

(別紙2)

○農林水産省告示第九百十四号

薬事法施行令(昭和三十六年政令第十一号)第八十三条の規定により読み替えて適用される同令第六十条の規定に基づき、動物用生物学的製剤検定基準(平成十四年十月三日農林水産省告示第千五百六十八号)の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十年六月六日

農林水産大臣臨時代理

国务大臣 冬柴 鐵三

(「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。)

ワクチンの部 豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチンの項を次のように改める。

豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン

動生剤基準の豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチンの 3.3.4、3.3.6、3.3.7 及び 3.3.8 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの部トリニューモウイルス感染症（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。

トリニューモウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン

動生剤基準のトリニューモウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.3及び3.5.4に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの部鶏貧血ウイルス感染症生ワクチンの項を次のように改める。

鶏貧血ウイルス感染症生ワクチン

動生剤基準の鶏貧血ウイルス感染症生ワクチンの3.3.4、3.3.5、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法2.1.1、2.1.2及び2.2.2を除く。）、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの部マレック病 (マレック病ウイルス 2 型・七面鳥ヘルペスウイルス)・鶏痘混合生ワクチンの項を次のように改める。

マレック病 (マレック病ウイルス 2 型・七面鳥ヘルペスウイルス)・鶏痘混合生ワクチン

動生剤基準のマレック病 (マレック病ウイルス 2 型・七面鳥ヘルペスウイルス)・鶏痘混合生ワクチンの 3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7 (迷入ウイルス否定試験法 2.1.1、2.1.2、2.2.2.1、2.2.2.2 及び 2.2.2.3 を除く。)、3.3.8、3.3.9 及び 3.3.11 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの部ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

**ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病・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**

動生剤基準のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.4及び3.5.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの部鶏大腸菌症（組換え型F11線毛抗原・ペロ細胞毒性抗原）（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・ペロ細胞毒性抗原）（油性アジュバント加）不活化ワクチン

動生剤基準の鶏大腸菌症（組換え型F11線毛抗原・ペロ細胞毒性抗原）（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.4.2、3.4.4及び3.4.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの部ぶりブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチンの項を次のように改める。

ぶりブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン

動生剤基準のぶりブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチンの 3.4.3、3.4.5 及び 3.4.6 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの部 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・犬コロナウイルス感染症混合生ワクチンの項を次のように改める。

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・犬コロナウイルス感染症混合生ワクチン

動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合生ワクチンの 3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法 2.8.2 を除く。）、3.3.7 及び 3.3.8 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの部 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・犬コロナウイルス感染症混合ワクチンの項を次のように改める。

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・犬コロナウイルス感染症混合ワクチン

動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合ワクチンの 3.3.5、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法 2.8.2 を除く。）、3.3.8、3.3.10 及び 3.3.12.5 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

また、小分製品の液状不活化ワクチンについて同基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症混合ワクチンの 3.2.4 の規定を準用して試験を行うものとする。

ワクチンの部 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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチンの項を次のように改める。

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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチン

動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチンの 3.4.5、3.4.7（迷入ウイルス否定試験法 2.8.2 を除く。）、3.4.8、3.4.10 及び 3.4.13.5 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。なお、3.4.10 の試験を適用しないものについては、同基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチンの 3.4.11 に規定するところにより、これに規定する試験を行うものとする。

また、小分製品の液状不活化ワクチンについて同基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチンの 3.3.4.1 の規定を準用して試験を行うものとする。

ワクチンの部 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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチンの項を次のように改める。

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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチン

動生剤基準のジステンパー・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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチンの 3.4.5、3.4.7（迷入ウイルス否定試験法 2.8.2 を除く。）、3.4.8 及び 3.4.10 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチンの豚オーエスキー病 (gI-、tk-) 生ワクチン (酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液) の項を次のように改める。

豚オーエスキー病 (gI-、tk-) 生ワクチン (酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液)

糖たんぱく gI 及びチミジンキナーゼを産生しない弱毒オーエスキー病ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したもので、使用時に酢酸トコフェロールアジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.3.1 及び 2.3.2 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、中和用血清は、抗オーエスキー病ウイルス血清 (付記 1) を非働化したものを用いる。

1.3 ウイルス含有量試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 試料

試験品をウイルス増殖用培養液 (付記 2) で溶解し、更に 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞、HmLu-1 細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

