

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）（抄）

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
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99精製線毛抗原）混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p> <p>1 定義 シードロット規格に適合した血清型のそれぞれ異なる3種類の牛ロタウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液、シードロット規格に適合した牛コロナウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得た<u>ウイルス液</u>及びシードロット規格に適合した大腸菌精製線毛抗原K99をそれぞれ不活化し、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。</p> <p>2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 牛ロタウイルス 2.1.1.1 (略) 2.1.1.2 性状 MA-104細胞に接種すると、単層細胞の剥離を特徴とするCPEを伴って増殖する。 2.1.1.3～2.1.1.5 (略) 2.1.2 牛コロナウイルス 2.1.2.1 (略) 2.1.2.2 性状 牛腎継代細胞、HAL細胞、HRT-18細胞（ヒト直腸ガン由来株化細胞）及びBEK-1細胞（牛胎子腎由来株化細胞）で合胞体形成を特徴とするCPEを伴って増殖する。 ラット、マウス、ハムスター及び鶏赤血球を凝集する。</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99精製線毛抗原）混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p> <p>1 定義 シードロット規格に適合した血清型のそれぞれ異なる3種類の牛ロタウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液、シードロット規格に適合した牛コロナウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得た<u>感染細胞の可溶化抗原</u>及びシードロット規格に適合した大腸菌精製線毛抗原K99をそれぞれ不活化し、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。</p> <p>2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 牛ロタウイルス 2.1.1.1 (略) 2.1.1.2 性状 MA-104細胞に接種すると、単層細胞の剥離を特徴とするCPEを伴って増殖し、その培養液は、<u>モルモット赤血球を凝集する</u>。 2.1.1.3～2.1.1.5 (略) 2.1.2 牛コロナウイルス 2.1.2.1 (略) 2.1.2.2 性状 <u>生後3日以内の乳のみマウスの脳内に接種すると、神経症状を呈し死亡する。</u> 牛腎継代細胞、HAL細胞、HRT-18細胞（ヒト直腸ガン由来株化細胞）及びBEK-1細胞（牛胎子腎由来株化細胞）で合胞体形成を特徴とするCPEを伴って増殖する。 ラット、マウス、ハムスター及び鶏赤血球を凝集する。</p>

2.1.2.3～2.1.2.5 (略)

2.1.3 大腸菌

2.1.3.1・2.1.3.2 (略)

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、連続した工程により作製し、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、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4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 -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5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 -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.6の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1・2.2.2 (略)

2.2.3 大腸菌

2.2.3.1 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 牛ロタウイルス各株

2.3.1.1 (略)

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを0.4vol%となるように加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス液とする。

2.1.2.3～2.1.2.5 (略)

2.1.3 大腸菌

2.1.3.1・2.1.3.2 (略)

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、適当と認められた液体培地 (付記1)で増殖させ、連続した工程により作製し、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、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4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、適当と認められた液体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 -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5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、適当と認められた液体培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.6の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1・2.2.2 (略)

2.2.3 大腸菌

2.2.3.1 培地

液体培地、寒天培地 (付記2)又は製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 牛ロタウイルス各株

2.3.1.1 (略)

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを0.4vol%となるように加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.5.1.1の試験を行う。

2.3.1.4 原液
不活化ウイルス液を混合し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。
原液について3.7の試験を行う。

2.3.2 牛コロナウイルス

2.3.2.1 (略)

2.3.2.2 ウイルスの培養
プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液の遠心上清又はこれを濃縮したものの遠心上清をウイルス浮遊液とする。
ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.3の試験を行う。
(削る)

2.3.2.3 不活化
ウイルス浮遊液にホルマリンを0.05vol%となるよう加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.5.1.2の試験を行う。

2.3.2.4 原液
不活化ウイルス液を混合し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。
原液について、3.7の試験を行う。

2.3.3 大腸菌

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、3.4の試験を行う。

2.3.3.2 集菌
培養菌液を遠心し、その沈渣を線毛抽出用緩衝液（付記1）に浮遊し、濃厚菌液とする。

2.3.3.3 線毛の精製
濃厚菌液から適当と認められる方法で加熱抽出したものの遠心上清を抽出線毛抗原液とする。抽出線毛抗原液に飽和硫酸アンモニウム溶液（付記2）を加え、更に0.4vol%ホルマリンを加え、2～5℃で静置し、その遠心沈渣を0.4%ホルマリン加リン酸緩衝食塩液に浮遊し、透析後濃度調整したものを精製線毛抗原液とする。
精製線毛抗原液について、3.6の試験を行う。
(削る)

不活化ウイルス液について、3.5の試験を行う。

2.3.1.4 原液
不活化ウイルス液を混合し、原液とする。
原液について3.10の試験を行う。

2.3.2 牛コロナウイルス

2.3.2.1 (略)

