

# ツベルクリン

平成 18 年 11 月 10 日 一部改正（農水省告示 1532）

## 1 定義

牛型結核菌及び人型結核菌の培養ろ液を濃縮して調製した皮内反応用抗原である。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

牛型結核菌牛 10 株及び人型結核菌青山 B 株

#### 2.1.2 性状

牛 10 株は、グリセリンにより発育促進性を示す。

#### 2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、小川培地又は適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 2 代以内でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結して - 80 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 培地

製造用培地には小川培地、ソートン培地（付記 1）、ソートンばれいしょ培地（付記 2）及び変法ソートン培地（付記 3）、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 培養菌液

種菌を小川培地に移植し、37 で約 4 週間培養する。発育した菌苔をソートンばれいしょ培地に移植し、37 で約 4 週間培養し、培地表面に発育した菌膜をソートン培地液面に浮かぶように移植し、3 ~ 4 週間培養して薄い菌膜を形成させる。菌膜を変法ソートン培地液面に浮かぶように移植し、37 で約 8 週間培養し、表面に厚い菌膜を形成させ、培養菌液とする。

#### 2.3.2 殺菌

培養菌液を振とうして菌膜を培地中に沈め、100 で 3 時間加温殺菌し、一夜静置する。

#### 2.3.3 除菌、濃縮及び加薬

殺菌後、ろ過及び遠心により透明な培養ろ液を集め、加熱又は限外ろ過その他適当と認められた方法により、培養前の培地量の 18vol% 以下となるように濃縮する。これを 100 で 15 分間加熱し、冷却する。5 w/v% フェノール液と精製水とを加えて培養前の培地量の 20 % となるように調整する。この場合、フェノールの含有量は、0.5w/v% となるようにしなければならない。

フェノール液の添加前に検体を採り、これについて 3.1 の試験を行う。

#### 2.3.4 熟成及び力価の測定

フェノール添加後、8 週間以上約 5 で貯蔵し、熟成させた後、メンブランフィルターでろ過滅菌する。両株由来のろ液を混合し、混合ろ液とする。

混合ろ液について、3.2 の試験を行う。

#### 2.3.5 力価の調整

希釈用液で動物用標準ツベルクリンに対する相対力価が 0.85 ~ 1.18 の範囲となるよう調整し、原液とする。

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、最終バルクとする。

## 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 濃縮ろ液の試験

#### 3.1.1 結核菌否定試験

##### 3.1.1.1 試験方法

検体 0.1mL ずつを小川培地 5 本以上に接種し、37℃ で 6 週間培養する。

##### 3.1.1.2 判定

結核菌の発育を認めてはならない。

### 3.2 混合ろ液の試験

#### 3.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験を行うとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2 相対力価の算出

混合ろ液及び動物用標準ツベルクリン（付記 4）を 0.5w/v% フェノール加リン酸緩衝食塩液（以下「希釈用液」という。）で 100,000/mL 国際単位に調整したものをそれぞれ 500、1,000 及び 2,000 倍に希釈し、その 0.1mL ずつを 6 匹以上の感作モルモット（付記 5）の背部 6 か所の皮内にそれぞれ注射し、24 時間後の反応の大きさを計測する。

それぞれの反応値から平行線検定法（付記 6）により、混合ろ液の動物用標準ツベルクリンに対する相対力価を算出する。

### 3.3 原液の試験

#### 3.3.1 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。

#### 3.3.2 力価試験

3.2.2 の方法に準じて、検体の動物用標準ツベルクリンに対する相対力価を算定するとき、0.85 ~ 1.18 でなければならない。

### 3.4 小分製品の試験

#### 3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する液体でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

#### 3.4.2 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。

#### 3.4.3 フェノール定量試験

一般試験法のフェノール定量法を準用して試験するとき、フェノールの含有量は、0.5w/v% でなければならない。

#### 3.4.4 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法 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、使用するモルモットは 5 匹とし、試験品の注射量は 1 mL とする。

#### 3.4.5 力価試験

3.2.2 の方法に準じて、試験品の動物用標準ツベルクリンに対する相対力価を算定するとき、0.80 ~ 1.25 でなければならない。

## 4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

## 5 その他

## 5.1 添付文書等記載事項

術者等のアレルギー反応に注意する旨

### 付記 1 ソートン培地

1,000mL 中

L - アスパラギン一水和物	4.0 g
クエン酸一水和物	2.0 g
リン酸水素二カリウム	0.5 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.5 g
クエン酸アンモニウム鉄 ( )	0.05 g
グリセリン	60.0 mL
水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.2 に調整し、培養びんに分注し、121 で 15 分間高圧滅菌する。

