLの水で長時間洗浄する。洗浄したビーズは、水中に入れて2～5℃で保存する。
(2) 0.01mol/Lリン酸カリウム液 (pH7.2) で試料を4℃一夜透析する。
透析した試験品2mLに洗浄したビーズ0.6gを加え5℃で120分間攪拌し、180G、10分間遠心して上清を得る。

付記16 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 2.95g
牛胎子血清 100mL
イーグルMEM 残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記17 F12培地
適当と認められた品質の液体製品

付記18 リン酸クエン酸緩衝液
1,000mL中
クエン酸 (無水) 4.67g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95g
水 残 量
pHを5.0に調整する。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症・猫白血病・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症・猫白血病・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3、3.4.6、3.4.7及び3.4.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品について同基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症・猫白血病・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 2 価・猫汎白血球減少症・猫白血病（猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白遺伝子導入カナリア痘ウイルス）・猫クラミジア感染症混合ワクチン</u> <u>弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、弱毒猫汎白血球減少症ウイルス及び弱毒猫クラミドフィラ・フェリスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液と 2 種類の猫カリシウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合し、凍結乾燥したもの（以下この項において「混合ワクチン」という。）と、猫白血病ウイルスのenvたん白、gagたん白及びpolたん白をコードする遺伝子の一部を組み込んだ弱毒カナリア痘ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液（以下この項において「液状ワクチン」という。）を組み合わせたワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1及び2.6.1を準用して試験するとき、これらに適合しなければならない。</u> <u>ただし、試料作製には中和用抗血清として抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清（付記 1）及び抗猫汎白血球減少症ウイルス血清（付記 2）をそれぞれ非働化したもの並びに抗生物質混合液（付記 3）を用いる。</u> <u>1.3 ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1.1 試料</u> <u>混合ワクチンを液状ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したもの（以下この項において「溶解ワクチン」という。）を抗猫汎白血球減少症ウイルス血清を非働化したもの及び抗生物質混合液を加えて37℃ 1 時間反応させたものをウイルス増殖用培養液（付記 4）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.3.1.2 培養細胞</u> <u>猫腎継代細胞を用いる。</u> <u>1.3.1.3 試験方法</u> <u>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、37℃で60分吸</u>

着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間培養し、観察する。

1.3.1.4 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.7}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

1.3.2.1 試料

溶解ワクチンを抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清を非働化したもの及び抗生物質混合液を加えて37℃で1時間反応させ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。

1.3.2.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.2.3 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注した4本(穴)以上に接種し、37℃で24時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に37℃で6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液(付記5)を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液(付記6)により濃度を調整した0.3~0.5%豚血球浮遊液を加え、2~5℃で静置した後、観察する。

1.3.2.4 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.7}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.3 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス含有量試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試料

液状ワクチン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。

1.3.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

1.3.3.2 試験方法

試料の0.1mLずつを96穴プレートの5穴以上の鶏胚細胞浮遊液に接種し、37℃で7日間培養する。

1.3.3.3 判定

特徴的なCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.2}TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 クラミドフィラ・フェリス生菌数試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 試料

混合ワクチンを液状ワクチンと同量の生理食塩液で溶解したものを生理食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.4.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵の6日齢のものを用いる。

1.4.2 試験方法

試料の0.2mLずつをそれぞれ10個の発育鶏卵の卵黄?内に接種し、37℃で11日間培養し、観察する。

1.4.3 判定

鶏胚が死亡したものを感染とみなし、EID₅₀を算出する。ただし、4日目までに死亡したものは、除外する。

試験品の生菌数は、1頭分当たり10^{3.0}EID₅₀以上でなければならない。

1.5 猫白血病ウイルス由来防御抗原蛋白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス同定試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 試料

液状ワクチンを牛胎子血清無添加の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。

1.5.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

1.5.2 試験方法

試料の0.1mLずつを96穴プレートの2穴の鶏胚細胞に接種し、37℃で3日間培養する。アセトン固定した後、これにリン酸緩衝食塩液で希釈したFITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体（付記7）及びローダミン標識抗猫白血病ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体（付記8）の混合液を0.08mL加え、37℃で30分間静置する。蒸留水で洗浄後、490nm及び550nm励起フィルターを用いて蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察する。

1.5.3 判定

カナリア痘ウイルス及び猫白血病ウイルスgp70たん白に対する特異蛍光が認められなければならない。

1.6 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定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、モルモットの観察期間は、14日間とする。

1.7 猫カリシウイルス感染症力価試験

1.7.1 試験材料

1.7.1.1 試料

混合ワクチンを液状ワクチンと同量の注射用水で溶解したものを試料とする。

1.7.2 試験方法

96穴ELLISA用プレート各穴に捕捉用抗猫カリシウイルス抗体（付記9）を120μLずつ加え、5℃で1夜静置後、TNE緩衝液（付記10）300μLで1回洗浄して固相化プレートとする。

固相化プレートの各穴にELISA用緩衝液（付記11）を100μLずつ加える。最初の列の2穴ずつに試料及び猫カリシウイルス抗原定量ELISA参照品（以下この項において「参照品」という。）（付記12）を100μLずつ加えて2倍階段希釈し、37℃で3時間反応させる。TNE緩衝液300μLで1回洗浄した後、猫カリシウイルス抗原定量ELISA用モノクローナル抗体（付記13）を100μLずつ各穴に加え、37℃で1時間静置する。TNE緩衝液300μLで3回洗浄した後、全穴に基質液（付記14）を100μLずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。反応停止液（付記15）を50μLずつ加え、主波長450nm及び補正波長630nmの2波長で吸光度（OD）を測定する。

以下の計算式によりOD₅₀を算出し、OD₅₀を示す検体の希釈倍数を抗原量としてELISA単位（log10）で表す。

$$OD_{50} = (OD_{max} + OD_{min}) / 2$$

OD_{max}:参照品の最大ODの平均

ODmin:参照品の最小ODの平均
抗原量(log 2)=(OD₅₀-定数)/傾き
定数及び傾き：ODと抗原希釈倍数の対数についてOD₅₀を挟む2点の回帰直線の
定数及び傾き
上記の計算式で算出した抗原量(log 2)の値をELISA単位(log10)に換算する。

1.7.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は、2.0log10ELISA単位以上でなければならない。

付記 1 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清
猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスで免疫した血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 2 抗猫汎白血球減少症ウイルス血清
猫汎白血球減少症ウイルスで免疫した血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 3 抗生物質混合液
1mL中
結晶ペニシリンGカリウム 100万単位
硫酸カナマイシン 1g力価
硫酸ストレプトマイシン 1g力価

付記 4 ウイルス増殖用培養液
1000mL中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95g
牛胎子血清 0~20mL
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。
必要最小限の抗生物質を加えてもよい。

付記 5 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液
1,000mL中
塩化ナトリウム 7.01g
ホウ酸 3.09g
水酸化ナトリウム 0.96g
水 残 量
牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。

付記 6 VAD6.0液
1,000mL中
塩化ナトリウム 8.77g
無水リン酸水素二ナトリウム 5.68g
リン酸二水素ナトリウム二水和塩 40.56g

水
牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して、pHを6.0に調整する。 残 量

付記7 FITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体
FITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩液で濃度を調整して使用する。

付記8 ローダミン標識抗猫白血病ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体
ローダミン標識抗白血病ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩液で濃度を調整して使用する。

付記9 捕捉用抗猫カリシウイルス抗体
猫を猫カリシウイルスG1株で免疫して得た血清であって、炭酸ナトリウム緩衝液（付記16）で至適濃度に希釈して使用する。－20℃で保存し、凍結融解は避ける。

付記10 TNE緩衝液
1,000mL中
塩化ナトリウム 8.77g
トリス 1.21g
ポリソルベート20 1mL
精製水 残 量
pHを7.5±0.2に調整する。

付記11 ELISA用緩衝液
1,000mL中
トリス 2.42g
塩化ナトリウム 8.77g
牛血清アルブミン 10g
ポリソルベート20 0.5mL
pHを7.2に調整する。

付記12 猫カリシウイルス抗原定量ELISA参照品
猫カリシウイルスG1株又は431株を含有する濃縮精製抗原、又は凍結乾燥ワクチン（G1株及び431株）を注射用水で溶解したものであって、抗原量が明らかなもの。
本ELISAで抗原量を測定するとき、所定の抗原量を示さなければならない。

付記13 猫カリシウイルス抗原定量ELISA用モノクローナル抗体
ベルオキシダーゼ標識抗猫カリシウイルスp66モノクローナル抗体

付記14 基質液
本ELISAに適当なテトラメチルベンジジン溶液

付記15	<u>反応停止液</u> <u>0.5mol/L硫酸液</u>	
付記16	<u>炭酸ナトリウム緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> <u>炭酸ナトリウム</u> <u>炭酸水素ナトリウム</u> <u>水</u> <u>pHを9.6に調整する。</u> <u>アジ化ナトリウム0.2gを加えてもよい。</u>	 1.59g 2.93g 残量

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症3価・猫汎白血球減少症・猫白血病（組換え型）・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症3価・猫汎白血球減少症・猫白血病（組換え型）・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.7.2、3.7.4及び3.7.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、中間製品について同基準の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症3価・猫汎白血球減少症・猫白血病（組換え型）・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ミンクウイルス性腸炎（アジュバント加）不 活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のミンクウイルス性腸炎（アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.3 及び3.4.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ミンクジステンパー生ワクチン</u> <u>動生剤基準のミンクジステンパー生ワクチンの3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ミンクボツリヌス症（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のミンクボツリヌス症（アジュバント加）不活化ワクチンの3.3.3及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>緑膿菌感染症全菌体不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準の緑膿菌感染症全菌体不活化ワクチンの3.3.3及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>ミンクウイルス性腸炎・ミンクボツリヌス症 混合（アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>動生剤基準のミンクウイルス性腸炎・ミンクボツリヌス症混合（アジュバント 加）不活化ワクチンの3.5.3及び3.5.7に規定するところにより、これらに規定する 試験を行うものとする</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>カナリア痘生ワクチン</u> <u>動生剤基準のカナリア痘生ワクチンの3.3.2、3.3.3、3.3.4及び3.3.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>牛コロナウイルス感染症（アジュバント加） 不活化ワクチン（シード）</u> <u>動生剤基準のシードロット規格に適合した牛コロナウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を濃縮した後、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> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 力価試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.2.1.3 赤血球凝集（HA）抗原</u> <u>HmLu-1細胞で増殖させた牛コロナウイルスNo.66/HL株であって、赤血球凝集価が64倍以上のものを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.5mL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7日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制（以下この項において「HI」という。）試験を行う。</u> <u>非働化した被検血清0.2mLに25w/v%カオリン加生理食塩液（付記1）0.8mLを加え、常温で20分間処理した後、1,700G、10分間遠心し、その上清に0.1w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液（付記2）で濃度を調整した1 vol%マウス赤血球浮遊液を等量加え、よく混合した後、常温で20分間処理し、1,700G、10分間遠心し、その上清を試料とする。</u> <u>試料0.2mLを0.1w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液0.2mLで2倍階段希釈し、各希釈液に4単位のHA抗原を0.2mL加え、37℃で60分間処理する。それに0.1w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液に浮遊させた1 vol%マウス赤血球浮遊液を0.2mL加え、常温で1～2時間静置し、観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>赤血球の凝集を阻止した血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。</u> <u>HI抗体価160倍以上をHI抗体陽性とする。</u> <u>試験動物のHI抗体陽性率は、80%以上でなければならない。</u> <u>2 中間製品の試験</u>

