25動薬第1847号
平 25.9.30 成
動物医薬品検査所

２５消安第２６４１号
平成２５年９月２６日

動物医薬品検査所長　殿

消費・安全局長

動物用生物学的製剤基準の一部改正等について

このことについて、別添写しのとおり各都道府県知事宛て通知したので、了知されたい。

接受
25. 9. 30
動物医薬品検査所

写

２５消安第２６４１号
平成２５年９月２６日

北海道知事　殿

農林水産省消費・安全局長

動物用生物学的製剤基準の一部改正等について

今般、「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）、「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）、「動物用医薬品の検定手数料並びに試験品及び出願者の保存用品として抜き取らせるべき数量」（平成２５年６月１８日農林水産省告示第２００９号）及び「薬事法第４３条第１項の規定に基づき、農林水産大臣の指定する医薬品を定める等の件」（昭和３６年２月１日農林省告示第６６号）の一部が別紙１から別紙４までのとおり改正されましたので、貴庁に備え置いて縦覧願います。

これらの改正に伴い、「薬事法関係事務の取扱いについて」（平成１２年３月３１日付け１２畜Ａ第７２９号農林水産省畜産局長通知）の一部を別紙５のとおり改正することとしましたので、御了知願います。

（別紙１）

○農林水産省告示第二千四百八十号

薬事法（昭和三十五年法律第百四十五号）第八十三条第二項の規定により読み替えて適用される同法第四十二条第一項の規定に基づき、動物用生物学的製剤基準（平成十四年十月三日農林水産省告示第千五百六十七号）の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十五年九月二十六日

農林水産大臣　林　芳正

（「次のよう」は、省略し、その関係書類を農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課及び都道府県庁に備え置いて縦覧に供する。）

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のマイコプラズマ・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）不活化ワクチンの項の 3.3.8.1.3 中「$P < 0.05$」を「$P \geqq 0.05$」に改め、同項の 4 中「には、その期間とする」を「は、この限りでない」に改める。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の鶏大腸菌症（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）不活化ワクチンの項を次のように改める。

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

1 定義

組換え型 F11 線毛抗原産生大腸菌及びベロ細胞毒性抗原産生大腸菌の培養菌液を不活化し、その遠心上清を濃縮後、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 F11 線毛抗原発現大腸菌

2.1.1.1 名称

大腸菌 JA221/pPF11-10 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

兎特異抗血清を用いた平板凝集反応で強い凝集を示す。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、血液寒天培地（付記１）又は適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では３代以内、種菌では２代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して－20 ℃以下で保存する。

2.1.2 ベロ細胞毒性抗原発現大腸菌

2.1.2.1 名称

大腸菌 CH7 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ベロ細胞毒性を示す。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、血液寒天培地又は適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では３代以内、種菌では２代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して－20 ℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 F11 線毛抗原発現大腸菌

2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 ベロ細胞毒性抗原発現大腸菌

2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 F11 線毛抗原発現大腸菌

2.3.1.1 培養

培養した種菌をF11 線毛抗原発現大腸菌用製造用培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液を適当と認められた温度及び時間で加熱し、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.1.3 原液の調製

不活化菌液について、遠心によって菌体を除いた上清をろ過・濃縮したものを原液とする。この場合において、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

原液について、3.3.1 及び 3.3.2.1 の試験を行う。

2.3.2 ベロ細胞毒性抗原発現大腸菌

2.3.2.1 培養

培養した種菌をベロ細胞毒性抗原発現大腸菌用製造用培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 原液の調製

培養菌液について、遠心によって菌体を除いた上清をろ過・濃縮したものに適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.2 及び 3.3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

F11 線毛抗原原液及びベロ細胞毒性抗原原液を濃度調整して混合した後、適当と認められた油性アジュバントを添加したものを最終バルクとする。この場合において、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

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、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.1 試験材料

3.1.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.1.1.2 試験方法

3.1.1.2.1 鏡検

試料 1 滴を顕微鏡下で観察し、グラム染色を行って鏡検する。

3.1.1.2.2 血液寒天培地接種

血液寒天培地 2 枚に試料を塗抹して 37 ± 2 ℃で 24 ± 4 時間培養し、コロニーの性状を観察する。

3.1.1.3 判定

鏡検においては、試料 1 滴中に大腸菌以外の菌を認めてはならず、また、グラム染色においてグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。また、血液寒天培地においては、乳白色状のコロニー以外のコロニーを認めてはならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.1.2 試験方法

試料 1 mL を 100mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地（以下この項において「SCD 培地」という。）に接種し、37 ± 2 ℃で 20 ± 4 時間培養した後、その 1 mL を新たな 100mL の SCD 培地に接種し、37 ± 2 ℃で 20 ± 4 時間培養する。

3.2.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.3 原液の試験

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。

3.3.2 抗原含有量試験

3.3.2.1 F11 線毛抗原量

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

適当と認められた参照抗原及び原液について、抽出操作を行ったものを試料とする。

3.3.2.1.2 試験方法

適当と認められた抗 F11 線毛抗原抗体を希釈し、ELISA プレートの各穴に固相化したのちブロッキングする。プレートを洗浄し、2倍階段希釈した試料を各穴に加え、37 ℃で1時間反応させる。プレートを洗浄し、適当と認められたペルオキシダーゼ標識抗 F11 線毛抗原抗体を加え、37 ℃で 45 分間反応させる。プレートを洗浄し、適当と認められた基質液を加えて反応させた後、硫酸で反応を停止させ、吸光度を測定する。参照抗原と比較し、平行線定量法により原液の抗原含有量を算出する。