### 付記 2 ソートンばれいしょ培地

流水で一晩水洗いしたばれいしょ片を、60 で 60 分間ソートン培地に漬ける。ルー試験管の下部にソートン培地を入れ、くびれの上部に上記ばれいしょ片を入れる。121 で 15 分間高圧滅菌する。

### 付記 3 変法ソートン培地

1,000mL 中

L - アスパラギン一水和物	8.0 g
クエン酸一水和物	2.0 g
リン酸水素二カリウム	0.5 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.5 g
クエン酸アンモニウム鉄 ( )	0.05 g
グリセリン	60.0 mL
塩化カルシウム	66.6 mg
硫酸亜鉛七水和物	26.7 mg
硫酸銅 ( ) 五水和物	4.14 mg
硝酸コバルト ( ) 七水和物	1.33 mg
水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.2 に調整し、培養びんに分注し、121 で 15 分間高圧滅菌する。

### 付記 4 動物用標準ツベルクリン

動物医薬品検査所から配布される 1 mL 中必要量の国際単位を含有するツベルクリン物質を含有する旧ツベルクリン又はこれと同等の力価を有するもの

### 付記 5 感作モルモット

牛 10 株と青山 B 株の加熱死菌を乾燥し、等量ずつ混合した後磨砕し、滅菌流動パラフィンに 1.0mg/mL となるように浮遊させ、それを体重約 400g の白色モルモットの両側の大腿部筋肉内に 0.3mL ずつ注射し、6 週間後、動物用標準ツベルクリンの 1,000、2,000 及び 4,000 倍希釈液をそれぞれ皮内に 0.1mL ずつ注射する。24 時間後、1,000 倍希釈液にあつては 13 ~ 23mm、2,000 倍希釈液にあつては 11 ~ 21mm、4,000 倍希釈液にあつては 9 ~ 19mm の反応を示したものを感作モルモットとし、試験に用いる。

## 付記6 平行線検定法

### 6-1 Validity の検定

動物用標準ツベルクリンを希釈用液で2倍に希釈したものと及び検体をそれぞれ希釈液で500、1,000及び2,000倍に希釈し、標準品及び試験品とする。その0.1mLずつをそれぞれ6匹以上24匹までの感作モルモットの皮内に注射し、24時間後、それぞれの反応の長径及び短径をmm単位で計測し、両者の平均を反応値とし、標準品及び試験品について、次式の計算を行う。ただし、標準品の高用量を $S_H$ 、中用量を $S_M$ 、低用量を $S_L$ とし、試験品の高用量を $T_H$ 、中用量を $T_M$ 、低用量を $T_L$ とする。

標準品の用量反応値の合計から

$$\text{標準品の直線性} \quad B = S_H - S_L$$

$$\text{標準品の曲線性} \quad C = S_H \times S_L - 2 \times S_M$$

両検体の用量反応値の合計から

$$\text{両検体の直線性} \quad C_B = B + (T_H - T_L)$$

$$\text{両検体の曲線性} \quad C_C = C + (T_H + T_L - 2 \times T_M)$$

$$\text{両検体の直線非平行性} \quad C_B' = B - (T_H - T_L)$$

$$\text{両検体の曲線非平行性} \quad C_C' = C - (T_H + T_L - 2 \times T_M) \text{を求める。}$$

上記の式で求めた $B$ 、 $C$ 、 $C_B$ 、 $C_B'$ 、 $C_C$ 及び $C_C'$ の絶対値がすべて付表1の該当するN行の $B$ 、 $C$ 、 $C_B'$ 、 $C_C$ 及び $C_C'$ のそれぞれの基準値の範囲内にある場合は、Validityの検定に適合する。

求めた $|B|$ 及び $|C|$ のいずれかが付表1の $B$ 及び $C$ のそれぞれの基準値から外れたときには、再試験を行う。

$|B|$ 及び $|C|$ がともに付表1の基準値の範囲内にあり、 $|C_B|$ 、 $|C_B'|$ 、 $|C_C|$ 、及び $|C_C'|$ のいずれかが付表1の基準値外にあるときは、不適合とする。