1.3.2 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 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液 0.5mL を加え、37℃で 6～7 日間培養し、観察する。

1.3.3. 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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.4 マーカー試験

1.4.1 糖たんぱく gI 欠損マーカー

1.4.1.1 試験材料

1.5 の試験終了後、14 日目の試験群の血清を用いる。

1.4.1.2 試験方法

オーエスキー病ウイルス糖たんぱく gI 抗体を識別できる酵素抗体反応キット又は動物医薬品検査所がこれと同等と認めたものを用いて酵素抗体反応を行う。

1.4.1.3 判定

血清中にオーエスキー病ウイルス糖たんぱく gI 抗体を認めてはならない。

1.4.2 チミジンキナーゼ欠損マーカ-

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試料

試験品を試料とする。

1.4.2.1.2 培養細胞

Ltk細胞を細胞増殖用培養液（付記3）で 1×10^{10} 個/mLとなるように調整した細胞浮遊液の5 mLを約25cm²の培養びんに入れ、37℃で培養し、単層となったものを用いる。

1.4.2.1.3 培養液

HAT培地（付記4）及びウイルス増殖用培養液を用いる。

1.4.2.2 試験方法

試料の0.2mLずつを2本の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、3回洗浄する。HAT培地又はウイルス増殖用培養液の約5 mLをそれぞれの培養細胞に加え、37℃で3日間培養する。それぞれの培養細胞について、凍結融解を1回行った後、遠心上清のウイルス含有量を1.3を準用して測定する。

1.4.2.3 判定

ウイルス増殖用培養液を用いて培養した細胞の遠心上清中のウイルス含有量は、HAT培地を用いて培養した細胞の遠心上清中のウイルス含有量と比べて、1,000倍以上高くなければならない。

1.5 安全試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.1.2 試験動物

体重10～40kgの豚を用いる。

1.5.2 試験方法

試験動物2頭を試験群、1頭を対照群とする。試験群に注射材料の1頭分をそれぞれ筋肉内又は皮内に注射し、対照群とともに同居飼育し、14日間観察する。

1.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

1.6 力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 試験動物

1.5の試験に用いた動物を用いる。

1.6.1.2 中和試験用ウイルス

Vero細胞で増殖させたオーエスキー病ウイルスベゴニア株を用いる。

1.6.1.3 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた細胞をシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

1.6.2 試験方法

1.5の試験終了後、14日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で10倍に希釈し、更に2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.2mL中約80PFUの中和試験用ウイルス液0.5mLを混合し、37℃で一夜処理

する。この各混合液の 0.2mL ずつをそれぞれ 4 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 5）を重層し、37℃ 5 vol% 炭酸ガス下で 2 日間培養後、第 2 次重層寒天培地（付記 6）を重層し、更に一夜培養後、ブラック数を測定する。

1.6.3 判定

ブラック数がウイルス対照の 50% 以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の中和抗体価は、20 倍以上でなければならない。この場合、対照群では 10 倍以下でなければならない。

付記 1 抗オーエスキー病ウイルス血清

オーエスキー病ウイルスで免疫した鶏、兎又はモルモットの血清で、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 2 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

L-グルタミン 0.3 g

牛血清 8 ~ 50 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 3 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

L-グルタミン 0.3 g

牛血清 30 ~ 100 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 HAT 培地

1,000mL 中

ヒポキサンチン 0.014 g

アミノプテリン 0.00018g

チミジン 0.0039 g

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 0 ~ 100 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記5 第1次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
寒天	10.0 g
牛血清	20 mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.6 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記6 第2次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
寒天	10.0 g
ニュートラルレッド	0.05 g
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.6 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

ワクチンの部豚サーコウイルス（2型・組換え型）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次に次の項を加える。

豚サーコウイルス（2型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）

豚サーコウイルス（2型）を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したもので、使用時に油性アジュバントを含む懸濁用液と混和して調製するワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 不活化試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 試料

