

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）（抄）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
<p>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・鶏伝染性コリーザ（A・C型組換え融合抗原）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</p> <p>（略） 1 小分製品の試験 （削る）</p> <p><u>1.1 ニューカッスル病力価試験</u> <u>1.1.1 試験材料</u> <u>1.1.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.1.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5～7週齢の鶏を用いる。</u> <u>1.1.1.3（略）</u> <u>1.1.2 試験方法</u> <u>試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。注射材料の1羽分ずつを</u></p>	<p>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・鶏伝染性コリーザ（A・C型組換え融合抗原）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</p> <p>（略） 1 小分製品の試験 <u>1.1 無菌試験</u> <u>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。</u> <u>1.2 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5～7週齢の鶏を用いる。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。</u> <u>注射材料の1羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群と共に4週間観察する。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 ニューカッスル病力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>（新設）</u> <u>1.3.1.1.1 試験動物</u> <u>1.2の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>1.3.1.1.2（略）</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>1.2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></p>

試験群の脚部筋肉内に注射し、4週間後に試験群及び対照群から採血する。
得られた各個体の血清について、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

1.1.3 (略)
(削る)

(削る)

ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

1.3.1.3 判定 (略)

1.3.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL中 $10^{4.0}$ EID₅₀以上でなければならない。

1.3.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢のものを用いる。

1.3.2.2 試験方法

1.2の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ各群ごとに等量プールし、非働化する。中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を3群に分け、第1群には試験群のプール血清を、第2群には対照群のプール血清を、第3群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を4℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した試料0.1 mLずつを5個以上の発育鶏卵に注射し、37℃で7～8日間培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染したものとみなし、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。試験群の中和指数は、対照群に対し2.0以上でなければならない。この場合において、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し1.0以下でなければならない。

1.3.3 鶏伝染性コリーザ（A・C型）力価試験

1.3.3.1 A型力価試験

1.3.3.1.1 試験材料

1.3.3.1.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.3.1.2 試験方法

1.2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、酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）を行う。精製組換えA型ELISA抗原（付記1）を96穴プレートの各穴に50 μLずつ加え、4℃で一夜反応させた後、洗浄液（付記2）で洗浄する。各穴にブロッキング溶液（付記3）を300 μLずつ加え、20～30℃で1時間反応させた後、洗浄液で洗浄す

る。試験群の血清、対照群の血清及びA・C参照陽性血清（付記4）を検体希釈液（付記5）で100倍に希釈したものをそれぞれ2穴に50 μ Lずつ加え、20～30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記6）を50 μ Lずつ加え、20～30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液（付記7）を100 μ Lずつ加え、遮光して20～30 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた後、反応停止液（付記8）を100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長450nm及び副波長650nmで測定し、これらの差をELISA値とする。

1.3.3.1.3 判定

被検血清のELISA値をA・C参照陽性血清のELISA値で除したものを各被検血清の抗体価とすると、試験群の80%以上が抗体価0.300以上でなければならない。この場合において、対照群の全てが抗体価0.300未満でなければならない。

1.3.3.2 C型力価試験

1.3.3.2.1 試験材料

1.3.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.3.2.2 試験方法

1.2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。精製組換えC型ELISA抗原（付記9）を96穴プレートの各穴に50 μ Lずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで一夜反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴にブロッキング溶液を300 μ Lずつ加え、20～30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。試験群の血清、対照群の血清及びA・C参照陽性血清を検体希釈液で100倍に希釈したものをそれぞれ2穴に50 μ Lずつ加え、20～30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を50 μ Lずつ加え、20～30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。基質液を100 μ Lずつ加え、遮光して20～30 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた後、反応停止液を100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長450nm及び副波長650nmで測定し、これらの差をELISA値とする。

1.3.3.2.3 判定

被検血清のELISA値をA・C参照陽性血清のELISA値で除したものを各被検血清の抗体価とすると、試験群の80%以上が抗体価0.300以上でなければならない。この場合において、対照群の全てが抗体価0.300未満でなければならない。

付記1 精製組換えA型ELISA抗原

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌No.221株由来の遺伝子を保有する組換え大腸菌の培養菌液を超音波破碎後、尿素で可溶化した溶液をアフィニティクロマトグラフィーで精製し、リン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）で透析したもので、たん白質量が0.1 μ g/穴になるようにPBSで調整した本抗原を用いて、1.3.3.1.2によりELISAを実施

