

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（シードロット製剤を除く。）の部 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（シード）</p> <p>1・2（略） 3 試験法 3.1～3.4（略） 3.5 小分製品の試験 3.5.1 特性試験 3.5.2～3.5.7（略） 3.5.8 力価試験 <u>3.5.8.1、3.5.8.2又は3.5.8.3の試験を行う。</u> <u>3.5.8.1・3.5.8.2（略）</u> <u>3.5.8.3 相対力価試験法</u> <u>3.5.8.3.1 試験材料</u> <u>試験品及び参照品（付記16）を用いる。</u> <u>3.5.8.3.2 試験方法</u> <u>3.5.8.3.2.1 試料の調製</u> <u>試験品を2回凍結融解したものを試料とする。この場合、凍結は、-65°C以下で24時間以上行う。</u> <u>3.5.8.3.2.2 固相化プレートの作製</u> <u>希釀した捕獲抗体（付記17）を96穴プレートの各穴に分注し、2～7°Cで16～72時間静置する。プレートを洗浄した後、ブロッキング液（付記18）を各穴に加え、35～39°Cで30～60分間反応させる。再度洗浄したものを固相化プレートとする。</u> <u>3.5.8.3.2.3 反応</u> <u>ELISAによりOD値を測定する。</u> <u>試料及び参照品をブロッキング液で適当な濃度に希釀したもの、及びそれらを階段希釀したものを、固相化プレートの各穴に加え、21～25°Cで60～75分間反応させる。洗浄した後、希釀した指示抗体（付記19）を各穴に加え、21～25°Cで60～75分間反応させる。洗浄した後、基質液（付記20）を各穴に加</u></p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 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（シード）</p> <p>1・2（略） 3 試験法 3.1～3.4（略） 3.5 小分製品の試験 3.5.1 特性試験 3.5.2～3.5.7（略） 3.5.8 力価試験 <u>3.5.8.1又は3.5.8.2の試験を行う。</u> <u>3.5.8.1・3.5.8.2（略）</u> （新設）</p>

え、21～25℃で反応させる。主波長405nm、副波長490nm又は492nmで最低希釈倍率の参照品の平均OD値を測定し、その値が1.5～2.2となった時点で反応終了とし、全ての穴のOD値を測定する。

3.5.8.3.3 判定

各穴のOD値を用いて、参照品中の抗原量を1.0として、試料の抗原量を相対力価（RP）の計算法（付記21）により算出するとき、試験品のRPは1.38以上でなければならない。

4 (略)

付記1 ポリソルベート20抽出抗原1

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の振とう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）に蛋白濃度1mg/mLになるように懸濁後、2vol%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。

(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2 参照陽性血清1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエJ株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清で、抗体価が2,560～5,120倍となるように調整し、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記3 (略)

付記4 抗原吸着プレート1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエJ株又はこれと同等の免疫原性を有する株に対するウサギ免疫血清（付記22）を炭酸緩衝液1（付記23）で100倍に希釈後、96穴マイクロプレートの各穴に100μLずつ加え、4℃で18時間反応させる。その後、洗浄液1で3回洗浄する。0.1w/v%ゼラチン液（付記24）を各穴に100μLずつ加え、4℃で18時間反応させる。さらに、洗浄液1で3回洗浄後、ポリソルベート20抽出抗原1を希釈液で蛋白量12.5μg/mLになるように希釈し、各穴に100μLずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液1で3回洗浄したもの。

付記5 洗浄液1

ポリソルベート20 0.5mLと希釈液1,000mLを混合したもの。

4 (略)

付記1 ポリソルベート20抽出抗原1

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の振とう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）に蛋白濃度1mg/mLになるように懸濁後、2vol%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。

(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2 参照陽性血清1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエJ株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清で、抗体価が2,560～5,120倍となるように調整し、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記3 (略)

付記4 抗原吸着プレート1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエJ株又はこれと同等の免疫原性を有する株に対するウサギ免疫血清（付記16）を炭酸緩衝液1（付記17）で100倍に希釈後、96穴マイクロプレートの各穴に100μLずつ加え、4℃で18時間反応させる。その後、洗浄液1で3回洗浄する。0.1w/v%ゼラチン液（付記18）を各穴に100μLずつ加え、4℃で18時間反応させる。さらに、洗浄液1で3回洗浄後、ポリソルベート20抽出抗原1を希釈液で蛋白量12.5μg/mLになるように希釈し、各穴に100μLずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液1で3回洗浄したもの。