試験品を試料とする。

1.2.1.2 培養細胞

PPK-3F細胞を用いる。

1.2.2 試験方法

細胞増殖用培養液（付記1）で適当な濃度に調整した培養細胞浮遊液30mLに試料1.5mLを接種し、37℃で1日培養後グルコサミン処理培地（付記2）を7～8mL加え、37℃で15分間静置した後、上清を除去し、ウイルス増殖用培養液（付記3）を加えて処理し、3日間培養する。培養細胞を2～3回凍結融解し、遠心して得た上清15mLを細胞浮遊液に同様に接種、培養、処理した後、ろ過した液を新たな細胞浮遊液に等量加え、37℃で4日間培養した細胞について豚サーコウイルス（2型）（以下「PCV2」という。）モノクローナル抗体（付記4）による蛍光抗体法を行う。

1.2.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。

1.3 異常毒性否定試験

動生剤基準の一般試験法の異常毒性否定試験を準用して試験するとき、適合しなければならない。

1.4 力価試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.4.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

1.4.2 試験方法

試験動物10匹のそれぞれの頸部皮下に注射材料を0.2mLずつ注射し、注射21日後に得られた各個体の血清についてELISAにより抗体価を測定する。

希釈用96穴プレートにDLE/SD緩衝液（付記5）を各穴に80μLずつ分注し、DLE/SD緩衝液で5倍に希釈した各被検血清、参照陽性血清（付記6）及び参照陰性血清（付記7）をそれぞれ80μL加え、2倍階段希釈する。抗原液（付記8）を各穴に等量加え、4℃で一夜静置して処理する。この抗原・抗体反応液を100μLずつ固相化プレート（付記9）の各穴に加え、37℃で3時間感作し、洗浄液（付記10）300μLで洗浄後、抗体価測定ELISA用標識抗体（付記11）を各穴に100μLずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液300μLで3回洗浄し、各穴に基質液（付記12）を100μLずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。0.5mol/L硫酸液を各穴に50μLずつ加え、反応を停止させる。主波長450nm、副波長630nmの2波長で吸光度（OD）を測定し、以下の計算式に

より OD₅₀ を示した血清の希釈倍率を抗体価とする。

$$OD_{50} = (OD_{min} + OD_{max}) / 2$$

OD_{min} : 参照陽性血清の最低希釈倍数における OD の平均

OD_{max} : 320 倍から 2,560 倍まで希釈した参照陰性血清の OD の平均

$$\text{抗体価} (\log_{10}) = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き : OD と血清希釈倍数の対数について OD₅₀ を挟む 2 点の回帰直線における定数及び傾き

1.4.3 判定

試験動物の抗体価の実数は幾何平均で 72 倍以上でなければならない。この際、参照陽性血清の抗体価は所定の値を示し、参照陰性血清のそれは 20 倍以下でなければならない

付記 1 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g

牛胎子血清 100 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 グルコサミン処理培地

1,000mL 中

D-グルコサミン 65 g

ハンクス 199 培地 残量

付記 3 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g

牛胎子血清 20 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 PCV2 モノクローナル抗体

PCV2 オープンリーディングフレーム 2 (以下「PCV2 ORF2」という。) を認識するモノクローナル抗体

付記 5 DLE/SD 緩衝液

1,000mL 中

トリス 1.21 g

塩化ナトリウム 8.77 g

EDTA 3.72 g

ポリソルベート 20 1 mL

水 残量

pH を 7.0 に調整する。

付記 6 参照陽性血清

標準陽性血清（付記 13）と同様の方法で作成した血清で、標準血清を用いて 1.4.2 を準用した ELISA（以下「力価試験の ELISA」という。）で測定したとき、2 倍階段希釈の 3 段階目から 5 段階目に OD₅₀ を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 7 参照陰性血清

SPF マウスから得られた血清で、力価試験の ELISA で測定したとき抗体価が 20 (1.30 log₁₀) 倍以下のもの

付記 8 抗原液

PK15 細胞で培養した PCV2 1010-25 株を超音波処理し、遠心した後、β-プロピオラクトンで不活化したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準血清が所定の抗体価を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 9 固相化プレート

抗体価測定 ELISA 用捕捉抗体（付記 14）を 120 μL ずつ 96 穴 ELISA プレートに分注し、4℃で一夜静置する。洗浄液で 3 回洗浄し、ブロッキング液（付記 15）を 200 μL ずつ加え、37℃で 60 分間反応させ、洗浄液で 3 回洗浄したもの