2.3.2.2 ウイルスの培養
プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに感染細胞と培養液を採取し、遠心した沈渣をウイルス感染細胞、上清をウイルス浮遊液とする。
ウイルス浮遊液について、3.3.2の試験を行う。

2.3.2.3 可溶化
ウイルス感染細胞を可溶化処理した後、遠心した上清を可溶化抗原液とする。
可溶化抗原液について、3.6の試験を行う。

2.3.2.4 不活化
可溶化抗原液から適当と認められた方法で可溶化剤を除去し、濃度調整したものにホルマリンを0.05vol%となるよう加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化可溶化抗原液とする。
不活化可溶化抗原液について、3.7の試験を行う。

2.3.2.5 原液
不活化可溶化抗原液を混合し、原液とする。
原液について、3.10の試験を行う。

2.3.3 大腸菌

2.3.3.1 培養
プロダクションシード菌を液体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、3.4の試験を行う。

2.3.3.2 集菌
培養菌液を遠心し、その沈渣を線毛抽出用緩衝液（付記3）に浮遊し、濃厚菌液とする。

2.3.3.3 線毛の精製
濃厚菌液から適当と認められる方法で加熱抽出したものの遠心上清を抽出線毛抗原液とする。抽出線毛抗原液から塩析法により抗原画分を採取し、リン酸緩衝食塩液に浮遊し、透析後濃度調整したものを精製線毛抗原液とする。

精製線毛抗原液について、3.8の試験を行う。

2.3.3.4 不活化
精製線毛抗原液にホルマリンを0.1vol%となるよう加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化精製線毛抗原液とする。

2.3.3.4 原液

精製線毛抗原液にホルマリンを0.1vol%となるように加え、不活化したものを原液とする。

原液について、3.7の試験を行う。

2.4 (略)

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、3.8の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1～3.1.3 (略)

3.1.4 マスターシード菌の試験

3.1.4.1 (略)

3.1.4.2 夾雑菌否定試験

3.1.4.2.1 試験材料

検体及びBCP乳糖寒天培地 (付記3) を用いる。

3.1.4.2.2 試験方法

検体を滅菌生理食塩液で溶解したものを試料とし、シャーレに固めたBCP乳糖寒天培地に塗抹し、37℃で24時間培養する。

3.1.4.2.3 (略)

3.1.5・3.1.6 (略)

3.2 (略)

3.3 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 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 牛ロタウイルス

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1・3.3.2.1.1.2 (略)

3.3.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、牛ロタウイルス増殖用培養液 (付記4) を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.3.2.1.3 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^{8.8}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。

3.3.3 赤血球凝集試験

3.3.3.1 牛コロナウイルス

不活化精製線毛抗原液について、3.9の試験を行う。

2.3.3.5 原液

不活化精製線毛抗原液を混合し、原液とする。

原液について、3.10の試験を行う。

2.4 (略)

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、3.11の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1～3.1.3 (略)

3.1.4 マスターシード菌の試験

3.1.4.1 (略)

3.1.4.2 夾雑菌否定試験

3.1.4.2.1 試験材料

検体及びBCP乳糖寒天培地 (付記4) を用いる。

3.1.4.2.2 試験方法

検体を滅菌整理食塩液で溶解したものを試料とし、シャーレに固めたBCP乳糖寒天培地に塗抹し、37℃で24時間培養する。

3.1.4.2.3 (略)

3.1.5・3.1.6 (略)

3.2 (略)

3.3 ウイルス浮遊液の試験

(新設)

3.3.1 ウイルス含有量試験

3.3.1.1 牛ロタウイルス

3.3.1.1.1 試験材料

3.3.1.1.1.1・3.3.1.1.1.2 (略)

3.3.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、牛ロタウイルス増殖用培養液 (付記5) を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.3.1.1.3 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^{8.8}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.2 赤血球凝集試験

3.3.2.1 牛コロナウイルス

3.3.3.1.1 試料

検体を0.1w/v%牛血清アルブミン（以下この項において「BSA」という。）加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.1.2 試験方法

試料と1 vol%になるように濃度を調整したマウス赤血球浮遊液をそれぞれ等量混合し、よく混和した後、常温で1～2時間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.3.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。検体の赤血球凝集価は、64倍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、その赤血球凝集価とする。

3.4 培養菌液の試験

3.4.1 (略)

3.4.2 生菌数試験

3.4.2.1 試験材料

試験用培地I（付記5）及び試験用培地II（付記6）を用いる。

3.4.2.2・3.4.2.3 (略)

3.5 不活化ウイルス液の試験

(削る)

