

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表
 ○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）（抄）

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>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・イクテロヘモラジー）混合ワクチン（シード）</p> <p>1 （略） 2 製法 2.1・2.2 （略） 2.3 原液 2.3.1～2.3.4 （略） 2.3.5 L・カニコーラ原液 2.3.5.1 （略） 2.3.5.2 不活化 培養菌液に適當と認められた不活化剤を加え不活化し、<u>不活化菌液とする。</u> <u>不活化菌液について 3.4 の試験を行う。</u> <u>不活化菌液をろ過濃縮又は遠心して集菌し、適當と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。</u> 原液について、3.5.1 及び 3.5.3 の試験を行う。 2.3.6 L・イクテロヘモラジー原液 2.3.6.1 （略） 2.3.6.2 不活化 培養菌液に適當と認められた不活化剤を加え不活化し、<u>不活化菌液とする。</u> <u>不活化菌液について 3.4 の試験を行う。</u> <u>不活化菌液をろ過濃縮又はこれを遠心して集菌し、適當と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。</u> 原液について、3.5.1 及び 3.5.3 の試験を行う。</p> <p>2.4・2.5 （略） 3 試験法 3.1・3.2 （略） 3.3 培養菌液の試験 3.3.1 （略） 3.3.2 総菌数試験 光電比色計又は菌数計算法によって菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液に 1 mL 中 10^5 個以上の菌を含まなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その菌数とする。また、原液において抗原量測定試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。 <u>3.4 不活化菌液の試験</u> <u>3.4.1 不活化試験</u></p> <p>（新設）</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>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（シード）</p> <p>1 （略） 2 製法 2.1・2.2 （略） 2.3 原液 2.3.1～2.3.4 （略） 2.3.5 L・カニコーラ原液 2.3.5.1 （略） 2.3.5.2 不活化 培養菌液に適當と認められた不活化剤を加え不活化し、ろ過濃縮又は<u>これを遠心して集菌し、適當と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。</u> 原液について、3.4.1 及び 3.4.3 の試験を行う。</p> <p>2.3.6 L・イクテロヘモラジー原液 2.3.6.1 （略） 2.3.6.2 不活化 培養菌液に適當と認められた不活化剤を加え不活化し、ろ過濃縮又は<u>これを遠心して集菌し、適當と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。</u> 原液について、3.4.1 及び 3.4.3 の試験を行う。</p> <p>2.4・2.5 （略） 3 試験法 3.1・3.2 （略） 3.3 培養菌液の試験 3.3.1 （略） 3.3.2 総菌数試験 光電比色計又は菌数計算法によって菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液に 1 mL 中 10^5 個以上の菌を含まなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その菌数とする。</p>

原液において不活化試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

3.4.1.1 試験材料

3.4.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.1.1.2 培地

EMJH 培地（付記3）又は適当と認められた培地を用いる。

3.4.1.2 試験方法

試料1 mL を100mLの培地に接種し、27～31℃で14日間培養し、更に100mLの培地に継代し、両方の培地を27～31℃で14日間培養する。

3.4.1.3 判定

いづれの培地でもレプトスピラの発育を認めてはならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 (略)

3.5.2 ウイルス含有量試験

3.5.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.5.2.1.1 (略)

3.5.2.1.1.1・3.5.2.1.1.2 (略)

3.5.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、35～37℃で7～21日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.2.1.3 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。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{4.5}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法及びそのウイルス含有量とする。

3.5.2.2 (略)

3.5.2.2.1 (略)

3.5.2.2.1.1・3.5.2.2.1.2 (略)

3.5.2.2.2・3.5.2.2.3 (略)

3.5.2.3 (略)

3.5.2.3.1 (略)

3.5.2.3.1.1・3.5.2.3.1.2 (略)

3.5.2.3.2・3.5.2.3.3 (略)

3.5.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.5.2.4.1 (略)

3.5.2.4.1.1・3.5.2.4.1.2 (略)