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 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。

2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を培養瓶に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

2.1.2 試験方法

試料の全量を 1 mLにつき 3 cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液（付記 3）を加え、37℃で 7 日間培養し、観察する。

2.1.3 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。

付記 1 25w/v%カオリン加生理食塩液

1,000mL中

カオリン

250g

塩化ナトリウム

8.75g

水

残 量

水酸化ナトリウム溶液でpHを7.2～7.4に調整する。

付記 2 0.1w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液

A液 5 w/v%牛血清アルブミン溶液

100mL中

牛血清アルブミン

5.0g

水

残 量

使用時に、リン酸緩衝食塩液196mLにA液 4 mLを加えて調製する。

付記 3 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

2.95g

ブドウ糖

1.0g

グルタミン酸ナトリウム

5.0g

イースト・イクストラクト

0.5g

牛胎子血清

10～20mL

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。

牛胎子血清は、牛コロナウイルスに対する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。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>牛伝染性鼻気管炎・牛パラインフルエンザ混合生ワクチン（シード）</u> <u>シードロット基準に適合した弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス及び弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルスをそれぞれ同基準に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 ウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 試料</u> <u>試験品中の牛パラインフルエンザ3型ウイルスを抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（付記1）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（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.2.1.1.2 培養細胞</u> <u>牛腎株化NLBK-6細胞を96穴プレートに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.2.1.2 試験方法</u> <u>試料0.2mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。</u> <u>1.2.1.3 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>試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.0}TCID₅₀以上でなければならない。</u> <u>1.2.2 牛パラインフルエンザ3型ウイルス</u> <u>1.2.2.1 試験材料</u> <u>1.2.2.1.1 試料</u> <u>試験品中の牛伝染性鼻気管炎ウイルスを抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清（付記3）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。</u> <u>1.2.2.1.2 培養細胞</u> <u>牛腎株化NLBK-6細胞を96穴プレートに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.2.2.2 試験方法</u> <u>試料0.2mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、</u>

観察する。

1.2.2.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.2}TCID₅₀以上でなければならない。

付記1 抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清

牛パラインフルエンザ3型ウイルスRLB103株又は適当と認められた株で免疫した羊又は兎の血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記2 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

2.95g

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

牛伝染性鼻気管炎ウイルスRLB106株又は適当と認められた株で免疫した羊又は兎の血清であって、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 <u>アカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス 感染症・ピートンウイルス感染症混合（アジ ュバント加）不活化ワクチン（シード）</u> <u>シードロット規格に適合したアカバネウイルス、カสบウイルス、アイノウイ ルス及びピートンウイルスをそれぞれ同規格に適合した培養細胞で増殖させて得 たウイルス液を不活化し、混合した後、アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 力価試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.2.1.3 中和試験用ウイルス</u> <u>1.2.1.3.1 アカバネウイルス</u> <u>HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたアカバネウイルスE-24-KB</u> <u>株を用いる。</u> <u>1.2.1.3.2 カสบウイルス</u> <u>BHK-21（C-13）細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたカสบウイルス</u> <u>K-47-KB株を用いる。</u> <u>1.2.1.3.3 アイノウイルス</u> <u>HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたアイノウイルス</u> <u>JaNAr28-KB株を用いる。</u> <u>1.2.1.3.4 ピートンウイルス</u> <u>HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させたピートンウイルスNS/3-KB</u> <u>株を用いる。</u> <u>1.2.1.4 培養細胞</u> <u>HmLu-1細胞及びVero-T細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったもの</u> <u>を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.5mL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</u>

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（付記1）で2倍階段希釈する。
各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを等量混合し、アカバネウイルス、アイノウイルス及びピートンウイルスでは37℃で60分間、カスバウイルスでは90分間処理する。この各混合液0.1mLずつをアカバネウイルス、アイノウイルス及びピートンウイルスではそれぞれ4本のHmLu-1細胞に、カスバウイルスではそれぞれ4本のVero-T細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、アカバネウイルス、カスバウイルス及びピートンウイルスは37℃、アイノウイルスは34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

1.2.3 判定

培養細胞の2本以上に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。

アカバネウイルス及びピートンウイルスでは中和抗体価16倍以上、カスバウイルスでは中和抗体価32倍以上、アイノウイルスでは中和抗体価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、それぞれのウイルスに対して80%以上でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、それぞれ検体5mLずつを4℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞及びVero-T細胞を培養瓶に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

2.1.2 試験方法

2.1.2.1 不活化アカバネウイルス中間製品、不活化アイノウイルス中間製品及びピートンウイルス中間製品の試験

それぞれの試料の全量を1mLにつき3cm²以上のHmLu-1細胞に接種し、アカバネウイルス及びピートンウイルスでは37℃で、アイノウイルスでは34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、アカバネウイルス及びピートンウイルスでは37℃で、アイノウイルスでは34～36℃で7日間培養し、観察する。

2.1.2.2 不活化カスバウイルス中間製品の試験

試料の全量を1mLにつき3cm²以上のVero-T細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養した後、細胞を次代に継代する。単層形成後に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養した後、更に次代に継代し、2代目と同様の方法で培養し、観察する。

2.1.3 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。

それぞれの検体に活性ウイルスを認めてはならない。

付記 1	<u>ウイルス増殖用培養液</u>	
	<u>1,000mL中</u>	
	<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95g</u>
	<u>グルタミン酸ナトリウム</u>	<u>5.0g</u>
	<u>ブドウ糖</u>	<u>1.0g</u>
	<u>酵母エキス</u>	<u>0.5g</u>
	<u>牛血清</u>	<u>10～20mL</u>
	<u>イーグルMEM</u>	<u>残 量</u>
	<u>炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。</u>	
	<u>牛血清は、アカバネウイルス、カスバウイルス、アイノウイルス及びピー</u>	
	<u>トンウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。</u>	
	<u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u>	

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>牛レプトスピラ病（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</u> <u>シードロット規格に適合したレプトスピラ・ボルグピータセニイ血清型ハージョ（以下この項において「レプトスピラ・ハージョ」という。）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ワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、体重測定は4日目に行う。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品をリン酸緩衝食塩液で10倍希釈したものを注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>体重約300gのモルモットを用いる。</u> <u>1.3.1.3 凝集反应用菌液</u> <u>レプトスピラ凝集反应用菌液（付記 1）を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>注射材料 1 mL ずつを10匹のモルモットの頸部皮下に 7 日間隔で 2 回注射する。</u> <u>2 回目注射後14日目に得られた各個体の血清について、レプトスピラ・ハージョに対する凝集抗体価を、レプトスピラ凝集反应用菌液を用いて、マイクロブレート生菌凝集反応により測定する。</u> <u>被検血清、参照陽性血清（付記 2）及び参照陰性血清（付記 3）を56℃で30分間処理する。これを96穴平底マイクロプレートを用いて、力価試験用EMJH基礎培地（付記 4）で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液50μLに凝集反应用菌液を等量ずつ加え、30℃で 2 ～ 4 時間処理する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>プレートの各穴を暗視野顕微鏡で観察し、菌の凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。凝集抗体価が32倍以上のとき、凝集抗体陽性とする。</u> <u>試験動物の凝集抗体陽性率は、70%以上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。</u> <u>付記 1 レプトスピラ凝集反应用菌液</u>

レプトスピラ・ハージョ凍結保存菌液（付記5）から調製したものを新鮮生菌浮遊液とする。

凍結保存菌液を速やかに融解し、変法EMJH培地（付記6）に接種し、30℃、40回転/分で振とう培養する。必要に応じて継代した後、培養後4～8日目の培養液を265Gで10分間遠心した上清を採取し、波長600nmで透過率を測定する。力価試験用EMJH基礎培地で透過率87～88T%（約2×10⁸個/mL）に調整したものを生菌浮遊液とする。

レプトスピラ凝集反応用菌液及び凍結保存菌液は、病原性レプトスピラであるレプトスピラ・ボルグピータセニイに分類される菌株の浮遊液であり、試験者の安全性を確保し、また、環境への漏出を防止するため、取扱いには注意すること。

付記2 参照陽性血清
レプトスピラ・ハージョ181株又はこれと同等の抗原性を示す株をモルモットに免疫して得られた血清であって、レプトスピラ・ハージョ181株又はこれと同等の抗原性を示す株に対して凝集価32倍を示すように濃度を調整したもの。小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記3 参照陰性血清
非免疫のモルモット血清であって、レプトスピラ・ハージョに対する凝集抗体価が2倍未満のもの。小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記4 力価試験用EMJH基礎培地
900mL中
レプトスピラ・メディウムベースEMJH 2.3g
水 残量
pHを7.5±0.2に調整した後、121℃で15分間高压滅菌する。

付記5 レプトスピラ・ハージョ凍結保存菌液
レプトスピラ・ハージョ181株又はこれと同等の抗原性を示す株を変法EMJH培地で培養した培養菌液にグリセリンを10%加えたもの。小分けして-70℃以下で保存する。

付記6 変法EMJH培地
1,000mL中
EMJH基礎溶液（付記7） 50mL
アルブミン溶液（付記8） 900mL
水 残量
pHを7.5±0.1に調整した後、ろ過滅菌する。

付記7 EMJH基礎溶液
50mL中
N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン 1.2g
塩化アンモニウム 0.225g
塩化ナトリウム 0.9g