3.5.1 不活化試験

3.5.1.1 牛ロタウイルス

3.5.1.1.1 試験材料

3.5.1.1.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体を4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.1.1.1.2 (略)

3.5.1.1.2 試験方法

試料の0.1mLずつを10本の小試験管の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、イーグルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛ロタウイルス増殖用培養液を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養する。培養細胞を凍結融解した後、その培養液を継代する。更に1代継代し、同様の方法で培養し観察する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.1.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

(削る)

3.3.2.1.1 試料

検体0.4mLを0.1w/v%牛血清アルブミン（以下この項において「BSA」という。）加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.2 試験方法

試料0.4mLに1 vol%になるように濃度を調整したマウス赤血球浮遊液をそれぞれ0.2mLずつ加え、よく混和した後、常温で1～2時間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.2.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。検体の赤血球凝集価は、64倍以上でなければならない。

3.4 培養菌液の試験

3.4.1 (略)

3.4.2 生菌数試験

3.4.2.1 試験材料

試験用培地I（付記6）及び試験用培地II（付記7）を用いる。

3.4.2.2・3.4.2.3 (略)

3.5 不活化ウイルス液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 不活化試験

(新設)

3.5.2.1 試験材料

3.5.2.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体2 mLを4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.2.1.2 (略)

3.5.2.2 試験方法

試料の0.1mLずつを10本の小試験管の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、イーグルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛ロタウイルス増殖用培養液を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養する。培養細胞を凍結融解した後、その培養液を継代する。更に1代継代し、同様の方法で培養し観察する。

3.5.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.6 可溶化抗原液の試験

3.6.1 無菌試験

<p>(削る)</p>	<p>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。</p>
<p>3.5.1.2 牛コロナウイルス</p> <p>3.5.1.2.1 試験材料</p> <p>3.5.1.2.1.1 試料</p> <p>100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体を4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。</p> <p>3.5.1.2.1.2 培養細胞</p> <p>HAL細胞を小試験管に1～2日間培養し、単層となったものを用いる。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その細胞を用いる。</p> <p>3.5.1.2.2 試験方法</p> <p>試料の0.1mLずつを10本の小試験管の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、試料を抜き取り、イーグルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛コロナウイルス増殖用培養液（付記7）を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。</p> <p>3.5.1.2.3 判定</p> <p>培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。 検体に活性ウイルスを認めてはならない。 (削る)</p>	<p>3.6.2 赤血球凝集試験</p> <p>3.3.2を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、14,120倍以上でなければならない。</p> <p>3.7 不活化可溶化抗原液の試験</p> <p>3.7.1 無菌試験</p> <p>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。</p> <p>3.7.2 不活化試験</p> <p>3.7.2.1 試験材料</p> <p>3.7.2.1.1 試料</p> <p>100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体2mLを4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。</p> <p>3.7.2.1.2 培養細胞</p> <p>HAL細胞を小試験管に1～2日間培養し、単層となったものを用いる。</p> <p>3.7.2.2 試験方法</p> <p>試料の0.1mLずつを10本の小試験管の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、試料を抜き取り、イーグルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛コロナウイルス増殖用培養液（付記8）を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。</p> <p>3.7.2.3 判定</p> <p>培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。 検体に活性ウイルスを認めてはならない。</p> <p>3.7.3 赤血球凝集試験</p> <p>3.3.2を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、14,120倍以上でなければならない。</p>
<p>3.6 精製線毛抗原液の試験</p> <p>3.6.1 抗原量の測定</p> <p>3.6.1.1 試験材料</p> <p>3.6.1.1.1 試料</p> <p>検体をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを試料とする。</p> <p>3.6.1.1.2 標準たん白溶液</p> <p>参照BSA液（付記8）を用いる。</p> <p>3.6.1.2 試験方法</p> <p>試料と各濃度の標準たん白溶液を100μLずつ別々の試験管に入れる。全ての試験管に反応液（付記9）を1.0mLずつ加え、60℃で30分間感作する。感作後、室温に戻し、波長562nmの吸光度を測定する。</p>	<p>3.8 精製線毛抗原液の試験</p> <p>3.8.1 抗原量の測定</p> <p>3.8.1.1 試験材料</p> <p>3.8.1.1.1 試料</p> <p>検体をリン酸緩衝食塩液で10倍に希釈し、試料とする。</p> <p>3.8.1.1.2 標準たん白溶液</p> <p>参照BSA液（付記9）を用いる。</p> <p>3.8.1.2 試験方法</p> <p>試料と各濃度の標準たん白溶液を100μLずつ別々の試験管に入れる。全ての試験管に反応液A（付記10）を1.0mLずつ入れ、混和後常温で20分間感作する。さらに、反応液B（付記11）を1.0mLずつ入れ、30分～2時間感作したも</p>