3.5.2.4.2 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0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.2.4.3 (略)

3.5.3 不活化試験

不活化菌液において不活化試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

3.5.3.1 (略)

3.5.3.1.1・3.5.3.1.2 (略)

3.5.3.2・3.5.3.3 (略)

3.5.4 抗原量測定試験

3.5.4.1 L・カニコーラ抗原量

3.4 原液の試験

3.4.1 (略)

3.4.2 ウイルス含有量試験

3.4.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.2.1.1 (略)

3.4.2.1.1.1・3.4.2.1.1.2 (略)

3.4.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、35～37℃で7～21日間培養し、観察する。

3.4.2.1.3 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。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{4.5}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.4.2.2 (略)

3.4.2.2.1 (略)

3.4.2.2.1.1・3.4.2.2.1.2 (略)

3.4.2.2.2・3.4.2.2.3 (略)

3.4.2.3 (略)

3.4.2.3.1 (略)

3.4.2.3.1.1・3.4.2.3.1.2 (略)

3.4.2.3.2・3.4.2.3.3 (略)

3.4.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.2.4.1 (略)

3.4.2.4.1.1・3.4.2.4.1.2 (略)

3.4.2.4.2 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、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記3）を加え、更にこの混合液と等量の0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.4.2.4.3 (略)

3.4.3 不活化試験

3.4.3.1 (略)

3.4.3.1.1・3.4.3.1.2 (略)

3.4.3.2・3.4.3.3 (略)

（新設）

3.5.4.1.1 試験材料

3.5.4.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.5.4.1.2 試験方法

酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）により、試料中の ELISA 抗原量を求める。96 穴 ELISA 用プレートを用い、通常、11 列を抗原の最大結合量の測定に、12 列をブランクの測定に用いる。

L・カニコーラ固相化プレート（付記 5）の A 行及び 11 列を除く全ての穴に 1 w/v %スキムミルク加 0.05 %ボリソルベート 20 加 PBS（付記 6。以下この項において「PBST-SM」という。）を 100 μ L ずつ加える。PBST-SM でそれぞれ至適濃度に希釈した L・カニコーラ参照抗原（付記 7）、試料及び L・カニコーラ内部標準（付記 8）を、A 行の 1 から 10 列までの 2 穴ずつに 200 μ L ずつ加えた後、H 行まで 100 μ L ずつ送り、2 倍階段希釈する。また 11 列の全ての穴には、PBST-SM で至適濃度に希釈した最大結合量測定用 L・カニコーラ参照抗原（付記 9）を 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させる。0.05 %ボリソルベート 20 加 PBS（付記 10。以下この項において「PBST」という。）で洗浄後、PBST-SM で希釈した L・カニコーラ検出用抗体（付記 11）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させ、PBST で洗浄する。基質液（付記 12）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して室温で 10 分間反応させ、2 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。各穴の吸光度を波長 450nm で測定し、適當と認められた計算方法により試料中の ELISA 抗原量を求める。

3.5.4.1.3 判定

試料 1 mL 中の抗原量は 30,000ELISA 単位以上でなければならない。この場合、内部標準で求められた抗原量は規定値を示さなければならぬ。試料の検量線の相関係数は 0.9 以上を示さなければならぬ、試料及び内部標準の検量線の傾きは参照抗原のそれに対して 0.8 ~ 1.25 の範囲になければならない。また、試料の各希釈段階における吸光度の変動係数は 20 %以下でなければならない。

3.5.4.2 L・イクテロヘモラジー抗原量

3.5.4.1 を準用して試験をするとき、試料 1 mL の抗原量は 3,000ELISA 単位以上でなければならない。ただし、試験には L・イクテロヘモラジー参照抗原（付記 13）、L・イクテロヘモラジー内部標準（付記 14）、L・イクテロヘモラジー固相化プレート（付記 15）、最大結合量測定用 L・イクテロヘモラジー参照抗原（付記 16）及び L・イクテロヘモラジー検出用抗体（付記 17）を用いる。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 ~ 3.6.6 (略)

