

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

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

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

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部	ワクチン（シードロット製剤）の部
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（シード）	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（シード）
1 （略）	1 （略）
2 製法	2 製法
2.1 製造用株	2.1 製造用株
2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ	2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ
2.1.1.1・2.1.1.2（略）	2.1.1.1・2.1.1.2（略）
2.1.1.3 マスターシード菌	2.1.1.3 マスターシード菌
2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数 マスターシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。 。分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。 <u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u>	2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数 マスターシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。 。分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。
マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。 マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。	マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。 マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。
2.1.1.4 ワーキングシード菌	2.1.1.4 ワーキングシード菌
2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖及び継代する。 ワーキングシード菌は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。 <u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存</u>	2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖及び継代する。 ワーキングシード菌は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

<u>温度とする。</u> ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。 2.1.1.5 プロダクションシード菌 2.1.1.5.1 増殖及び保存 プロダクションシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させる。 プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u> プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。 2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ 2.1.2.1・2.1.2.2 (略) 2.1.2.3 マスターシード菌 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数 マスターシード菌は、鶏血清加PPLO寒天培地（付記2）又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。 分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u> マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。 マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。 2.1.2.4 ワーキングシード菌 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングシード菌は、鶏血清加PPLO寒天培地又は適当と認められた培地で増殖及び継代する。 ワーキングシード菌は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u> ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。 2.1.2.5 プロダクションシード菌 2.1.2.5.1 増殖及び保存 プロダクションシード菌は、鶏血清加PPLO寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させる。 プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－70℃以下又は	ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。 2.1.1.5 プロダクションシード菌 2.1.1.5.1 増殖及び保存 プロダクションシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させる。 プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。 プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。 2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ 2.1.2.1・2.1.2.2 (略) 2.1.2.3 マスターシード菌 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数 マスターシード菌は、鶏血清加PPLO寒天培地（付記2）又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。 分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。 マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。 マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。 2.1.2.4 ワーキングシード菌 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングシード菌は、鶏血清加PPLO寒天培地又は適当と認められた培地で増殖及び継代する。 ワーキングシード菌は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。 ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。 2.1.2.5 プロダクションシード菌 2.1.2.5.1 増殖及び保存 プロダクションシード菌は、鶏血清加PPLO寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させる。 プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－70℃以下又は
--	--

凍結乾燥して5℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u> プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。 2.1.3 豚丹毒菌 2.1.3.1・2.1.3.2 (略) 2.1.3.3 マスターシード菌 2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数 マスターシード菌は、豚丹毒菌用平板培地（付記3）又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。 分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u> マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。 マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。 2.1.3.4 ワーキングシード菌 2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングシード菌は、豚丹毒菌用平板培地又は適当と認められた培地で増殖及び継代する。 ワーキングシード菌は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u> ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。 2.1.3.5 プロダクションシード菌 2.1.3.5.1 増殖及び保存 プロダクションシード菌は、豚丹毒菌用平板培地又は適当と認められた培地で増殖させる。 プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u> プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。 2.2 製造用材料 2.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ 2.2.1.1 (略) 2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ	凍結乾燥して5℃以下で保存する。 プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。 2.1.3 豚丹毒 2.1.3.1・2.1.3.2 (略) 2.1.3.3 マスターシード菌 2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数 マスターシード菌は、豚丹毒菌用平板培地（付記3）又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。 分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。 マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。 マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。 2.1.3.4 ワーキングシード菌 2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存 ワーキングシード菌は、豚丹毒菌用平板培地又は適当と認められた培地で増殖及び継代する。 ワーキングシード菌は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。 ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。 2.1.3.5 プロダクションシード菌 2.1.3.5.1 増殖及び保存 プロダクションシード菌は、豚丹毒菌用平板培地又は適当と認められた培地で増殖する。 プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。 プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。 2.2 製造用材料 2.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ<u>の製造用材料</u> 2.2.1.1 (略) 2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ<u>の製造用材料</u>
--	--