3.3.2.1.3 判定

F11 線毛抗原含有量は、1 mL 中 0.98 mg 以上でなければならない。

3.3.2.2 ベロ細胞毒性抗原量

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

適当と認められた参照抗原及び原液について、抽出操作を行ったものを試料とする。

3.3.2.2.2 試験方法

適当と認められた抗ベロ細胞毒性抗原抗体を希釈し、ELISA プレートの各穴に固相化したのちブロッキングする。プレートを洗浄し、2倍階段希釈した試料を各穴に加え、37 ℃で1時間反応させる。プレートを洗浄し、適当と認められたペルオキシダーゼ標識抗ベロ細胞毒性抗原抗体を加え、37 ℃で 45 分間反応させる。プレートを洗浄し、適当と認められた基質液を加えて反応させた後、硫酸で反応を停止させ、吸光度を測定する。参照抗原と比較し、平行線定量法により原液の抗原含有量を算出する。

3.3.2.2.3 判定

ベロ細胞毒性抗原含有量は、1 mL 中 0.98 mg 以上でなければならない。

3.3.3 不活化試験

3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 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。

3.4.3 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は 0.135vol %以下でなければならない。

3.4.4 安全試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.4.1.2 試験動物

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。

3.4.4.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、５羽を対照群とする。

注射材料２羽分ずつを試験群の胸部筋肉内に注射し、対照群と共に４週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

3.4.4.3 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、剖検するとき、注射局所に 10 個以上の壊死又は膿瘍を認めてはならない。

3.4.5 力価試験

3.4.5.1 試験材料

3.4.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の２～４週齢の鶏を用いる。

3.4.5.1.3 抗原固相化プレート

抗原吸着プレート（付記２）を用いる。

3.4.5.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、５羽を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを試験群の胸部筋肉内に注射し、４週目に両群から得られた血清について、F11 線毛抗原及びベロ細胞毒性抗原に対する抗体価を酵素抗体法(以下この項において「ELISA」という。）により測定する。

あらかじめ、抗原吸着プレートの全ての穴に希釈液（付記３）を 100 μ L ずつ加える。試験群及び対照群の血清を希釈液で 50 倍に希釈したもの、並びに参照陽性血清（付記４）を希釈液で 500 倍に希釈したものを 100 μ L ずつ加え、同希釈液で２倍階段希釈し、希釈液のみの穴をブランクとする。37 ℃で１時間反応させた後、液を捨て、水で５回洗浄する。次に、各穴に至適単位の標識抗体（付記５）を 100 μ L ずつ加え、37 ℃で 30 分間反応させた後、液を捨て、水で５回洗浄する。その後、基質液(付記６）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光し、常温で 15 分間反応させた後、2 mol/L の硫酸を全ての穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm の吸光度を測定する。

3.4.5.3 判定

ブランクの全穴の吸光度の平均値に 4.5 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。試験群の抗体価は、試験群の 80 %以上が、F11 線毛抗原にあっては 100 倍以上、ベロ細胞毒性抗原にあっては 1,000 倍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、F11 線毛抗原にあっては 100 倍未満、ベロ細胞毒性抗原にあっては 1,000 倍未満でなければならない。ただし、試験成立条件として、1) ブランクの吸光度が 0.100 以下であること、2) 参照陽性血清の抗体価が、F11 線毛抗原では $10^{3.6}$ ～ $10^{4.2}$、ベロ細胞毒性抗原では $10^{4.5}$ ～ $10^{5.0}$ の範囲であること、を満たしていなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、３年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、この限りでない。

付記１　血液寒天培地

1,000 mL 中

牛心臓抽出液	500 g
ペプトン	10 g

塩化ナトリウム	5 g
カンテン	15 g
馬脱線維素血液	50 mL

pH を 7.2 に調整する。

付記２　抗原吸着プレート

0.04mol/L PBS（付記７）で、F11 線毛抗原については参照 F11 線毛抗原（付記８）を 2.5 μg/mL、ベロ細胞毒性抗原については参照ベロ細胞毒性抗原（付記９）を２μ g/mL に希釈後、これらを 96 穴マイクロプレートに 100 μ L ずつ加え、常温で 16 時間反応させる。その後、液を捨て、ブロッキング緩衝液（付記 10）を各穴に 200 μ L ずつ加え、37 ℃で 20 分間反応させた後、液を捨て、プレートを水で５回洗浄したもの。

付記３　希釈液

1,000 mL 中

リン酸水素二ナトリウム二水和物	35.58 g
塩化ナトリウム	11.69 g
ポリソルベート 80	0.5 mL
水	残　量

4 mol/L 塩酸で pH を 7.0 に調整後、ろ過滅菌する。

付記４　参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を F11 線毛抗原及びベロ細胞毒性抗原で免疫して得られた血清で、ELISA で抗体価を測定するとき、抗体価がそれぞれ $10^{3.6}$ ～ $10^{4.2}$ 及び $10^{4.5}$ ～ $10^{5.0}$ であるもの。

付記５　標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (H+L) 血清にグリセリンを 50vol %濃度になるように加え、－20 ℃に保存したもの。

付記６　基質液

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。

付記７　0.04mol/L PBS

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.4307 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.099 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	残　量

pH を 7.2 に調整後、ろ過滅菌する。

付記８　参照 F11 線毛抗原

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記９　参照ベロ細胞毒性抗原

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記 10　ブロッキング緩衝液

0.04mol/L PBS にカオリン処理した牛血清アルブミンを 10 g 加えたもの。

付記 11　UP 緩衝液

TMB 基質緩衝液（13.6g の酢酸ナトリウム三水和物を 80mL の水に溶解し、1.5mol/L のクエン酸で pH を 5.3 ～ 5.7 に調整し、水を加えて 100mL にしたもの）に過酸化尿素 140mg を加えたもの。

