

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（シードロット製剤を除く。）の部	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・ 産卵低下症候群－1976・トリニューモウイル ス感染症混合（油性アジュバント加）不活化 ワクチン	ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・ 産卵低下症候群－1976・トリニューモウイル ス感染症混合（油性アジュバント加）不活化 ワクチン
1 （略）	1 （略）
2 製法	2 製法
2.1 （略）	2.1 （略）
2.2 製造用材料	2.2 製造用材料
2.2.1 ニューカッスル病ウイルス	2.2.1 ニューカッスル病ウイルス
2.2.1.1 発育鶏卵	2.2.1.1 発育鶏卵
9～11 日齢のものを用いる。	<u>10</u> ～11 日齢のものを用いる。
2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス	2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス
2.2.2.1 発育鶏卵	2.2.2.1 発育鶏卵
<u>10</u> ～12 日齢のものを用いる。	<u>11</u> ～12 日齢のものを用いる。
2.2.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス	2.2.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス
2.2.3.1 発育あひる卵	2.2.3.1 発育あひる卵
9～10 日齢のものを用いる。	<u>10</u> 日齢のものを用いる。
2.2.4 （略）	2.2.4 （略）
2.3 原液	2.3 原液
2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液 （削る）	2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液
	<u>2.3.1.1 発育鶏卵の培養</u> <u>1 回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。</u> <u>個体別発育鶏卵について、3.1.1 の試験を行う。</u>
<u>2.3.1.1</u> ウイルスの培養	<u>2.3.1.2</u> ウイルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の<u>ろ液</u>をウイルス浮遊液とする。 <u>2.3.1.2 不活化</u> ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について <u>3.2.1.1</u> の試験を行う。 <u>2.3.1.3</u> アジュバントの添加 不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。 原液について、<u>3.3.1</u> の試験を行う。 なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて <u>3.3.2.1</u> の試験を行う。 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス原液 (削る) <u>2.3.2.1</u> ウイルスの培養 各株の種ウイルスを発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液の<u>ろ液</u>を各株のウイルス浮遊液とする。 ウイルス浮遊液について、<u>3.1.1.1</u> の試験を行う。 <u>2.3.2.2</u> 不活化 各ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて<u>不活化したもの又は不活化後に濃縮したものを</u>、それぞれの株の不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、<u>3.2.1.2</u> の試験を行う。 <u>2.3.2.3</u> アジュバントの添加 各株の不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。 ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。 原液について、<u>3.3.1</u> の試験を行う。 2.3.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス原液 (削る)	種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の<u>遠心上清</u>をウイルス浮遊液とする。 <u>ウイルス浮遊液について、3.2.1.1 の試験を行う。</u> <u>2.3.1.3</u> 不活化 ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について <u>3.3.1</u> 及び <u>3.3.2.1</u> の試験を行う。 <u>2.3.1.4</u> アジュバントの添加 不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。 原液について、<u>3.4.1</u> の試験を行う。 なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて <u>3.4.2.1</u> の試験を行う。 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス原液 <u>2.3.2.1</u> 発育鶏卵の培養 <u>1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。</u> <u>個別発育鶏卵について、3.1.1 の試験を行う。</u> <u>2.3.2.2</u> ウイルスの培養 各株の種ウイルスを発育鶏卵で尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液の<u>遠心上清</u>を各株のウイルス浮遊液とする。 ウイルス浮遊液について、<u>3.2.1.2</u> の試験を行う。 <u>2.3.2.3</u> 不活化 各ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて<u>不活化し</u>、それぞれの株の不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、<u>3.3.1</u> 及び <u>3.3.2.2</u> の試験を行う。 <u>2.3.2.4</u> アジュバントの添加 各株の不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。 ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。 原液について、<u>3.4.1</u> の試験を行う。 2.3.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス原液 <u>2.3.3.1</u> 発育あひる卵の培養 <u>1 回に処理する発育あひる卵を個別発育あひる卵とみなす。</u> <u>個別発育あひる卵について、3.1.2 の試験を行う</u>
--	---