3.6.1.3 判定

最小自乗法でYを吸光度、Xをたん白量とする回帰直線 $Y=aX+b$ を参照BSA液を用いて求める。試料の吸光度Yを代入し、たん白量Xを求め、検体のたん白量としたとき、たん白量は $590\mu\text{g/mL}$ 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、そのたん白量とする。
(削る)

3.6.2 エンドトキシン含量測定試験

3.6.2.1 試験材料

検体をエンドトキシンフリー蒸留水で希釈し、試料とする。

3.6.2.2 試験方法

ライセート試薬(付記10)を加えた試験管に、エンドトキシン標準溶液(付記11)又は試料をそれぞれライセート試薬と等量加え、混和する。直ちに 37°C で60分間反応させ、ゲル化時間を測定する。

3.6.2.3 判定

検体のエンドトキシン濃度をエンドトキシン標準溶液のゲル化時間をプロットして得られた用量反応直線を用いて算出するとき、 $499,800\text{EU/mL}$ 以下でなければならない。

のについて、波長 550nm の吸光度を測定する。

3.8.1.3 判定

最小自乗法でYを吸光度、Xをたん白量とする回帰直線 $Y=aX+b$ を参照BSA液を用いて求める。試料の吸光度Yを代入し、たん白量Xを求め、検体のたん白量としたとき、たん白量は $590\mu\text{g/mL}$ 以上でなければならない。

3.8.2 精製度確認試験

3.8.2.1 試験材料

3.8.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で $100\mu\text{g/mL}$ になるように希釈し、試料とする。

3.8.2.1.2 試験方法

抗原捕捉用抗K99線毛抗原モノクローナル抗体(付記12)を炭酸緩衝液(付記13)で希釈し、酵素抗体法(以下この項において「ELISA」という。)用マイクロプレート(付記14)に $100\mu\text{L}$ ずつ加え、 $2\sim 5^\circ\text{C}$ で1夜静置しモノクローナル抗体を固相化する。このプレートを洗浄液(付記15)で3回洗浄し、抗体希釈液(付記16)を $250\mu\text{L}$ ずつ全穴に加え、 37°C で1時間静置させた後、同様に3回洗浄する。次に、試料及び参照抗原(付記17)をそれぞれ8穴に $100\mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で60分間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。その後、抗K99線毛抗原陽性血清(付記18)を全穴に $100\mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で60分間反応させ、3回洗浄した後、酵素標識抗体(付記19)を全穴に $100\mu\text{L}$ ずつ加えて、 37°C で60分間反応させ、3回洗浄する。次に、基質溶液(付記20)を $100\mu\text{L}$ ずつ加え、遮光して 30°C で30分間反応させた後、 1mol/L 硫酸溶液を $50\mu\text{L}$ ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 、副波長 630nm で測定し、その差をELISA値とする。

3.8.2.1.3 判定

参照抗原の平均ELISA値が $0.6\sim 1.0$ のとき、試料の平均ELISA値は、参照抗原のELISA値以上でなければならない。

3.8.3 エンドトキシン含量測定試験

3.8.3.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で希釈し、試料とする。

3.8.3.2 試験方法

$200\mu\text{L}$ のEt反応液(付記21)を加えた試験管に、エンドトキシンフリー蒸留水(ブランク)、エンドトキシン標準溶液(付記22)又は試料 $10\mu\text{L}$ をそれぞれ加え、混和する。直ちに 37°C で30分間反応させ、反応終了後氷水浴槽に移し、 0.8mol/L 酢酸 0.4mL を加え反応を停止させる。波長 405nm の吸光度を測定する。

3.8.3.3 判定

検体のエンドトキシン濃度を以下の計算式を用いて算出するとき、 $8,820\text{ng/mL}$ 以下でなければならない。

$C = Et \times \Delta E (Sa) \times df \Delta E (St)$ C: 検体のエンドトキシン濃度 (pg/mL)

(削る)

3.7 (略)

3.7.1 (略)

3.8 小分製品の試験

3.8.1～3.8.3 (略)

3.8.4 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、固有の値以下でなければならない。

3.8.5・3.8.6 (略)

3.8.7 力価試験

3.8.7.1 牛ロタウイルス

3.8.7.1.1 (略)

3.8.7.1.1.1～3.8.7.1.1.4 (略)

3.8.7.1.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを20匹の試験動物の腹腔内に3週間隔で2回注射し、2回目の注射後、14日目に得られた血清について中和試験を行う。

マウス血清は、任意に4匹分ずつプールし、5プールを用いる。

被検血清を非働化した後、10倍から2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中に約200TCID₅₀のウイルスを含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつを4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、接種した混合液を除き、イーグルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛ロタウイルス増殖用培養液を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.8.7.1.3 (略)

