

動物用生物学的製剤検定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検定基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1568 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、これを加える。

改正後	改正前
診断液の部 ヨーネ病診断用リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応キット（インターカレーション法） マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの遺伝子が保有する挿入塩基配列であるIS900を増幅することができるプライマーの組合せを用い、<u>インターカレーション法によるリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応</u>（以下この項において「リアルタイムPCR」という。）によりヨーネ菌DNAを検出し、また、ヨーネ菌DNA濃度を算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 （略） 1.1.2 試験方法 1.1.2.1 <u>プライマー10.1及び11.1を用いる方法</u> 指示陽性DNA、参照陽性DNA、特異性検定用陰性DNA及び陰性対照のそれぞれ 5 μ Lを、核酸増幅試薬25 μ L、プライマー10.1及びプライマー11.1のそれぞれ0.25 μ L、ウラシルーNーグリコシラーゼ（以下この項において「UNG」という。）0.5 μ L並びにリボヌクレアーゼフリー水19 μ Lを混和した反応液45 μ Lに加え、よく混和する。リアルタイムPCR装置（付記4）を用いて、50℃ 2 分間の加熱及び95℃15分間の熱変性後、95℃30秒間の解離反応並びに68℃ 1 分間のアニーリング及び伸長反応を 1 セットとして45回繰り返した後、融解曲線解析を行う。 1.1.2.2 <u>プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法</u> <u>試験品中の強陽性コントロール、弱陽性コントロール、陰性コントロール、参照陽性DNA及び特異性検定用陰性DNAのそれぞれ 5 μ Lを、核酸増幅試薬25 μ L、プライマーIS900-3及びプライマーIS900-32のそれぞれ 1 μ L、インターナルコントロール 1 μ L、UNG0.25 μ L並びにリボヌクレアーゼフリー水16.75 μ Lを混和した反応液45 μ Lに加え、よく混和する。リアルタイムPCR装置を用いて、40℃10分間の加熱及び95℃10分間の熱変性後、95℃30秒間の解離反応並びに68℃ 1 分間のアニーリング及び伸長反応を 1 セットとして45回繰り返した後、融解曲線解析を行う。</u>	診断液の部 ヨーネ病診断用リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応キット マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの遺伝子が保有する挿入塩基配列であるIS900を増幅することができるプライマーの組合せを用い、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「リアルタイムPCR」という。）によりヨーネ菌DNAを検出し、また、ヨーネ菌DNA濃度を算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 （略） 1.1.2 試験方法 （新設） 指示陽性DNA、参照陽性DNA、特異性検定用陰性DNA及び陰性対照のそれぞれ 5 μ Lを、核酸増幅試薬25 μ L、プライマー10.1及びプライマー11.1のそれぞれ0.25 μ Lずつ、ウラシルーNーグリコシラーゼ（以下この項において「UNG」という。）0.5 μ L並びにリボヌクレアーゼフリー水19 μ Lを混和した反応液45 μ Lに加え、よく混和する。リアルタイムPCR装置（付記4）を用いて、50℃ 2 分間の加熱及び95℃15分間の熱変性後、95℃30秒間の解離反応並びに68℃ 1 分間のアニーリング及び伸長反応を 1 セットとして45回繰り返した後、融解曲線解析を行う。 （新設）