付記 12　0.6w/v % TMB 溶液

ジメチルスルホキシド 1,000mL にテトラメチルベンチジンを 6 g 溶解し、窒素で飽和状態にしたもの。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチンの項の４中「その期間とする」を「この限りでない」に改め、同項の付記１中「加熱死菌をぶり」を「死菌をかんぱち又はぶり」に、「調製し」を「に濃度を調整し」に改める。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の猫白血病（アジュバント加）ワクチン（組換え型）の項を次のように改める。

猫白血病（アジュバント加）ワクチン（組換え型）

1 定義

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 p45 を精製したものに、アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

猫白血病ウイルスサブグループ A エンベロープ抗原発現組換え大腸菌 MZ-1/pBO TF70D 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

大腸菌に一致する生物学的性状を示し、かつ、塩酸テトラサイクリン加培地で発育する。発育には、ヒスチジン、イソロイシン及びバリンの各アミノ酸が必須である。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では２代以内、種菌では３代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して－70 ℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

種菌を培養したものを培養菌液とする。

2.3.2 原液の調整

培養種菌を遠心又はろ過し、菌体を回収して洗浄する。この菌体をホモジナイズした後に洗浄し、適当と認められた界面活性剤で処理し、封入体を回収する。これを適当と認められたタンパク変性剤によって可溶化し、ゲルろ過及びイオン交換カラムによって精製したものを原液とする。

原液について、3.1 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液にサポニン、水酸化アルミニウム及びチメロサールを添加し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注して小分製品とする。

小分製品について、3.2 の試験を行う。

3 試験法

3.1 原液の試験

3.1.1 同定試験

3.1.1.1 試験材料

尿素加トリス緩衝液（pH8.0）で検体の蛋白量を１ mL 当たり１ mg に調整したものを、試料とする。

3.1.1.2 試験方法

試料を電気泳動し、クマシーブルー染色と抗猫白血病ウイルス p45 モノクローナル抗体（付記１）

及び抗大腸菌 MZ-1 株ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットをそれぞれ行う。なお、対照として大腸菌 MZ-1 株を可溶化して用いる。

3.1.1.3 判定

クマシーブルー染色では、1本の主要な猫白血病ウイルス p45 抗原のバンドが観察されなければならない。ウエスタンブロットでは、モノクローナル抗体と反応する1本の主要なバンドが観察されなければならず、抗大腸菌 MZ-1 株ポリクローナル抗体とは反応してはならない。この場合において、対照では、抗大腸菌 MZ-1 株ポリクローナル抗体と反応して 20 ～ 76kDa の間に多くのバンドが認められなければならない。

3.2 小分製品の試験

3.2.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する均質な液体でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.2.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.2.3 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。

3.2.4 チメロサール定量試験

3.2.4.1 試験材料

3.2.4.1.1 試料

試験品を 450nm のメンブランフィルターでろ過したものを試料とする。

3.2.4.1.2 標準溶液

チメロサールを精製水で溶解し、チメロサール濃度 0 μ g/mL（精製水のみ）、60 μ g/mL 及び 120 μ g/mL となるように調整する。

3.2.4.1.3 カラム

オクタデシルシリル化シリカゲルを充填したカラム（内径 4.6mm × 150mm）を用いる。

3.2.4.1.4 移動相

アセトニトリルと、リン酸で pH を 3.0 に調整した精製水を、75:25 の割合に混合したものを用いる。

3.2.4.2 試験方法

日本薬局方の高速液体クロマトグラフ法を準用して試験を行う。すなわち、標準溶液及び試料の 0.01mL ずつを室温でそれぞれカラムに注入し、波長 240nm での吸光度を測定する。得られた標準溶液のチメロサールのピーク面積から作成した検量線を用いて、試料のチメロサールのピーク面積から試料中のチメロサール量を算出する。

3.2.4.3 判定

試験品のチメロサール量は、1頭分当たり 0.11mg 以下でなければならない。

3.2.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、試験品のアルミニウム含有量は、1頭分当たり 1.8mg 以下でなければならない。

3.2.6 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。

3.2.7 同定試験

3.2.7.1 試験材料

3.2.7.1.1 試料

試験品1本を4℃、1本を 20 ～ 35 ℃でそれぞれ1週間静置し、よく振とうした後、1 mL ずつをマイクロチューブにそれぞれ入れ、2,000 *G*で5分間遠心して上清を除去する。沈渣に 100 μ L

の２倍濃度のサンプル用バッファーを加え、８分間煮沸したものを試料とする。

3.2.7.2 試験方法

試料 20 μ L 及び分子量マーカーをそれぞれ 12 %アクリルアミドゲル（7.5 × 9.0cm）上のウェルに充填し、泳動する。

試料のレーンのゲルを切り取り、一部はクマシーブルー染色を行い、一部は転写用膜に転写する。転写した膜を切り取り、一部クマシーブルー染色を行う。残りの膜に１ w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液を加え、37 ℃で１時間膜表面のブロッキングを行った後、リン酸緩衝食塩液を加えて３回洗浄する。この膜を牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液で約 500 倍に希釈したモノクローナル抗体（付記１）と 37 ℃で１時間反応させる。リン酸緩衝食塩液で３回洗浄し、更に 500 ～ 2,000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体と 37 ℃で１時間反応させる。リン酸緩衝食塩液で３回洗浄し、基質液（付記２）に膜を入れ、発色のバンドが出現するまで室温で５～ 10 分間反応させる。膜を蒸留水で洗浄して反応を止め、風乾後、観察する。

