

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）

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
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>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（シード）</b></p> <p>1 （略）</p> <p>2 製法</p> <p>2.1 製造用株</p> <p>2.1.1、2.1.2 （略）</p> <p>2.1.3 作製、保存及び小分製品までの最高継代数  <u>マスターシード菌は、適当と認められた液状培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。</u>            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-20℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u>            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。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その最高継代数とする。</u></p> <p>2.1.4 ワーキングシード菌</p> <p>2.1.4.1 増殖、継代及び保存            ワーキングシード菌は、適当と認められた液状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-20℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u>            ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。</p> <p>2.1.5 プロダクションシード菌</p> <p>2.1.5.1 増殖及び保存            プロダクションシード菌は、適当と認められた液状培地で増殖させる。            プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-20℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。</u>            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。</p> <p>2.2 （略）</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>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（シード）</b></p> <p>1 （略）</p> <p>2 製法</p> <p>2.1 製造用株</p> <p>2.1.1、2.1.2 （略）</p> <p>2.1.3 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状培地で増殖させ、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、凍結して-20℃以下で保存する。</p> <p>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。</p> <p>2.1.4 ワーキングシード菌</p> <p>2.1.4.1 増殖、継代及び保存            ワーキングシード菌は、適当と認められた液状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-20℃以下で保存する。</p> <p>ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。</p> <p>2.1.5 プロダクションシード菌</p> <p>2.1.5.1 増殖及び保存            プロダクションシード菌は、適当と認められた液状培地で増殖させる。            プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-20℃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、3.1.3の試験を行う。</p> <p>2.2 （略）</p>

## 2.3 原液

### 2.3.1 (略)

### 2.3.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加えて攪拌し、不活化菌液とする。  
不活化菌液について、必要に応じて3.3の試験を行う。

不活化菌液の不活化剤を適当と認められた方法で中和したものを原液とする。  
この場合、必要に応じて濃縮し、適当と認められた保存剤又は消泡剤を添加してもよい。

原液について、3.4の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液に適量のアジュバントを加えたものを最終バルクとする。  
この場合、必要に応じて濃度調整し、適当と認められた保存剤等を添加してもよい。

### 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、3.5の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 (略)

### 3.2 培養菌液の試験

3.2.1、3.2.2、3.2.3及び3.2.4、又は3.2.3及び3.2.4の試験を行う。

#### 3.2.1 暗視野顕微鏡下観察試験

##### 3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.2.1.2 試験方法

検体0.01mL以上をスライドグラスにとり、暗視野顕微鏡下で、約1,000倍に拡大して5視野以上を鏡検する。

##### 3.2.1.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ様菌(球状又は球桿状から短桿状の菌)以外の菌を検出してはならない。

#### 3.2.2 pH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7.0以下でなければならない。

#### 3.2.3 染色試験

##### 3.2.3.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.2.3.2 試験方法

検体0.01mL以上をスライドグラスにとり、グラム染色し、約1,000倍に拡大して5視野以上を鏡検する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

##### 3.2.3.3 判定 (略)

## 2.3 原液

### 2.3.1 (略)

### 2.3.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後に、適当と認められた方法で不活化剤を中和したものを原液とする。  
この場合、必要に応じて濃縮し、適当と認められた保存剤又は消泡剤を添加してもよい。

原液について、3.3の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整したものに適量のアジュバントを加えたものを最終バルクとする。  
この場合、必要に応じて濃度調整し、適当と認められた保存剤等を添加してもよい。

### 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 (略)

### 3.2 培養菌液の試験

#### 3.2.1 染色試験

##### 3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.2.1.2 試験方法

検体0.01mL以上をスライドグラス上に塗抹し、乾燥・固定した後にグラム染色して標本を作成する。標本は約1,000倍に拡大して1視野以上鏡検する。

##### 3.2.1.3 判定 (略)

### 3.2.4 抗原定量試験

3.2.4.1又は3.2.4.2の試験を行う。

#### 3.2.4.1 DNA含有量試験

##### 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1.5mLを1本の試験管にとり、20,000G以上で10分間遠心分離した後、上清を除いた沈渣を適当と認められた液に懸濁する。適当と認められた分析用溶液で40倍に希釈した後、既知のDNA濃度の標準液で校正した分光蛍光光度計を用いてDNA量を測定する。