3.8.7.2 牛コロナウイルス

3.8.7.2.1 赤血球凝集抗原

牛コロナウイルス赤血球凝集抗原(付記12)を用いる。

3.8.7.2.2 試験方法

3.8.7.1.2の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清0.1mLに0.1w/v%BSA加リン酸緩衝食塩液0.4mL及び25w/v%カオリン加生理食塩液(付記13)0.5mLを加え、常温で20分間処理した後、1,700Gで10分間遠心し、その上清0.2mLを0.1w/v%BSA加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釈血清0.2mLに4単位の赤血球凝集抗原0.2mLを加え、常温で60

Et: エンドトキシン標準液濃度 (pg/mL)

ΔE (Sa): 試料の吸光度-ブランクの吸光度

ΔE (St): 標準溶液の吸光度-ブランクの吸光度

df: 検体の希釈倍数

3.9 不活化精製線毛抗原液の試験

3.9.1 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。

3.10 (略)

3.10.1 (略)

3.11 小分製品の試験

3.11.1～3.11.3 (略)

3.11.4 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、0.23vol%以下でなければならない。

3.11.5・3.11.6 (略)

3.11.7 力価試験

3.11.7.1 牛ロタウイルス

3.11.7.1.1 (略)

3.11.7.1.1.1～3.11.7.1.1.4 (略)

3.11.7.1.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを20匹の試験動物の腹腔内に3週間隔で2回注射し、2回目の注射後、14日目に得られた血清について中和試験を行う。

マウス血清は、任意に4匹分ずつプールし、5プールを用いる。

被検血清を非働化した後、10倍から2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中に約200TCID₅₀のウイルスを含む中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつを4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、接種した混合液を除き、イーグルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛ロタウイルス増殖用培養液を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.11.7.1.3 (略)

3.11.7.2 牛コロナウイルス

3.11.7.2.1 赤血球凝集抗原

牛コロナウイルス赤血球凝集抗原(付記23)を用いる。

3.11.7.2.2 試験方法

3.11.7.1.2の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清0.1mLに0.1w/v%BSA加リン酸緩衝食塩液0.4mL及び25w/v%カオリン加生理食塩液(付記24)0.5mLを加え、常温で20分間処理した後、1,700Gで10分間遠心し、その上清0.2mLを0.1w/v%BSA加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釈血清0.2mLに4単位の赤血球凝集抗原0.2mLを加え、常温で60

分間処理した後、1.0vol%マウス赤血球浮遊液0.2mLを加え、1～2時間静置し、観察する。

3.8.7.2.3 (略)

3.8.7.3 大腸菌

3.8.7.3.1 試験方法

3.8.7.1.2の血清について酵素抗体法(以下この項において「ELISA」という。)を行う。

大腸菌K99 ELISA抗体価測定用抗原(付記14)を炭酸緩衝液で希釈し、ELISA用マイクロプレートに100 μ Lずつ加え、2～5 $^{\circ}$ Cで1夜静置し抗原を固相化する。このプレートを洗浄液で3回洗浄し、抗体希釈液を1穴に250 μ Lずつ全穴に加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置させた後、同様に3回洗浄する。次に、抗体希釈液で100倍から12,800倍まで2倍階段希釈を行ったプール血清、参照陽性血清(付記15)及び参照陰性血清(付記16)をそれぞれ1列に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。その後、抗体希釈液で希釈した酵素標識抗体を全穴に100 μ Lずつ加えて37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させ、3回洗浄する。次に、基質溶液を100 μ Lずつ加え、遮光して30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、1 mol/L硫酸溶液を50 μ Lずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長492nm、副波長630nmで測定し、その差をELISA値とする。

3.8.7.3.2 (略)

4 (略)

(削る)

(削る)

分間処理した後、1.0vol%マウス赤血球浮遊液0.2mLを加え、1～2時間静置し、観察する。

3.11.7.2.3 (略)

3.11.7.3 大腸菌

3.11.7.3.1 試験方法

3.11.7.1.2の血清についてELISAを行う。

大腸菌K99 ELISA抗体価測定用抗原(付記25)を炭酸緩衝液で希釈し、ELISA用マイクロプレートに100 μ Lずつ加え、2～5 $^{\circ}$ Cで1夜静置し抗原を固相化する。このプレートを洗浄液で3回洗浄し、抗体希釈液を1穴に250 μ Lずつ全穴に加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置させた後、同様に3回洗浄する。次に、抗体希釈液で100倍から12,800倍まで2倍階段希釈を行ったプール血清、参照陽性血清(付記26)及び参照陰性血清(付記27)をそれぞれ1列に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。その後、抗体希釈液で希釈した酵素標識抗体を全穴に100 μ Lずつ加えて37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させ、3回洗浄する。次に、基質溶液を100 μ Lずつ加え、遮光して30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、1 mol/L硫酸溶液を50 μ Lずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長492nm、副波長630nmで測定し、その差をELISA値とする。