<u>2.3.3.1</u> (略) <u>2.3.3.2</u> 不活化 ウイルス浮遊液を農林水産大臣が適当と認めた方法により不活化し、原液とする。 原液について、<u>3.2.1.3</u>、<u>3.3.1</u> 及び <u>3.3.2.2</u> の試験を行う。 2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス (削る) <u>2.3.4.1</u> ウイルスの培養 種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した<u>感染細胞を含む培養液を超音波処理したもの</u>をウイルス浮遊液とする。 <u>2.3.4.2</u> 不活化 ウイルス浮遊液にβ-プロピオラクトンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、<u>3.2.1.4</u> の試験を行う。 <u>2.3.4.3</u> アジュバントの添加 不活化ウイルス浮遊液に農林水産大臣が適当と認めた油性アジュバントを添加し、原液とする。 ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。 原液について、<u>3.3.1</u> の試験を行う。 なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて <u>3.3.2.3</u> の試験を行う。 2.4 最終バルク ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルスの各原液、<u>産卵低下症候群-1976 ウイルス原液</u>及び七面鳥鼻気管炎ウイルス原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してよい。 2.5 小分製品 最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。 小分製品について、<u>3.4</u> の試験を行う。	<u>2.3.3.2</u> (略) <u>2.3.3.3</u> 不活化 ウイルス浮遊液を<u>製剤ごとに</u>農林水産大臣が適当と認めた方法により不活化し、原液とする。 原液について、<u>3.3.1</u>、<u>3.3.2.3</u> 及び <u>3.3.3.2</u> の試験を行う。 2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス原液 <u>2.3.4.1</u> 細胞の培養 <u>1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。</u> <u>個体別培養細胞について、3.1.2 の試験を行う。</u> <u>2.3.4.2</u> ウイルスの培養 種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した<u>培養液のろ過及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合し、</u>ウイルス浮遊液とする。 <u>ウイルス浮遊液について、3.2.1.4 の試験を行う。</u> <u>2.3.4.3</u> 不活化 ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。 不活化ウイルス浮遊液について、<u>3.3.1</u> 及び <u>3.3.2.4</u> の試験を行う。 <u>2.3.4.4</u> アジュバントの添加 不活化ウイルス浮遊液に<u>製剤ごとに</u>農林水産大臣が適当と認めた油性アジュバントを添加し、原液とする。 ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。 原液について、<u>3.4.1</u> の試験を行う。 なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて <u>3.4.2.3</u> の試験を行う。 2.4 最終バルク ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルスの各原液、<u>鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス原液</u>及び七面鳥鼻気管炎ウイルス原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してよい。 2.5 小分製品 最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。 小分製品について、<u>3.5</u> の試験を行う。
---	---

3.1 ウイルス浮遊液の試験

3.1.1 ウイルス含有量試験 (削る)

3.1 発育卵、発育あひる卵又は培養細胞の試験

個体別発育鶏卵の 1 % 以上又は 30 個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次に掲げる試験を行う。

対照発育鶏卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

3.1.1.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

個体別発育あひる卵の 1 % 以上又は 30 個以上を対照発育あひる卵とし、これについて次に掲げる試験を行う。

対照発育あひる卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、あひる胚に異常を認めてはならない。

3.1.2.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

個体別培養細胞の 1 % 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.3.1 の試験最終日に培養液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

