

精製鳥型ツベルクリン

1 定義

マイコバクテリウム・アビウム培養液を濃縮し、部分精製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 4110 - NIAH 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

液体培地で長時間培養すると、鳥型ツベルクリンを産生する。

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3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）、ソートン馬鈴薯培地（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馬鈴薯培地に移植し、37 で約2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、約2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8～10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 100 で3時間加温殺菌する。

2.3.3 除菌、濃縮及び精製

殺菌後、ろ過及び遠心により培養液を集め、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 20vol % 以下となるように濃縮する。濃縮液9容に、40w/v % トリクロロ酢酸液1容を加えて、十分混和する。生じた沈殿を遠心により集め、4 w/v % トリクロロ酢酸液で洗浄する。沈殿を濃縮液の 1 / 5 量のリン酸緩衝食塩液に溶解して、透析によりトリクロロ酢酸を除去後、ろ過滅菌したものを抗原液とする。

抗原液について、3.1 の試験を行う。

2.3.4 力価の調整

リン酸緩衝食塩液で参照鳥型ツベルクリン（付記4）に対する相対力価が 0.76 ~ 1.32 の5倍の範囲となるよう調整し、原液とする。

原液について、3.2 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て凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 抗原液の試験

3.1.1 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。

3.1.2 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 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。

3.1.2.2 判定

マイコバクテリウム・アビウムの発育を認めてはならない。

3.1.3 相対力価の算出

リン酸緩衝食塩液で適当な濃度に希釈した検体及び参照鳥型ツベルクリンをリン酸緩衝食塩液でそれぞれ 50、100 及び 200 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、抗原液の参照鳥型ツベルクリンに対する相対力価を算出する。

3.2 原液の試験

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 力価試験

3.1.3 の方法に準じて、原液の参照鳥型ツベルクリンに対する相対力価を算定するとき、0.76 ~ 1.32 の 5 倍でなければならない。ただし、検体はリン酸緩衝食塩液で 5 倍に希釈する。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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。

3.3.2 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。

3.3.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、5%以下でなければならない。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

3.3.6 力価試験

3.1.3 の方法に準じて、試験品の参照鳥型ツベルクリンに対する相対力価を算定するとき、0.76 ~ 1.32 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 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 に調整して 120 で 20 分間滅菌する。

付記 2 ソートン馬鈴薯培地

流水で一晩水洗いした馬鈴薯片を、60 で 60 分間ソートン培地につける。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馬鈴薯片を入れる。120 で 20 分間滅菌する。

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
無水塩化カルシウム	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 に調整して 120 で 20 分間滅菌する。

付記 4 参照鳥型ツベルクリン

鳥型ツベルクリン PPD 国際標準品 (40,000 国際単位 / mL) と同等の力価を有するもの

付記 5 感作モルモット

マイコバクテリウム・アビウム 4110-NIAH 株の加熱死菌乾燥物を、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 400g の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、参照鳥型ツベルクリンの 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 6 平行線検定法

6 - 1 Validity の検定

参照鳥型ツベルクリン及び検体をそれぞれリン酸緩衝食塩液で 50、100 及び 200 倍に希釈し、参照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、参照品及び試験品について、次式の計算を行う。ただし、参照品の高用量を 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。

参照品の用量反応値の合計から

$$\text{参照品の直線性} \quad B = S_H - S_L$$

$$\text{参照品の曲線性} \quad C = S_H + S_L - 2 \times S_M$$

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 _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	0.95	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	0.62	0.62	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	0.57	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	0.52	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。