3.11.7.3.2 (略)

4 (略)

付記1 液体培地

1,000mL中

リン酸二水素カリウム	1.36 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	20.3 g
カゼイン製ペプトン	10.0 g
ブドウ糖	1.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
塩類溶液*	1.0 mL
水	残量

pHを7.2～7.4に調整し、118 $^{\circ}$ Cで20分間高圧蒸気滅菌する。

*1,000mL中

硫酸マグネシウム七水和物	10.0 g
塩化マンガン(II)四水和物	1.0 g
塩化鉄(III)六水和物	0.135g
塩化カルシウム二水和物	0.4 g
水	残量

付記2 寒天培地

1,000mL中

付記1 線毛抽出用緩衝液
 1,000mL中
 リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.384g
 リン酸水素二ナトリウム十二水和物 20.64 g
 塩化ナトリウム 42.24 g
 水 残量
 121℃で30分間高圧蒸気滅菌する。

付記2 飽和硫酸アンモニウム溶液
 1,000mL中
 硫酸アンモニウム 767.0g
 水 1,000mL
 溶解後、4℃で一晩以上放置し、その上清を使用する。

付記3 (略)

付記4 牛ロタ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 0.292g
 トリプシン 5,000~30,000BAEE*単位
 イーグルMEM 残量

リン酸二水素カリウム 1.36 g
 リン酸水素二ナトリウム十二水和物 20.3 g
 カゼイン製ペプトン 10.0 g
 酵母エキス 1.0 g
 塩化ナトリウム 5.0 g
 塩類溶液* 1.0 mL
 寒天 12.0 g
 水 残量

118℃で15分間高圧蒸気滅菌する。

*1,000mL中
 硫酸マグネシウム七水和物 10.0 g
 塩化マンガン(II)四水和物 1.0 g
 塩化鉄(III)六水和物 0.135g
 塩化カルシウム二水和物 0.4 g
 水 残量

付記3 線毛抽出用緩衝液
 1,000mL中
 リン酸二水素カリウム 0.2 g
 リン酸水素二ナトリウム十二水和物 58.44 g
 塩化ナトリウム 8.0 g
 塩化カリウム 0.2 g
 水 残量
 pHを7.0~7.4に調整し、121℃で15分間高圧蒸気滅菌する。

(新設)

付記4 (略)

付記5 牛ロタ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

トリプシン 1 mg
 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。

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。
*BAEE：N-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル

付記5 試験用培地 I
1,000mL中
カゼイン製ペプトン 17.0g
バクトソイトン 3.0g
ブドウ糖 2.5g
リン酸水素二カリウム 2.5g
塩化ナトリウム 5.0g
水 残量
pHを7.1～7.5に調整し、121℃で15分間高圧蒸気滅菌する。

付記6 試験用培地II
1,000mL中
カゼイン製ペプトン 15.0g
バクトソイトン 5.0g
塩化ナトリウム 5.0g
寒天 15.0g
水 残量
pHを7.1～7.5に調整し、121℃で20分間高圧蒸気滅菌する。

付記7 牛コロナ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 0.292g
L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物 5.0 g
ブドウ糖 1.0 g
酵母エキス 0.5 g
牛胎子血清 50 mL
イーグルMEM 残量
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8 参照BSA液
BSAを水で2 mg/mLとなるように作製した後、下表に準じて調製したものを各濃度の参照BSA液とする。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記6 試験用培地 I
1,000mL中
カゼイン製ペプトン 17.0g
バクトソイトン 3.0g
ブドウ糖 2.5g
リン酸水素二カリウム 2.0g
塩化ナトリウム 5.0g
水 残量
pHを7.1～7.5に調整し、121℃で15分間高圧蒸気滅菌する。

付記7 試験用培地II
1,000mL中
カゼイン製ペプトン 15.0g
バクトソイトン 5.0g
塩化ナトリウム 5.0g
寒天 12.0g
水 残量
pHを7.1～7.5に調整し、121℃で20分間高圧蒸気滅菌する。

付記8 牛コロナ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

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7.2～7.6に調整する。
牛胎子血清は、牛コロナウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記9 参照BSA液
BSAを水で1 mg/mLとなるように作製した後、下表に準じて調製したものを各濃度の参照BSA液とする。

BSA濃度 (μ g/mL)	量比	
	<u>2</u> mg/mL BSA	PBS
0	0	<u>100.0</u>
50	<u>2.5</u>	<u>97.5</u>
100	<u>5.0</u>	<u>95.0</u>
<u>150</u>	<u>7.5</u>	<u>92.5</u>
<u>200</u>	<u>10.0</u>	<u>90.0</u>
400	<u>20.0</u>	<u>80.0</u>