2.2.2.1 (略) 2.2.3 豚丹毒菌 2.2.3.1 (略) 2.3 原液 2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液 2.3.1.1 培養 ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を、製造用培地 1 又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。 培養菌液について、3.2.1.1 及び 3.2.2 の試験を行う。 2.3.1.2 (略) 2.3.1.3 濃度調整 PBS 又は適当と認められた保存剤を添加した PBS でボルデテラ・ブロンキセプチカ不活化菌液の濃度を調整したものを原液とする。 原液について、3.6.1 の試験を行う。 2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ原液 2.3.2.1 培養 鶏血清加 PPLO 寒天培地又は適当と認められた培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を、製造用培地 2 又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。 培養菌液について、3.2.1.2 及び <u>3.2.3.1</u> の試験を行う。 2.3.2.2 集菌及び破碎 培養菌液を遠心し、得られた沈殿菌を適量のリン酸緩衝液（付記 9）に浮遊し、物理的処理により菌体を破碎したものをパスツレラ・ムルトシダ破碎菌液とする。 パスツレラ・ムルトシダ破碎菌液について、3.4 の試験を行う。 2.3.2.3 部分精製及び濃縮 <u>パスツレラ・ムルトシダ破碎菌液</u> からカラムクロマトグラフィーにより毒素活性部分を分取し、濃縮したものをパスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液とする。 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液について、3.5 の試験を行う。 2.3.2.4 (略) 2.3.3 豚丹毒菌原液	2.2.2.1 (略) 2.2.3 豚丹毒の製造用材料 2.2.3.1 (略) 2.3 原液 2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液 2.3.1.1 培養 ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を、製造用培地 1 又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ培養菌液</u> とする。 <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ培養菌液</u> について、3.2.1.1 及び 3.2.2 の試験を行う。 2.3.1.2 (略) 2.3.1.3 濃度調整 PBS 又は適当と認められた保存剤を添加した PBS でボルデテラ・ブロンキセプチカ不活化菌液の濃度を調整したものを <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液</u> とする。 <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液</u> について、3.6.1 の試験を行う。 2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ原液 2.3.2.1 培養 鶏血清加 PPLO 寒天培地又は適当と認められた培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を、製造用培地 2 又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。 <u>パスツレラ・ムルトシダ培養菌液</u> について、3.2.1.2 及び <u>3.2.3</u> の試験を行う。 2.3.2.2 集菌及び破碎 <u>パスツレラ・ムルトシダ培養菌液</u> を遠心し、得られた沈殿菌を適量のリン酸緩衝液（付記 9）に浮遊し、物理的処理により菌体を破碎したものをパスツレラ・ムルトシダ破碎菌液とする。 パスツレラ・ムルトシダ破碎菌液について、3.4 の試験を行う。 2.3.2.3 部分精製及び濃縮 破碎菌液からカラムクロマトグラフィーにより毒素活性部分を分取し、濃縮したものをパスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液とする。 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液について、3.5 の試験を行う。 2.3.2.4 (略) 2.3.3 豚丹毒菌原液
---	---