3.6.7 ウイルス含有量試験

3.6.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.6.7.1.1 試験材料

3.6.7.1.1.1 試料

試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 18、19 及び 20）を非働化したもので中和したものを作成し、各段階の希釈液を試料とする。

3.6.7.1.1.2 (略)

3.6.7.1.2 ~ 3.6.7.1.3 (略)

3.6.7.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.6.7.2.1 試験材料

3.6.7.2.1.1 試料

試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスを各抗血清（付記 19、20 及び 22）を非働化したもので中和したものを作成し、各段階の希釈液を試料とする。

3.6.7.2.1.2 (略)

3.5 小分製品の試験

3.5.1 ~ 3.5.6 (略)

3.5.7 ウイルス含有量試験

3.5.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.5.7.1.1 試験材料

3.5.7.1.1.1 試料

試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 4、5 及び 6）を非働化したもので中和したものを作成し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.7.1.1.2 (略)

3.5.7.1.2 ~ 3.6.7.1.3 (略)

3.5.7.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.5.7.2.1 試験材料

3.5.7.2.1.1 試料

試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスを各抗血清（付記 5、6 及び 8）を非働化したもので中和したものを作成し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.7.2.1.2 (略)

<u>3.6.7.2.2</u> ・ <u>3.6.7.2.3</u> (略)	<u>3.5.7.2.2</u> ・ <u>3.6.7.2.3</u> (略)
<u>3.6.7.3</u> 犬パライフルエンザウイルス含有量試験	<u>3.5.7.3</u> 犬パライフルエンザウイルス含有量試験
<u>3.6.7.3.1</u> 試験材料	<u>3.5.7.3.1</u> 試験材料
<u>3.6.7.3.1.1</u> 試料	<u>3.5.7.3.1.1</u> 試料
試験品中の犬パライフルエンザウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 18、20 及び 22）を非働化したもので中和したものと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。	試験品中の犬パライフルエンザウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 4、6 及び 8）を非働化したもので中和したものと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>3.6.7.3.1.2</u> (略)	<u>3.5.7.3.1.2</u> (略)
<u>3.6.7.3.2</u> ・ <u>3.6.7.3.3</u> (略)	<u>3.5.7.3.2</u> ・ <u>3.5.7.3.3</u> (略)
<u>3.6.7.4</u> 犬パルボウイルス含有量試験	<u>3.5.7.4</u> 犬パルボウイルス含有量試験
<u>3.6.7.4.1</u> 試験材料	<u>3.5.7.4.1</u> 試験材料
<u>3.6.7.4.1.1</u> 試料	<u>3.5.7.4.1.1</u> 試料
試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 18、19 及び 22）を非働化したもので中和したもの又は液状混合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。	試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 4、5 及び 8）を非働化したもので中和したもの又は液状混合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。
<u>3.6.7.4.1.2</u> 培養細胞	<u>3.5.7.4.1.2</u> 培養細胞
猫腎継代細胞又は適當と認められた細胞を用いる。	猫腎継代細胞を用いる。
<u>3.6.7.4.2</u> 試験方法	<u>3.5.7.4.2</u> 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、32 ℃又は 37 ℃で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に 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を加え、更にこの混合液と等量の 0.3 ~ 0.5vol %豚赤血球を加え、2 ~ 5 ℃で静置した後、観察する。 <u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。</u>	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、32 ℃又は 37 ℃で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に 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を加え、更にこの混合液と等量の 0.3 ~ 0.5vol %豚赤血球を加え、2 ~ 5 ℃で静置した後、観察する。
<u>3.6.7.4.3</u> (略)	<u>3.5.7.4.3</u> (略)
<u>3.6.8</u> ～ <u>3.6.10</u> (略)	<u>3.5.8</u> ～ <u>3.5.11</u> (略)
<u>3.6.11</u> (略)	<u>3.5.11</u> (略)
<u>3.6.11.1</u> (略)	<u>3.5.11.1</u> (略)
<u>3.6.11.1.1</u> ・ <u>3.6.11.1.2</u> (略)	<u>3.5.11.1.1</u> ・ <u>3.5.11.1.2</u> (略)
<u>3.6.11.2</u> ・ <u>3.6.11.2</u> (略)	<u>3.5.11.2</u> ・ <u>3.5.11.2</u> (略)
<u>3.6.12</u> 力価試験	<u>3.5.12</u> 力価試験