##### 3.2.4.1.3 判定

検体のDNA含有量は5,000ng/mL以上でなければならない。

#### 3.2.4.2 抗原定量試験 1

##### 3.2.4.2.1 試験材料

###### 3.2.4.2.1.1 試料 (略)

###### 3.2.4.2.1.2 試験方法

試料0.01mLに適量の0.04%Hoechst色素又はこれと同等のHoechst色素溶液を加えて混合し、蛍光量計で試料中の総DNA量 (ng) を測定した後、検体 1 mL 当たりの抗原量をDNA量 (ng/mL) 又は*Mycoplasma hyopneumoniae* DNA Cell equivalents (MHDCE) (付記 2) として以下の計算式により算出する。

検体 1 mL 中のMHDCE=DNA量 (ng/mL)  $\times 1.25 \times 10^6$

###### 3.2.4.2.1.3 判定 (略)

#### 3.3 不活化菌液の試験

##### 3.3.1 不活化試験 1

###### 3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1 試料

検体に適当と認められた中和剤を加え、不活化剤を中和したものを試料とする。

###### 3.3.1.1.2 培地

適当と認められた液状培地を用いる。

###### 3.3.1.2 試験方法

培地10mLを分注した試験管 5 本に試料 1 mL ずつを接種する。また、不活化剤添加前の同じ培養菌液を陽性対照試料とし、培地10mLを分注した試験管 4 本に陽性対照試料 1 mL ずつを接種し、その中の 2 本の試験管に試料 1 mL を加える。合計 9 本の試験管及び試料未接種の培地のみの試験管 2 本 (陰性対照) と共に35~39°Cで7日間培養する。

培養 7 日目に、試料を接種した試験管 5 本及び陰性対照 2 本につき、各 1 mL をそれぞれ新しい培地に接種し、35~39°Cで更に 7 日間培養した後、培地の色調を観察する。

培養 7 日目に陽性対照試料を接種した試験管 4 本の培地の色調に変化が認

### 3.2.2 抗原定量試験

##### 3.2.2.1 試験材料

###### 3.2.2.1.1 試料 (略)

###### 3.2.2.2 試験方法

試料0.01mLに適量の0.04%Hoechst色素又はこれと同等のHoechst色素溶液を加えて混合し、蛍光量計で試料中の総DNA量 (ng) を測定した後、検体 1 mL 当たりの抗原量をDNA量 (ng/mL) 又は*Mycoplasma hyopneumoniae* DNA Cell equivalents (MHDCE) (付記 2) として以下の計算式により算出する。

検体 1 mL 中のMHDCE=DNA量 (ng/mL)  $\times 1.25 \times 10^6$

###### 3.2.2.3 判定 (略)

められなかった場合、陽性対照試料を接種した培地 1 mLを新しい培地に接種する。これを35～39℃で更に7日間培養し、培地の色調を観察する。

### 3.3.1.3 判定

試料を接種した試験管及び陰性対照の試験管には、色調の変化を認めてはならない。また、試料と陽性対照試料を接種した試験管及び陽性対照試料のみを接種した試験管には、赤色から黄色への色調変化を認めなければならない。

### 3.4 原液の試験

#### 3.4.1 無菌試験 (略)

#### 3.4.2 抗原定量試験

3.4.2.1又は3.4.2.2の試験を行う。

##### 3.4.2.1 抗原定量試験 1

3.4.2.2を準用して試験するとき、検体 1 mL中の抗原量は、所定の値でなければならない。

##### 3.4.2.2 抗原定量試験 2

###### 3.4.2.2.1 試験材料

###### 3.4.2.2.1.1 試料

検体及び参照ワクチン 1 (付記 3) を凍結融解したものを試料とする。

###### 3.4.2.2.2 試験方法

捕捉抗体吸着プレート (付記 4) にブロッキング液 (付記 5) を100  $\mu$  Lずつ加え、試料を各々 3 穴に100  $\mu$  Lずつ加えてプレート上で2倍階段希釈する。また、陽性対照抗原 (付記 6) 及び陰性対照抗原 (付記 7) をいずれも凍結融解した後、プレートの4穴ずつに100  $\mu$  Lずつ加え、プレート上で2倍希釈する。35～39℃で1時間反応させた後、洗浄液 (付記 8) で3回洗浄する。マウス抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエモノクローナル抗体 (付記 9) をブランクを除く各穴に100  $\mu$  Lずつ、ブランクにはブロッキング液を100  $\mu$  Lずつ加え、35～39℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。標識抗体 1 (付記10) をブランクを除く各穴に100  $\mu$  Lずつ、ブランクには標識抗体 1 希釈液 (付記11) を100  $\mu$  Lずつ加え、35～39℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。基質液 1 (付記12) を各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、10分間反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100  $\mu$  Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