改正後	改正前										
ワクチン（シードロット製剤）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>牛クロストリジウム・ボツリヌス（C・D型） 感染症（アジュバント加）トキシイド（シード）</u> <u>クロストリジウム・ボツリヌスC型菌及びD型菌の培養菌液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シイドである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、注射後の体重測定は、5 日目とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>約 4 週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物20匹を試験群とし、10匹を対照群とする。</u> <u>注射材料0.2mLずつを 3 週間隔で 2 回、試験群の天腿部筋肉内に注射する。第 2 回目の注射後 2 週間後に、20LD₅₀/0.5mLになるように希釈液（付記 1）で調製したボツリヌスC型毒素及びD型毒素を、それぞれ試験群のマウス10匹及び対照群のマウス 5 匹の腹腔に0.5mLずつ注射し、7 日間観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>試験群においては、いずれも80%以上のマウスが生残しなければならず、対照群においては、すべてのマウスが死亡しなければならない。</u> <u>付記 1 希釈液</u> <table><tr><td>1,000mL 中</td><td></td></tr><tr><td>りん酸二水素ナトリウム二水和物</td><td>2.80g</td></tr><tr><td>りん酸水素二ナトリウム・12水</td><td>0.70g</td></tr><tr><td>ゼラチン</td><td>2.0g</td></tr><tr><td>水</td><td>残 量</td></tr></table> <u>pHを6.0～6.2に調整し、121℃で15分間高压滅菌する。</u>	1,000mL 中		りん酸二水素ナトリウム二水和物	2.80g	りん酸水素二ナトリウム・12水	0.70g	ゼラチン	2.0g	水	残 量
1,000mL 中											
りん酸二水素ナトリウム二水和物	2.80g										
りん酸水素二ナトリウム・12水	0.70g										
ゼラチン	2.0g										
水	残 量										

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>豚サーコウイルス（２型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）（シード）</u> <u>動生剤基準のシードロット規格に適合した豚サーコウイルス（２型）を同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したもので、使用時に油性アジュバントを含む懸濁用液と混和して調製するワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品を試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培養細胞</u> <u>PPK-3F細胞を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>細胞増殖用培養液（付記１）で適当な濃度に調整した培養細胞浮遊液30mLに試料1.5mLを接種し、37℃で１日培養後グルコサミン処理培地（付記２）を7～8 mL加え、37℃で15分間静置した後、上清を除去し、ウイルス増殖用培養液（付記３）を加えて処理し、３日間培養する。培養細胞を2～3回凍結融解し、遠心して得た上清15mLを細胞浮遊液に同様に接種、培養、処理した後、ろ過した液を新たな細胞浮遊液に等量加え、37℃で4日間培養した細胞について豚サーコウイルス（２型）（以下この項において「PCV2」という。）モノクローナル抗体（付記４）による蛍光抗体法を行う。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>6～7週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物10匹のそれぞれの頸部皮下に注射材料を0.2mLずつ注射し、注射21日後に得られた各個体の血清についてELISAにより抗体価を測定する。</u> <u>希釈用96穴プレートにDLE/SD緩衝液（付記５）を各穴に80μLずつ分注し、</u>

DLE/SD緩衝液で5倍に希釈した各被検血清、参照陽性血清（付記6）及び参照陰性血清（付記7）をそれぞれ80μL加え、2倍階段希釈する。抗原液（付記8）を各穴に等量加え、4℃で1夜静置して処理する。この抗原・抗体反応液を100μLずつ固相化プレート（付記9）の各穴に加え、37℃で3時間感作し、洗浄液（付記10）300μLで洗浄した後、抗体価測定ELISA用標識抗体（付記11）を各穴に100μLずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液300μLで3回洗浄し、各穴に基質液（付記12）を100μLずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。0.5mol/L硫酸液を各穴に50μLずつ加え、反応を停止させる。主波長450nm、副波長630nmの2波長で吸光度（OD）を測定し、以下の計算式によりOD₅₀を示した血清の希釈倍率を抗体価とする。

$$OD_{50} = (OD_{min} + OD_{max}) / 2$$

OD_{min}：参照陽性血清の最低希釈倍数におけるODの平均

OD_{max}：320倍から2,560倍まで希釈した参照陰性血清のODの平均

$$\text{抗体価} (\log_{10}) = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き：ODと血清希釈倍数の対数についてOD₅₀を挟む2点の回帰直線における定数及び傾き

1.3.3 判定

試験動物の抗体価の実数は幾何平均で72倍以上でなければならない。この際、参照陽性血清の抗体価は所定の値を示し、参照陰性血清のそれは20倍以下でなければならない。

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	2.95g
牛胎子血清	100mL
イーグルMEM	残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6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 グルコサミン処理培地

1,000mL中	
d-グルコサミン	65g
ハンクス199培地	残 量

付記3 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	2.95g
牛胎子血清	20mL
イーグルMEM	残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6に調整する。	
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記4 PCV2モノクローナル抗体

PCV2オープンリーディングフレーム2（以下この項において「PCV2ORF2」という。）を認識するモノクローナル抗体

付記 5	<u>DLE/SD緩衝液</u> <u>1,000mL中</u> トリス 塩化ナトリウム EDTA ポリソルベート20 水 <u>pHを7.0に調整する。</u>	 1.21g 8.77g 3.72g 1mL <u>残 量</u>
付記 6	参照陽性血清 <u>標準陽性血清（付記13）と同様の方法で作成した血清であって、標準血清を用いて1.4.2を準用したELISA（以下この項において「力価試験のELISA」という。）で測定したとき、2倍階段希釈の3段階目から5段階目までにOD₅₀を示すようにDLE/SD緩衝液で希釈して用いる。</u>	
付記 7	参照陰性血清 <u>SPFマウスから得られた血清であって、力価試験のELISAで測定したとき抗体価が20（1.30log₁₀）倍以下のもの。</u>	
付記 8	抗原液 <u>PK15細胞で培養したPCV21010-25株を超音波処理し、遠心した後、β-プロピオラクトンで不活化したもので、標準陽性血清を用いて力価試験のELISAで測定したとき、標準血清が所定の抗体価を示すようにDLE/SD緩衝液で希釈して用いる。</u>	
付記 9	固相化プレート <u>抗体価測定ELISA用捕捉抗体（付記14）を120μLずつ96穴ELISAプレートに分注し、4℃で1夜静置する。洗浄液で3回洗浄し、ブロッキング液（付記15）を200μLずつ加え、37℃で60分間反応させ、洗浄液で3回洗浄したもの。</u>	
付記10	<u>洗浄液</u> <u>1,000mL中</u> トリス 塩化ナトリウム ポリソルベート20 水 <u>pHを7.3～7.7に調整する。</u>	 1.21g 8.77g 1mL <u>残 量</u>
付記11	抗体価測定ELISA用標識抗体 <u>PCV2ORF2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PCV21902B1BCを接種したヌードマウスの腹水を精製し、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した後、15w/v%サッカリン加リン酸緩衝食塩液で濃度を調整したものであって、標準陽性血清を用いて力価試験のELISAで</u>	

測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すようにDLE/SD緩衝液で希釈して用いる。

付記12 基質液
適当な規格のテトラメチルベンチジン溶液

付記13 標準陽性血清
マウスをPCV2感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）で2回免疫後35日目に得られたブール血清であって、力価試験のELISAで測定したとき、抗体価4,000～10,000倍を示すもの。

付記14 抗体価測定ELISA用捕捉抗体
PCV2ORF2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PCV21903A8BCを接種したヌードマウスの腹水を精製し、15w/v%サッカリン加リン酸緩衝食塩液で濃度を調整したもので、標準陽性血清を用いて力価試験のELISAで測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように炭酸ナトリウム緩衝液（付記16）で希釈して用いる。

付記15 ブロッキング液
リン酸緩衝食塩液に植物性ポリペプトンを1 w/v%加えたもの。

付記16 炭酸ナトリウム緩衝液
1,000mL中
塩化ナトリウム 1.59g
炭酸水素ナトリウム 2.93g
アジ化ナトリウム 0.2g
水 残 量
pHを9.6に調整する。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>豚パルボウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</u> <u>動生剤基準のシードロット規格に適合した豚パルボウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品10mLに等量のクロロホルムを加え、よく混和した後、遠心分離した水層の 5 mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液で4℃で1夜透析したものを試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培養細胞</u> <u>PK-15細胞を培養瓶で培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試料の全量を 1 mLにつき 3 cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させる。試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液（付記 1）を加え、37℃で10日間培養した後、培養上清にベロナール緩衝食塩液（以下この項において「VBS－」という。）（付記 2）で濃度を調整した0.5vol%の非凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液を等量加え、室温で60分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>赤血球の凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。</u> <u>試料に活性ウイルスを認めてはならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、注射量は、0.4mLとする。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.4.1.2 試験動物</u> <u>体重約300gのモルモットを用いる。</u>

1.4.1.3	赤血球凝集抗原
	豚パルボウイルス90HS株又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原（付記3）を用いる。
1.4.2	試験方法
	注射材料2mLずつを、5匹の試験動物の皮下に注射し、28日目に得られた各個体の血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。
	被検血清をVBSーで5倍に希釈し、等量の25w/v%カオリン液を加え、室温で20分間処理する。
	遠心後の上清に鶏又はモルモットの赤血球を加え、室温で15分間処理し、再度遠心し、上清を採取する。これをVBSーで2倍階段希釈し、各段階の希釈液に8単位の赤血球凝集抗原を等量加え、4℃で1夜処理する。これにVBSーで濃度を調整した0.5vol%の非凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液を加え、室温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。
1.4.3	判定
	赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。試験動物の赤血球凝集抑制抗体価の幾何平均は、80倍以上でなければならない。
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2.95g
	牛胎子血清又は牛血清アルブミン20mL又は1.1g
	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。
	必要最少量の抗生物質を加えてもよい。
付記2	ペロナール緩衝食塩液（pH7.2）
	1,000mL中
	バルビタール0.575g
	バルビタールナトリウム0.375g
	塩化ナトリウム8.5g
	水残量
付記3	赤血球凝集抗原
	豚パルボウイルス90HS株又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原であって、赤血球凝集価が64倍以上のもの。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>豚繁殖・呼吸障害症候群 2 価生ワクチン（シード）</u> <u>2 種類の弱毒豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 ウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品を抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス血清（付記 1）のそれぞれの血清で中和したものをウイルス増殖用培養液（付記 2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液をそれぞれ試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培養細胞</u> <u>MARCI45細胞を96穴プレートに培養し、単層となったものを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試料0.1mLずつをそれぞれ10穴以上の培養細胞に接種し、37℃で 8 日間培養し観察する。</u> <u>1.2.3 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>試験品のそれぞれのウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{3.0} TCID₅₀以上でなければならない。</u> <u>1.3 安全試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>3 ～ 4 週齢の豚を用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>注射材料 1 頭分ずつを 3 頭の試験動物の頸部筋肉内に注射し、14日間観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>観察期間中、異常を認めてはならない。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 試験動物</u>

1.3の試験に用いた動物を用いる。

1.4.1.2 中和試験用ウイルス
MARCI45細胞で増殖させた弱毒豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスKKM-33株及びKCI-97137株を用いる。

1.4.1.3 培養細胞
MARCI45細胞を96穴プレートに培養し、単層となったものを用いる。

1.4.2 試験方法
1.3の試験終了後28日目に得られた各個体の血清について、補体要求性中和試験を行う。
各被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各段階の希釈血清100μLと、10vol%モルモット新鮮血清を加えたウイルス増殖用培養液（以下この項において「モルモット血清加ウイルス増殖用培養液」という。）で200TCID₅₀/50μLに調整したそれぞれの中和試験用ウイルス液100μLを混合し、2～5℃で24時間処理する。この各混合液50μLずつを4穴の培養細胞に接種し、37℃で1時間吸着後、リン酸緩衝食塩液で細胞を一回洗浄し、モルモット血清加ウイルス増殖用培養液を50μLずつ加え、37℃、5 vol%炭酸ガス下で5日間培養する。