<u>3.6.12.1</u> ジステンパンペー力価試験	<u>3.5.12.1</u> ジステンパンペー力価試験
<u>3.6.12.1.1</u> 試験材料	<u>3.5.12.1.1</u> 試験材料
<u>3.6.12.1.1.1</u> 試験動物	<u>3.5.12.1.1.1</u> 試験動物
3.6.11 の試験に用いた動物を用いる。	3.5.11 の試験に用いた動物を用いる。
<u>3.6.12.1.1.2</u> ・ <u>3.6.12.1.1.3</u> (略)	<u>3.5.12.1.1.2</u> ・ <u>3.5.12.1.1.3</u> (略)
<u>3.6.12.1.2</u> 試験方法	<u>3.5.12.1.2</u> 試験方法
3.6.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。	3.5.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。
各プール血清を非働化し、2 vol %馬血清加リン酸緩衝食塩液又は適當と認められた希釈液で 4 又は 5 倍階段希釈し、各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID ₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2 ~ 5 ℃で一夜又は 35 ~ 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（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ~ 37 ℃で 7 ~ 21 日間培養し、観察する。 <u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。</u>	各プール血清を非働化し、2 vol %馬血清加リン酸緩衝食塩液又は適當と認められた希釈液で 4 又は 5 倍階段希釈し、各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID ₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2 ~ 5 ℃で一夜又は 35 ~ 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（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ~ 37 ℃で 7 ~ 21 日間培養し、観察する。
<u>3.6.12.1.3</u> (略)	<u>3.5.12.1.3</u> (略)
<u>3.6.12.2</u> 天アデノウイルス（2型）感染症力価試験	<u>3.5.12.2</u> 犬アデノウイルス（2型）感染症力価試験
<u>3.6.12.2.1</u> 試験材料	<u>3.5.12.2.1</u> 試験材料
<u>3.6.12.2.1.1</u> 試験動物	<u>3.5.12.2.1.1</u> 試験動物
3.6.11 の試験に用いた動物を用いる。	3.5.11 の試験に用いた動物を用いる。
<u>3.6.12.2.1.2</u> ・ <u>3.6.12.2.1.3</u> (略)	<u>3.5.12.2.1.2</u> ・ <u>3.5.12.2.1.3</u> (略)

3.6.12.2.2 試験方法

3.6.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で2、4又は5倍階段希釈する。各希釀血清と0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37 ℃で60～90分間処理する。この各混合液0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、35～37 ℃で7～10日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.6.12.2.3 (略)

3.6.12.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.6.12.3.1 試験材料

3.6.12.3.1.1 試験動物

3.6.11 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.12.3.1.2 (略)

3.6.12.3.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.6.12.3.2 試験方法

3.6.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釀血清と0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2～5℃で一夜又は適当な温度で60分間処理する。この各混合液0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、35～37 ℃で7～10日間培養する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の0.2vol %モルモット赤血球浮遊液を加え、2～5℃で60分間静置し、観察するか、又は培養後、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90分間静置し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.6.12.3.3 判定

赤血球凝集又は赤血球吸着を阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、2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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法及びその抗体価とする。

3.6.12.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.6.12.4.1 試験材料

3.6.12.4.1.1 (略)

3.6.12.4.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記23）を用いる。

3.6.12.4.2 試験方法

3.6.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、25w/v %カオリン液及び豚赤血球を加えて処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釀血清に8単位の赤血球凝集抗原を混合し、常温で60分間処理し、VAD6.0 液（付記24）で調整した0.3～0.5vol %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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.6.12.4.3 (略)