付記 10 洗浄液

1,000mL 中

トリス

1.21 g

塩化ナトリウム

8.77 g

ポリソルベート 20

1 mL

水

残量

pH を 7.3 ~ 7.7 に調整する。

付記 11 抗体価測定 ELISA 用標識抗体

PCV2ORF2 に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ PCV2 1902B1BC を接種したヌードマウスの腹水を精製し、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した後、15 w/v % サッカリン加里ン酸緩衝食塩液で調整したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 12 基質液

適当な規格のテトラメチルベンチジン溶液

付記 13 標準陽性血清

マウスを PCV2 感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）で 2 回免疫後 35 日に得られたプール血清で、力価試験の ELISA で測定したとき、抗体価 4,000 ~ 10,000 倍を示すもの

付記 14 抗体価測定 ELISA 用捕捉抗体

PCV2ORF2 に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ PCV2 1903A8BC を接種したヌードマウスの腹水を精製し、15w/v % サッカリン加里ン酸緩衝食塩液で調整したもので、

標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように炭酸ナトリウム緩衝液（付記 16）で希釈して用いる。

付記 15 ブロッキング液

リン酸緩衝食塩液に植物性ポリペプトンを 1 w/v % 加えたもの

付記 16 炭酸ナトリウム緩衝液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

1.59 g

炭酸水素ナトリウム

2.93 g

アジ化ナトリウム

0.2 g

水

残 量

pH を 9.6 に調整する。

診断液の部ヨーネ病診断用抗原固相化酵素抗体反応キット（不活化マイコバクテリウム・フレイ菌体吸収剤）の次に次の項を加える。

ヨーネ病診断用抗原固相化酵素抗体反応キット（予備的検出用）

マイコバクテリウム・アビウムの菌体から抽出した抗原をプレートに固相化し、加熱処理マイコバクテリウム・フレイの菌体から抽出した抗原を吸収剤として処理した血清について、酵素抗体法により特異抗体を予備的に検出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 吸光度試験

1.1.1 試験材料

試験品を用いる。

1.1.2 試験方法

指示陽性血清及び指示陰性血清を、試料希釈吸収液でそれぞれ 20 倍に希釈し、 $21 \pm 5^\circ\text{C}$ で 15 分間吸収させる。吸収した各血清を抗原固相化マイクロプレートの各 4 ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ分注し、 $21 \pm 5^\circ\text{C}$ で 45 分間反応させる。プレートを洗浄液（付記 1）で 3 回洗浄後、標識抗体希釈液で 100 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗体液を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 $21 \pm 5^\circ\text{C}$ で 30 分間反応させる。プレートを洗浄液で 3 回洗浄後、発色液を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、遮光して $21 \pm 5^\circ\text{C}$ で 10 分間反応させた後、反応停止液を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、450nm で吸光度値を測定する。

1.1.3 判定

指示陽性血清の平均吸光度値は 0.7 ~ 2.0 であり、指示陽性血清の平均吸光度値と指示陰性血清の平均吸光度値の比は 7.0 以上でなければならない。

1.2 特異性試験

1.2.1 特異性試験 1

1.2.1.1 試験材料

試験品（指示陽性血清及び指示陰性血清を除く。）、参照陽性血清（付記 2）、参照陰性血清（付記 3）及び特異性検定用血清（付記 4）を試験材料とする。

1.2.1.2 試験方法

1.1.2 に準じて参照陽性血清、参照陰性血清及び特異性検定用血清の吸光度を測定する。

1.2.1.3 判定

特異性検定用血清の平均吸光度値を T、参照陽性血清の平均吸光度値を P、及び参照陰性血清の平均吸光度値を N とし、 $100 \times (T - N) / (P - N)$ により特異性検定用血清の S/P 値を求める。このとき、特異性検定用血清の S/P 値は、50 未満でなければならない。

1.2.2 特異性試験 2

1.2.2.1 試験材料

試験品及び特異性検定用血清を試験材料とする。

1.2.2.2 試験方法

1.1.2 に準じて指示陽性血清、指示陰性血清及び特異性検定用血清の吸光度を測定する。

1.2.2.3 判定

1.2.1.3 に準じて S/P 値を求める。ただし、P は指示陽性血清の平均吸光度、及び N は指示陰性血清の平均吸光度とする。

特異性検定用血清の S/P 値は、50 未満でなければならない。

1.3 力価試験

1.3.1 試験材料

試験品（指示陽性血清及び指示陰性血清を除く。）、参照陽性血清、参照陰性血清及び力価検定用血清（付記5）を用いる。

1.3.2 試験方法

1.1.2 に準じて参照陽性血清、参照陰性血清及び力価検定用血清の吸光度値を測定する。ただし、力価検定用血清はリン酸緩衝食塩液で10倍から2倍階段希釈したものをを用いる。