<u>3.1.1.1 鶏伝染性気管支炎ウイルス</u> <u>3.1.1.1.1 試験材料</u> <u>3.1.1.1.1.1・3.1.1.1.1.2</u> (略) <u>3.1.1.1.2</u> (略) <u>3.1.1.1.3 判定</u> 鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID₅₀を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。 検体のウイルス含有量は、M41株の場合は1 mL 中 10^{8.0}EID₅₀以上及び249g 株の場合は1 mL 中 10^{7.4}EID₅₀以上でなければならない。 (削る)	検体をリン酸緩衝食塩液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。 <u>3.2.1.1.1.2 発育鶏卵</u> 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の9～11日齢のものを用いる。 <u>3.2.1.1.2 試験方法</u> 試料 0.1mL ずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。 <u>3.2.1.1.3 判定</u> 尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID₅₀を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。 検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{9.0}ID₅₀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。 <u>3.2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス</u> <u>3.2.1.2.1 試験材料</u> <u>3.2.1.2.1.1・3.2.1.2.1.2</u> (略) <u>3.2.1.2.2</u> (略) <u>3.2.1.2.3 判定</u> 鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID₅₀を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。 検体のウイルス含有量は、M41株の場合にあっては1 mL 中 10^{8.0}EID₅₀以上及び249g 株の場合にあっては1 mL 中 10^{7.4}EID₅₀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。 <u>3.2.1.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス</u> <u>3.2.1.3.1 試験材料</u> <u>3.2.1.3.1.1 試料 1</u> 検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）で階段希釈した後、4 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料 1 とする。 <u>3.2.1.3.1.2 試料 2</u> 検体をトリプトース・ホスフェイト・ブロス溶液で階段希釈した各段階の希釈液を試料 2 とする。 <u>3.2.1.3.1.3 培養細胞</u> 96 穴マイクロプレートに培養したあひる胚初代細胞を用いる。 <u>3.2.1.3.1.4 発育あひる卵</u> 13～15 日齢の EDS－76 抗体陰性の発育あひる卵を用いる。
---	--

3.2 不活化ウイルス浮遊液の試験 (削る)	3.2.1.3.2 試験方法 次のいずれかの方法によりウイルス含有量を測定する。 3.2.1.3.2.1 培養細胞接種試験 試料 1 の 0.1mL ずつをそれぞれ 4 穴以上の培養細胞に接種し、37℃で 7 日間培養して、CPE 形成の有無を観察する。 3.2.1.3.2.2 発育あひる卵接種試験 試料 2 の 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育あひる卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 7 日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。 3.2.1.3.2.3 判定 培養細胞接種試験にあつては CPE が認められる最高希釈倍数から TCID₅₀ を、発育あひる卵接種試験にあつては赤血球凝集性を示した最高希釈倍数から EID₅₀ を算出する。 検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5}EID₅₀ 以上又は 1 mL 中 10^{8.5}EID₅₀ 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。 3.2.1.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス 3.2.1.4.1 試験材料 3.2.1.4.1.1 試料 検体を細胞増殖用培養液（付記 2）で調整した鶏胚初代細胞浮遊液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。 3.2.1.4.1.2 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞浮遊液を用いる。 3.2.1.4.2 試験方法 試料 200μL ずつを、それぞれ 96 穴組織培養用プレートの 5 穴以上に接種し、37℃で 5 ～ 7 日間培養し、観察する。 3.2.1.4.3 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。 検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5}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。 3.3 不活化ウイルス浮遊液の試験 3.3.1 無菌試験 一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。
-----------------------------------	---