2.3.3.1 培養 ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を豚丹毒菌用培地又は適当と認められた培地に接種し、増量培養したものを更に製造用培地3又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。 培養菌液について、3.2.1.3及び<u>3.2.3.2</u>の試験を行う。 2.3.3.2 (略) 2.4～2.5 (略) 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシード菌の試験 3.1.1.1 (略) 3.1.1.2 夾雑菌否定試験 3.1.1.2.1・3.1.1.2.2 (略) 3.1.1.2.3 豚丹毒菌の夾雑菌否定試験 3.1.1.2.3.1 (略) 3.1.1.2.3.2 普通寒天培地斜面培養法 3.1.1.2.3.2.1 培地 普通寒天斜面培地を用いる。 3.1.1.2.3.2.2 試験方法 検体0.5mLずつを培地の4本に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。 3.1.1.2.3.2.3 判定 (略) 3.1.2・3.1.3 (略) 3.2～3.4 (略) 3.5 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液の試験 3.5.1 同定試験 (略) 3.5.2 皮膚壊死毒素定量試験 3.5.2.1 試験材料 3.5.2.1.1 検体及び試料 <u>毒素量測定試験</u>には、検体をPBSで2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料としたものを用いる。また、<u>たん白量測定試験</u>には、検体を用いる。 3.5.2.1.2 試験動物 (略) 3.5.2.2 試験方法 (略) 3.5.2.3 判定	2.3.3.1 培養 ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を豚丹毒菌用培地又は適当と認められた培地に接種し、増量培養したものを更に製造用培地3又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。 培養菌液について、3.2.1.3及び<u>3.2.3</u>の試験を行う。 2.3.3.2 (略) 2.4～2.5 (略) 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシード菌の試験 3.1.1.1 (略) 3.1.1.2 夾雑菌否定試験 3.1.1.2.1・3.1.1.2.2 (略) 3.1.1.2.3 豚丹毒菌の夾雑菌否定試験 3.1.1.2.3.1 (略) 3.1.1.2.3.2 普通寒天培地斜面培養法 3.1.1.2.3.2.1 培地 普通寒天斜面培地を用いる。 3.1.1.2.3.2.2 試験方法 検体0.5mLずつを<u>普通寒天斜面培地</u>の4本に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。 3.1.1.2.3.2.3 判定 (略) 3.1.2・3.1.3 (略) 3.2～3.4 (略) 3.5 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液の試験 3.5.1 同定試験 (略) 3.5.2 皮膚壊死毒素定量試験 3.5.2.1 試験材料 3.5.2.1.1 検体及び試料 <u>たん白量測定試験</u>には、検体を用いる。また、<u>毒素量測定試験</u>には、検体をPBSで2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料としたものを用いる。 3.5.2.1.2 試験動物 (略) 3.5.2.2 試験方法 (略) 3.5.2.3 判定 検体1mL中の皮膚壊死毒素単位及びたん白量から、たん白1μg当た
---	---