3.2.7.3 判定

クマシーブルー染色で１本の主要なバンド（猫白血病ウイルス p45 抗原）と１本のマイナーなバンドが確認される。この主要なバンドとマイナーなバンドは、ウエスタンブロットによって確認されなければならない。クマシーブルー染色結果をデンシトメーターで解析するとき、マイナーなバンドのピークの高さは、主要なバンドのピークの高さの 40 %未満でなければならない。

3.2.8 蛋白定量試験

3.2.8.1 試験材料

試験品、参照水酸化アルミニウムゲル（付記３）及び参照牛血清アルブミン液（付記４。以下この項において「参照 BSA」という。）を使用する。

ただし、試験品及び参照水酸化アルミニウムゲルは、次の処理をする。

６本の試験品から 900 μ L ずつ採取し、別々のマイクロチューブに入れる。別に参照水酸化アルミニウムゲルから 900 μ L ずつ３本のマイクロチューブに入れる。これらを 2,000*G*、５分間遠心した後、上清を除去してそれぞれの重量測定を行う。風袋重量を引いた試験品及び参照水酸化アルミニウムゲルのそれぞれの重量の平均値を算出し、これらの平均値の差が５ mg 以内であることを確認する。各マイクロチューブに 0.1mol/L 水酸化ナトリウム液を 450 μ L ずつ加え、混合した後、試験品及び参照水酸化アルミニウムゲルをそれぞれ混合し、試験品処理試料及び分光光度計ゼロ点調整用試料とする。

3.2.8.2 試験方法

試験品処理試料を 50 μ L ずつ 30 本、参照 BSA の濃度 0 μ g/mL のものを 50 μ L ずつ２本及び参照 BSA の濃度 150 ～ 250 μ g/mL のものを 50 μ L ずつ各６本の試験管に入れる。全ての試験管に反応液（付記５）1 mL ずつを添加し、60 ℃で 30 分間反応させた後、４℃の水中で冷却する。2,000*G* で 10 分間遠心し、その上清を分光光度計用セルにそれぞれ採取して、直ちに 562nm の波長で吸光度を測定する。

3.2.8.3 判定

参照 BSA の各濃度における吸光度の平均値を計算し、単回帰分析を行い、Y を吸光度値、X を蛋白量とする Y ＝ aX ＋ b の一次方程式を算出する。その相関係数は、0.99 以上でなければならない。試験品処理試料の平均吸光度値を Y として代入し、蛋白量X を求めた後、1/2 を乗じたものを試験品の蛋白量とする。その蛋白量は、1 mL 当たり 102 μ g 以上でなければならない。

3.2.9 安全試験

3.2.9.1 試験材料

3.2.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.2.9.1.2 試験動物

猫白血病ウイルス p45 抗原に対する抗体陰性の９～16 週齢の SPF 猫２頭を用いる。

3.2.9.2 試験方法

２頭の試験動物に注射材料２頭分ずつを皮下に注射し、21 日間飼育し、観察する。

3.2.9.3 判定

試験観察中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、２年３か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、この限りでない。

付記１　モノクローナル抗体

猫白血病ウイルス p45 エンベロープ蛋白抗原に特異的に反応する抗体で、ハイブリドーマを接種して得たマウス腹水を精製して得たもの。

付記２　基質液

DAP（3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride）15 mg と 30% 過酸化水素水 48 μL をリン酸緩衝食塩液に加えて溶解し、全量 30mL になるように調製したもの。

付記３　水酸化アルミニウムゲル

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記４　参照牛血清アルブミン液

牛血清アルブミン（以下この項において「BSA」という。）を水で１ mg/mL となるように作成した後、下表に準じて調整したものを各濃度の参照牛血清アルブミン液とする。

濃度	BSA	0.5mol/LNaOH	参照アルミニウムゲル	水
0	0	200	200	600
150	150	200	200	450
175	175	200	200	425
200	200	200	200	400
225	225	200	200	375
250	250	200	200	350

添加量はいずれもμL

濃度は BSA 濃度μg/mL

付記５　反応液

動物医薬品検査所が指定したもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部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（シード）の項の 2.3.3 中「もの」の次に「、又はこれにアルミニウムゲルアジュバントを加えたもの」を加え、同項の 2.4 中「原液を混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加し、」を「原液を混合したもの又は原液を混合しアルミニウムゲルアジュバントを加えたものを」に改め、同項の 4 中「には、その期間とする」を「は、この限りでない」に改める。

ワクチン（シードロット製剤）の部のボルデテラ・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）トキソイド（シード）の項の次に次のように加える。

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（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した線毛抗原 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、同規格に適合した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及び同規格に適合したクロストリジウム・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。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 K88 線毛抗原保有大腸菌

2.1.1.1 名称

大腸菌 pPS002 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認め、アラビノース利用能（＋）、イノシトール利用能（－）、ソルビトール利用能（＋）、硫化水素産生能（－）、インドール産生能（＋）、ウレアーゼ活性（－）、β-ガラクトシダーゼ活性（＋）及び硝酸塩還元性（＋）の性状を示し、K88 線毛を保有する。また、病原性に関与する毒素をコードするプラスミドを欠損し、耐熱性エンテロトキシン（ST）及び易熱性エンテロトキシン（LT）を産生しない。

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、適当と認められた培地で増殖させ、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、凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.1.4 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、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.1.5 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、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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 K99 線毛抗原保有大腸菌