1.4.3 判定
培養細胞の2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。
試験動物の両ウイルス株に対する中和抗体価は、3頭中2頭以上で両株とも2倍以上でなければならない。

付記 1 抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス血清
弱毒豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスKKM-33株及びKCI-97137株でそれぞれ免疫した豚の血清であって、それぞれ10^{2.0}TCID₅₀/mLのKKM-33株及びKCI-97137株のウイルスを37℃、1時間の感作で完全に中和する力価を有するもの。
ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記 2 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 2.95g
牛血清アルブミン 2.0g
イーグルMEM 残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.5に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

改正後	改正前												
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 豚丹毒全菌体（油性アジュバント加）不活化ワ クチン（シード） <u>豚丹毒菌の培養菌液を不活化し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、</u> <u>注射後の体重測定は5日目とする。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.3.1.2 試験動物</u> <u>5週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.3.1.3 攻撃用菌液</u> <u>豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記）に接種し、37℃で14</u> <u>～20時間培養する。これを普通ブイヨンで1mL中10⁶個の菌</u> <u>量になるように希釈したものを攻撃用菌液とする。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試験動物10匹を試験群とし、10匹を対照群とする。</u> <u>注射材料0.5mLずつを試験群の内股部皮下に注射する。注射後3週目に、攻撃用菌液を試験群及</u> <u>び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、7日間観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>試験群においては、70%以上が経過生存しなければならない。この場合、対照群においては、90</u> <u>%以上が死亡しなければならない。</u> <u>付記 攻撃菌用培地</u> <table><tr><td><u>1,000mL中</u></td><td></td></tr><tr><td><u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u></td><td><u>30g</u></td></tr><tr><td><u>プロテオーゼペプトンNo.3</u></td><td><u>10g</u></td></tr><tr><td><u>ポリソルベート80</u></td><td><u>1mL</u></td></tr><tr><td><u>水</u></td><td><u>残 量</u></td></tr><tr><td><u>121℃で15分間高圧滅菌する。</u></td><td></td></tr></table>	<u>1,000mL中</u>		<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>30g</u>	<u>プロテオーゼペプトンNo.3</u>	<u>10g</u>	<u>ポリソルベート80</u>	<u>1mL</u>	<u>水</u>	<u>残 量</u>	<u>121℃で15分間高圧滅菌する。</u>	
<u>1,000mL中</u>													
<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>30g</u>												
<u>プロテオーゼペプトンNo.3</u>	<u>10g</u>												
<u>ポリソルベート80</u>	<u>1mL</u>												
<u>水</u>	<u>残 量</u>												
<u>121℃で15分間高圧滅菌する。</u>													

--	--

(下線部分は改正部分)

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>豚インフルエンザ・豚パストツレラ症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</u> <u>動生剤基準のシードロット規格に適合した豚インフルエンザウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を不活化したもの、パストツレラ・ムルトシダ（以下この項において「Pm」という。）の培養上清を濃縮し、遠心して得た上清を不活化したもの及び同規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエ（以下この項において「Mhp」という。）の培養菌液を不活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ワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 無毒化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>体重約350gのモルモットを用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>注射材料0.1mLずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、10日間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>注射反応は無視し得る程度以下でなければならない、試験動物は全て生存しなければならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、注射量は0.2mLとし、注射後の体重測定は 6 日目とする。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 豚インフルエンザ力価試験</u> <u>1.4.1.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.4.1.1.2 試験動物</u> <u>5 週齢のマウスを用いる。</u> <u>1.4.1.1.3 赤血球凝集抗原</u> <u>試験品に含まれるそれぞれのウイルス株と同一タイプのウイルスで調製した赤血球凝集抗原（付記 1）を用いる。</u>

1.4.1.2 試験方法

試験動物30匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料の0.2mLずつを2週間隔で2回、試験群の脚部筋肉内に注射する。2回目の注射後2週目に得られた各個体の血清を群ごとに5匹分ずつプールし、試験群として6プール血清を得ると共に、対照群として2プール血清を得る。

得られた各プール血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清をRDE及び鶏赤血球で処理する。これをリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈液0.2mLに0.2mL中8単位の赤血球凝集抗原を等量加え、室温で60分間処理する。これに0.5vol%鶏赤血球浮遊液を0.4mLずつ加え、室温に60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.1.3 判定

赤血球の凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、6プール血清中4プール血清以上が8倍以上でなければならない。この場合、対照群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、4倍未満でなければならない。

1.4.2 豚バスタツレラ症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

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

Pm皮膚壊死毒素（以下この項において「PMT」という。）抗原（付記2）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

1.4.1.2の試験で得られた各プール血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、PMT参照陽性血清（付記3）及びPMT参照陰性血清（付記4）を希釈・洗浄液（付記5）で4倍希釈したものを2倍階段希釈し、各段階の希釈液をPMT抗原吸着プレート（付記6）の各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体（付記7）を各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液（付記8）を各穴に100 μ Lずつ加え、遮光して30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。停止液（付記9）を各穴に50 μ Lずつ加え、反応を停止させる。主波長492nm、副波長630nmの2波長で吸光度を測定し、これらの差をELISA値とする。

1.4.2.3 判定

ELISA値が0.5以上を示す血清の最高希釈倍数を抗PMT抗体価とする。

試験群のプール血清の抗PMT抗体価は、6プール血清中4プール血清以上がPMT参照陽性血清の示す抗PMT抗体価以上でなければならない。この場合、対照群のプール血清の抗PMT抗体価は、4倍未満でなければならない。また、PMT参照陽性血清の抗PMT抗体価は、8～32倍を示さなければならない。PMT参照陰性血清の抗PMT抗体価は、4倍未満でなければならない。

1.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

1.4.3.1.2 ELISA用抗原

Mhp-ELISA抗原（付記10）を用いる。

1.4.3.2 試験方法

1.4.1.2の試験で得られた各プール血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各プール血清、Mhp参照陽性血清（付記11）及びMhp参照穴に100 μ Lずつ加え、37℃で1時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、遮光して30℃で30分間反応させる。停止液を各穴に50 μ Lずつ加えて反応を停止させる。主波長492nm、副波長630nm 2波長で吸光度を測定し、これらの差をELISA値とする。

1.4.3.3 判定

それぞれ6穴のELISA値の平均を抗Mhp抗体価とする。

試験群のプール血清の抗Mhp抗体価は、6プール血清中4プール血清がMhp参照陽性血清の示す抗Mhp抗体価以上の値を示さなければならない。この場合、対照群のプール血清の抗Mhp抗体価は、0.15未満でなければならない。また、Mhp参照陽性血清の抗Mhp抗体価は、0.45以上を示さなければならない、Mhp参照陰性血清の抗Mhp抗体価は、0.15未満でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 注射材料

不活化した2種類の豚インフルエンザウイルスの混合液を注射材料とする。

2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の10～12日齢のものを用いる。

2.1.2 試験方法

注射材料0.2mLずつを4個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、36～37℃で培養し、3日間隔で尿膜腔液を2代まで継代する。2代目の尿膜腔液に0.5vol%の鶏の赤血球浮遊液を等量加え、室温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

ただし、赤血球凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量に混合して3代まで継代し、3代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後、判定する。

2.1.3 判定

赤血球凝集を認めない場合には、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。

付記 1 赤血球凝集抗原

豚インフルエンザウイルスA型A/swine/京都/3/79（H1N1）株及び豚インフルエンザウイルスA型A/swine/和田山/5/69（H3N2）株を用いて、それぞれ調製した赤血球凝集抗原

付記 2 PMT抗原

パスツレラ・ムルトシダB-45株の培養上清を限外ろ過により濃縮した後、ハイドロキシアパタイトカラムで分画し、ホルマリンで不活化し、得られた皮膚壊死毒素活性を持つ抗原であって、B-45株培養上清免疫モルモットの血清を用いてウェスタンブロッティングを行う場合に、150kDa付近に単一なバンドを認め、そのたん白量を測定するとき、30～100 μ g/mLを示すもの。

- 付記3 PMT参照陽性血清
PmB-45株の培養上清濃縮液をマウスに免疫して得られた血清であって、抗PMT抗体価8～32倍を示すものであり、凍結保存する。
- 付記4 PMT参照陰性血清
健康なマウスから採血した血清であって、抗PMT抗体価4倍未満を示すものであり、凍結保存する。
- 付記5 希釈・洗浄液
1,000mL中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9g
リン酸二水素カリウム	0.2g
塩化ナトリウム	8.0g
塩化カリウム	0.2g
ポリソルベート20	0.5mL
水	残量

pHを7.2～7.4に調整する。
- 付記6 PMT抗原吸着プレート
PMT抗原を炭酸緩衝液（付記14）でたん白濃度0.005～0.01mg/mLに希釈し、ELISA用プレート（U字型）の各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2 w/v%牛血清アルブミン溶液（付記15）を各穴に250 μ Lずつ加え、37℃で1時間感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの。
- 付記7 標識抗体
西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を希釈・洗浄液で希釈したもの。
- 付記8 基質液
o-フェニレンジアミン二塩酸塩40mgをリン酸クエン酸緩衝液（付記16）100mLに溶解し、遮光したものに、使用直前に過酸化水素水を0.04mL添加したもの。
- 付記9 停止液
濃硫酸56.1mLを正確に量り、精製水440mL中に攪拌冷却しながら溶解し、更に水を加えて500mLとしたもの。
- 付記10 Mhp-ELISA抗原
MhpM-21株の振とう培養菌液を遠心集菌し、TNF液（付記17）で菌体を洗浄した後、洗浄菌体をたん白濃度が10mg/mLとなるように濃度を調整したもの。
- 付記11 Mhp参照陽性血清

MhpM-21株の不活化全菌体をマウスに免疫して得られた血清であって、抗Mhp抗体価0.45以上を示すものであり、凍結保存する。

付記12 Mhp参照陰性血清
健康なマウスから採血した血清であって、抗Mhp抗体価0.15未満を示すものであり、凍結保存する。

付記13 Mhp-ELISA抗原吸着プレート
Mhp-ELISA抗原を炭酸緩衝液でたん白濃度が0.05～0.1mg/mLとなるように希釈し、ELISA用プレート（U字型）の各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2 w/v%牛血清アルブミン溶液を各穴に250 μ Lずつ加え、37℃で1時間感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの。

付記14 炭酸緩衝液
1,000mL中
炭酸ナトリウム 1.59g
炭酸水素ナトリウム 2.93g
水 残 量
pHを9.6に調整し、4℃に保存する。

付記15 2 w/v%牛血清アルブミン溶液
牛血清アルブミン2 gを希釈・洗浄液100mLで使用直前に溶解したもの。

付記16 リン酸クエン酸緩衝液
1,000mL中
無水クエン酸 4.67g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95g
水 残 量
pHを5.0に調整する。