<u>3.2.1</u> 不活化試験 <u>3.2.1.1</u> ニューカッスル病ウイルス <u>3.2.1.1.1</u> 試験材料 <u>3.2.1.1.1.1</u> (略) <u>3.2.1.1.1.2</u> 発育鶏卵 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9 ～ <u>12</u> 日齢のものをを用いる。 <u>3.2.1.1.2</u> ・ <u>3.2.1.1.3</u> (略) <u>3.2.1.2</u> 鶏伝染性気管支炎ウイルス <u>3.2.1.2.1</u> 試験材料 <u>3.2.1.2.1.1</u> ・ <u>3.2.1.2.1.2</u> (略) <u>3.2.1.2.2</u> ・ <u>3.2.1.2.3</u> (略) <u>3.2.1.3</u> 産卵低下症候群－1976 ウイルス <u>3.2.1.3.1</u> 試験材料 <u>3.2.1.3.1.1</u> ・ <u>3.2.1.3.1.2</u> (略) <u>3.2.1.3.2</u> ・ <u>3.2.1.3.3</u> (略) <u>3.2.1.4</u> 七面鳥鼻気管炎ウイルス <u>3.2.1.4.1</u> 試験材料 <u>3.2.1.4.1.1</u> ・ <u>3.2.1.4.1.2</u> (略) <u>3.2.1.4.2</u> 試験方法 試料の全量を 1 mL につき 20cm² 以上の培養細胞に接種し、<u>36～38℃</u> で 5 日間培養した後、その培養上清 0.1mL を採取し、更に継代し、5 日間培養して観察する。 <u>3.2.1.4.3</u> (略) <u>3.3</u> 原液の試験 <u>3.3.1</u> (略) <u>3.3.2</u> 抗原含有量試験 <u>3.3.2.1</u> ニューカッスル病ウイルス <u>3.3.2.1.1</u> 試験材料 <u>3.3.2.1.1.1</u> (略) <u>3.3.2.1.2</u> ・ <u>3.3.2.1.3</u> (略) <u>3.3.2.2</u> 産卵低下症候群－1976 ウイルス <u>3.3.2.2.1</u> 試験材料 <u>3.3.2.2.1.1</u> (略)	<u>3.3.2</u> 不活化試験 <u>3.3.2.1</u> ニューカッスル病ウイルス <u>3.3.2.1.1</u> 試験材料 <u>3.3.2.1.1.1</u> (略) <u>3.3.2.1.1.2</u> 発育鶏卵 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9 ～ <u>11</u> 日齢のものをを用いる。 <u>3.3.2.1.2</u> ・ <u>3.3.2.1.3</u> (略) <u>3.3.2.2</u> 鶏伝染性気管支炎ウイルス <u>3.3.2.2.1</u> 試験材料 <u>3.3.2.2.1.1</u> ・ <u>3.3.2.2.1.2</u> (略) <u>3.3.2.2.2</u> ・ <u>3.3.2.2.3</u> (略) <u>3.3.2.3</u> 産卵低下症候群－1976 ウイルス <u>3.3.2.3.1</u> 試験材料 <u>3.3.2.3.1.1</u> ・ <u>3.3.2.3.1.2</u> (略) <u>3.3.2.3.2</u> ・ <u>3.3.2.3.3</u> (略) <u>3.3.2.4</u> 七面鳥鼻気管炎ウイルス <u>3.3.2.4.1</u> 試験材料 <u>3.3.2.4.1.1</u> ・ <u>3.3.2.4.1.2</u> (略) <u>3.3.2.4.2</u> 試験方法 試料の全量を 1 mL につき 20cm² 以上の培養細胞に接種し、<u>37℃</u> で 5 日間培養した後、その培養上清 0.1mL を採取し、更に継代し、<u>37℃</u> で 5 日間培養して観察する。 <u>3.3.2.4.3</u> (略) <u>3.4</u> 原液の試験 <u>3.4.1</u> の試験又は <u>3.4.1</u> 若しくは <u>3.4.2</u> の試験を行う。 <u>3.4.1</u> (略) <u>3.4.2</u> 抗原含有量試験 <u>3.4.2.1</u> ニューカッスル病ウイルス <u>3.4.2.1.1</u> 試験材料 <u>3.4.2.1.1.1</u> (略) <u>3.4.2.1.2</u> ・ <u>3.4.2.1.3</u> (略) <u>3.4.2.2</u> 産卵低下症候群－1976 ウイルス <u>3.4.2.2.1</u> 試験材料 <u>3.4.2.2.1.1</u> (略)
--	---