2.1.2.1 名称

大腸菌 NL-1005 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、5 vol %羊血液寒天培地上で溶血性を認めず、インドール産生能（+）、硝酸塩還元性（+）、硫化水素産生能（−）、グルコース利用能（+）及びマンノース利用能（+）の性状を示し、K99 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

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、適当と認められた培地で増殖させ、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、凍結乾燥して２～７℃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、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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 987P 線毛抗原保有大腸菌

2.1.3.1 名称

大腸菌 NADC1413 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、アラビノース利用能（+）、イノシトール利用能（−）、ソルビトール利用能（+）、硫化水素産生能（−）、インドール産生能（+）、ウレアーゼ活性（−）、β-ガラクトシダーゼ活性（+）及び硝酸塩還元性（+）の性状を示し、987P 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

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、適当と認められた培地で増殖させ、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、凍結乾燥して２～７℃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、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.4 K99 及び F41 線毛抗原保有大腸菌

2.1.4.1 名称

大腸菌 NADC1471 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、アラビノース利用能（+）、イノシトール利用能（−）、ソルビトール利用能（+）、硫化水素産生能（−）、インドール産生能（+）、ウレアーゼ活性（−）、β-ガラクトシダーゼ活性（+）及び硝酸塩還元性（+）の性状を示し、K99 線毛及び F41 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

2.1.4.3 マスターシード菌

2.1.4.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、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、凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.4.4 ワーキングシード菌

2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.4.5 プロダクションシード菌

2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.5 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。）産生大腸菌

2.1.5.1 名称

大腸菌 NL-1001 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認め、アラビノース利用能（+）、イノシトール利用能（−）、ソルビトール利用能（+）、硫化水素産生能（−）、インドール産生能（+）、ウレアーゼ活性（−）、β-ガラクトシダーゼ活性（+）及び硝酸塩還元性（+）の性状を示す。ST 及び LT を産生しないが、LT_B を産生する。また、本製造用菌株は、定着に必要な線毛をコードするプラスミドを欠損している。

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、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、凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.5.4 ワーキングシード菌

2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、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－60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.5.5 プロダクションシード菌

2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.6 クロストリジウム・パーフリンゲンスＣ型菌

2.1.6.1 名称

クロストリジウム・パーフリンゲンスＣ型菌 NL-1003 株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

グラム陽性桿菌で、グルコース利用能（＋）、マルトース利用能（＋）、アラビノース利用能（＋）、ラクトース利用能（＋）、マンノース利用能（＋）、キシロース利用能（＋）及びインドール産生能（－）の性状を示す。β毒素を産生し、本毒素を含む培養上清ろ液をマウス及び子豚の静脈内に投与すると、毒性を示す。

2.1.6.3 マスターシード菌

2.1.6.3.1 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、適当と認められた培地で増殖させ、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、凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.6.4 ワーキングシード菌

2.1.6.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、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－60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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。

2.1.6.5 プロダクションシード菌

2.1.6.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、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－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して２～７℃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 製造材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 大腸菌 pPS002 株、NL-1005 株、NADC1413 株及び NADC1471 株原液

2.3.1.1 培養

それぞれのプロダクションシード菌を培地で培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加え、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、リン酸緩衝食塩液で再浮遊させ、チメロサール又は適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 大腸菌 NL-1001 株原液

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を培地で培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2.2 濃縮及び除菌

培養菌液を遠心分離し、上清液を中空糸フィルターで濃縮した後、透析して除菌する。チメロサール又は適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.3 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌 NL-1003 株原液

2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を培地で培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化及び無毒化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加え、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を２～７℃に冷却し、遠心分離して上清液を採り、チメロサール又は適当と認められた保存剤を添加し、限外ろ過により濃縮したものを原液とする。

2.4 最終バルク

各原液を混合し、濃度調整し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものを最終バルクとする。

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、3.5 の試験を行う。

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 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、大腸菌又はクロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 大腸菌 pPS002 株、NADC1413 株及びNADC1471 株の試験

3.2.1.1 染色試験

3.2.1.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドグラス上の 1 cm^2 の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焔固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

3.2.1.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.1.2 型別試験

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.2.1.2.1.2 抗血清

抗大腸菌線毛抗原 K88 血清（付記１）、抗大腸菌線毛抗原 987P 血清（付記２）及び抗大腸菌線毛抗原 F41 血清（付記３）を用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

pPS002 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 K88 血清、NADC1413 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 987P 血清、NADC1471 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 F41 血清をスライドグラス上でそれぞれ混合し、急速凝集反応を行う。

3.2.1.2.3 判定

検体は、当該抗血清で速やかに凝集しなければならない。

3.2.2 大腸菌 NL-1005 株の試験

3.2.2.1 染色試験

3.2.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドグラス上の 1 cm^2 の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焔固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

3.2.2.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.2.2 型別試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.2.2.2.1.2 抗血清

抗大腸菌線毛抗原 K99 血清（付記４）を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

NL-1005 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 K99 血清をスライドグラス上で混合し、急速凝集反応を

行う。

3.2.2.2.3 判定

検体は、当該抗血清で速やかに凝集しなければならない。

3.2.2.3 吸光度測定試験

検体を波長420nmで吸光度を測定するとき、その値は、規定の値でなければならない。

3.2.3 大腸菌NL-1001株の試験

3.2.3.1 染色試験

3.2.3.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.3.1.2 試験方法

検体0.01mLをスライドグラス上の1 cm^2の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焔固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約1,000倍に拡大し、30視野以上を観察する。