付記17 TNF液
1,000mL中
塩化ナトリウム 14.6g
エデト酸ナトリウム 3.72g
トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.94g
水 残 量

(下線部分は改正部分)

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード）</u> <u>動生剤基準の鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード）の3.5.4から3.5.7までに規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

(下線部分は改正部分)

改正後	改正前														
ワクチン（シードロット製剤）の部 （削る）	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>鶏伝染性ファブリキウス嚢病凍結生ワクチン（シード）</u> <u>シードロット規格に適合した弱毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを同規格に適合した鶏胚初代細胞で増殖させて得た感染細胞浮遊液を凍結したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 マイコプラズマ否定試験</u> <u>一般試験法のマイコプラズマ否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.3 ウイルス含有量試験</u> <u>1.3.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1 試料</u> <u>試験品を細胞維持用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。</u> <u>1.3.1.2 培養細胞</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格2.1.1に適合した鶏胚初代細胞を培養し、単層となつたものを用いる。</u> <u>1.3.2 試験方法</u> <u>試料の0.2mLずつを4枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、細胞維持用培養液を加え、37℃で6日間培養し、観察する。</u> <u>1.3.3 判定</u> <u>培養細胞にCPEを認めた場合を感染とみなし、TCID₅₀を算出する。</u> <u>試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり10^{6.0}TCID₅₀以上でなければならない。</u> <u>付記 細胞維持用培養液</u> <table><tr><td><u>1,000mL中</u></td><td></td></tr><tr><td><u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u></td><td><u>2.95g</u></td></tr><tr><td><u>牛血清</u></td><td><u>20mL</u></td></tr><tr><td><u>L-グルタミン</u></td><td><u>0.30g</u></td></tr><tr><td><u>イーグルMEM</u></td><td><u>残 量</u></td></tr><tr><td><u>炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.4に調整する。</u></td><td></td></tr><tr><td><u>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</u></td><td></td></tr></table>	<u>1,000mL中</u>		<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95g</u>	<u>牛血清</u>	<u>20mL</u>	<u>L-グルタミン</u>	<u>0.30g</u>	<u>イーグルMEM</u>	<u>残 量</u>	<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>	
<u>1,000mL中</u>															
<u>トリプトース・ホスフェイト・ブロス</u>	<u>2.95g</u>														
<u>牛血清</u>	<u>20mL</u>														
<u>L-グルタミン</u>	<u>0.30g</u>														
<u>イーグルMEM</u>	<u>残 量</u>														
<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>															

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>鶏サルモネラ症（サルモネラ・インファンティス・サルモネラ・エンテリティディス・サルモネラ・ティフィムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</u> <u>シードロット規格に適合したサルモネラ・インファンティス（以下この項において「SI」という。）、サルモネラ・エンテリティディス（以下この項において「SE」という。）及びサルモネラ・ティフィムリウム（以下この項において「ST」という。）のそれぞれの培養菌液を不活化し、濃縮したものに油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 力価試験</u> <u>1.2.1 鶏サルモネラ症（SI）力価試験</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5～7 週齢の鶏を用いる。</u> <u>1.2.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原</u> <u>組換えSIべん毛抗原（付記 1）を用いる。</u> <u>1.2.1.2 試験方法</u> <u>試験動物の10羽を試験群、3 羽を対照群とする。</u> <u>注射材料 1 羽分ずつを、試験群の背側部皮下に注射する。注射後 4 週目に両群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。</u> <u>試験群及び対照群の各血清、SI参照陽性血清（付記 2）及び参照陰性血清（付記 3）を希釈・洗浄液（付記 4）で400倍希釈し、それぞれ組換えSIべん毛抗原吸着プレート（付記 5）4 穴に100 μLずつ加える。各プレートに、希釈・洗浄液のみの穴を 3 穴設け、ブランク穴とする。37℃で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記 6）を100 μLずつ加え、37℃で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄する。基質液（付記 7）を100 μLずつ加え、遮光して室温で15分間反応させた後、反応停止液（付記 8）を50 μLずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長492nmで測定する。</u> <u>1.2.1.3 判定</u>

各穴の吸光度からブランク穴の平均吸光度を引いた値を各穴の吸光度値とする。
それぞれの血清の4穴の吸光度値を比較し、最高値と最低値を除いた2穴の平均吸光度値を、それぞれの血清の吸光度値とし、試験群及び対照群の各血清の吸光度値をSI参照陽性血清の吸光度値で割った値を、それぞれの血清のELISA抗体価とする。

試験群のELISA抗体価の平均値は、0.25以上でなければならない。対照群のELISA抗体価は、いずれも0.1以下でなければならない。また、SI参照陽性血清の吸光度値は、0.8～1.2を示さなければならない。参照陰性血清の吸光度値は、0.1以下でなければならない。

1.2.2 鶏サルモネラ症（SE）力価試験

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試験動物

1.2.1の試験に使用した試験動物を用いる。

1.2.2.1.2 ELISA用抗原

SE精製べん毛抗原（付記9）を用いる。

1.2.2.2 試験方法

注射後4週目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、SE参照陽性血清（付記10）及び参照陰性血清を希釈・洗浄液で800倍希釈し、それぞれSE精製べん毛抗原吸着プレート（付記11）4穴に100 μ Lずつ加える。各プレートに、希釈・洗浄液のみの穴を3穴設け、ブランク穴とする。37℃で1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄する。基質液を100 μ Lずつ加え、遮光して室温で15分間反応させた後、反応停止液を50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長492nmで測定する。

1.2.2.3 判定

各穴の吸光度からブランク穴の平均吸光度を引いた値を各穴の吸光度値とする。
それぞれの血清の4穴の吸光度値を比較し、最高値と最低値を除いた2穴の平均吸光度値を、それぞれの血清の吸光度値とし、試験群及び対照群の各血清の吸光度値をSE参照陽性血清の吸光度値で割った値を、それぞれの血清のELISA抗体価とする。

試験群のELISA抗体価の平均値は、0.25以上でなければならない。対照群のELISA抗体価は、いずれも0.1以下でなければならない。また、SE参照陽性血清の吸光度値は、0.8～1.2を示さなければならない。参照陰性血清の吸光度値は、0.1以下でなければならない。

1.2.3 鶏サルモネラ症（ST）力価試験

1.2.3.1 試験材料

1.2.3.1.1 試験動物

1.2.1の試験に使用した試験動物を用いる。

1.2.3.1.2 ELISA用抗原

組換えSTべん毛抗原（付記12）を用いる。

1.2.3.2 試験方法

注射後4週目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、ST参照陽性血清（付記13）及び参照陰性血清を希

積・洗浄液で400倍希釈し、それぞれ組換えSTべん毛抗原吸着プレート（付記14）4穴に100 μ Lずつ加える。各プレートに、希釈・洗浄液のみの穴を3穴設け、ブランク穴とする。37℃で1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄する。基質液を100 μ Lずつ加え、遮光して室温で15分間反応させた後、反応停止液を50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長492nmで測定する。

1.2.3.3 判定

各穴の吸光度からブランク穴の平均吸光度を引いた値を各穴の吸光度値とする。それぞれの血清の4穴の吸光度値を比較し、最高値と最低値を除いた2穴の平均吸光度値を、それぞれの血清の吸光度値とし、試験群及び対照群の各血清の吸光度値をST参照陽性血清の吸光度値で割った値を、それぞれの血清のELISA抗体価とする。

試験群のELISA抗体価の平均値は、0.2以上でなければならない。対照群のELISA抗体価は、いずれも0.1以下でなければならない。また、ST参照陽性血清の吸光度値は、0.8～1.2を示さなければならない。参照陰性血清の吸光度値は、0.1以下でなければならない。

付記 1 組換えSIべん毛抗原

SII-178株のfliC遺伝子の一部を挿入したプラスミドで形質転換した大腸菌を超音波で破碎し、べん毛抗原をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した後、リン酸緩衝食塩液（付記15）で透析したもので、－80℃以下で保存する。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したとき、35～40KDaの位置にバンドを認める。1.3.1.2の試験によりELISAを行うとき、SI参照陽性血清の吸光度値が0.8～1.2、参照陰性血清の吸光度値が0.1以下を示し、使用時の蛋白質量が0.01～0.06 μ g/穴になるように炭酸緩衝液（付記16）で調整する。

付記 2 SI参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をSI I-178株で免疫して得た血清で、1.2.1.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.8～1.2を示し、1.2.2.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.25以下を示し、1.2.3.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.2以下を示す。凍結して－20℃以下で保存する。

付記 3 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏の血清で、1.2.1.2、1.2.2.2及び1.2.3.2の試験によりELISAを行うとき、いずれの試験においても吸光度値が0.1以下を示す。凍結して－20℃以下で保存する。

付記 4 希釈・洗浄液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.0g
塩化カリウム	0.2g
リン酸水素二ナトリウム	1.15g
リン酸二水素カリウム	0.3g

水 残 量
pHを7.2に調整後、ポリソルベート20を0.5mL添加する。

付記 5 組換えSIべん毛抗原吸着プレート
組換えSIべん毛抗原を炭酸緩衝液で希釈し、96穴プレートの各穴に100 μ L
ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、次に、各穴
に1 w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液（付記17）を200 μ Lずつ加え、37℃
で1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの

付記 6 酵素標識抗体
ペルオキシダーゼ標識抗鶏IgG（H+L）抗体で、1.2.1.2、1.2.2.2及び1.2.3.2
の試験によりELISAを行うとき、SI参照陽性血清、SE参照陽性血清及びST
参照陽性血清の吸光度値が0.8～1.2を示し、参照陰性血清の吸光度値が0.1以
下を示すように、希釈・洗浄液又は1 w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液で
調整したもの

付記 7 基質液
 σ -フェニレンジアミン二塩酸塩10mgをリン酸クエン酸緩衝液（付記18）
10mLに遮光して溶解し、使用直前に過酸化水素水10 μ Lを添加したもの

付記 8 反応停止液
1,000mL中
シュウ酸二水和物 28.02g
水 残 量

付記 9 SE精製べん毛抗原
SE E-926株の培養菌液に塩酸を加えた後、硫酸アンモニウムで沈殿させた
べん毛抗原をリン酸緩衝食塩液で透析したもので、-80℃以下で保存する。
1.2.2.2の試験によりELISAを行うとき、SE参照陽性血清の吸光度値が0.8～
1.2、参照陰性血清の吸光度値が0.1以下を示し、使用時の蛋白質量が0.01～0.2
 μ g/穴になるように炭酸緩衝液で調整する。

付記10 SE参照陽性血清
生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をSE E-926株で免疫して得た血
清で、1.2.1.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.25以下を示し、
1.2.2.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.8～1.2を示し、1.2.3.2の
試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.2以下を示す。凍結して-20℃
以下で保存する。