<u>3.3.2.2.2・3.3.2.2.3</u> (略) <u>3.3.2.3</u> 七面鳥鼻気管炎ウイルス <u>3.3.2.3.1</u> 試験材料 <u>3.3.2.3.1.1</u> 試料 検体を<u>ELISA緩衝液（付記1）</u>で<u>6倍</u>に希釈し、<u>更に1.5倍階段希釈した希釈液</u>を試料とする。 <u>3.3.2.3.2</u> 試験方法 七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化した<u>ELISAプレート（付記2）</u>に試料及び<u>ELISA緩衝液で1.5倍階段希釈した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原定量用参照抗原（付記3）</u>を添加し、37℃で反応させる。反応終了後、<u>洗浄用緩衝液（付記4）</u>で洗浄した後、<u>ビオチン標識マウス抗七面鳥鼻気管炎ウイルスモノクローナル抗体（付記5）</u>を添加し、37℃で反応させる。反応終了後、<u>洗浄用緩衝液で洗浄した後、アビジン・ペルオキシダーゼコンジュゲートを添加し、37℃で反応させる。</u>反応終了後、<u>洗浄用緩衝液で洗浄した後、基質液（付記6）</u>を添加し、<u>37℃</u>で反応させる。<u>その後、反応停止液（付記7）</u>を加えて、反応を停止させる。 <u>3.3.2.3.3</u> 判定 波長<u>450nm</u>で吸光度値を測定する。<u>階段希釈した参照抗原の吸光度値から作成した標準曲線より検体の相対抗原量を算出する。</u> 検体の<u>相対抗原量</u>は、<u>1 mL中250EU以上でなければならない。</u> <u>3.4</u> 小分製品の試験 <u>3.4.1～3.4.3</u> (略) <u>3.4.4</u> 安全試験 <u>3.4.4.1</u> 試験材料 <u>3.4.4.1.1・3.4.4.1.2</u> (略) <u>3.4.4.2・3.4.4.3</u> (略) <u>3.4.5</u> 力価試験 <u>3.4.5.1</u> ニューカッスル病力価試験 <u>3.4.5.1.1</u> 試験材料 <u>3.4.5.1.1.1</u> 試験動物 <u>3.4.4</u>の試験に用いた動物を用いる。 <u>3.4.5.1.1.2</u> (略) <u>3.4.5.1.2</u> 試験方法 <u>3.4.4</u>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、	<u>3.4.2.2.2・3.4.2.2.3</u> (略) <u>3.4.2.3</u> 七面鳥鼻気管炎ウイルス <u>3.4.2.3.1</u> 試験材料 <u>3.4.2.3.1.1</u> 試料 検体を<u>洗浄用緩衝液（付記3）</u>で<u>2倍階段希釈し、各段階の希釈液</u>を試料とする。 <u>3.4.2.3.2</u> 試験方法 七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化した<u>96穴平底プレート</u>に各試料及び<u>陰性対照を50μL</u>ずつ添加し、37℃で<u>45分間</u>反応させる。反応終了後<u>洗浄用緩衝液で3回</u>洗浄した後、<u>七面鳥鼻気管炎ウイルス抗体陽性鶏血清を50μL</u>添加し、37℃で<u>30分間</u>反応させる。反応終了後、<u>洗浄用緩衝液で洗浄し、やぎ抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体を50μL</u>添加し、37℃で<u>30分間</u>反応させる。反応終了後、<u>洗浄用緩衝液で洗浄し、基質液（付記4）を50μL</u>ずつ添加し、<u>室温で10分間</u>反応させる。<u>反応終了後、反応停止液（付記5）を25μL</u>加えて、反応を停止させる。 <u>3.4.2.3.3</u> 判定 波長 <u>450nm</u> で吸光度を測定する。<u>陰性対照より2倍以上の吸光度値を示す最終希釈倍数を相対抗原量とする。</u> 検体の<u>抗原量</u>は、<u>250EU/mL以上である。</u> <u>3.5</u> 小分製品の試験 <u>3.5.1～3.5.3</u> (略) <u>3.5.4</u> 安全試験 <u>3.5.4.1</u> 試験材料 <u>3.5.4.1.1・3.5.4.1.2</u> (略) <u>3.5.4.2・3.5.4.3</u> (略) <u>3.5.5</u> 力価試験 <u>3.5.5.1</u> ニューカッスル病力価試験 <u>3.5.5.1.1</u> 試験材料 <u>3.5.5.1.1.1</u> 試験動物 <u>3.5.4</u>の試験に用いた動物を用いる。 <u>3.5.5.1.1.2</u> (略) <u>3.5.5.1.2</u> 試験方法 <u>3.5.4</u>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
---	---

ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。 <u>3.4.5.1.3</u> (略) <u>3.4.5.2</u> 鶏伝染性気管支炎力価試験 <u>3.4.5.2.1</u> 試験材料 <u>3.4.5.2.1.1</u> 試験動物 <u>3.4.4</u> の試験に用いた動物を用いる。 <u>3.4.5.2.1.2</u>・<u>3.4.5.2.1.3</u> (略) <u>3.4.5.2.2</u>・<u>3.4.5.2.3</u> (略) <u>3.4.5.3</u> 産卵低下症候群－1976 力価試験 <u>3.4.5.3.1</u> 試験材料 (削る) <u>3.4.5.3.1.1</u> 試験動物 <u>3.4.4</u> の試験に用いた動物を用いる。 <u>3.4.5.3.1.2</u> 赤血球凝集抗原 産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原（<u>付記 8</u>）を用いる。 <u>3.4.5.3.2</u> 試験方法 <u>3.4.4</u> 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赤血球凝集抑制試験を行う。 血清 1 容に 25w/v%カオリン液（<u>付記 9</u>） 3 容を加え、室温で処理した後、遠心した上清を採取する。これをリン酸緩衝食塩液で階段希釈し、各希釈血清 25μL に等量の 4 単位の産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し、処理した後、鶏赤血球浮遊液を 50μL ずつ加えて振盪混合し静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。 <u>3.4.5.3.3</u> (略) <u>3.4.5.4</u> 七面鳥鼻気管炎力価試験 <u>3.4.5.4.1</u> 試験材料 (削る) <u>3.4.5.4.1.1</u> 試験動物 <u>3.4.4</u> の試験に用いた動物を用いる。 <u>3.4.5.4.2</u> 試験方法 <u>3.4.4</u> の試験終了日に試験群及び対照群から採取した各個体の血清について ELISA を行う。	て、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。 <u>3.5.5.1.3</u> (略) <u>3.5.5.2</u> 鶏伝染性気管支炎力価試験 <u>3.5.5.2.1</u> 試験材料 <u>3.5.5.2.1.1</u> 試験動物 <u>3.5.4</u> の試験に用いた動物を用いる。 <u>3.5.5.2.1.2</u>・<u>3.5.5.2.1.3</u> (略) <u>3.5.5.2.2</u>・<u>3.5.5.2.3</u> (略) <u>3.5.5.3</u> 産卵低下症候群－1976 力価試験 <u>3.5.5.3.1</u> 試験材料 <u>3.5.5.3.1.1</u> 注射材料 <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>3.5.5.3.1.2</u> 試験動物 <u>3.5.4</u> の試験に用いた動物を用いる。 <u>3.5.5.3.1.3</u> 赤血球凝集抗原 産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原（<u>付記 6</u>）を用いる。 <u>3.5.5.3.2</u> 試験方法 <u>3.5.4</u> 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赤血球凝集抑制試験を行う。 血清 1 容に 25w/v%カオリン（<u>付記 7</u>） 3 容を加え、室温で処理した後、遠心した上清を採取する。これをリン酸緩衝食塩液で階段希釈し、各希釈血清 25μL に等量の 4 単位の産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し、処理した後、鶏赤血球浮遊液を 50μL ずつ加えて振盪混合し静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。 <u>3.5.5.3.3</u> (略) <u>3.5.5.4</u> 七面鳥鼻気管炎力価試験 <u>3.5.5.4.1</u> 試験材料 <u>3.5.5.4.1.1</u> 注射材料 <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>3.5.5.4.1.2</u> 試験動物 <u>3.5.4</u> の試験に用いた動物を用いる。 <u>3.5.5.4.2</u> 試験方法 <u>3.5.4</u> の試験最終日に試験群及び対照群から採取した各個体の血清について ELISA を行う。
--	---