1.3.3 判定

1.2.1.3 に準じて力価検定用血清の S/P 値を算出する。ただし、T は力価検定用血清の各段階の希釈液の平均吸光度値とする。

S/P 値が 70 以上を示す力価検定用血清の最高希釈倍数を力価とすると、力価は 400 又は 800 倍でなければならない。

付記 1 洗浄液

濃縮洗浄液を水で 20 倍に希釈したもの

付記 2 参照陽性血清

菌分離検査によってヨーネ病陽性と診断された牛由来で、ヨーネ病補体結合反応で抗体価が 40 ~ 80 倍を示す血清で、酵素抗体法において 0.7 ~ 2.0 の吸光度値を示すように参照陰性血清で調整し、- 80 °C で凍結保存したもの

付記 3 参照陰性血清

健康な牛の血清で、酵素抗体法において 0.1 未満の吸光度値であることを確認し、- 80 °C で凍結保存したもの

付記 4 特異性検定用血清

マイコバクテリウム・フレイ 5865-KB 株の培養菌を不活化後、水酸化アルミニウムゲルアジュバントを混合して健康な牛に注射し、4 週間後に採血した血清で、酵素抗体法において 50 未満の S/P 値を示すように調整し、- 80 °C で凍結保存したもの

付記 5 力価検定用血清

ヨーネ病補体結合反応で抗体価が 40 ~ 80 倍を示す血清で、酵素抗体法において 800 倍希釈時の S/P 値が 55 ~ 95 となるように参照陰性血清で調整し、- 80 °C で凍結保存したもの

診断液の部トキソプラズマ病診断用蛍光抗体の項の次に次のように加える。

A型インフルエンザ診断用ラテックス標識抗体反応キット

ラテックスで標識したA型インフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体と結合した抗原の複合体を、認識部位の異なる補足用モノクローナル抗体を用いて検出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 特異性試験

1.1.1 試験材料

1.1.1.1 被検材料

アッセイストリップ及び検体抽出用試薬を用いる。

1.1.1.2 反作用抗原

B型インフルエンザウイルス抗原（付記1）、ニューカッスル病ウイルス抗原（付記2）、鶏伝染性気管支炎ウイルス抗原（付記3）、希釈液（付記4）及び参照陽性抗原（付記5）を希釈液で8倍希釈したものをを用いる。

1.1.2 試験方法

反作用抗原 150 μ L と検体抽出用試薬 800 μ L をそれぞれ混合したものを 200 μ L ずつアッセイストリップに添加し、15 分間静置して発色を観察する。

1.1.3 判定

B型インフルエンザウイルス抗原、ニューカッスル病ウイルス抗原、鶏伝染性気管支炎ウイルス抗原及び希釈液を添加したアッセイストリップでは、コントロール位置に赤色のラインのみが認められ、判定位置に青色のラインが認められてはならない。希釈した参照陽性抗原を添加したアッセイストリップでは、コントロール位置に赤色のライン、判定位置に青色のラインがそれぞれ認められなければならない。

1.2 力価試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 被検材料

アッセイストリップ及び検体抽出用試薬を用いる。

1.2.1.2 反作用抗原

参照陽性抗原を希釈液で2倍階段希釈した各希釈抗原液を反作用抗原とする。

1.2.2 試験方法

反作用抗原 150 μ L と検体抽出用試薬 800 μ L をそれぞれ混合したものを 200 μ L ずつアッセイストリップに添加し、15 分間静置して発色を観察する。

1.2.3 判定

判定位置に青色のラインが認められる参照陽性抗原の最高希釈倍数は 32 ~ 128 倍でなければならない。いずれの反作用抗原でもコントロール位置に赤色のラインが認められなければならない。

付記1 B型インフルエンザウイルス抗原

発育鶏卵でB型インフルエンザウイルス B/Shanghai/361/02 株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前のウイルス含有量を $10^{6.0}$ FFU / mL に調整したもの

付記2 ニューカッスル病ウイルス抗原

発育鶏卵でニューカッスル病ウイルス B1 株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前