付記11 SE精製べん毛抗原吸着プレート
SE精製べん毛抗原を炭酸緩衝液で希釈し、96穴プレートの各穴に100 μ L
ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、次に、各穴
に1 w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液を200 μ Lずつ加え、37℃で1時間反
応させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの

付記12	組換えSTべん毛抗原 ST T-023株のfliC遺伝子の一部を挿入したプラスミドで形質転換した大腸菌を超音波で破碎し、べん毛抗原をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した後、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、-80°C以下で保存する。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したとき、$35\sim 40\text{KDa}$の位置にバンドを認める。1.2.3.2の試験によりELISAを行うとき、ST参照陽性血清の吸光度値が$0.8\sim 1.2$、参照陰性血清の吸光度値が0.1以下を示し、使用時の蛋白質量が$0.01\sim 0.06\mu\text{g/穴}$になるように炭酸緩衝液で調整する。												
付記13	ST参照陽性血清 生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をST T-023株で免疫して得た血清で、1.2.1.2及び1.2.2.2の試験によりELISAを行うとき、いずれも吸光度値が0.25以下を示し、1.2.3.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が$0.8\sim 1.2$を示す。凍結して-20°C以下で保存する。												
付記14	組換えSTべん毛抗原吸着プレート 組換えSTべん毛抗原を炭酸緩衝液で希釈し、96穴プレートの各穴に$100\mu\text{L}$ずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、次に、各穴に$1\text{ w/v\%}$スキムミルク加希釈・洗浄液を$200\mu\text{L}$ずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの												
付記15	リン酸緩衝食塩液 <table> <tr><td>1,000mL中</td><td></td></tr> <tr><td>塩化ナトリウム</td><td>8.0g</td></tr> <tr><td>塩化カリウム</td><td>0.2g</td></tr> <tr><td>リン酸水素二ナトリウム</td><td>1.15g</td></tr> <tr><td>リン酸二水素カリウム</td><td>0.2g</td></tr> <tr><td>水</td><td>残量</td></tr> </table> リン酸二水素カリウムでpHを$6.8\sim 7.4$に調整する。	1,000mL中		塩化ナトリウム	8.0g	塩化カリウム	0.2g	リン酸水素二ナトリウム	1.15g	リン酸二水素カリウム	0.2g	水	残量
1,000mL中													
塩化ナトリウム	8.0g												
塩化カリウム	0.2g												
リン酸水素二ナトリウム	1.15g												
リン酸二水素カリウム	0.2g												
水	残量												
付記16	炭酸緩衝液 <table> <tr><td>1,000mL中</td><td></td></tr> <tr><td>炭酸ナトリウム</td><td>1.59g</td></tr> <tr><td>炭酸水素ナトリウム</td><td>2.93g</td></tr> <tr><td>水</td><td>残量</td></tr> </table> pHを9.6に調整する。	1,000mL中		炭酸ナトリウム	1.59g	炭酸水素ナトリウム	2.93g	水	残量				
1,000mL中													
炭酸ナトリウム	1.59g												
炭酸水素ナトリウム	2.93g												
水	残量												
付記17	1 w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液 希釈・洗浄液にスキムミルクを$1\text{ w/v\%}$となるように加え、溶解したもの												
付記18	リン酸クエン酸緩衝液 <table> <tr><td>1,000mL中</td><td></td></tr> <tr><td>クエン酸一水和物</td><td>10.3g</td></tr> <tr><td>リン酸水素二ナトリウム</td><td>14.5g</td></tr> <tr><td>水</td><td>残量</td></tr> </table>	1,000mL中		クエン酸一水和物	10.3g	リン酸水素二ナトリウム	14.5g	水	残量				
1,000mL中													
クエン酸一水和物	10.3g												
リン酸水素二ナトリウム	14.5g												
水	残量												

pHを5.0に調整する。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>鶏サルモネラ症（サルモネラ・インファンティス抽出抗原・サルモネラ・エンテリティデイス抽出抗原・サルモネラ・ティフィムリウム抽出抗原）（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</u> <u>シードロット規格に適合したサルモネラ・インファンティス（以下この項において「SI」という。）、サルモネラ・エンテリティデイス（以下この項において「SE」という。）及びサルモネラ・ティフィムリウム（以下この項において「ST」という。）のそれぞれの培養菌液を不活化し、濃縮した後、破碎処理して得た抽出抗原に油性アジュバントを添加したものを混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 力価試験</u> <u>1.2.1 鶏サルモネラ症（SI）力価試験</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5～7週齢の鶏を用いる。</u> <u>1.2.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原</u> <u>SI LPS-ELISA抗原（付記1）を用いる。</u> <u>1.2.1.2 試験方法</u> <u>試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。</u> <u>注射材料1羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群と共に4週間飼育する。</u> <u>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、ELISAを行う。</u> <u>試験群及び対照群の各血清、SI参照陽性血清（付記2）及び参照陰性血清（付記3）を検体希釈液（付記4）で400倍に希釈し、それぞれSI LPS-ELISA抗原吸着プレート（付記5）2穴に50μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液（付記6）で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記7）を50μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液（付記8）を100μLずつ加え、</u>

遮光して25℃で反応させた後、反応停止液（付記9）を100μLずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長450nm及び副波長650nmで測定し、これらの差をELISA値とする。

1.2.1.3 判定

各血清のELISA値の平均値をSI参照陽性血清のELISA値の平均値で除したものを、各血清のELISA抗体価とする。

試験群のELISA抗体価の平均値は1.600以上でなければならず、対照群のELISA抗体価はいずれも0.200未満でなければならず、また、SI参照陽性血清のELISA値の平均値は0.800～1.300を示さなければならず、参照陰性血清のELISA値の平均値は0.200未満でなければならず、

1.2.2 鶏サルモネラ症（SE）力価試験

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試験動物

1.2.1の試験に使用した試験動物を用いる。

1.2.2.1.2 ELISA用抗原

SE LPS－ELISA抗原（付記10）を用いる。

1.2.2.2 試験方法

1.2.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、SE参照陽性血清（付記11）及び参照陰性血清をSE検体前処理液（付記12）で100倍希釈し、2～10℃で一夜反応させる。SE検体前処理液で処理した血清を検体希釈液で4倍に希釈し、それぞれSE LPS-ELISA抗原吸着プレート（付記13）2穴に50μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を50μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液を100μLずつ加え、遮光して25℃で反応させた後、反応停止液を100μLずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長450nm及び副波長650nmで測定し、これらの差をELISA値とする。

1.2.2.3 判定

各血清のELISA値をSE参照陽性血清のELISA値の平均値で除したものを、各血清のELISA抗体価とする。

試験群のELISA抗体価の平均値は1.347以上でなければならず、対照群のELISA抗体価はいずれも0.200未満でなければならず、また、SE参照陽性血清のELISA値の平均値は0.800～1.300を示さなければならず、参照陰性血清のELISA値の平均値は0.200未満でなければならず、

1.2.3 鶏サルモネラ症（ST）力価試験

1.2.3.1 試験材料

1.2.3.1.1 試験動物

1.2.1の試験に使用した試験動物を用いる。

1.2.3.1.2 ELISA用抗原

ST LPS－ELISA抗原（付記14）を用いる。

1.2.3.2 試験方法

1.2.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、ST参照陽性血清（付記15）及び参照陰性血清をST検体前処理液（付記16）で100倍希釈し、2～10℃で一夜反応させる。ST検体前処

理液で処理した血清を検体希釈液で4倍に希釈し、それぞれST LPS-ELISA抗原吸着プレート（付記17）2穴に50μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を50μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液を100μLずつ加え、遮光して25℃で反応させた後、反応停止液を100μLずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長450nm及び副波長650nmで測定し、これらの差をELISA値とする。

1.2.3.3 判定

各血清のELISA値をST参照陽性血清のELISA値の平均値で除したものを、各血清のELISA抗体価とする。

試験群のELISA抗体価の平均値は1.302以上でなければならず、対照群のELISA抗体価はいずれも0.200未満でなければならない。また、ST参照陽性血清のELISA値の平均値は0.800～1.300を示さなければならず、参照陰性血清のELISA値の平均値は0.200未満でなければならない。

付記1 SI LPS-ELISA抗原

SI I-178株又はこれと同等の抗原性を有する株の不活化菌液にフェノールを添加し、遠心によりたん白質を除去したLPS抗原であり、リン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）で透析したもの。本抗原を用いて1.3.1.2の試験によりELISAを行うとき、SI参照陽性血清のELISA値の平均値が0.800～1.300を示す。使用時のエンドトキシン量が2,500～10,000EU/穴になるようにPBSで調整する。

付記2 SI参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をSI菌体抽出抗原で免疫して得られた血清で、1.3.1.2の試験によりELISAを行うとき、ELISA値の平均値が0.800～1.300を示すもの。

付記3 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏の血清で、1.3.1.2、1.3.2.2及び1.3.3.2の試験によりELISAを行うとき、ELISA値の平均値が0.200未満を示すもの。

付記4 検体希釈液

精製水にスキムミルクを10w/v%、ポリソルベート20を0.1vol%となるように加え、溶解したもの。

付記5 SI LPS-ELISA抗原吸着プレート

SI LPS-ELISA抗原を96穴プレートの各穴に50μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄し、次に、各穴に5 w/v%スキムミルク溶液を300μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記6 洗浄液

PBS1,000mLにポリソルベート20を0.5mL添加したもの。

付記7 酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗鶏IgG（H+L）抗体。1.3.1.2、1.3.2.2及び1.3.3.2の試験によりELISAを行うとき、SI参照陽性血清、SE参照陽性血清及びST参照陽性血清のそれぞれのELISA値の平均値が0.800～1.300を示すように5 w/v%スキムミルク溶液にて希釈して用いる。

付記8 基質液
市販のテトラメチルベンチジン（TMB）基質液を用いる。

付記9 反応停止液
1,000mL中
硫酸 55mL
精製水 残 量

付記10 SE LPS-ELISA抗原
SE E-926株又はこれと同等の抗原性を有する株の不活化菌液にフェノールを添加し、遠心によりたん白質を除去したLPS抗原であり、PBSで透析したもの。本抗原を用いて1.3.2.2の試験によりELISAを行うとき、SE参照陽性血清のELISA値の平均値が0.800～1.300を示す。使用時のエンドトキシン量が2,500～10,000EU/穴になるようにPBSで調整する。

付記11 SE参照陽性血清
生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をSE菌体抽出抗原で免疫して得られた血清で、1.3.2.2の試験によりELISAを行うとき、ELISA値の平均値が0.800～1.300を示すもの。

付記12 SE検体前処理液
ST T-023株又はこれと同等の抗原性を有する株の菌体抽出抗原液をエンドトキシン量が50,000EU/mLになるようにPBSで調整したもの。