固相化緩衝液（付記 10）で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原（付記 11）を 96 穴平底マイクロプレートに 100μL ずつ分注し、37℃で 3 時間反応後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄した後、乾燥させる。次に被検血清を IB・EIA 緩衝液（付記 12）で 2 倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を 100μL ずつ加え、37℃で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、ヤギ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記 13）を 100μL 加え、37℃で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、水切りを行った後、基質液を 100μL 加え、常温で 8 分間反応させる。その後、反応停止液を 50μL 加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。	固相化緩衝液（付記 8）で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原（付記 9）を 96 穴平底プレートに 100μL ずつ分注し、37℃で 3 時間反応後、洗浄用緩衝液で洗浄し、乾燥させる。次に被検血清を IB・EIA 緩衝液（付記 10）で階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を 100μL ずつ加え、37℃で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、水切りを行った後、ヤギ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記 11）を 100μL 加え、37℃で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、水切りを行った後、基質液を 100μL 加え、常温で 8 分間反応させる。反応終了後、反応停止液を 50μL 加えて、反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。																
3.4.5.4.3 判定 参照陰性血清（付記 14）の平均吸光度値の少なくとも 1.5 倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数を ELISA 抗体価とすると、試験群の 80%以上が ELISA 抗体価 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清（付記 15）は、$2^{6.64}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。	3.5.5.4.3 判定 参照陰性血清（付記 12）の平均吸光度値の少なくとも 1.5 倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数を ELISA 抗体価とすると、試験群の 80%以上は ELISA 抗体価 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清（付記 13）は $2^{6.64}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。																
4 （略）	4 （略）																
（削る）	付記 1 ウイルス増殖用培養液 <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>2.95g</td></tr> <tr><td>牛血清</td><td>20mL</td></tr> <tr><td>イーグル MEM</td><td>残量</td></tr> <tr><td>炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0～7.4 に調整する。</td><td></td></tr> <tr><td>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</td><td></td></tr> </table>	1,000mL 中		トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g	牛血清	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。					
1,000mL 中																	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g																
牛血清	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。																	
（削る）	付記 2 細胞増殖用培養液 <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>0.83g</td></tr> <tr><td>トリプトース</td><td>1.00g</td></tr> <tr><td>ラクトアルブミン水解物</td><td>1.25g</td></tr> <tr><td>炭酸水素ナトリウム</td><td>2.45g</td></tr> <tr><td>牛血清</td><td>50ml</td></tr> <tr><td>イーグル MEM</td><td>残量</td></tr> <tr><td>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</td><td></td></tr> </table>	1,000mL 中		トリプトース・ホスフェイト・ブロス	0.83g	トリプトース	1.00g	ラクトアルブミン水解物	1.25g	炭酸水素ナトリウム	2.45g	牛血清	50ml	イーグル MEM	残量	必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	
1,000mL 中																	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	0.83g																
トリプトース	1.00g																
ラクトアルブミン水解物	1.25g																
炭酸水素ナトリウム	2.45g																
牛血清	50ml																
イーグル MEM	残量																
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。																	
付記 1 ELISA緩衝液	付記 3 洗浄用緩衝液																