1.1.3 判定 1.1.3.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法 (略) 1.1.3.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法 参照陽性DNA、強陽性コントロール及び弱陽性コントロールについては、蛍光強度の上昇が認められ、蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められなければならない。特異性検定用陰性DNA及び陰性コントロールについては、蛍光強度の上昇が認められるとともに、参照陽性DNA及び強陽性コントロールと同じ温度範囲で蛍光値のピークが認められてはならない。 1.2 力価試験 1.2.1 試験材料 1.2.1.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法 試験品、力価検定用DNA（付記5）及び陰性対照を用いる。 1.2.1.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法 試験品中の強陽性コントロール、弱陽性コントロール、陰性コントロール、力価検定用強陽性コントロール（付記6）、力価検定用弱陽性コントロール（付記7）並びに力価検定用陰性コントロール（付記8）を用いる。 1.2.2 試験方法 1.2.2.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法 指示陽性DNAを、DNA濃度が1 pg/2.5 μLから0.001pg/2.5 μLまでになるようにトリス塩酸エチレンジアミン四酢酸緩衝液（付記9。以下この項において「TE緩衝液」という。）を用いて10倍階段希釈する。希釈した各段階の指示陽性DNA、力価検定用DNA及び陰性対照のそれぞれ5 μLについて、1.1.2.1に準じて融解曲線解析を行う。力価検定用DNAの増幅曲線についてスレッシュホールド・サイクル値（以下この項において「Ct値」という。）を用い、標準曲線を作成する。 1.2.2.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法 強陽性コントロール、弱陽性コントロール、力価検定用強陽性コントロール、力価検定用弱陽性コントロール、力価検定用陰性コントロール及び陰性コントロールについて、1.1.2.2に準じて融解曲線解析を行う。 1.2.3 判定 1.2.3.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法 力価検定用DNA及び指示陽性DNAのそれぞれ1 pg/2.5 μLの濃度におけるCt値は24±3サイクルであり、0.001pg/2.5 μLの濃度において2穴中1穴以上が陽性でなければならない。また、ヨーネ菌DNA濃度とCt値との用量－反応式の相関係数の2乗値は0.9以上であり、PCR効率は80～120%でな	1.1.3 判定 (新設) (略) (新設) 1.2 力価試験 1.2.1 試験材料 (新設) 試験品、力価検定用DNA（付記5）及び陰性対照を用いる。 (新設) 1.2.2 試験方法 (新設) 指示陽性DNAを、DNA濃度が1 pg/2.5 μLから0.001pg/2.5 μLまでになるようにトリス塩酸エチレンジアミン四酢酸緩衝液（付記6。以下この項において「TE緩衝液」という。）を用いて10倍階段希釈する。希釈した各段階の指示陽性DNA、力価検定用DNA及び陰性対照のそれぞれ5 μLについて、1.1.2に準じて融解曲線解析を行い、また、力価検定用DNAの増幅曲線についてスレッシュホールド・サイクル値（以下この項において「Ct値」という。）を用い、標準曲線を作成する。 (新設) 1.2.3 判定 (新設) 力価検定用DNA及び指示陽性DNAのそれぞれ1 pg/2.5 μLの濃度におけるCt値は24±3サイクルであり、0.001pg/2.5 μLの濃度において2穴中1穴以上が陽性でなければならない。また、ヨーネ菌DNA濃度とCt値との用量－反応式の相関係数の2乗値は0.9以上であり、PCR効率は80～120%でな
--	---

ければならず、蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められなければならない。陰性対照については、蛍光強度の上昇が認められないか、認められた場合であっても指示陽性DNAと同じ温度範囲で蛍光値のピークが認められてはならない。 1.2.3.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法 <u>所定の試験成立条件をすべて満たしたとき、強陽性コントロール及び力価検定用強陽性コントロールの定量サイクル値（以下この項において「Cq値」という。）は24±3サイクル、弱陽性コントロール及び力価検定用弱陽性コントロールのCq値は32.5±3サイクル、力価検定用陰性コントロール及び陰性コントロールのCq値は33.5±3サイクルでなければならない。強陽性コントロール及び力価検定用強陽性コントロールの蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められなければならない。弱陽性コントロール及び力価検定用弱陽性コントロールの蛍光値のピークは所定の温度範囲に二峰性に認められなければならない。力価検定用陰性コントロール及び陰性コントロールの蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められ、かつ強陽性コントロール及び力価検定用強陽性コントロールと同じ温度範囲で蛍光値のピークが認められてはならない。</u> 付記1 参照陽性DNA マイコバクテリウム・アビウム亜種<u>パラツベルクローシス42-13-1株</u>から抽出・精製されたDNAであり、DNA濃度が0.4pg/μLになるように、適当な緩衝液で調製した後、<u>－20℃又は－80℃</u>で保存する。 付記2 特異性検定用陰性DNA マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウムP-18株及びマイコバクテリウム2333株からそれぞれ抽出・精製されたDNAであり、DNA濃度が4 pg/μLになるように、適当な緩衝液で調製した後、<u>－20℃又は－80℃</u>で保存する。 付記3 （略） 付記4 リアルタイムPCR装置 動物医薬品検査所が適当と認めたリアルタイムPCR装置。<u>1.1.2.1にあつては指示陽性DNAを用いて1.1.2.1に規定する条件で測定したときの蛍光値のピークの認められる温度範囲が、事前に確認されているもの。</u>	ければならず、蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められなければならない。陰性対照については、蛍光強度の上昇が認められないか、認められた場合であっても指示陽性DNAと同じ温度範囲で蛍光値のピークが認められてはならない。 (新設) 付記1 参照陽性DNA マイコバクテリウム・アビウム亜種ツベルクローシス42-13-1株から抽出・精製されたDNAであり、DNA濃度が0.4pg/μLになるように、適当な緩衝液で調製した後、－20℃で保存する。 付記2 特異性検定用陰性DNA マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウムP-18株及びマイコバクテリウム2333株からそれぞれ抽出・精製されたDNAであり、DNA濃度が4 pg/μLになるように、適当な緩衝液で調製した後、－20℃で保存する。 付記3 （略） 付記4 リアルタイムPCR装置 動物医薬品検査所が適当と認めたリアルタイムPCR装置であつて、指示陽性DNAを用いて<u>1.1.2</u>に規定する条件で測定したときの蛍光値のピークの認められる温度範囲が、事前に確認されているもの。
---	---