3.6.12.5 (略)

3.6.12.5.1 (略)

3.6.12.5.1.1～3.6.12.5.1.3 (略)

3.6.12.5.2・3.6.12.5.3 (略)

3.5.12.2.2 試験方法

3.5.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釀液で2、4又は5倍階段希釈する。各希釀血清と0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37 ℃で60～90分間処理する。この各混合液0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、35～37 ℃で7～10日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.12.2.3 (略)

3.5.12.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.5.12.3.1 試験材料

3.5.12.3.1.1 試験動物

3.5.11 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.12.3.1.2 (略)

3.5.12.3.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.5.12.3.2 試験方法

3.5.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釀血清と0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2～5℃で一夜又は適当な温度で60分間処理する。この各混合液0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、35～37 ℃で7～10日間培養する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の0.2vol %モルモット赤血球浮遊液を加え、2～5℃で60分間静置し、観察するか、又は培養後、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90分間静置し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.12.3.3 判定

赤血球凝集又は赤血球吸着を阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、2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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その抗体価とする。

3.5.12.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.5.12.4.1 試験材料

3.5.12.4.1.1 (略)

3.5.12.4.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記9）を用いる。

3.5.12.4.2 試験方法

3.5.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、25w/v %カオリン液及び豚赤血球を加えて処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釀血清に8単位の赤血球凝集抗原を混合し、常温で60分間処理し、VAD6.0 液（付記10）で調整した0.3～0.5vol %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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.12.4.3 (略)

3.5.12.5 (略)

3.5.12.5.1 (略)

3.5.12.5.1.1～3.5.12.5.1.3 (略)

3.5.12.5.2・3.5.12.5.3 (略)

4 (略)

付記1 抗L・カニコーラ血清

L・カニコーラの不活化菌で免疫した兎又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記2 抗L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーの不活化菌で免疫した兎又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記3 EMJH 培地

1,000mL 中	
<u>リン酸水素二ナトリウム二水和物</u>	0.94 g
<u>リン酸二水素カリウム</u>	0.27 g
<u>塩化ナトリウム</u>	0.9 g
<u>塩化アンモニウム</u>	0.23 g
<u>塩酸サイアミン</u>	0.0045g
<u>87vol %グリセリン</u>	0.09 g
<u>牛血清アルブミン</u>	10.0 g
<u>ビルビン酸ナトリウム</u>	0.09 g
<u>硫酸亜鉛</u>	0.004 g
<u>塩化カルシウム</u>	0.01 g
<u>塩化マグネシウム</u>	0.01 g
<u>硫酸鉄(II)七水和物</u>	0.05 g
<u>硫酸銅(II)五水和物</u>	0.0003g
<u>ポリソルベート 80</u>	1.25 g
<u>ビタミン B₁₂</u>	0.0002g
<u>水</u>	残 量

220nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記4 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
<u>塩化ナトリウム</u>	10.52 g
<u>ホウ酸</u>	3.09 g
<u>水酸化ナトリウム</u>	0.96 g
<u>水</u>	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、pHを9.0に調整する。

付記5 L・カニコーラ固相化プレート

L・カニコーラの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体を炭酸緩衝液(付記25)で至適濃度に調整したものを96穴ELISA用マイクロプレートの各穴に150μLずつ加え、2～8℃で16時間固相化し、反応終了後抗体液を捨て、PBST-SMを各穴に200μLずつ加え37℃で1時間感作し、PBSTで洗浄したもの。

付記6 1 w/v %スキムミルク加0.05 %ポリソルベート20加PBS(PBST-SM)

スキムミルク10.0gをPBST(付記10)1,000mLに溶解したもの。

付記7 L・カニコーラ参照抗原

4 (略)

付記1 抗L・カニコーラ血清

L・カニコーラの不活化菌で免疫した兎又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記2 抗L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーの不活化菌で免疫した兎又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

(新設)