検体 1 mL中の皮膚壊死毒素単位及びたん白量から、たん白量 1 μg 当たりの皮膚壊死毒素単位を算出する。 検体中の皮膚壊死毒素は、たん白量 1 μg 当たり 30 皮膚壊死毒素単位以上でなければならない。 3.6 原液の試験 (略) 3.7 小分製品の試験 3.7.1～3.7.7 (略) 3.7.8 安全試験 3.7.8.1～3.7.8.3 (略) 3.7.9 力価試験 3.7.9.1 <u>豚ボルデテラ感染症力価試験</u> 3.7.9.1.1 試験材料 3.7.9.1.1.1 試験動物 (略) 3.7.9.1.1.2 凝集反応用抗原 (略) 3.7.9.1.2・3.7.9.1.3 (略) 3.7.9.2 <u>豚パストツレラ症力価試験</u> 3.7.9.2.1 試験材料 3.7.9.2.1.1 試験動物 (略) 3.7.9.2.1.2 酵素抗体反応 (以下この項において「ELISA」という。) 用抗原組換え無毒変異型皮膚壊死毒素たん白 (以下この項において「<u>mrPMT</u>」という。) (付記17) を用いる。 3.7.9.2.2 試験方法 3.7.8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、ELISAを行う。 試験群と対照群の血清を血清希釈液 (付記18) で100倍に希釈したもの、<u>指示陽性血清</u> (付記19) 及び<u>指示陰性血清</u> (付記20) を<u>mrPMT</u> 吸着プレート (付記21) の4穴 (偶数列2穴と奇数列2穴) に50 μ Lずつ加える。37℃で30分間反応させた後、洗浄液 (付記22) で3回洗浄する。 次に、各穴に酵素標識抗体液 (付記23) を50 μ L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24) を各穴に50 μ Lずつ加え、遮光して30℃で<u>指示血清が所定の吸光度値となるように感作させた後</u>、2 mol/L硫酸水溶液を50 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長490～492nm、副波長630nmで測定する。 3.7.9.2.3 判定	りの皮膚壊死毒素単位を算出する。 検体中の皮膚壊死毒素は、たん白量 1 μg 当たり 30 皮膚壊死毒素単位以上でなければならない。 3.6 原液の試験 (略) 3.7 小分製品の試験 3.7.1～3.7.7 (略) 3.7.8 安全試験 3.7.8.1～3.7.8.3 (略) 3.7.9 力価試験 3.7.9.1 <u>ボルデテラ・ブロンキセプチカ感染症力価試験</u> 3.7.9.1.1 試験材料 3.7.9.1.1.1 試験動物 (略) 3.7.9.1.1.2 凝集反応用抗原 (略) 3.7.9.1.2・3.7.9.1.3 (略) 3.7.9.2 <u>パストツレラ・ムルトシダ感染症力価試験</u> 3.7.9.2.1 試験材料 3.7.9.2.1.1 試験動物 (略) 3.7.9.2.1.2 酵素抗体反応 (以下この項において「ELISA」という。) 用抗原組換え皮膚壊死毒素たん白 (以下この項において「<u>rToxA</u>」という。) (付記17) を用いる。 3.7.9.2.2 試験方法 3.7.8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、ELISAを行う。 試験群と対照群の血清を血清希釈液 (付記18) で100倍に希釈したもの、<u>参照陽性血清</u> (付記19) 及び<u>参照陰性血清</u> (付記20) を<u>rToxA</u> 吸着プレート (付記21) の4穴 (偶数列2穴と奇数列2穴) に50 μ Lずつ加える。37℃で30分間反応させた後、洗浄液 (付記22) で3回洗浄する。 次に、各穴に酵素標識抗体液 (付記23) を50 μ L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24) を各穴に50 μ Lずつ加え、遮光して30℃で<u>20分間反応させた後</u>、2 mol/L硫酸水溶液を50 μ L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。 3.7.9.2.3 判定 試験群と対照群の血清、<u>参照陽性血清</u> 及び<u>参照陰性血清</u> について、奇数列穴の吸光度値から偶数列穴の吸光度値を差し引いた値を算出し、平
---	---

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から偶数列穴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:被検血清の吸光度値 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、全て陽性でなければならない。この場合において、対照群では、全て0.1未満でなければならない。 3.7.9.3 (略) 4 (略) 付記1～付記10 (略) 付記11 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・ブロス 1,000mL中 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・ブロス 30 g 水 残 量 加熱溶解後、pHを7.0～7.4に調整し、沈殿をろ過により除去した後、121℃で15分間高压滅菌する。 付記12～付記16 (略) 付記17 <u>mrPMT</u> 組換え無毒変異型皮膚壊死毒素たん白 (mrPMT) を発現するパスツレラ・ムルトシダ由来無毒変異型皮膚壊死毒素遺伝子を導入した大腸菌株の培養液を集菌して得た菌体を超音波処理により破碎し、硫酸塩析法によりmrPMTを回収し、精製する。 精製したmrPMT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る。精製したmrPMTをホルマリンで不活化し、リン酸緩衝液に透析したものをELISA抗原とする。 付記18 血清希釈液	均したものを各血清の吸光度値とする。 参照陽性血清の吸光度値が0.8～1.3、参照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:被検血清の吸光度値 N:参照陰性血清の吸光度値 P:参照陽性血清の吸光度値 試験群のE値は、全て陽性でなければならない。この場合において、対照群では、全て0.1未満でなければならない。 3.7.9.3 (略) 4 (略) 付記1～付記10 (略) 付記11 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・ブロス 1,000mL中 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・ブロス 30 g 水 残 量 加熱溶解後、pHを7.0～7.4に調整し、沈殿をろ過により除去した後、121℃で15分間高压滅菌する。 付記12～付記16 (略) 付記17 <u>rToxA</u> 大腸菌K-12株由来のXL-1 Blue株を、ToxA遺伝子を挿入したpSN131プラスミドで形質転換してrToxA産生大腸菌を作出する。 この組換え大腸菌の培養液を集菌・洗浄して得た菌体を超音波処理及び硫酸塩析した後、カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、ホルマリンで不活化したものをrToxAとする。 rToxAは、不活化前の試料を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。 付記18 血清希釈液 1,000mL中 ゼラチン 10.0 g
--	---