3.2.3.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.3.2 大腸菌LT_B確認試験

3.2.3.2.1 試料

検体を用いる。

3.2.3.2.2 試験方法

大腸菌LT_B成分の参照品（付記5）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（付記6）による6段階の2倍階段希釈液を作製し、氷槽にて保存する。ガングリオシド固相化プレート（付記7）の各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。希釈・洗浄液2（付記8）で1回、希釈・洗浄液1で2回洗浄後、抗LT_B抗原兎ポリクロナール抗体（付記9）を各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液3（付記10）で洗浄後、標識抗体1（付記11）を各穴に50μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液3で洗浄後、基質液1（付記12）を各穴に200μL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、全ての穴の吸光度を測定する。

3.2.3.2.3 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、1.62以上でなければならない。

3.2.3.3 吸光度測定試験

検体を波長420nmで吸光度を測定するとき、その値は、規定の値でなければならない。

3.2.4 クロストリジウム・パーフリンゲンスC型NL-1003株の試験

3.2.4.1 染色試験

3.2.4.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.4.1.2 試験方法

検体0.01mLをスライドグラス上の1 cm^2の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焔固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約1,000倍に拡大し、30視野以上を観察する。

3.2.4.1.3 判定

均一なグラム陽性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体1 mLを300mLの液状チオグリコール酸培地4本にそれぞれ接種し、2本は23℃で、他の2本は33℃で6～8日間一次培養する。次に各一次培養液1 mLを新しい300mLの液状チオグリコール酸培地4本にそれぞれ接種し、2本は23℃で、他の2本は33℃で7日間培養して観察する。

3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 大腸菌NL-1001株

3.4.1.1 無菌試験

3.4.1.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

3.4.1.1.2 試験方法

検体1 mLを300mLの液状チオグリコール酸培地4本にそれぞれ接種し、2本は23℃で、他の2本は33℃で6～8日間一次培養する。次に各一次培養液1 mLを新しい300mLの液状チオグリコール酸培地4本にそれぞれ接種し、2本は23℃で、他の2本は33℃で7日間培養して観察する。

3.4.1.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、帯黄褐色のゲル状混濁液で、静置すると沈殿物の上層が無色又は帯黄褐色、振とうすれば均一な懸濁液でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.5.2 pH測定試験

一般試験法のpH測定試験法を準用して試験するとき、pHは、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 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。

3.5.4 チメロサール定量試験

一般試験法のチメロサール定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1.5 mg/mL以下でなければならない。

3.5.6 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリン含有量は、0.1vol %以下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は、この限りでない。

3.5.7 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。ただし、試験品の注射量は0.3 mLとし、体重測定は4日目に行うものとする。

3.5.8 エンドトキシン試験

日本薬局方一般試験法のエンドトキシン試験法の光学的定量法の比色法を準用して試験するとき、1頭分当たり1×10^6 EU未満でなければならない。

3.5.9 力価試験

3.5.9.1 大腸菌線毛抗原及び大腸菌LT_B成分の力価試験

3.5.9.1.1 又は3.5.9.1.2の試験を行う。

3.5.9.1.1 相対力価（付記13）による力価試験

3.5.9.1.1.1 大腸菌線毛抗原K88の力価試験

3.5.9.1.1.1.1 試験材料

3.5.9.1.1.1.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液１で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液（付記 14）を加え、常温で 60 分間振とうする。

3.5.9.1.1.1.2 試験方法

線毛抗原 K88 成分の参照品（付記 15）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時間振とうした後、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１（付記 16）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で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクロナール抗体（付記 17）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で洗浄した後、基質液２（付記 18）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。

3.5.9.1.1.1.3 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 19）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。

3.5.9.1.1.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

3.5.9.1.1.2.1 試験材料

3.5.9.1.1.2.1.1 試料

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

3.5.9.1.1.2.2 試験方法

線毛抗原 K99 成分の参照品（付記 20）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時間振とうした後、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 21）の各穴に 100 μ L ずつ加え、15 ～ 30 ℃で 15± 2分間静置し、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液２で洗浄した後、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 22）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で洗浄した後、基質液２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。

3.5.9.1.1.2.3 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。

3.5.9.1.1.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

3.5.9.1.1.3.1 試験材料

3.5.9.1.1.3.1.1 試料

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

3.5.9.1.1.3.2 試験方法

線毛抗原 987P 成分の参照品（付記 23）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時間振とうした後、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 24）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で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクロナール抗体１（付記 25）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で洗浄した後、標識抗体２（付記 26）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で洗浄した後、基質液２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。

3.5.9.1.1.3.3 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。

3.5.9.1.1.4 大腸菌線毛抗原 F41 成分の力価試験

3.5.9.1.1.4.1 試験材料

3.5.9.1.1.4.1.1 試料

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

3.5.9.1.1.4.2 試験方法

線毛抗原 F41 成分の参照品（付記 27）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時間振とうした後、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 28）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で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクロナール抗体１（付記 29）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で洗浄した後、標識抗体２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で洗浄した後、基質液２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。

3.5.9.1.1.4.3 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。

3.5.9.1.1.5 大腸菌 LT_B の力価試験

3.5.9.1.1.5.1 試験材料

3.5.9.1.1.5.1.1 試料

試験品を滅菌精製水で希釈し、水酸化ナトリウム溶液（付記 30）で pH を 12.0 に調整した後、硫酸アンモニウム溶液（付記 31）を混合して中和する。この混合液を遠心し、その上清を試料とする。

