

馬伝染性貧血診断用沈降反応抗原

1 定義

馬伝染性貧血ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を精製し、不活化した寒天ゲル内沈降反应用抗原である。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

馬伝染性貧血ウイルス P-337-EFD 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

馬由来の白血球培養細胞で CPE を伴って増殖し、馬由来の他の培養細胞では増殖するが、CPE は示さない。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、馬由来の白血球培養細胞又は皮膚培養細胞で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは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。

原株及び種ウイルスは、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 培養細胞

製造に相当と認められた馬由来の培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞に接種し、37 で培養し、ウイルスの増殖極期に個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、3.2 の試験を行う。

2.3.3 原液の調製

ウイルス浮遊液を混合し、相当と認められた方法で精製して濃縮し、冷ジエチルエーテルで処理し、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

原液をリン酸緩衝食塩液で希釈し、抗原価の調整を行い、アジ化ナトリウムを 0.1w/v% となるように加えてる過し、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。

2.6 指示血清

実験感染馬由来の抗馬伝染性貧血ウイルス血清を非働化した後、1 w/v% 牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液で力価を調整し、アジ化ナトリウムを 0.1w/v% となるように加え、小分容器に分注

し、指示血清とする。

指示血清について、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 1 % 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、37 で 7 日間培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

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。

3.3 原液の試験

3.3.1 力価試験

3.3.1.1 試験材料

検体、参照抗原（付記 1）及び抗血清アガロース平板（付記 2）を用いる。

3.3.1.2 試験方法

2 枚の抗血清アガロース平板の所定の穴に検体並びに 8 単位及び 12 単位の参照抗原をそれぞれ 0.035mL ずつ満たし、37 で湿度を保ちながら、水平に静置して 72 時間反応させる。

試験は、逐次検定法により 15 回まで繰り返し行う。

3.3.1.3 判定

穴の周囲に形成されたリングの直径の 2 乗又は長径と短径の積をそれぞれの反応値とする。

各回の参照抗原 8 単位と 12 単位との反応値の差 b を求め、その累和 b の値が回帰係数 b の管理限界（付記 3）内にあることを確認する。

次に、各回の検体と参照抗原 8 単位との反応値の差 Y を求め、その累和 Y の値を求める。

次式により検体の力価 $X T$ を求めるとき、その力価は、8 単位以上でなければならない。

$$X T = 8 + 4 \times \frac{Y}{b}$$

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 特異性試験

3.4.2.1 試験材料

試験品、力価 4 ~ 8 単位の参照陽性血清（付記 4）、指示血清、感染馬血清（付記 5）及び非感染馬血清（付記 6）をそれぞれ非働化したもの並びに寒天平板（付記 7 - 1）を用いる。

3.4.2.2 試験方法

寒天平板の所定の穴に試験材料 0.05mL ずつを満たし、湿度を保ちながら水平に静置して 96 時間反応させる。

3.4.2.3 判定

試験品は、参照陽性血清、指示血清及び感染馬血清との間に明瞭な 1 本の沈降線を生じなければならず、それらは互いに融合しなければならない。また、非感染馬血清に対しては沈降線を生じてはならない。

3.4.3 力価試験

3.3.1 を準用して試験するとき、試験品の力価は、6 ~ 10 単位でなければならない。

3.5 指示血清の試験

3.5.1 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。

3.5.2 特異性試験

3.5.2.1 試験材料

試験品、力価 8 単位の参照抗原、力価 4 ~ 8 単位の参照陽性血清及び寒天平板（付記 7 - 2）を用いる。

3.5.2.2 試験方法

寒天平板の所定の穴に試験材料の 0.05mL ずつを満たし、湿度を保ちながら、水平に静置して 96 時間反応させる。

3.5.2.3 判定

試験品は、参照抗原との間に明瞭な 1 本の沈降線を生じなければならず、この沈降線は、参照抗原と参照陽性血清との間に生じた沈降線と融合しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 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。