1,000mL中 ゼラチン 10 g 10倍濃度PBS 100 mL ポリソルベート80 1 mL 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PBS及び ポリソルベート80を添加する。	10倍濃度PBS 100 mL ポリソルベート80 1 mL 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PBS及び ポリソルベート80を添加する。
付記19 指示陽性血清 <u>精製mrPMTで免疫した豚の血清であって、ELISAの吸光度値が約1.0を示すように調整したもの。</u> 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19 参照陽性血清 <u>不活化した精製パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素で免疫した豚の血清であって、血清希釈によりELISAの吸光度値が約1.0を示すように濃度を調整し、凍結したもの。</u> 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20 指示陰性血清 <u>健康な豚の血清であって、ELISAの吸光度値が0.1未満を示すもの。</u>	付記20 参照陰性血清 <u>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、ELISAの吸光度が0.1以下を示すもの。</u>
付記21 mrPMT吸着プレート <u>ELISA抗原を指示陽性血清の吸光度が0.8～1.3になるよう0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液（付記25）で希釈し、プレートの奇数列に分注し、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50μLずつ分注し、2～10℃で1夜固相化する。固相化したプレートを洗浄液で洗浄し、ブロッキング液（付記26）を50μLずつ各穴に加えてブロッキング後、プレートを洗浄液で洗浄したもの。</u>	付記21 rToxA吸着プレート <u>rToxAを0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液（付記25）によりたん白濃度が1μg/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50μLずつ加え、4℃で1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26）を50μL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。</u>
付記22 洗浄液 （略）	付記22 洗浄液 （略）
付記23 酵素標識抗体液 1,000mL中 ペルオキシダーゼ標識プロテインA 1 mL 10倍濃度PBS 100 mL	付記23 酵素標識抗体液 1,000mL中 ペルオキシダーゼ標識プロテインA（たん白濃度2.0mg/mL） 1 mL 10倍濃度PBS 100 mL ポリソルベート80 1 mL 水 残 量

	ポリソルベート80 水 使用直前に調製する。	1 mL 残 量		使用直前に調製する。	
付記24	発色基質液 1,000mL中 <i>o</i> -フェニレンジアミン二塩酸塩 30%過酸化水素水 基質緩衝液（付記27） 使用直前に調製する。	<u>0.4</u> g 0.2 mL 残 量	付記24	発色基質液 1,000mL中 <i>o</i> -フェニレンジアミン二塩酸塩 30%過酸化水素水 基質緩衝液（付記27） 使用直前に調製する。	<u>0.40</u> g 0.2 mL 残 量
付記25	0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液 1,000mL中 炭酸水素ナトリウム 炭酸ナトリウム 水 pHを9.6に調整する。	<u>3</u> g 1.5 g 残 量	付記25	0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液 1,000mL中 炭酸水素ナトリウム 炭酸ナトリウム 水 pHを9.6に調整する。	<u>3.0</u> g 1.5 g 残 量
付記26	ブロッキング液 1,000mL中 ゼラチン 水 ゼラチンを加温・溶解し、冷却後使用する。	<u>10</u> g 残 量	付記26	ブロッキング液 1,000mL中 ゼラチン 水 ゼラチンを加温・溶解し、冷却後使用する。	<u>10.0</u> g 残 量
付記27	（略）		付記27	（略）	