

ヨーネ病診断用補体結合反応抗原

1 定義

マイコバクテリウム・アビウムから抽出したりポ多糖類を主成分とする補体結合反応抗原である。

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 Teps 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、変法小川培地（付記 1）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

製造用培地には変法小川培地、ドルセット馬鈴薯培地（付記 2）及びドルセット培地（付記 3）を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養菌液

種菌を変法小川培地に移植し、37℃ で約 3 週間培養する。発育した菌苔をドルセット馬鈴薯培地に移植し、37℃ で約 2 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、2 ~ 3 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 集菌、洗浄及び乾燥

殺菌後、60 メッシュ金網又は同等の方法を用いて菌体を集め、精製水で十分洗浄後、アセトンに浸漬して水分を除き、ろ過して菌体を集め、50℃ で乾燥後磨砕し、乾燥菌体とする。

乾燥菌体について、3.1 の試験を行う。

2.3.4 抗原の抽出

乾燥菌体を精製水で約 8 w/v% 浮遊液とし、60℃ に保つ。これに等量の 90w/v% フェノール溶液を加えて混和する。次に 60℃ で 60 分間抽出後、5 ~ 10℃ に冷却し、約 7,000G で 30 分間遠心して透明な水層を採取する。これを精製水で 4 日間 6 回透析外液を交換し透折した後、エタノール（95）を最終濃度が 50vol% となるように加える。生じた沈殿を 90vol% エタノール及びジエチルエーテルでそれぞれ 1 回遠心洗浄後、乾燥し、原末とする。

原末について 3.2 の試験を行う。

2.3.5 抗原価の調整

原末を 0.01w/v% 硫酸マグネシウム加生理食塩液（以下「希釈用液」という。）で 1mL 中 2mg となるように溶解して抗原原液とする。抗原原液を希釈用液で希釈し、0.25mL 中に 200 単位が含まれるように抗原価を調整し原液とする。

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、凍結乾燥し、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 乾燥菌体の試験

3.1.1 染色試験

菌体の塗抹標本をチールネルゼン染色して鏡検するとき、マイコバクテリウム・アビウム以外の菌を認めてはならない。

3.2 原末の試験

3.2.1 力価試験

3.2.1.1 試験材料

試験品を希釈用液で 1 mL 中 2 mg となるように溶解し抗原原液とし、これを希釈用液で 25 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈法により 3,200 倍まで希釈する。

3.2.1.2 試験方法

2 種類の参照陽性血清（付記 4）を非働化し、それぞれ 10 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈法により 320 倍まで希釈する。各段階の希釈した抗原と血清のそれぞれ 0.25mL ずつを混合してボックスを組み、2 単位の補体 0.5mL を加え、4 で一夜処理する。3 vol% 羊血球浮遊液と 3 単位の溶血素とを等量混和した感作血球液 0.5mL を加え、37 で 30 分間反応させ、抗体価を測定する。抗体価は 100 % 溶血阻止を示す血清の最高希釈倍数とする。

3.2.1.3 判定

反応終了後、溶血の程度を観察し、次のように数値化する。

4 : 100 % 溶血阻止 (0 % 溶血)

3 : 75 % 溶血阻止

2 : 50 % 溶血阻止

1 : 25 % 溶血阻止

0 : 0 % 溶血阻止 (完全溶血)

参照陽性血清の所定の力価に対応する抗原原液の力価（1 単位）を求める時、0.25mL 中に 200 単位以上が含まれていなければならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 特異性試験

3.3.1.1 試験材料

検体を 100 倍に希釈した試料、参照陽性血清及び陰性牛血清を用いる。

3.3.1.2 試験方法

2 種類の参照陽性血清及び 3 例の陰性牛血清をそれぞれ 5 倍に希釈し、更に参照陽性血清を 2 倍階段希釈する。各血清希釈に試料を加え補体結合反応を行う。

3.3.1.3 判定

3.2.1.3 の基準で判定する時、陽性血清ではいずれも所定の抗体価で 4 を示さなければならず、陰性血清ではいずれも血清希釈 5 倍で 2 以下でなければならない。また、2 単位の抗原で抗補体作用を認めてはならない。

3.3.2 力価試験

3.3.2.1 試験方法

3.2.1 の方法に準じて、参照抗原（付記 5）とともに補体結合反応を行う。

3.3.2.2 判定

検体は、参照陽性血清に対して参照抗原とほぼ等しい反応パターンを示し、抗原価は、0.25mL

中 200 単位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乾燥物でなければならない。溶解したものは、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 真空度試験

一般試験法の真空度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 力価試験

3.2.1 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、判定は 3.3.2.2 に準じて行う。

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 抗体価を明示した指示陽性血清を添付する。

付記 1 変法小川培地

1,000mL 中

リン酸二水素カリウム 10.0 g

L - アスパラギン酸一水和物 10.0 g

ポリソルベート 80 15.0 g

フレイ菌乾燥死菌体 30.0 g

グリセリン 60 mL

水 残 量

100 で 30 分間滅菌後、卵黄液 2,000mL、2w/v% マラカイトグリーン液 60mL を加えて混和し、約 10mL ずつ滅菌試験管に分注し、90 で 60 分間滅菌する。

付記 2 ドルセット馬鈴薯培地

流水で一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 3 ドルセット培地

1,000mL 中

L - アスパラギン酸一水和物 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 100.0 mL

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 4 参照陽性血清

参照陽性血清はヨーネ病に感染した牛の未非働化血清で、参照抗原に対する補体結合反応抗

体価は 160 倍のもの

付記 5 参照抗原

「ヨ－ネ病診断用補体結合反応抗原」又は動物医薬品検査所がこれと同等と認めるもの