付記9 反応液
ブラッドフォード法を原理とする適当な市販品を用いる。

(削る)

(削る)

BSA濃度	量比	
	<u>1</u> mg/mL BSA	PBS
0	0	<u>1,000</u>
<u>25</u>	<u>25</u>	<u>975</u>
50	<u>50</u>	<u>950</u>
100	<u>100</u>	<u>900</u>
200	<u>200</u>	<u>800</u>
400	<u>400</u>	<u>600</u>

付記10 反応液A
a 1,000mL中
炭酸ナトリウム 20.0 g
水酸化ナトリウム 4.0 g
水 残量
b 100mL中
硫酸銅六水和物 0.5 g
酒石酸カリウム 1.0 g
水 残量
使用直前に、a : b = 50 : 1の割合で混合したものを反応液Aとする。

付記11 反応液B
フェノール試薬 2 mol/Lを水で2倍に希釈する。

付記12 抗原捕捉用抗K99線毛抗原モノクローナル抗体
1 性状
K99抗原を発現している大腸菌を特異的に凝集する。K99線毛抗原を発現している大腸菌から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した線毛を抗原として、ウェスタンブロッティング法を行うと、約17kDaの位置に特異的なバンドを認める。
2 作製方法
K99抗原を保有する大腸菌T-2株 (10⁹個/mL以上を含有) をマウスに3週間隔で2回腹腔内に注射し、脾細胞を得る。その細胞とミエロマ細胞との融合細胞のうち、抗K99線毛抗原モノクローナル抗体を産生している細胞を、K99精製線毛を抗原としたELISA法により選択後、クローニングを行う。抗体産生細胞の培養液を抗原捕捉用抗K99線毛

	<p>抗原モノクローナル抗体とする。</p> <p><u>3 規格</u></p> <p>参照抗原、抗K99線毛抗原陽性血清を用いて3.8.2に準じた方法でELISAを実施し、吸光度値が0.6~1.0になるように炭酸緩衝液で希釈して使用する。</p>												
(削る)	<p>付記13 <u>炭酸緩衝液</u></p> <p><u>1,000mL中</u></p> <table> <tr> <td>炭酸ナトリウム</td> <td>1.59 g</td> </tr> <tr> <td>炭酸水素ナトリウム</td> <td>2.93 g</td> </tr> <tr> <td>水</td> <td>残 量</td> </tr> </table> <p>pHを9.6に調整する。</p>	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						
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												
(削る)	<p>付記14 <u>ELISA用マイクロプレート</u></p> <p><u>U字型96穴プレートを用いる。</u></p>												
(削る)	<p>付記15 <u>洗浄液</u></p> <p><u>1,000mL中</u></p> <table> <tr> <td>塩化ナトリウム</td> <td>8.00 g</td> </tr> <tr> <td>塩化カリウム</td> <td>0.20 g</td> </tr> <tr> <td>リン酸二水素カリウム</td> <td>0.20 g</td> </tr> <tr> <td>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</td> <td>2.90 g</td> </tr> <tr> <td>ポリソルベート20</td> <td>0.50 mL</td> </tr> <tr> <td>水</td> <td>残 量</td> </tr> </table>	塩化ナトリウム	8.00 g	塩化カリウム	0.20 g	リン酸二水素カリウム	0.20 g	リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.90 g	ポリソルベート20	0.50 mL	水	残 量
塩化ナトリウム	8.00 g												
塩化カリウム	0.20 g												
リン酸二水素カリウム	0.20 g												
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.90 g												
ポリソルベート20	0.50 mL												
水	残 量												
(削る)	<p>付記16 <u>抗体希釈液</u></p> <p><u>BSA 2 gを洗浄液100mLで使用直前に溶解したもの。</u></p>												
(削る)	<p>付記17 <u>参照抗原</u></p> <p>液体培地で増殖させた大腸菌T-2株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製したK99線毛抗原で、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した場合、約17kDaの単一なバンドを認める。リン酸緩衝食塩液で1 mg/mLになるように濃度を調整した抗原液を注射材料とし、3.11.7.3に準じた方法でマウスへの注射及び大腸菌ELISA抗体価の測定を行うと、ELISA抗体価は800倍以上を示す。</p> <p>抗原捕捉用抗K99線毛抗原モノクローナル抗体及び抗K99線毛抗原陽性血清を用いて3.8.2に準じた方法でELISAを実施し、ELISA値が0.6~1.0になるように濃度を調整して使用する。</p>												
	<p>付記18 <u>抗K99線毛抗原陽性血清</u></p>												

(削る)