3.5.9.1.1.5.2 試験方法

大腸菌 LT_B 成分の参照品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回洗浄した後、抗 LT_B 抗原兎ポリクロナール抗体を各穴に 50 μ L ずつ加え、37 ℃で１時間加温する。洗浄液３で洗浄した後、標識抗体１を各穴に 50 μ L ずつ加え、37 ℃で１時間加温する。洗浄液３で洗浄した後、基質液１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、全ての穴の吸光度を測定する。

3.5.9.1.1.5.3 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。

3.5.9.1.2 抗体測定法による力価試験

3.5.9.1.2.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

3.5.9.1.2.1.1 試験材料

3.5.9.1.2.1.1.1 注射材料

試験品を水酸化アルミニウムゲル（付記 32）で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.9.1.2.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.9.1.2.1.2 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 33）については 512 倍から、対照群血清については２倍から、希釈液３（付記 34）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 35）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 36）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 37）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２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。

得られた被検血清の吸光度値が 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。

3.5.9.1.2.1.3 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。

3.5.9.1.2.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

3.5.9.1.2.2.1 試験材料

3.5.9.1.2.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.1.2.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.9.1.2.2.2 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 38）については８倍から、対照群血清については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 39）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 40）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２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。

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

3.5.9.1.2.2.3 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。

3.5.9.1.2.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

3.5.9.1.2.3.1 試験材料

3.5.9.1.2.3.1.1 試験動物

3.5.9.1.2.2 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.9.1.2.3.2 試験方法

3.5.9.1.2.2 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。

試験群血清については４倍から、対照群血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清１（付記 41）については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 42）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 43）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２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。

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

3.5.9.1.2.3.3 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。

3.5.9.1.2.4 大腸菌線毛抗原 F41 の力価試験

3.5.9.1.2.4.1 試験材料

3.5.9.1.2.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.1.2.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.9.1.2.4.2 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 44）については 64 倍から、対照群血清については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 45）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 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２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。

得られた被検血清の吸光度値が 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。

3.5.9.1.2.4.3 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 256 ～ 512 倍を示さなければならない。

3.5.9.1.2.5 大腸菌 LT_B の力価試験

3.5.9.1.2.5.1 試験材料

3.5.9.1.2.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.1.2.5.1.2 試験動物

約６週齢の雄 ddY 系マウスを用いる。

3.5.9.1.2.5.2 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 47）については 128 倍から、対照群血清については８倍から、希釈液４（付記 48）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 49）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 50）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 51）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２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。

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

3.5.9.1.2.5.3 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。

3.5.9.2 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

3.5.9.2.1 試験材料

3.5.9.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.2.1.2 試験動物

体重 1.8 ～ 3.6kg の SPF ニュージーランドホワイト種の兎、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。

3.5.9.2.2 試験方法

注射材料の１ mL を、３週間隔で２回、８匹の兎の皮下に注射する。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 52）で作製する。$10L_0$ 量（付記 53）に濃度を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 54）と各希釈血清を等量混合後、25 ℃で１時間反応させ、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 $10L_0$ 量及び $10L_+$ 量（付記 55）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 56）の標準抗毒素（付記 57）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、$10L_0$ 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。

3.5.9.2.3 判定

マウスが全数生存している群の最大希釈倍数を 10 倍した値を抗毒素抗体価とし、IAU で表すとき、プール血清の抗毒素抗体価は、10 IAU 以上でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後１年６か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、この限りでない。

付記１　抗大腸菌線毛抗原 K88 血清

精製した大腸菌の線毛抗原 K88 を兎に免疫して得られた抗血清

付記２　抗大腸菌線毛抗原 987P 血清

精製した大腸菌の線毛抗原 987P を兎に免疫して得られた抗血清

付記３　抗大腸菌線毛抗原 F41 血清

精製した大腸菌の線毛抗原 F41 を兎に免疫して得られた抗血清

付記４　抗大腸菌線毛抗原 K99 血清

精製した大腸菌の線毛抗原 K99 を兎に免疫して得られた抗血清

付記５　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６　希釈・洗浄液１

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
精製水	残　量

pH を 7.2 に調整する。200 nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記７　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 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 58）を加え、更に反応させた後、希釈・洗浄液１を加えたもの。

付記８　希釈・洗浄液２

1,000mL 中

ポリソルベート 20	0.5 mL
希釈・洗浄液１	残　量

pH を 7.2 に調整する。

付記９　抗 LT_B 抗原兎ポリクロナール抗体

兎に精製 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 10　洗浄液３

1,000mL 中

ブロッキング液	100 mL
希釈・洗浄液１	残　量

付記 11　標識抗体１

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。

付記 12　基質液 1

A液：25mg の 4-アミノアンチピリンを 50 mL の 0.17mol/L フェノールで溶解したもの。

B液：0.3%過酸化水素溶液をリン酸ナトリウム緩衝液（付記 59）で希釈したもの。

A液とB液を使用時に等量混合したもの。

付記 13　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 14　溶出緩衝液

リン酸二水素カリウム	8.2 g
水	94 mL

pH を 9.3 に調整する。

付記 15　線毛抗原 K88 成分の参照品

次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

（1）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。

（2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 16　抗体固相化プレート 1

希釈液 5（付記 60）で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K88 マウスモノクロナール抗体 1（付記 61）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 17　ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクロナール抗体

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 62）で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 18　基質液 2

C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。

D液：0.02vol %過酸化水素溶液

C液とD液を使用時に等量混合したもの。

付記 19　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 20　線毛抗原 K99 成分の参照品

次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

（1）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。

（2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記21　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マウスモノクロナール抗体1（付記63）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22　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