付記13 SE LPS-ELISA抗原吸着プレート
SE LPS-ELISA抗原を96穴プレートの各穴に50μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄し、次に、各穴に5 w/v%スキムミルク溶液を300μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記14 ST LPS-ELISA抗原
ST T-023株又
はこれと同等の抗原性を有する株の不活化菌液にフェノールを添加し、遠心によりたん白質を除去したLPS抗原であり、PBSで透析したもの。本抗原を用いて1.3.3.2の試験によりELISAを行うとき、ST参照陽性血清のELISA値の平均値が0.800～1.300を示す。使用時のエンドトキシン量が2,500～10,000EU/穴になるようにPBSで調整する。

付記15 ST参照陽性血清
生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をST菌体抽出抗原で免疫して得られた血清で、1.3.3.2の試験によりELISAを行うとき、ELISA値の平均値が

0.800～1.300を示すもの。

付記16 ST検体前処理液
SE E-926株又はこれと同等の抗原性を有する株の菌体抽出抗原液をエンド
トキシン量が50,000 EU/mLになるようにPBSで調整したもの。

付記17 ST LPS-ELISA抗原吸着プレート
ST LPS-ELISA抗原を96穴プレートの各穴に50μLずつ加え、25℃で1時間
反応させた後、洗浄液で洗浄し、次に、各穴に5 w/v%スキムミルク溶液を
300μLずつ加え、25℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>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・犬コロナウイルス感染症混合（アジュバント加）ワクチン（シード）</u> <u>動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合（アジュバント加）ワクチン（シード）の3.4.5、3.4.7及び3.4.12.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u> <u>また、小分製品の液状不活化ワクチンについて同基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合（アジュバント加）ワクチン（シード）の3.3.4の規定を準用して試験を行うものとする。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>犬レプトスピラ病（カニコーラ・イクテロヘモラジー・グリッポチフォーサ・ポモナ）不活化ワクチン（アジュバント加溶解用液）（シード）</u> <u>シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・イクテロヘモラジー、レプトスピラ・グリッポチフォーサ及びレプトスピラ・ポモナの全培養菌液を濃縮し、不活化したものの混合液を凍結乾燥したもので、使用時にアジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1. 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>1.2. 毒性限度確認試験</u> <u>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。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>犬レプトスピラ病（カニコーラ・コペンハーゲン・ヘブドマデイス・オータムナリス・オーストラリス）不活化ワクチン（シード）</u> <u>シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・コペンハーゲン、レプトスピラ・ヘブドマデイス、レプトスピラ・オータムナリス及びレプトスピラ・オーストラリスの培養菌液を不活化した後、混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u>

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>犬アデノウイルス（２型）感染症・犬パライ ンフルエンザ・犬ボルデテラ感染症（部分精 製赤血球凝集素）混合不活化ワクチン（シー ド）</u> <u>シードロット規格に適合した犬アデノウイルス（２型）及び犬パラインフル エンザウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液をそれぞ れ不活化したものを、シードロット規格に適合したボルデテラ・ブロンキセプチ カ</u> <u>の培養菌体から部分精製して得た赤血球凝集素と混合したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 不活化試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 試料</u> <u>試験品 2 mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」</u> <u>という。）（付記１）を用いて2～5℃で一夜以上透析したものを試料とする。</u> <u>1.2.1.2 培養細胞</u> <u>犬腎継代細胞を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試料を25cm²以上の培養細胞 2 本に 1 mLずつ接種し、37℃で 1 時間吸着させた</u> <u>後、細胞表面をPBSで洗浄する。ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間培</u> <u>養後、接種した培養細胞を継代し、更に37℃で 7 日間培養する。培養最終日に、</u> <u>培養液を除き、PBSで洗浄・調整した0.1vol%モルモット赤血球浮遊液を重層し、</u> <u>1 時間静置する。その後、細胞表面をPBSで洗浄し、顕微鏡下で赤血球吸着の有</u> <u>無を確認する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>培養細胞にCPEを認めてはならず、かつ、赤血球吸着を認めてはならない。</u> <u>1.3 毒性限度確認試験</u> <u>一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければ</u> <u>ならない。ただし、注射後の体重測定は、5 日目とする。</u> <u>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 犬アデノウイルス（２型）力価試験</u> <u>1.4.1.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1.1 注射材料</u>

試験品を注射材料とする。

1.4.1.1.2 試験動物

約5週齢のラットを用いる。

1.4.1.1.3 中和試験用ウイルス

犬アデノウイルス（2型）225株（付記2）又は適当と認められた犬アデノウイルス（2型）を用いる。

1.4.1.1.4 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.4.1.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。

注射材料0.5mLを21日間隔で2回、試験群の両後肢筋肉内に半量ずつ注射する。第2回目注射後7日目に試験群及び対照群から採血し、血清を採取する。得られた各個体の血清について、56℃で30分間加温して非働化した後、ウイルス増殖用培養液（付記3）で、2倍階段希釈する。次に、各希釈血清と0.1mL中200TCID₅₀の中和試験用ウイルスを含む液を等量混合し、37℃で1時間処理する。各混合液0.1mLずつを単層形成した培養細胞の4穴ずつに接種し、37℃で1時間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加える。37℃で10日間培養し、観察する。

1.4.1.3 判定

培養細胞の半数以上の穴に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。試験群では、80%以上が中和抗体価8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2倍以下でなければならない。

1.4.2 犬パラインフルエンザ力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

1.4.2.1.3 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルスT2/KS4株（付記4）又は適当と認められた犬パラインフルエンザウイルスを用いる。

1.4.2.1.4 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.4.2.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。

注射材料0.5mLを21日間隔で2回、試験群の両後肢筋肉内に半量ずつ注射する。第2回目注射後7日目に試験群及び対照群から採血し、血清を採取する。得られた各個体の血清について、56℃で30分間加温して非働化した後、ウイルス増殖用培養液で、2倍階段希釈する。次に、各希釈血清と0.1mL中200TCID₅₀の中和試験用ウイルスを含む液を等量混合し、37℃で1時間処理する。各混合液0.1mLずつを単層形成した培養細胞の4穴ずつに接種し、37℃で1時間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加える。37℃で7日間培養後、各穴の培養液を採取して96穴V底マイクロプレートの各1穴ずつに50μLずつ分注し、更にPBSで洗浄・調整した0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を等量加えた後、1時間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.2.1.6 判定

培養細胞の半数以上の穴において、赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群では、80%以上が中和抗体価16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2倍以下でなければならない。

1.4.3 ボルデテラ・ブロンキセプチカ力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 試験動物

1.4.2の試験に用いた動物を用いる。

1.4.3.1.2 赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカHA抗原（付記5）を用いる。

1.4.3.2 試験方法

1.4.2.2の試験で得られた各個体の血清について、56℃で30分間加温して非働化した後、マイクロタイター法で赤血球凝集抑制（以下この項において「HI」という。）試験を行う。

非働化血清1容に、25w/v%カオリン加PBS2容及びPBS1容を加え、30分間転倒混和した後、遠心上清を採取する（4倍希釈血清）。4倍希釈血清をPBSで2倍階段希釈した後、各希釈液25μLずつを96穴V底マイクロプレートの2穴以上に分注する。各希釈血清に8単位のHA抗原を25μLずつ加えて、37℃で1時間静置する。これに0.5vol%グルタルアルデヒド固定牛赤血球（付記6）を50μLずつ加え、37℃で2時間反応させた後、赤血球の凝集の有無を観察する。

1.4.3.3 判定

半数以上の穴において、赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。

試験群では、80%以上がHI抗体価16倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価4倍以下でなければならない。

付記1 リン酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム

8.00g

塩化カリウム

0.20g

リン酸水素二ナトリウム（無水）

1.15g

リン酸二水素ナトリウム（無水）

0.20g

水

残量

pHを7.0～7.4に調整して、121℃15分間高压滅菌する。

付記2 犬アデノウイルス（2型）225株

犬腎継代細胞で継代した犬アデノウイルス（2型）で、犬腎継代細胞を用いて測定するときのウイルス含有量が10⁷TCID₅₀/mL以上のもの。

付記3 ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

牛胎子血清

20mL

トリプトースフォスフェイト・ブロス

2.95g

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpH7.0～7.4に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 犬パラインフルエンザウイルスT2/KS4株
犬腎継代細胞で継代した犬パラインフルエンザウイルスで、犬腎継代細胞
を用いて測定するときのウイルス含有量が $10^{3.0}$ TCID₅₀/mL以上のもの。

付記 5 ボルデテラ・ブロンキセプチカHA抗原
牛赤血球に対して強い凝集活性を有するボルデテラ・ブロンキセプチカ I
相菌の菌体から遊離させた赤血球凝集素を濃縮後、HA価が約128倍になるよ
うに濃度を調整し、保存剤を加えたもの。

付記 6 0.5vol%グルタルアルデヒド固定牛赤血球
牛赤血球をグルタルアルデヒドで固定した後、10vol%赤血球液となる
ように濃度を調整し、使用時に0.01w/v%ゼラチン加PBSで0.5vol%赤血球液
となるように希釈したもの。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>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・犬コロナウイルス感染症・犬レ プトスピラ病（カニコーラ・イクテロヘモラ ジー・ヘブドマディス）混合（アジュバント 加）ワクチン（シード）</u> <u>シードロット規格に適合した弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイル ス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス及び弱毒犬パルボウイルスをそれ ぞれ同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液とシードロット規格 に適合したレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・イクテロヘモラジー及び レプトスピラ・ヘブドマディスの培養菌液を不活化したものの混合液を凍結乾燥 したワクチン（以下この項において「混合乾燥ワクチン」という。）と、シードロ ット規格に適合した犬コロナウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて 得たウイルス液を不活化してアルミニウムゲルアジュバント加えたものを混合し たワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わ せたワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したもの（以下この項において</u> <u>「混合ワクチン」という。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、</u> <u>これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 ウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 試料</u> <u>混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液又は滅菌蒸</u> <u>留水で溶解する。</u> <u>試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記 1 から 3 ま</u> <u>で）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（付記 4）で10倍</u> <u>階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.2.1.1.2 培養細胞</u> <u>Vero細胞を用いる。</u> <u>1.2.1.2 試験方法</u>

試料0.1mLずつを5本（穴）以上の培養細胞に接種し、34～38℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、34～38℃で10日間培養し、観察する。

1.2.1.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{7.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液又は滅菌蒸留水で溶解する。

試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスの各抗血清（付記2、3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。

1.2.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを5本（穴）以上の培養細胞に接種し、34～38℃で60分間吸着後、ウイルス増殖用培養液を加え、34～38℃で10日間培養し、観察する。

1.2.2.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.3 犬バラインフルエンザウイルス含有量試験

1.2.3.1 試験材料

1.2.3.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液又は滅菌蒸留水で溶解する。

試験品中の犬バラインフルエンザウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記1、3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。