液体培地で増殖させた大腸菌T-2株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製したK99線毛抗原を1 mg/mLになるようにリン酸緩衝食塩液で濃度を調整し、その抗原とリン酸アルミニウムゲルを85 : 15の割合で混合する。その0.5mLを体重約350gのモルモットの皮下に3週間隔で2回注射し、その2週間後に得られた血清である。

抗原捕捉用抗K99線毛抗原モノクローナル抗体及び参照抗原を用いて3.8.2に準じた方法でELISAを実施し、ELISA値が0.6~1.0になるように濃度を調整して使用する。

(削る)

付記19 酵素標識抗体

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗モルモットIgGを用い、抗原捕捉用抗K99線毛抗原モノクローナル抗体及び参照抗原を用いて3.8.2に準じた方法でELISAを実施し、抗K99線毛抗原陽性血清の吸光度値が0.6~1.0になるように濃度を調整して使用する。

(削る)

付記20 基質溶液

オルトフェニレンジアミン二塩酸塩13mgをリン酸クエン酸緩衝液* 32.5mLに溶解し、遮光する。使用直前に過酸化水素水を13 μL添加する。

* 1,000mL中

無水クエン酸 4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95 g

水 残量

pHを5.0に調整する。

付記10 ライセート試薬

カプトガニ血球抽出物の凍結乾燥品 (β-1,3-グルカン誘導体を含む。) であり、エンドトキシンフリー蒸留水を加えて使用する。

付記21 Et反応液

カプトガニライセートと発色合成基質をバイアル瓶に分注し、乾燥させたもので、エンドトキシンフリー蒸留水100 μL及び0.2mol/LTris-HCl * 100 μLを加えて使用する。

* 1,000mL中

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 10.60 g

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 17.76 g

水 残量

調製後のpHは、8.0である。

付記11 エンドトキシン標準溶液

日本薬局方エンドトキシン標準品20,000EU/mLを10,000EU/mLに調整したものを検体と同様にエンドトキシンフリー蒸留水で希釈し、用いる。

付記22 エンドトキシン標準溶液

E.coli O111 : B4由来のエンドトキシンで、そのエンドトキシン濃度は、100~300pg/mLの範囲である。

付記12 (略)

付記23 (略)

付記13 25w/v%カオリン加生理食塩液
1,000mL中
カオリン 250 g
塩化ナトリウム 8.75g
水 残量
pHを7.2~7.4に調整する。
アジ化ナトリウムを適量加える。

付記14 大腸菌K99 ELISA抗体価測定用抗原
液体培地で増殖させた大腸菌T-2株から熱抽出、硫酸アンモニウム塩析により精製し、ホルマリンで不活化したK99線毛抗原で、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析するとき、約17kDaの主要なバンドを認めるもの

付記15 参照陽性血清
液体培地で増殖させた大腸菌T-2株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製したK99線毛抗原を1/50量になるようにリン酸緩衝食塩液で調整し、その抗原とリン酸アルミニウムゲルを85:15の割合で混合する。その0.5mLを約4週齢のマウスの腹腔内に3週間隔で2回注射し、その2週間後に得られた血清である。
大腸菌K99ELISA抗体価測定用抗原を用いて3.8.7.3に準じた方法でELISAを実施するとき、ELISA抗体価は、800倍から3,200倍までを示す。

付記16 参照陰性血清
非免疫マウスの血清で、大腸菌K99ELISA抗体価測定用抗原を用いて3.8.7.3に準じた方法でELISAを実施するとき、ELISA抗体価は、100倍未満を示す。

付記24 25w/v%カオリン加生理食塩液
1,000mL中
カオリン 250 g
塩化ナトリウム 8.75g
水 残量
1 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpHを7.2~7.4に調整する。

付記25 大腸菌K99 ELISA抗体価測定用抗原
液体培地で増殖させた大腸菌T-2株から熱抽出、硫酸アンモニウム塩析及び陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製したK99線毛抗原で、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析するとき、約17kDaの単一なバンドを認めるもの。

付記26 参照陽性血清
液体培地で増殖させた大腸菌T-2株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製したK99線毛抗原を118 µg/mLになるようにリン酸緩衝食塩液で調整し、その抗原とリン酸アルミニウムゲルを85:15の割合で混合する。その0.5mLを約4週齢のマウスの腹腔内に3週間隔で2回注射し、その2週間後に得られた血清である。
大腸菌K99ELISA抗体価測定用抗原を用いて3.11.7.3に準じた方法でELISAを実施するとき、ELISA抗体価は、800倍から3,200倍までを示す。

付記27 参照陰性血清
非免疫マウスの血清で、大腸菌K99ELISA抗体価測定用抗原を用いて3.11.7.3に準じた方法でELISAを実施するとき、ELISA抗体価は、100倍未満を示す。