付記 1 参照抗原

馬伝染性貧血ウイルスを馬由来の培養細胞で増殖させて得たウイルス浮遊液を調製した抗原で力価が 8 単位及び 12 単位となるように調製されたものである。

ただし、抗血清アガロース平板を用いて、沈降反応を行った場合、その反応値の累和 b の値が、回帰係数 b の管理限界内に入らなければならない。

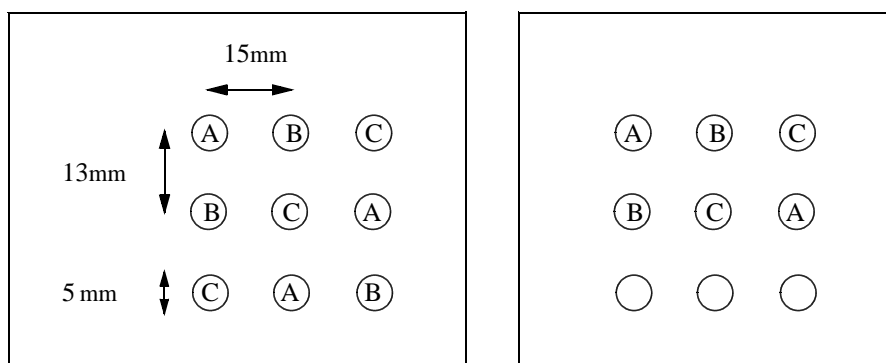
また、力価 8 単位の抗原は、寒天平板を用いて沈降反応を行った場合、力価 4 ~ 8 単位の参照陽性血清に対し、明瞭な 1 本の沈降線を生じるものでなければならない。

付記 2 抗血清アガロース平板

トリス・塩酸緩衝液にアジ化ナトリウムを 0.1w/v% となるように加えた後、アガロースを加えて沸騰水中で溶解させる。これを 50 に保温しながら、参照陽性血清を 1 単位となるように加え、十分混和した後、1 w/v% の寒天液を薄く塗布し、乾燥したガラス板と清浄なガラス板とで組合せた平板容器（縦 70mm、横 90mm、厚さ 2 mm）内に注入し、凝固させる。凝固させたアガロースは、平板容器のまま 2 ~ 5 で湿度を保たせながら一夜保存し、常温に戻してから清浄なガラス板を除き、下図のように穴を開けたものである。

ただし、アガロースの最終濃度は、1 w/v% である。

力価試験における試験材料を満たす穴



A : 12 単位の参照抗原
B : 8 単位の参照抗原
C : 検体又は試験品

付記3 回帰係数 b の管理限界

繰り返し回数	b		
	下 限	平 均	上 限
1	13.00	- 16.40	- 19.80
2	26.00	- 32.80	- 39.60
3	39.00	- 49.20	- 59.40
4	52.00	- 65.60	- 79.20
5	65.00	- 82.00	- 99.00
6	78.00	- 98.40	- 118.80
7	91.00	- 114.80	- 138.60
8	104.00	- 131.20	- 158.40
9	117.00	- 147.60	- 178.20
10	130.00	- 164.00	- 198.00
11	143.00	- 180.40	- 217.80
12	156.00	- 196.80	- 237.60
13	169.00	- 213.20	- 257.40
14	182.00	- 229.60	- 277.20
15	195.00	- 246.00	- 297.00