### 6-2 判定

Validityの検定に適合したときは、次式により検体差を求める。

$$\text{検体差 } C_A = (T_H + T_M + T_L) - (S_H + S_M + S_L)$$

この $C_A$ 値が付表2の該当するN行の合格域の範囲内にあるとき、試験に適合とする。

$C_A$ 値が検査継続域にあるときは、更に別の試験動物について、6-1の試験を実施し、その成績を最初の試験に加えて、Validityの検定を行い、適合したときは、 $C_A$ について付表2により合否を判定する。

この繰り返しは合否が決定するまで行う。動物数の合計が24匹になるまで行っても、検査継続域にあるときは、試験に適合とする。

$C_A$ 値が不合格域にあるとき、試験品は、不適合とする。

### 6-3 相対力価の計算

6-2で適合と判定された場合、次式又は付表3によって相対力価を求める。

$$P = \text{anti log} (4/3 \times 0.301 \times Q)$$

$$P : \text{相対力価} \quad Q = C_A / C_B$$

付表1 Validity 検定表

N	標準		2 検 体		
	直線性 B	曲線性 C	直線性 C <sub>B</sub>	直線非 平行性 C <sub>B</sub>	曲線性 曲線非 平行性 C <sub>C</sub> ( C <sub>C</sub> )
6	5.85	17.54	7.75	13.42	23.24
7	6.32	18.94	8.37	14.49	25.10
8	6.75	20.25	8.95	15.49	26.84
9	7.16	21.48	9.49	16.43	28.47
10	7.55	22.64	10.00	17.32	30.01
11	7.92	23.75	10.49	18.17	31.47
12	8.27	24.81	10.96	18.98	32.87
13	8.61	25.82	11.40	19.75	34.21
14	8.93	26.79	11.84	20.50	35.51
15	9.25	27.73	12.25	21.22	36.75
16	9.55	28.94	12.65	21.91	37.96
17	9.84	29.53	13.04	22.59	39.13
18	10.13	30.38	13.42	23.24	40.26
19	10.41	31.22	13.79	23.88	41.36
20	10.68	32.03	14.15	24.50	42.44
21	10.94	32.82	14.50	25.10	43.49
22	11.20	33.59	14.84	25.70	44.51
23	11.45	34.34	15.17	26.27	45.51
24	11.70	35.08	15.50	26.84	46.49

Nは使用動物数である。

付表2 合否判定表

N	不合格域	検査継続域	合格域	検査継続域	不合格域
6	- 30.9	- 30.8 ~ - 1.6	- 1.5 ~ 1.5	1.6 ~ 30.8	30.9
7	- 33.6	- 33.6 ~ - 4.3	- 4.2 ~ 4.2	4.3 ~ 33.5	33.6
8	- 36.3	- 36.2 ~ - 7.0	- 6.9 ~ 6.9	7.0 ~ 36.2	36.3
9	- 39.0	- 38.9 ~ - 9.7	- 9.6 ~ 9.6	9.7 ~ 38.9	39.0
10	- 41.7	- 41.6 ~ - 12.4	- 12.3 ~ 12.3	12.4 ~ 41.6	41.7
11	- 44.4	- 44.3 ~ - 15.1	- 15.0 ~ 15.0	15.1 ~ 44.3	44.4
12	- 47.1	- 47.0 ~ - 17.8	- 17.7 ~ 17.7	17.8 ~ 47.0	47.1
13	- 49.8	- 49.7 ~ - 20.5	- 20.4 ~ 20.4	20.5 ~ 49.7	49.8
14	- 52.5	- 52.4 ~ - 23.2	- 23.1 ~ 23.1	23.2 ~ 52.4	52.5
15	- 55.2	- 55.1 ~ - 25.9	- 25.8 ~ 25.8	25.9 ~ 55.1	55.2
16	- 57.9	- 57.8 ~ - 28.6	- 28.5 ~ 28.5	28.6 ~ 57.8	57.9
17	- 60.6	- 60.5 ~ - 31.3	- 31.2 ~ 31.2	31.3 ~ 60.5	60.6
18	- 63.3	- 63.2 ~ - 34.0	- 33.9 ~ 33.9	34.0 ~ 63.2	63.3
19	- 66.0	- 65.9 ~ - 36.7	- 36.6 ~ 36.6	36.7 ~ 65.9	66.0
20	- 68.7	- 68.6 ~ - 39.4	- 39.3 ~ 39.3	39.4 ~ 68.6	68.7
21	- 71.4	- 71.3 ~ - 42.1	- 42.0 ~ 42.0	42.1 ~ 71.3	71.4
22	- 74.1	- 74.0 ~ - 44.8	- 44.7 ~ 44.7	44.8 ~ 74.0	74.1
23	- 76.8	- 76.7 ~ - 47.5	- 47.4 ~ 47.4	47.5 ~ 76.7	76.8
24	- 79.5	- 79.4 ~ - 50.2	- 50.1 ~ 50.1	50.2 ~ 79.4	79.5