水 15 mL TMB 溶液は、DMSO1,000mL に TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) を 6 g 溶解したもの。 UP 緩衝液は尿素過酸化物 140mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム三水和物 136g を約 500mL の水に溶解し、1.5mol/L クエン酸で pH5.3～5.7 に調整した後、水を加えて 1,000mL とし、121℃、20 分間高压滅菌したもの) 100mL に溶解したもの。	精製水 15mL a:TMB 溶液は DMSO1,000mL に TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を 6 g 溶解したもの。 b:UP 緩衝液は尿素過酸化物 1 錠(140mg)を TMB 緩衝液 100mL に溶解したもの。 c:TMB 緩衝液は酢酸ナトリウム 136g を約 500mL の精製水に溶解し、1.5M クエン酸で pH5.5±0.2 に調整した後、蒸留水を加えて 1,000mL とし高压蒸気滅菌を行う。																
付記 7～付記 9 (略)	付記 5～付記 7 (略)																
付記 10 固相化緩衝液 1,000mL 中 <table> <tr> <td>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</td><td>12.10 g</td></tr> <tr> <td>リン酸二水素ナトリウム二水和物</td><td>1.43 g</td></tr> <tr> <td>塩化ナトリウム</td><td>8.5 g</td></tr> <tr> <td>水</td><td>残 量</td></tr> </table> pH を 6.9～7.1 に調整する。	リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g	リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g	塩化ナトリウム	8.5 g	水	残 量	付記 8 固相化緩衝液 1,000mL 中 <table> <tr> <td>リン酸一水素ナトリウム</td><td>12.10g</td></tr> <tr> <td>リン酸二水素ナトリウム</td><td>1.43g</td></tr> <tr> <td>塩化ナトリウム</td><td>8.5g</td></tr> <tr> <td>精製水</td><td>残量</td></tr> </table> pH7.0±0.1 に調整する。	リン酸一水素ナトリウム	12.10g	リン酸二水素ナトリウム	1.43g	塩化ナトリウム	8.5g	精製水	残量
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g																
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g																
塩化ナトリウム	8.5 g																
水	残 量																
リン酸一水素ナトリウム	12.10g																
リン酸二水素ナトリウム	1.43g																
塩化ナトリウム	8.5g																
精製水	残量																
付記 11 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原 製造用株を生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞に接種し、38℃で培養する。 CPE が出現したときに培養上清を採取し、感染細胞は少量の培養液でかきとり、超音波破碎を行う。感染細胞を超音波破碎後遠心 (3,000G、10 分間) し、その遠心上清と製造用株培養上清をプールする。次に 30,000G で 1 時間遠心し、沈渣を少量の滅菌水に再浮遊させる。再浮遊させたものをショ糖密度勾配遠心 (53,000G、1 時間) した後、上層を採取し、これを ELISA 抗原とする。 参照陽性血清の 100 倍希釈液の吸光度を測定するときは 0.8 以上、参照陰性血清では 0.2 以下を示すように調製する。	付記 9 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原 動物用生物学的製剤基準の生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の発育鶏卵を用いて作製した鶏胚線維芽細胞に製造用七面鳥鼻気管炎ウイルスを感染させ、超音波破碎及びショ糖ステップ遠心等の加工により得られたもので、参照陽性血清の 100 倍希釈液の吸光度値が 0.8 以上及び参照陰性血清の吸光度値が 0.2 以下を示すもの。																
付記 12 IB・EIA 緩衝液 1,000mL 中 <table> <tr> <td>リン酸二水素ナトリウム二水和物</td><td>2.31 g</td></tr> </table>	リン酸二水素ナトリウム二水和物	2.31 g	付記 10 IB・EIA 緩衝液 1,000mL 中 <table> <tr> <td>リン酸二水素ナトリウム</td><td>2.31g</td></tr> </table>	リン酸二水素ナトリウム	2.31g												
リン酸二水素ナトリウム二水和物	2.31 g																
リン酸二水素ナトリウム	2.31g																

リン酸水素二ナトリウム二水和物 24.06 g 塩化ナトリウム 29.22 g カオリン処理 30w/v%牛血清アルブミン 3.3 mL <u>ポリソルベート 20</u> 0.50 g <u>水</u> 残 量 <u>200nm</u> でろ過滅菌後、 <u>スキムミルク 2w/v%</u> 及び <u>牛胎子血清 5vol%</u> を加える。	リン酸水素二ナトリウム二水和物 24.06g 塩化ナトリウム 29.22g カオリン処理 30w/v%牛血清アルブミン 3.3mL <u>Tween20</u> 0.50g <u>精製水</u> 残量 <u>ろ過滅菌 (200nm)</u> 後、 <u>スキムミルクを 2w/v%</u> 及び <u>牛胎児血清を 5vol%</u> 加える。
<u>付記 13</u> <u>ヤギ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体</u> 参照陽性血清が規定の抗体価を示すように IB・EIA 緩衝液で調製したもの。	<u>付記 11</u> <u>やぎ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体</u> 参照陽性血清が規定の抗体価を示すように IB・EIA 緩衝液で調整したもの。
<u>付記 14</u> 参照陰性血清 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体を保有しない鶏血清で、ELISA 抗体価 $2^{4.64}$ 倍未満を示すもの。	<u>付記 12</u> 参照陰性血清 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏群由来で七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体を保有しない鶏血清で、ELISA 抗体価 $2^{4.64}$ 倍未満を示すもの。
<u>付記 15</u> 参照陽性血清 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体陰性の鶏を弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1 #8544 株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA 抗体価 $2^{8.64} \sim 2^{9.64}$ 倍を示すもの。	<u>付記 13</u> 参照陽性血清 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏群由来で七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体陰性鶏を弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1#8544 株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA 抗体価 $2^{8.64} \sim 2^{9.64}$ 倍を示すもの。