

ヨーニン

1 定義

マイコバクテリウム・アビウム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

マイコバクテリウム・アビウム P 18 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 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。

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、ドルセット馬鈴薯培地（付記 1）及びドルセット培地（付記 2）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。発育した菌体をドルセット馬鈴薯培地に移植し、37 で約 4 週間培養し、培地液面に発育した菌膜をドルセット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。菌膜をドルセット培地液面に浮かぶように移植し、37 で約 12 週間培養し、表面に厚い菌膜を形成させ、培養菌液とする。この間又は培養の終わりに、菌膜の沈んだもの及び発育の異常を認めるもの又は雑菌の混入のおそれのあるものは除く。

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 時間加熱して殺菌する。

2.3.3 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、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。

ろ液について、3.2 の試験を行う。

2.3.5 力価の調整

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。）で参照ヨーニ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

3.1.2 マイコバクテリウム・アビウム否定試験

3.1.2.1 試験方法

検体 1 mL ずつを小川培地 5 本以上に接種し、37℃ で 8 週間培養する。

3.1.2.2 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.2 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するとき、適合しなければならない。

3.2.2 相対力価の算出

ろ液及び参照ヨーニン（付記 3）を希釈用液でそれぞれ 50、100 及び 200 倍に希釈し、その 0.1 mL ずつを 6 匹以上の感作モルモット（付記 4）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 5）により、ろ液の参照ヨーニ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 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% 以下でなければならない。

3.3.3 力価試験

3.2.2 の方法に準じて、検体の参照ヨーニ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ない、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 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。

3.4.4 力価試験

3.2.2 の方法に準じて、試験品の参照ヨーニンに対する相対力価を算出するとき、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、特に承認されたものは、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 ドルセット馬鈴薯培地

流水で - 晩水洗した馬鈴薯片を 60℃ で 60 分間ドルセット培地につける。ルー試験管の下部

にドルセット培地を入れ、くびれの上部に上記馬鈴薯片を入れる。115 で 20 分間高圧滅菌する。

付記 2 ドルセット培地

1,000mL 中

L - アスパラギン一水和物	14.0 g
クエン酸ナトリウム	0.9 g
リン酸水素二カリウム	1.8 g
硫酸マグネシウム七水和物	1.5 g
クエン酸鉄 () n 水和物	0.3 g
ブドウ糖	10.0 g
グリセリン	100.0mL
水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.2 に調整し、培養びんに分注し、115 で 20 分間高圧滅菌する。

付記 3 参照ヨーニン

独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所が製造する特定の製造番号のもの

付記 4 感作モルモット

P 18 株の加熱死菌を乾燥して磨砕し、滅菌流動パラフィンに 1 mL 当たり 1.0mg となるように浮遊させたものを体重約 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、参照ヨーニンの 50、100 及び 200 倍希釈液をそれぞれ皮内に 0.1mL ずつ注射する。24 時間後、50 倍希釈液にあつては 13 ~ 23mm、100 倍希釈液にあつては 11 ~ 21mm、200 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 5 平行線検定法

1 Validity の検定

試験品及び参照ヨーニンを希釈用液で 50、100 及び 200 倍に希釈する。その 0.1mL ずつを 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、参照ヨーニン及び試験品について、次式の計算を行う。ただし、参照ヨーニンの高用量を 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。

参照ヨーニンの用量反応値の合計から

$$\text{参照ヨーニンの直線性} \quad B = S_H - S_L$$

$$\text{参照ヨーニンの曲線性} \quad C = S_H + S_L - 2 \times S_M$$

両検体の用量反応値の合計から

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

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

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

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

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_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 の検定に適合とする。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よりはずれたときは、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。

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 の値が付表 2 の該当する N 行の合格域の範囲にあるとき、試験に適合とする。C_A の値が、検査継続域にあるときは、更に別の試験動物について、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、試験に適合とする。C_A の値が不合格域にあるとき、試験品は、不適合とする。

3 相対力価の計算

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。

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

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

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 _B	直線非 平行性 C _B	曲線性 曲線非 平行性 C _C (C _C)
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	28.64	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	-33.5~-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	0.94	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	0.84	
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	
0.3	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	
0.4	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	
0.5	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	
0.6	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	
0.7	1.91	1.93	1.95	1.96	1.98	2.00	2.02	2.04	2.06	2.08	0.52	0.52	0.51	0.51	0.50	0.50	0.50	0.49	0.49	
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	
0.9	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	
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	
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	0.33	
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	0.30	
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	
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	
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	
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	
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	
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	0.17	
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	

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。