###### 3.4.2.2.3 判定 (略)

#### 3.4.3 不活化試験

3.3.1を準用して試験するか、又は3.4.3.1若しくは3.4.3.2の試験を行う。

ただし、3.3.1を準用して試験するときは、中和は行わず、検体を試料として用いる。

##### 3.4.3.1 不活化試験 2

###### 3.4.3.1.1 試験材料

###### 3.4.3.1.1.1 試料 (略)

### 3.3 原液の試験

#### 3.3.1 無菌試験 (略)

#### 3.3.2 抗原定量試験

3.3.2.1又は3.3.2.2の試験を行う。

##### 3.3.2.1 抗原定量試験 1

3.2.2を準用して試験するとき、検体 1 mL中の抗原量は、所定の値でなければならない。

##### 3.3.2.2 抗原定量試験 2

###### 3.3.2.2.1 試験材料

###### 3.3.2.2.1.1 試料

原液及び参照ワクチン 1 (付記 3) を凍結融解したものを試料とする。

###### 3.3.2.2.2 試験方法

捕捉抗体吸着プレート (付記 4) にブロッキング液 (付記 5) を100  $\mu$  Lずつ加え、試料を各々 3 穴に100  $\mu$  Lずつ加えてプレート上で2倍階段希釈する。また、陽性対照抗原 (付記 6) 及び陰性対照抗原 (付記 7) をいずれも凍結融解した後、プレートの4穴ずつに100  $\mu$  Lずつ加え、プレート上で2倍希釈する。35～39℃で1時間反応させた後、洗浄液 (付記 8) で3回洗浄する。マウス抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエモノクローナル抗体 (付記 9) をブランクを除く各穴に100  $\mu$  Lずつ、ブランクにはブロッキング液を100  $\mu$  Lずつ加え、35～39℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。標識抗体 1 (付記10) をブランクを除く各穴に100  $\mu$  Lずつ、ブランクにはブロッキング液を100  $\mu$  Lずつ加え、35～39℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。基質液 1 (付記11) を各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、10分間反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100  $\mu$  Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

###### 3.3.2.2.3 判定 (略)

#### 3.3.3 不活化試験

3.3.3.1又は3.3.3.2の試験を行う。

##### 3.3.3.1 不活化試験 1

###### 3.3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.3.1.1.1 試料 (略)

3.4.3.1.1.2 培地 (略)

3.4.3.1.2 試験方法 (略)

3.4.3.1.3 判定 (略)

3.4.3.2 不活化試験 3

3.4.3.2.1 試験材料

3.4.3.2.1.1 試料 (略)

3.4.3.2.1.2 培地 (略)

3.4.3.2.2 試験方法 (略)

3.4.3.2.3 判定 (略)

3.5 小分製品の試験

3.5.1 特性試験 (略)

3.5.2 pH測定試験 (略)

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

3.5.4 チメロサル定量試験 (略)

3.5.5 カルボキシビニルポリマー定量試験

沈降法又はメチレンブルー法により試験をするとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

3.5.6 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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が0.125vol%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には、その試験法によるものとする。

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、注射量は、0.3mLとする。また、3.5.8の試験を行うとき又は農林水産大臣が特に認めた場合には、本試験は実施しなくてもよい。

3.5.8 安全試験

農林水産大臣が特に認めた場合には、本試験は実施しなくてもよい。

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料 (略)

3.5.8.1.2 試験動物 (略)

3.5.8.2 試験方法 (略)

3.5.8.3 判定 (略)

3.5.9 抗原定量試験

必要に応じて、3.4.2.2を準用して試験するとき、試験品の抗原RPは1.0~4.6でなければならない。

3.5.10 力価試験

3.3.3.1.1.2 培地 (略)

3.3.3.1.2 試験方法 (略)

3.3.3.1.3 判定 (略)

3.3.3.2 不活化試験 2

3.3.3.2.1 試験材料

3.3.3.2.1.1 試料 (略)

3.3.3.2.1.2 培地 (略)

3.3.3.2.2 試験方法 (略)

3.4.3.2.3 判定 (略)

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験 (略)

3.4.2 pH測定試験 (略)