付記3 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
<u>塩化ナトリウム</u>	10.52 g
<u>ホウ酸</u>	3.09 g
<u>水酸化ナトリウム</u>	0.96 g
<u>水</u>	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pHを9.0に調整する。

(新設)

(新設)

(新設)

L・カニコーラ培養菌液を不活化し、1 mL 中に不活化前生菌数が 1×10^9 個を含むように調製したものを 1,000ELISA 単位を含む標準品として、ELISA 単位を測定したもの。－15 ℃以下で保存する。

付記 8 L・カニコーラ内部標準

L・カニコーラ参照抗原と同じ製造方法で作製し、PBST-SM で所定の ELISA 単位を含むように希釀して使用する。－15 ℃以下で保存する。

付記 9 最大結合量測定用 L・カニコーラ参照抗原

L・カニコーラ参照抗原を PBST-SM で至適濃度に希釀したもの。

付記 10 0.05 %ポリソルベート PBS (PBST)

ポリソルベート 20 0.5mL に PBS 1,000mL を加えたもの。

付記 11 L・カニコーラ検出用抗体

L・カニコーラの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体にペルオキシダーゼ標識を行ったもの。PBST-SM で希釀して使用する。－15 ℃以下で保存する。

付記 12 基質液

A 液

10w/v %クエン酸溶液 3.2mL
酢酸ナトリウム三水和物 13.1 g
水 100 mL

B 液

テトラメチルベンゼン 2.36g
ジメチルスルホキシド 100 mL

使用時に A 液 : B 液 : 水を 1.5 : 0.2 : 13.3 の割合で混合する。あるいは適當な品質の市販品を用いてよい。

付記 13 L・イクテロヘモラジー参考抗原

L・イクテロヘモラジー培養菌液を不活化し、1 mL 中に不活化前生菌数が 1×10^9 個を含むよう調製したものを 1,000ELISA 単位を含む標準品として、ELISA 単位を測定したもの。－15 ℃以下で保存する。

付記 14 L・イクテロヘモラジー内部標準

L・イクテロヘモラジー参考抗原と同じ製造方法で作製し、PBST-SM で所定の ELISA 単位を含むよう希釀して使用する。－15 ℃以下で保存する。

付記 15 L・イクテロヘモラジー固相化プレート

L・イクテロヘモラジーの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体を炭酸緩衝液で至適濃度に調整したものを 96 穴 ELISA プレートの各穴に $150 \mu\text{L}$ ずつ加え、2～8 ℃で 16 時間固相化し、反応終了後抗体液を捨て、PBST-SM を各穴に $200 \mu\text{L}$ ずつ加え 37 ℃で 1 時間感作し、PBST で洗浄したもの。

付記 16 最大結合量測定用 L・イクテロヘモラジー参考抗原

L・イクテロヘモラジー参考抗原を PBST-SM で至適濃度に希釀したもの。

付記 17 L・イクテロヘモラジー検出用抗体

L・イクテロヘモラジーの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体にペルオキシダーゼ

(新設)

標識を行ったもの。PBST-SM で希釈して使用する。－15℃以下で保存する。

付記 18 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、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの。

付記 19 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、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの。

付記 20 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、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの。

付記 21 ウィルス増殖用培養液

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g
牛胎子血清 20～30 mL
イーグル MEM 残量
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 22 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、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの。

付記 23 犬パルボウイルス赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス Y-1 株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清を不活化したもので、赤血球凝集価が 128 倍以上のもの。

付記 24 (略)

付記 25 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
精製水 残量
pH を 9.6 に調整する。

付記 4 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、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの。

付記 5 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、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの。

付記 6 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、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの。

付記 7 ウィルス増殖用培養液

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.98 g
牛胎子血清 30 mL
イーグル MEM 残量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0～7.4 に調整する。必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 8 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、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの。

付記 9 犬パルボウイルス赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス Y-1 株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清を不活化したもので、赤血球凝集価が 128 倍以上のもの。

付記 10 (略)

(新設)