付記5 (略)	付記5 (略)
付記6 <u>力価検定用強陽性コントロール陽性コントロールとして適当と認められたDNAを、DNA濃度が0.02 5pg/μLになるように調整したもの。－80℃で保存する。</u> 付記7 <u>力価検定用弱陽性コントロール陽性コントロールとして適当と認められたDNAを、DNA濃度が0.02 5fg/μLになるように調整したもの。－80℃で保存する。</u> 付記8 <u>力価検定用陰性コントロールTE緩衝液を用いる。</u> 付記9 (略) <u>ヨーネ病診断用リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応キット（ハイブリダイゼーション法）</u> <u>マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの遺伝子が保有する挿入塩基配列であるIS900を増幅することができるプライマーの組合せを用い、ハイブリダイゼーション法によるリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「リアルタイムPCR」という。）によりヨーネ菌DNAを検出し、また、ヨーネ菌DNA濃度を算出するためのキットである。</u> 1 小分製品の試験 1.1 特異性試験 1.1.1 試験材料 <u>試験品、参照陽性DNA（付記1）及び特異性検定用陰性DNA（付記2）を用いる。</u> 1.1.2 試験方法 <u>陽性コントロール1～5、参照陽性DNA、特異性検定用陰性DNA及び陰性コントロールのそれぞれ5μLを、核酸増幅試薬42.75μL、ウラシルーNーグリコシラーゼ0.25μL、インターナルコントロール（以下この項において「IC」という。）1μL、プライマーMP10-1 0.25μL、プライマーMP11-1 0.25μL、プローブIS900-6 0.25μL及びプローブIC 0.25μLを混和した反応液45μLに加え、よく混和する。リアルタイムPCR装置（付記3）を用いて、50℃2分間の加熱及び95℃10分間の熱変性後、95℃30秒間の解離反応並びに68℃1分間のアニーリング及び伸長反応を1セットとして45回繰</u>	(新設) 付記6 (略) (新設)

り返す。

1.1.3 試験成立条件

陽性コントロール1～5の定量サイクル値（以下この項において「Cq値」という。）とその濃度を用いて算出された標準曲線の相関係数の二乗値（以下この項において「R²」という。）が0.9以上であり、PCR効率は80～120%でなければならない。陽性コントロール1では2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認め、かつCq値が25±3サイクルでなければならない。陽性コントロール5では1穴以上でIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。陰性コントロールでは2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めず、かつ2穴ともICを検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。これらの条件をすべて満たした場合、試験が成立するものとする。

1.1.4 判定

参照陽性DNAでは2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。特異性検定用陰性DNAでは2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めず、かつ2穴ともICを検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。

1.2 力価試験

1.2.1 試験材料

試験品、力価検定用標準DNA（付記4）1～5及び力価検定用陰性コントロール（付記5）を用いる。

1.2.2 試験方法

陽性コントロール1～5、陰性コントロール、力価検定用標準DNA1～5及び力価検定用陰性コントロールに対し、1.1.2を準用し、DNA増幅を行う。また、陽性コントロール1～5及び力価検定用標準DNA1～5の増幅曲線のCq値を用い、それぞれの標準曲線を作成する。

1.2.3 試験成立条件

1.1.3を準用する。

1.2.4 判定

力価検定用標準DNA1では2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認め、かつCq値が25±3サイクルでなければならない。力価検定用標準DNA5では1穴以上でIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。力価検定用標準DNAの標準曲線のR²は0.9以上でなければならない。PCR効率は80～120%でなければならない。力価検定用陰性コントロールでは2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めず、かつ2穴ともICを検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。

付記 1	<u>参照陽性DNA</u> マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス42-13-1株から抽出・精製されたDNAであり、DNA濃度が0.4pg/μLになるように、適当な緩衝液で調製したもの。－80℃で保存する。
付記 2	<u>特異性検定用陰性DNA</u> マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウムP-18株及びマイコバクテリウム2333株からそれぞれ抽出・精製されたDNAであり、DNA濃度が4 pg/μLになるように、適当な緩衝液で調製したもの。－80℃で保存する。
付記 3	<u>リアルタイムPCR装置</u> 動物医薬品検査所が適当と認めたリアルタイムPCR装置であって、蛍光色素FAM（励起波長495nm、蛍光波長520nm）及びAtto532（励起波長532nm、蛍光波長553nm）をそれぞれ同時に測定可能なもの。
付記 4	<u>力価検定用標準DNA</u> 陽性コントロールプラスミドpPC10-11を、DNA濃度が75fg/μLから7.5ag/μLまでになるように、適当な緩衝液で10倍階段希釈したもの。DNA濃度が75fg/μLのプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 1、7.5fg/μLのプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 2、750ag/μLのプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 3、75ag/μLのプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 4、7.5ag/μLのプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 5 とする。－80℃で保存する。
付記 5	<u>力価検定用陰性コントロール</u> 適当な緩衝液を力価検定用陰性コントロールとしたもの。－80℃で保存する。