3.4.3 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。

3.4.4 チメロサル定量試験 (略)

3.4.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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が0.125vol%以下でなければならない。

3.4.6 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、注射量は、0.3mLとする。また、3.4.7の試験を行うときは、本試験は実施しなくてもよい。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料 (略)

3.4.7.1.2 試験動物 (略)

3.4.7.2 試験方法 (略)

3.4.7.3 判定 (略)

3.4.8 力価試験

3.5.10.1又は3.5.10.2の試験を行う。

3.5.10.1 力価試験 1

3.5.10.1.1 試験材料

3.5.10.1.1.1 注射材料

試験品及び参照ワクチン 2 (付記13) を注射材料とする。

3.5.10.1.1.2 試験動物 (略)

3.5.10.1.1.3 酵素抗体反応 (以下この項において「ELISA」という。) 用抗原固相化抗原 1 (付記14) を用いる。

3.5.10.1.2 試験方法

試験動物の40匹を試験群、10匹を対照群とする。

試験群を1群20匹の2群に分け、1群 (以下この項において「試験品群」という。) には試験品を、他の1群 (以下この項において「参照ワクチン群」という。) には参照ワクチン 2 をそれぞれ0.2mLずつ皮下に注射する。注射後2週目に、試験品群、参照ワクチン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。

試験品群、参照ワクチン群及び対照群の血清を希釈液 (付記15) で40倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 (付記16) の2穴ずつに100 $\mu$ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。また、指示陽性血清 (付記17) を希釈液で40倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 の4穴に100 $\mu$ Lずつ加える。1時間反応させた後、希釈液で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 2 (付記18) を100 $\mu$ Lずつ加え、30分間反応させた後、希釈液で4回洗浄する。基質液 2 (付記19) を各穴に100 $\mu$ Lずつ加えて反応させ、主波長405nm、副波長450nmで吸光度を測定する。各被検血清の吸光度から血清対照の平均吸光度を引いた値を各被検血清の吸光度値として平均吸光度値を算出するとき、指示陽性血清の平均吸光度値が0.85~1.05となった時点を反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定し、試験品群、参照ワクチン群及び対照群の平均吸光度値を算出する。

3.5.10.1.3 判定 (略)

3.5.10.2 力価試験 2

3.5.10.2.1 試験材料

3.5.10.2.1.1 注射材料

試験品をワクチン希釈液 (付記20) で90倍に希釈した後、更に生理食塩液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.10.2.1.2 試験動物 (略)

3.5.10.2.1.3 ELISA用抗原

固相化抗原 2 (付記21) を用いる。

3.5.10.2.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.1mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後3週目に、試験品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。

3.4.8.1又は3.4.8.2の試験を行う。

3.4.8.1 力価試験 1

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 注射材料

試験品及び参照ワクチン 2 (付記12) を注射材料とする。

3.4.8.1.1.2 試験動物 (略)

3.4.8.1.1.3 酵素抗体反応 (以下この項において「ELISA」という。) 用抗原固相化抗原 1 (付記13) を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

試験動物の40匹を試験群、10匹を対照群とする。

試験群を1群20匹の2群に分け、1群 (以下この項において「試験品群」という。) には試験品を、他の1群 (以下この項において「参照ワクチン群」という。) には参照ワクチン 2 をそれぞれ0.2mLずつ皮下に注射する。注射後2週目に、試験品群、参照ワクチン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。

試験品群、参照ワクチン群及び対照群の血清を希釈液 (付記14) で40倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 (付記15) の2穴ずつに100 $\mu$ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。また、指示陽性血清 (付記16) を希釈液で40倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 の4穴に100 $\mu$ Lずつ加える。1時間反応させた後、希釈液で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 2 (付記17) を100 $\mu$ Lずつ加え、30分間反応させた後、希釈液で4回洗浄する。基質液 2 (付記18) を各穴に100 $\mu$ Lずつ加えて反応させ、主波長405nm、副波長450nmで吸光度を測定する。各被検血清の吸光度から血清対照の平均吸光度を引いた値を各被検血清の吸光度値として平均吸光度値を算出するとき、指示陽性血清の平均吸光度値が0.85~1.05となった時点を反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定し、試験品群、参照ワクチン群及び対照群の平均吸光度値を算出する。

3.4.8.1.3 判定 (略)

3.4.8.2 力価試験 2

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 注射材料

試験品をワクチン注射液 (付記19) で90倍に希釈した後、更に生理食塩液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.8.2.1.2 試験動物 (略)