1.2.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.2.3.2 試験方法

試料0.1mLずつを5本（穴）以上の培養細胞に接種し、34～38℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、34～38℃で7日間培養し、観察する。培養後、培養液を採取し、これに等量の0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で20～40分間静置し、観察する。

1.2.3.3 判定

培養液に赤血球の凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.2.4.1 試験材料

1.2.4.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液又は滅菌蒸留水で溶解する。

試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記1、2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。

1.2.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.2.4.2 試験方法

試料0.1mLずつを5本（穴）以上の培養細胞に接種し、34～38℃で18～30時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に34～38℃で6日間培養する。培養後、各本（穴）の培養上清を採取し、犬パルボウイルス特異的ポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「PCR」という。付記6）を行い、特異的PCR産物を電気泳動して観察する。

1.2.4.3 判定

特異的PCR産物を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3 毒性限度確認試験

混合ワクチンについて、一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、判定には注射後4日目の体重を用いる。

1.4 不活化試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 試料

液状不活化ワクチン2mL以上を100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2～5℃で一夜以上透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

1.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.4.2 試験方法

試料を25cm²以上の培養細胞2本に1mLずつ接種し、34～38℃で1時間吸着させた後、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄する。ウイルス増殖用培養液を加えて34～38℃で5日間培養した後、接種した培養細胞を継代し、更に34～38℃で7日間培養し、観察する。

1.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めてはならない。

1.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

1.5.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

1.5.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

1.5.1.4 培養細胞

猫全胎子継代細胞浮遊液を用いる。

1.5.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。試験群に注射材料0.5mLずつを3週間間隔で2回両後肢に半量ずつ筋肉内注射し、2回目注射後7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、細胞増殖用培養液（付記7）で2倍階段希釈する。

各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液を等量混合し、34～38℃で60分間処理する。各混合液0.1mLずつをそれぞれ1穴当たり0.1mLに分注した培養細胞浮遊液4穴に接種し、34～38℃で5日間培養し、観察する。

1.5.3 判定

培養細胞の4穴中2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。

試験群の抗体価は、80%以上が8倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍以下でなければならない。

付記1 抗犬アデノウイルス（2型）血清

犬アデノウイルス（2型）V197株又は製造用株である96-LP03株を除く犬アデノウイルス（2型）株で免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬アデノウイルス（2型）を完全に中和できるもの。

付記2 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルスD008株又は製造用株であるT2MD10株を除く犬パラインフルエンザウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬パラインフルエンザウイルスを完全に中和できるもの。

付記3 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスCPV97-008株又は製造用株であるHD037株を除く犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬パルボウイルスを完全に中和できるもの。

付記4 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	2.95g
牛胎子血清	10～20mL
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。	
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記5 抗ジステンパーウイルス血清

ジステンパーウイルスオンダーステポート株又は製造用株であるKDK-1/135株を除くジステンパーウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品のジステンパーウイルスを完全に中和できるもの。

付記6 犬パルボウイルス特異的ポリメラーゼ連鎖反応

犬パルボウイルスのカプシドたん白VP-1及びVP-2を含む領域を特異的に検出するPCR法で、0.5kbpの特異的PCR産物が得られる。

付記7 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	2.95g
牛胎子血清	50mL

	イーグルMEM <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>	<u>残 量</u>
--	--	-------------------

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ・コペンハーゲニー・ヘブドマディス・オータムナリス・オーストラリス）混合ワクチン（シード）</u> <u>シードロット規格に適合した弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス、弱毒犬パルボウイルス及び弱毒犬コロナウイルスをそれぞれ同規格に適合した株化細胞又は初代細胞で増殖させて得たウイルス液の混合液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「混合生ワクチン」という。）と、シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・コペンハーゲニー、レプトスピラ・ヘブドマディス、レプトスピラ・オータムナリス及びレプトスピラ・オーストラリスの培養菌液を不活化した後、混合したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 ウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 試料</u> <u>混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記1から4まで）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（付記5）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u> <u>1.2.1.1.1.2 培養細胞</u> <u>Vero細胞を用いる。</u> <u>1.2.1.1.2 試験方法</u> <u>試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。</u> <u>1.2.1.3 判定</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。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスの各抗血清（付記2から4まで及び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。

1.2.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞を用いる。

1.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

1.2.2.3 判定

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。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

1.2.3.1 試験材料

1.2.3.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。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の各抗血清（付記1、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。

1.2.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

1.2.3.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、30℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、30℃で7日間回転培養し、観察する。

1.2.3.3 判定

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。
試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.2.4.1 試験材料

1.2.4.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記1、2、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。

1.2.4.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞浮遊液を用いる。

1.2.4.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本以上の培養試験管に接種し、30℃で24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液1.0mLと交換し、30℃で6日間回転培養する。培養後、培養試験管に赤血球凝集用リン酸緩衝食塩液（付記7）で濃度を調整した1 vol%

豚赤血球浮遊液を0.2mL加え、4℃で18時間静置した後、観察する。

1.2.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.5 犬コロナウイルス含有量試験

1.2.5.1 試験材料

1.2.5.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬コロナウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記1から3まで及び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。

1.2.5.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

1.2.5.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

1.2.5.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

付記1 抗犬アデノウイルス（2型）血清

犬アデノウイルス（2型）で免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬アデノウイルス（2型）を完全に中和できるもの。

付記2 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬パラインフルエンザウイルスを完全に中和できるもの。

付記3 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、試験品の犬パルボウイルスを完全に中和できるもの。

付記4 抗犬コロナウイルス血清

犬コロナウイルスで免疫した兎の血清であって、試験品の犬コロナウイルスを完全に中和できるもの。

付記5 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

2.95g

酵母エキス

1.0g

牛胎子血清

20～50mL

イーグルMEM

残 量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 6 抗ジステンパーウイルス血清
ジステンパーウイルスで免疫した兎、モルモット又はフェレットの血清で
あって、試験品のジステンパーウイルスを完全に中和できるもの。

付記 7 赤血球凝集用リン酸緩衝食塩液
A液800mL中
塩化ナトリウム 8.0g
塩化カリウム 0.2g
リン酸水素二ナトリウム、無水 1.15g
リン酸二水素カリウム 0.2g
水 残 量
B液100mL中
塩化マグネシウム六水和物 0.1g
水 残 量
C液100mL中
塩化カルシウム 0.1g
水 残 量
A液、B液及びC液を8：1：1に混合した後、5 w/v
%牛血清アルブミン液を2 vol%添加したもの。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 (削る)	ワクチン（シードロット製剤）の部 <u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感 染症3価・猫汎白血球減少症混合ワクチン(シ ード)</u> <u>シードロット規格に適合した猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを同規格に適合し た培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチン（以下この項に おいて「生ワクチン」という。）並びに同規格に適合した3種類の猫カリシウイル ス及び猫汎白血球減少症ウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得た ウイルス液をそれぞれ不活化したものを混合した液状ワクチン（以下この項にお いて「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u> <u>1.2 ウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験</u> <u>1.2.1.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1.1 試料</u> <u>生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌精製水で溶解したものをウイル 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。</u> <u>1.2.1.1.2 培養細胞</u> <u>猫腎継代細胞を用いる。</u> <u>1.2.1.2 試験方法</u> <u>試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、32℃で60分間吸着させた後、 ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、32℃で7日間回転培養し、観察する。</u> <u>1.2.1.3 判定</u> <u>培養細胞にCPEが認められたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。</u> <u>試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。</u> <u>1.3 異常毒性否定試験</u> <u>一般試験法の異常毒性否定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>1.4 力価試験</u> <u>1.4.1 猫カリシウイルス力価試験</u> <u>1.4.1.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1.1 注射材料</u>

試験品を注射材料とする。

1.4.1.1.2 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

1.4.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.4.1.1.4 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた猫カリシウイルスのそれぞれの製造用株を用いる。

1.4.1.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料 1 頭分ずつを試験群の筋肉内に 3 週間隔で 2 回注射し、2 回目の注射後 7 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、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ を含む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。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着した後、混合液を除き、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間回転培養する。

1.4.1.3 判定

CPEの阻止が認められたものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、幾何平均値で16倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2 倍未満でなければならない。

1.4.2 猫汎白血球減少症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

1.4.2.1.3 赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原（付記 2）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1 頭分ずつを試験群の臀部筋肉内に注射し、3 週間後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赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を 25w/v% カオリン液及び豚赤血球で処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 3）で 2 倍段階希釈する。各希釈血清に 8 単位の赤血球凝集抗原を加え、常温で 60 分間処理し、VAD6.0 液（付記 4）で濃度を調整した 0.5vol% 豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で 1 夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.2.3 判定

赤血球凝集の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とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、幾何平均値で128倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8 倍未満でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 猫カリシウイルス不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

原液 2 mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて 2 ～ 5℃で 1 夜透析したものを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

2.1.2 試験方法

試料の全量を25cm²以上の培養細胞に接種し、1 時間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液で細胞を洗浄し、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で10日間培養する。

2.1.3 判定

細胞にCPEを認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。

2.2 猫汎白血球減少症ウイルス不活化試験

2.2.1 試験材料

2.1.1に準ずる。

2.2.2 試験方法

試料の全量を 3 × 10⁵個/mLの浮遊細胞 5 mLを入れた25cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で培養する。細胞が単層を形成した後、ウイルス増殖用培養液に交換し、さらに10日間培養する。

観察最終日に培養液を採取し、等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0で濃度を調整した0.5%豚赤血球浮遊液を加え、赤血球の凝集の有無を観察する。

2.2.3 判定

培養細胞にCPE、培養液に赤血球凝集を認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。

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	2.95g
牛胎子血清	20mL
イーグルMEM	残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6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 猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルスを猫腎継代細胞で増殖させて得た培養液又はこれを不活化したものであって、赤血球凝集価が128倍以上のもの。

付記 3 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	10.25g
ホウ酸	3.09g
水酸化ナトリウム	0.96g
水	残 量
牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。	

付記 4	VAD6.0液	
	1,000mL中	
	塩化ナトリウム	8.77g
	無水リン酸水素二ナトリウム	5.68g
	リン酸二水素ナトリウム二水和物	40.56g
	水	残量
	牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合してpHを6.0に調整する。	

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
診断液（体外診断用医薬品を除く。）の部 （削る）	診断液（体外診断用医薬品を除く。）の部 <u>牛肝てつ症診断用皮内反応抗原</u> <u>動生剤基準の牛肝てつ症診断用皮内反応抗原の3.3.3、3.3.5、3.3.6及び3.3.7に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成14年10月 3 日農林水産省告示第1568号）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
診断液（体外診断用医薬品を除く。）の部 （削る）	診断液（体外診断用医薬品を除く。）の部 <u>精製鳥型ツベルクリン</u> <u>動生剤基準の精製鳥型ツベルクリンの3.3.4、3.3.5及び3.3.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u>