付記4 参照陽性血清

実験感染馬由来の抗馬伝染性貧血ウイルス血清である。

力価は4～8単位に調整されており、寒天平板を用いて沈降反応を行った場合、力価8単位の参照抗原に対し明瞭な1本の沈降線を生ずるもの

付記5 感染馬血清

適当と認められた抗馬伝染性貧血ウイルス血清

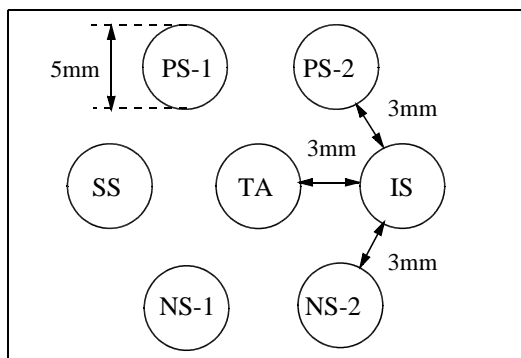
付記6 非感染馬血清

健康な馬由来の血清

付記7 寒天平板

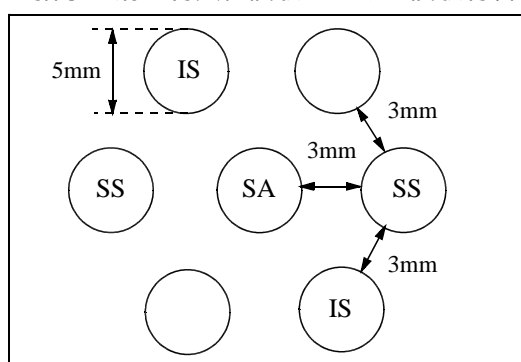
100mLの生理食塩液に0.8gの寒天及び1 mLの10w/v%アジ化ナトリウム液を加え、沸騰水中で溶解させた後、スライドガラス上に注加し、凝固させた後、下図のように穴をあけた厚さ3 mmの平板

1 抗原の特異性試験における試験材料を満たす穴



TA：検体又は試験品
 SS：参照陽性血清
 IS：指示血清
 PS-1：感染馬血清 1
 PS-2：感染馬血清 2
 NS-1：非感染馬血清 1
 NS-2：非感染馬血清 2

2 指示血清の特異性試験における試験材料を満たす穴



IS：試験品（指示血清）
 SA：参照抗原
 SS：参照陽性血清

付記 8 逐次検定表 (Y)

繰り返し回数	低力価 不合格域	検査続行域	合格域	検査続行域	高力価 不合格域
1	- 26.81	- 26.80 ~		~ 26.80	26.81
2	- 38.11	- 38.10 ~ - 7.10	- 7.09 ~ 7.09	7.10 ~ 38.10	38.11
3	- 49.41	- 49.40 ~ - 18.40	- 18.39 ~ 18.39	18.40 ~ 49.40	49.41
4	- 60.71	- 60.70 ~ - 29.70	- 29.69 ~ 29.69	29.70 ~ 60.70	60.71
5	- 72.01	- 72.00 ~ - 41.00	- 40.99 ~ 40.99	41.00 ~ 72.00	72.01
6	- 83.31	- 83.30 ~ - 52.30	- 52.29 ~ 52.29	52.30 ~ 83.30	83.31
7	- 94.61	- 94.60 ~ - 63.60	- 63.59 ~ 63.59	63.60 ~ 94.60	94.61
8	-105.91	-105.90 ~ - 74.90	- 74.89 ~ 74.89	74.90 ~ 105.90	105.91
9	-117.21	-117.20 ~ - 86.20	- 86.19 ~ 86.19	86.20 ~ 117.20	117.21
10	-128.51	-128.50 ~ - 97.50	- 97.49 ~ 97.49	97.50 ~ 128.50	128.51
11	-139.81	-139.80 ~ - 108.80	-108.79 ~ 108.79	108.80 ~ 139.80	139.81
12	-151.11	-151.10 ~ - 120.10	-120.09 ~ 120.09	120.10 ~ 151.10	151.11
13	-162.41	-162.40 ~ - 131.40	-131.39 ~ 131.39	131.40 ~ 162.40	162.41
14	-173.71	-173.70 ~ - 142.70	-142.69 ~ 142.69	142.70 ~ 173.70	173.71
15	-185.01	-185.00 ~ - 154.00	-153.99 ~ 153.99	154.00 ~ 185.00	185.01