(削る)

(削る)	<p>するとき、<u>A・C参照陽性血清のELISA値が0.800～1.350を示すもの。</u></p> <p>付記2 <u>洗浄液</u></p> <table border="0"> <tr> <td><u>1,000mL中</u></td> <td></td> </tr> <tr> <td><u>ポリソルベート20</u></td> <td><u>0.5mL</u></td> </tr> <tr> <td><u>PBS</u></td> <td><u>残量</u></td> </tr> </table>	<u>1,000mL中</u>		<u>ポリソルベート20</u>	<u>0.5mL</u>	<u>PBS</u>	<u>残量</u>		
<u>1,000mL中</u>									
<u>ポリソルベート20</u>	<u>0.5mL</u>								
<u>PBS</u>	<u>残量</u>								
(削る)	<p>付記3 <u>ブロッキング溶液</u></p> <p><u>PBSにスキムミルクを5 w/v%となるように加え、溶解したもの。</u></p>								
(削る)	<p>付記4 <u>A・C参照陽性血清</u></p> <p><u>組換え大腸菌発現ヘモフィルス・パラガリナルムAC融合抗原液で免疫した、動生剤基準生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合する発育鶏卵、又はこれと同等の規格の発育鶏卵由来の鶏の血清であって、1.3.3.1.2及び1.3.3.2.2によりELISAを実施するとき、ELISA値がA型に対して0.800～1.350、C型に対して0.750～1.350を示さなければならない。</u></p>								
(削る)	<p>付記5 <u>検体希釈液</u></p> <table border="0"> <tr> <td><u>1,000mL中</u></td> <td></td> </tr> <tr> <td><u>スキムミルク</u></td> <td><u>100g</u></td> </tr> <tr> <td><u>ポリソルベート20</u></td> <td><u>1mL</u></td> </tr> <tr> <td><u>水</u></td> <td><u>残量</u></td> </tr> </table>	<u>1,000mL中</u>		<u>スキムミルク</u>	<u>100g</u>	<u>ポリソルベート20</u>	<u>1mL</u>	<u>水</u>	<u>残量</u>
<u>1,000mL中</u>									
<u>スキムミルク</u>	<u>100g</u>								
<u>ポリソルベート20</u>	<u>1mL</u>								
<u>水</u>	<u>残量</u>								
(削る)	<p>付記6 <u>酵素標識抗体</u></p> <p><u>西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗鶏IgG (H+L) 抗体。1.3.3.1.2及び1.3.3.2.2によりELISAを実施するとき、A・C参照陽性血清のELISA値がA型に対しては0.800～1.350、C型に対しては0.750～1.350を示すように標識抗体希釈液（付記10）で希釈して用いる。</u></p>								
(削る)	<p>付記7 <u>基質液</u></p> <p><u>市販のテトラメチルベンチジン（TMB）基質液を用いる。</u></p>								
(削る)	<p>付記8 <u>反応停止液</u></p> <table border="0"> <tr> <td><u>1,000mL中</u></td> <td></td> </tr> <tr> <td><u>硫酸</u></td> <td><u>55mL</u></td> </tr> <tr> <td><u>精製水</u></td> <td><u>残量</u></td> </tr> </table>	<u>1,000mL中</u>		<u>硫酸</u>	<u>55mL</u>	<u>精製水</u>	<u>残量</u>		
<u>1,000mL中</u>									
<u>硫酸</u>	<u>55mL</u>								
<u>精製水</u>	<u>残量</u>								
(削る)	<p>付記9 <u>精製組換えC型ELISA抗原</u></p> <p><u>ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌53-47株由来の遺伝子を保有する組換え大腸菌の培養菌液を超音波破碎後、尿素で可溶化した溶液をアフィニティクロマトグラフィーで精製し、PBSで透析したものであって、</u></p>								

(削る)

たん白質量が0.1 μ g/穴になるようにPBSで調整した本抗原を用いて、1.3.3.2.2によりELISAを実施するとき、A・C参照陽性血清のELISA値が0.750~1.350を示すもの。

付記10 標識抗体希釈液

<u>1,000mL</u> 中	
スキムミルク	<u>50g</u>
ポリソルベート20	<u>1mL</u>
水	残量