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23　線毛抗原987P成分の参照品

次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

（1）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。

（2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記24　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 兎ポリクロナール抗体（付記64）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25　抗大腸菌線毛抗原987Pマウスモノクロナール抗体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得たハイブリドーマ 1BB6-3D6 が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液7（付記65）で適当に希釈したもの。

付記26　標識抗体2

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66）で溶解し、更に希釈液8（付記67）で希釈したもの。

付記27　線毛抗原F41成分の参照品

次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

（1）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。

（2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記28　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 兎ポリクロナール抗体（付記68）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29　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得たハイブリドーマ SDSU56/85 が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液7で適当に希釈したもの。

付記30　水酸化ナトリウム溶液

1,000mL 中

水酸化ナトリウム	30.0 g

水	残　量

付記 31　硫酸アンモニウム溶液

1,000mL 中

硫酸アンモニウム	132.0 g
水	残　量

付記 32　水酸化アルミニウムゲル

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 を加え撹はんする。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、ブレンダーで砕細する。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濃度を調整し、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 分間高圧滅菌する。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%となるように濃度を調整したもの。

付記 33　線毛抗原 K88 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 K88（付記 69）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 2,048 ～ 4,096 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 34　希釈液 3

1,000mL 中

牛血清アルブミン	1.0 g
希釈・洗浄液 2	残　量

付記 35　線毛抗原 K88 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 K88 で免疫したモルモットの血清であって、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 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 36　抗原吸着プレート 1

希釈液 5 で 0.5 μ g/mL に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクロナール抗体 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 で洗浄した後、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。

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の吸光度が 0.9 ～ 1.1 となる濃度とする。

付記 37　ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1

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 で希釈したもの。

付記 38　線毛抗原 K99 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 K99（付記 71）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 32 ～ 64 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 39　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あって、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 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 40　抗原吸着プレート２

希釈液５で１μ g/mL に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクロナール抗体２（付記 72）100 μ L ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液２で洗浄した後、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の吸光度が 0.9 ～ 1.1 となる濃度とする。

付記 41　線毛抗原 987P 参照陽性血清１

精製線毛抗原 987P（付記 73）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で８～ 16 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 42　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あって、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 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 43　抗原吸着プレート３

希釈液５で１μ g/mL に希釈した抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクロナール抗体２（付記 74）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で洗浄した後、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の吸光度が 0.9 ～ 1.1 となる濃度とする。

付記 44　線毛抗原 F41 参照陽性血清１

精製線毛抗原 F41（付記 75）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 256 ～ 512 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 45　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あって、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 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 46　抗原吸着プレート４

希釈液５で１μ g/mL に希釈した抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクロナール抗体２（付記 76）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で洗浄した後、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用いて反応させた場合の吸光度が 0.9 ～ 1.1 となる濃度とする。

付記 47　LT_B 参照陽性血清１

精製大腸菌 LT_B（付記 77）で免疫したマウスの血清であって、酵素抗体反応で 256 ～ 512 倍の

抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 48　希釈液４

100mL 中

カゼイン	1.0 g
希釈・洗浄液２	残　量

付記 49　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あって、精製大腸菌 LT_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 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 50　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 78）100 μ L ずつを 96 穴プレートの各穴に加え、希釈・洗浄液２で洗浄した後、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用いて反応させた場合の吸光度が 0.9 ～ 1.1 となる濃度とする。

付記 51　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 52　バクト-ペプトン液

1,000mL 中

バクト-ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	2.5 g
水	残　量

溶解後、pH を 7.2 に調整し、121 ℃で 25 分間滅菌する。

付記 53　$10L_0$ 量

10 IAU 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 54　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 55　$10L_+$ 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 56　IAU（International Antitoxin Units）

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国際単位

付記 57　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これと比較して標準化された抗毒素

付記 58　ブロッキング液

1,000mL 中

牛血清アルブミン	10.0 g
希釈・洗浄液 1	残　量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 59　リン酸ナトリウム緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム一水和物	10.76 g
無水リン酸水素二ナトリウム	17.37 g
水	残　量

pH を 7.0 に調整する。

付記 60　希釈液 5

1,000mL 中

無水炭酸ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残　量

pH を 9.6 に調整する。

付記 61　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得たハイブリドーマ 21BA1-1H1 が産出するマウスモノクローナル抗体

付記 62　希釈液 6

1,000mL 中

オボアルブミン	10.0 g
希釈・洗浄液 2	残　量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 63　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得たハイブリドーマ 2BD4E4 が産出するマウスモノクローナル抗体

付記 64　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した後、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 65　希釈液 7

1,000mL 中

牛血清アルブミン	20.0 g
希釈・洗浄液 2	残　量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 66　50 %グリセリン溶液

滅菌精製水とグリセリンを等量混合したもの。

付記 67　希釈液 8

兎血清 1 mL 当たり 100mL の希釈・洗浄液 2 を混合したもの。

付記 68　抗大腸菌線毛抗原 F41 兎ポリクローナル抗体

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した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の 1839 株で吸収したもの。

付記 69　精製線毛抗原 K88

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 79）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兎血清を用いて免疫染色を行うとき、約 29kDa 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 K88 マウスモノクローナル抗体 2

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う場合、約 29kDa 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 K99

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うとき、約 19kDa 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 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う場合、約 19kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 73　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砕、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うとき、約 23 kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 74　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う場合、約 23kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 75　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砕、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うとき、約 30kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 76　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 77　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うとき、約 10 kDa の位置に単一のバンドを認める。

付記 78　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 79　2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液

1,000mL 中

尿素	120 g
0.05mol/L リン酸緩衝液（pH7.2）（付記 80）	残　量

付記 80　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。