Nは、使用動物数である。

付表3 相対力価の簡易計算表

	Q										Q									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.0	1.00	1.01	1.02	1.03	1.04	1.05	1.06	1.07	1.08	1.09	1.00	0.99	0.98	0.97	0.96	0.95	0.95	0.94	0.93	0.92
0.1	1.10	1.11	1.12	1.13	1.14	1.15	1.16	1.17	1.18	1.19	0.91	0.90	0.90	0.89	0.88	0.87	0.86	0.85	0.85	0.84
0.2	1.20	1.21	1.23	1.24	1.25	1.26	1.27	1.28	1.30	1.31	0.83	0.82	0.82	0.81	0.80	0.79	0.79	0.78	0.77	0.76
0.3	1.32	1.33	1.34	1.36	1.37	1.38	1.39	1.41	1.42	1.43	0.76	0.75	0.74	0.74	0.73	0.72	0.72	0.71	0.70	0.70
0.4	1.45	1.46	1.47	1.49	1.50	1.52	1.53	1.54	1.56	1.57	0.69	0.68	0.67	0.67	0.67	0.66	0.65	0.65	0.64	0.64
0.5	1.59	1.60	1.62	1.63	1.65	1.66	1.68	1.69	1.71	1.73	0.63	0.52	0.52	0.61	0.61	0.60	0.60	0.59	0.59	0.58
0.6	1.74	1.76	1.77	1.79	1.81	1.82	1.84	1.86	1.87	1.89	0.57	0.56	0.56	0.56	0.55	0.55	0.54	0.54	0.53	0.53
0.7	1.91	1.93	1.95	1.96	1.98	2.00	2.02	2.04	2.06	2.08	0.52	0.51	0.51	0.51	0.50	0.50	0.50	0.49	0.49	0.48
0.8	2.09	2.11	2.13	2.15	2.17	2.19	2.21	2.23	2.26	2.28	0.48	0.47	0.47	0.46	0.46	0.46	0.45	0.45	0.44	0.44
0.9	2.30	2.32	2.34	2.36	2.38	2.41	2.43	2.45	2.47	2.50	0.44	0.43	0.43	0.42	0.42	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40
1.0	2.52	2.54	2.57	2.59	2.61	2.64	2.66	2.69	2.71	2.74	0.40	0.39	0.39	0.39	0.38	0.38	0.38	0.37	0.37	0.37
1.1	2.76	2.79	2.82	2.84	2.87	2.89	2.92	2.95	2.98	3.00	0.36	0.36	0.36	0.35	0.35	0.35	0.34	0.34	0.34	0.33
1.2	3.03	3.06	3.09	3.12	3.15	3.17	3.20	3.23	3.26	3.29	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32	0.31	0.31	0.31	0.31	0.30
1.3	3.32	3.36	3.39	3.42	3.45	3.48	3.51	3.55	3.58	3.61	0.30	0.30	0.30	0.29	0.29	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
1.4	3.65	3.68	3.71	3.75	3.78	3.82	3.85	3.89	3.93	3.96	0.27	0.27	0.27	0.27	0.26	0.26	0.26	0.26	0.25	0.25
1.5	4.00	4.04	4.07	4.11	4.15	4.19	4.23	4.27	4.31	4.35	0.25	0.25	0.25	0.24	0.24	0.24	0.24	0.23	0.23	0.23
1.6	4.39	4.43	4.47	4.51	4.55	4.59	4.64	4.68	4.72	4.77	0.23	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.21	0.21	0.21
1.7	4.81	4.86	4.90	4.95	4.99	5.04	5.09	5.13	5.18	5.23	0.21	0.21	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19
1.8	5.28	5.33	5.38	5.43	5.48	5.53	5.58	5.63	5.68	5.74	0.19	0.19	0.19	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17
1.9	5.79	5.84	5.90	5.95	6.01	6.06	6.12	6.18	6.23	6.29	0.17	0.17	0.17	0.17	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16

付表1で求めた対比から  $Q = C_A / C_B$  を計算し、Qが正の値なら左表を、Qが負の値なら右表を用いて相対力価を求める。

表中2行目「0～9」の数値は、左端の縦の欄の数値に続く小数点以下2桁目の数値を示す。