付記5 洗浄液1

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1 アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体を希釈液で至適濃度に希釈したもの。	付記6 標識抗体1 アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体を希釈液で至適濃度に希釈したもの
付記7 基質液1 <i>p</i> -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25）100mLで溶解したもの。	付記7 基質液1 <i>p</i> -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19）100mLで溶解したもの
付記8 ポリソルベート20抽出抗原2 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、蛋白量として2 mg/mLとなるようにリン酸緩衝液2（付記26）中に懸濁し、2 vol%ポリソルベート20溶液を等量加えて、37°Cで90分間振とうしながら加温し、遠心後に採取し、適當な濃度に調製したもの。	付記8 ポリソルベート20抽出抗原2 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、蛋白量として2 mg/mLとなるようにリン酸緩衝液2（付記20）中に懸濁し、2 vol%ポリソルベート20溶液を等量加えて、37°Cで90分間振とうしながら加温し、遠心後に採取し、適當な濃度に調製したもの
付記9 参照陽性血清2 豚での有効性が確認されている最少抗原量を含有するワクチン（3×10 ⁸ CCU/dose）の1 mLをウサギに免疫して得られた血清で、ELISA抗体価40～160倍となるように調製し、小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの。	付記9 参照陽性血清2 豚での有効性が確認されている最少抗原量を含有するワクチン（3×10 ⁸ CCU/dose）の1 mLをウサギに免疫して得られた血清で、ELISA抗体価40～160倍となるように調製し、小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの
付記10 参照陰性血清 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗体陰性のウサギ血清でELISA抗体価20倍以下のものを小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの。	付記10 参照陰性血清 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗体陰性のウサギ血清でELISA抗体価20倍以下のものを小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの
付記11 (略)	付記11 (略)
付記12 抗原吸着プレート2 ポリソルベート20抽出抗原2を炭酸緩衝液2（付記27）で蛋白量として10 μg/mLに調製した抗原液をマイクロプレートの各穴に100 μLずつ分注し、プレートをシールして室温で18～72時間感作したもの。	付記12 抗原吸着プレート2 ポリソルベート20抽出抗原2を炭酸緩衝液2（付記21）で蛋白量として10 μg/mLに調製した抗原液をマイクロプレートの各穴に100 μLずつ分注し、プレートをシールして室温で18～72時間感作したもの
付記13 (略)	付記13 (略)
付記14 標識抗体2 ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG（H+L）を希釈液2で至適濃度に希釈したもの。	付記14 標識抗体2 ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG（H+L）を希釈液2で至適濃度に希釈したもの
付記15 基質液2 A液：0.6gの2,2'-アジノージ（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの。 B液：0.02vol%過酸化水素溶液	付記15 基質液2 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ット）を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの 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する。

付記16 参照品

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、油性アジュバントを添加したものであり、豚における攻撃試験において肺病変及び抗体価に基づ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17 捕獲抗体

ハイブリドーマクローンによって作製された抗p46マウスモノクローナル抗体。

付記18 ブロッキング液

溶液A
牛胎子血清 $\frac{60}{0.3}$ mL

溶液A
溶液B $\frac{90}{0.1}$ mL
Triton X-100 $\frac{0.1}{10}$ mL
Tween 20

溶液B
カゼイン $\frac{1}{100}$ g
リン酸緩衝食塩液

リン酸緩衝食塩液
1,000mL中
塩化ナトリウム $\frac{8}{1.15}$ g
無水リン酸水素二ナトリウム $\frac{0.2}{0.2}$ g
塩化カリウム $\frac{0.2}{\text{残量}}$ g
精製水
pH7.1～7.3に調整する。孔径0.2μm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記19 指示抗体

ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した抗p46マウスモノクローナル抗体。

付記20 基質液

2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)

A液とB液を使用時に等量混合する。

(新設)

<p><u>(ABTS) 液</u></p> <p><u>付記21 相対力価 (RP) の計算法</u> <u>動物医薬品検査所が適当と認めたもの。</u></p>	
<p><u>付記22 ウサギ免疫血清</u> マイコプラズマ・ハイオニューモニエJ株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したウサギの血清で、発育阻止試験において直径3mm以上の阻止帯を示すもの。</p>	<p><u>付記16 ウサギ免疫血清</u> マイコプラズマ・ハイオニューモニエJ株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したウサギの血清で、発育阻止試験において直径3mm以上の阻止帯を示すもの</p>
<p><u>付記23 (略)</u></p>	<p><u>付記17 (略)</u></p>
<p><u>付記24 0.1w/v%ゼラチン液</u> ゼラチン1.0gを希釀液<u>2</u> 1,000mLで溶解したもの。</p>	<p><u>付記18 0.1w/v%ゼラチン液</u> ゼラチン1.0gを希釀液1,000mLで溶解したもの</p>
<p><u>付記25 基質緩衝液</u> 塩化マグネシウム六水和物0.049g、ジエタノールアミン96mLを水に溶解後、5mol/Lの塩酸でpHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの。</p>	<p><u>付記19 基質緩衝液</u> 塩化マグネシウム六水和物0.049g、ジエタノールアミン96mLを水に溶解後、5mol/Lの塩酸でpHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの</p>
<p><u>付記26・27 (略)</u></p>	<p><u>付記20・21 (略)</u></p>