3.4.8.2.1.3 ELISA用抗原

固相化抗原 2 (付記20) を用いる。

3.4.8.2.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.1mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後3週目に、試験品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。

試験品群と対照群の血清及び参照陽性血清（付記22）をブロッキング液で10倍に希釈したものを、更に同液で2倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート2（付記23）の穴に100 $\mu$ Lずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体3（付記24）を100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液1を各穴に100 $\mu$ Lずつ加えて10分間反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

#### 3.5.10.2.3 判定（略）

4（略）

付記1～付記3（略）

付記4 捕捉抗体吸着プレート

抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兎抗体（付記25）をトリス緩衝食塩液（付記26）で適当と考えられる濃度に希釈し、96穴ELISAプレートに100 $\mu$ Lずつ加える。なお、プレートの両端各1列は、ブランクとし、トリス緩衝食塩液を100 $\mu$ Lずつ加える。35～39 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、2～8 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記5（略）

付記6 陽性対照抗原

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加し、3.4.2.2.2の試験における吸光度値が適当な値となるように生理食塩液で濃度を調整したもの。

付記7～付記9（略）

付記10 標識抗体1

ベルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を標識抗体1希釈液（付記11）で至適濃度に希釈したもの。

付記11 標識抗体1希釈液

1,000mL中	2.42 g
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	8.77 g
塩化ナトリウム	50 g
スキムミルク	0.5 mL
ポリソルベート20	50 mL

試験品群と対照群の血清及び参照陽性血清（付記21）をブロッキング液で10倍に希釈したものを、更に同液で2倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート2（付記22）の穴に100 $\mu$ Lずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体3（付記23）を100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液1を各穴に100 $\mu$ Lずつ加えて10分間反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

#### 3.4.8.2.3 判定（略）

4（略）

付記1～付記3（略）

付記4 捕捉抗体吸着プレート

抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兎抗体（付記24）をトリス緩衝食塩液（付記25）で適当と考えられる濃度に希釈し、96穴ELISAプレートに100 $\mu$ Lずつ加える。なお、プレートの両端各1列は、ブランクとし、トリス緩衝食塩液を100 $\mu$ Lずつ加える。35～39 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、2～8 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記5（略）

付記6 陽性対照抗原

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加し、3.3.2.2.2のELISAにおける吸光度値が適当な値となるように生理食塩液で濃度を調整したもの。

付記7～付記9（略）

付記10 標識抗体1

ベルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を標識抗体1希釈液（付記26）で至適濃度に希釈したもの。

（新設）

豚血清  
水

残 量

pHを7.2~7.4に調整する。必要に応じ、200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

- 付記12 基質液 1 (略)  
付記13 参照ワクチン 2 (略)  
付記14 固相化抗原 1 (略)  
付記15 希釈液 (略)  
付記16 抗原吸着プレート 1 (略)  
付記17 指示陽性血清 (略)  
付記18 標識抗体 2 (略)  
付記19 基質液 2 (略)  
付記20 ワクチン希釈液 (略)  
付記21 固相化抗原 2 (略)  
付記22 参照陽性血清 (略)  
付記23 抗原吸着プレート 2 (略)  
付記24 標識抗体 3 (略)  
付記25 抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兔抗体 (略)  
付記26 トリス緩衝食塩液 (略)

(削る)

- 付記11 基質液 1 (略)  
付記12 参照ワクチン 2 (略)  
付記13 固相化抗原 1 (略)  
付記14 希釈液 (略)  
付記15 抗原吸着プレート 1 (略)  
付記16 指示陽性血清 (略)  
付記17 標識抗体 2 (略)  
付記18 基質液 2 (略)  
付記19 ワクチン注射液 (略)  
付記20 固相化抗原 2 (略)  
付記21 参照陽性血清 (略)  
付記22 抗原吸着プレート 2 (略)  
付記23 標識抗体 3 (略)  
付記24 抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兔抗体 (略)  
付記25 トリス緩衝食塩液 (略)

- 付記26 標識抗体 1 希釈液  
1,000mL中  
トリスヒドロキシメチルアミノメタン  
塩化ナトリウム  
スキムミルク  
ポリソルベート20  
豚血清  
水

2.42 g  
8.77 g  
50 g  
0.5 mL  
50 mL  
残 量



(略)

pHを7.2～7.4に調整する。必要に応じ、200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

(略)