

# ひな白痢急速診断用菌液

## 1 定義

ひな白痢菌の濃厚死菌液にマラカイトグリ - ンを加えた急速凝集反応用抗原である。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

ひな白痢菌 9-25 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、適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では5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

製造用培地として SCD 寒天培地及びひな白痢菌連続培養用培地（付記1）又は製造に適当と認められた液状培地を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 培養菌液

種菌を SCD 寒天培地に移植し、37 で24～48時間培養し、菌苔を生理食塩液に浮遊させたものを製造用液体培地に接種し、通気と攪拌を行いながら8～10時間培養後、連続培養に移して、一定時間ごとに菌液を分割採取し、分割採取菌液とする。

分割採取菌液について、3.1の試験を行う。

#### 2.3.2 集菌及び殺菌

分割採取菌液を遠心し、沈殿菌の約10倍量の生理食塩液に浮遊させ、ガーゼ及び脱脂綿でろ過後、生理食塩液で遠心洗浄する。沈殿菌を約10倍量の生理食塩液に再浮遊させ、80 で30分間加熱殺菌し、分割採取死菌液とする。

#### 2.3.3 濃度調整

分割採取死菌液の濃度を McFarland 混濁管 No. 1 の200倍濃度となるように生理食塩液で調整する。この場合、マラカイトグリーンシュウ酸塩を0.1w/v%、フェノールを0.5w/v%となるように加える。これを37 で48時間静置し、染色後、2～5 で1か月以上保存し、分割採取原液とする。

分割採取原液について、3.2の試験を行う。

#### 2.3.4 抗原価の調整

分割採取原液について、3.2.2の方法により参照抗原（付記2）に対するそれぞれの相対力価を算出し、相対力価が0.9～1.1となるように分割採取原液を混合し、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 分割採取菌液の試験

#### 3.1.1 夾雑菌否定試験

#### 3.1.1.1 試験材料

検体及び SCD 寒天培地を用いる。

#### 3.1.1.2 試験方法

検体 1 白金耳を平板に塗抹し、37 で 24 時間培養し、観察する。

#### 3.1.1.3 判定

ひな白痢菌以外の菌の発育を認めてはならない。

#### 3.1.2 変異試験

##### 3.1.2.1 試験材料

検体及び 0.2w/v% アクリフラビン液を用いる。

##### 3.1.2.2 試験方法

検体を生理食塩液で McFarland 混濁管 No. 1 の 10 倍の濃度に希釈し、その 0.5mL に 0.2w/v% アクリフラビン液 0.5mL を加え、37 で 18 ~ 24 時間処理し、凝集の有無を観察する。

##### 3.1.2.3 判定

凝集を認めてはならない。

#### 3.2 分割採取原液の試験

##### 3.2.1 生菌否定試験

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

参照陽性血清（付記 3）を 0.5vol% フェノール加生理食塩液で 7.5、7.5 × 1.5、7.5 × 1.5<sup>2</sup> 倍に希釈する。これらの希釈血清と参照抗原及び検体の 6 つの組合せについて、それぞれ抗原及び血清 1 滴ずつを混合し、平板凝集反応を 5 回以上 14 回まで行う。反応温度は 24 ~ 26 に保ち、各回の組合せは無作為に作成する。血清と抗原とを混合後、凝集の出現が認められるまでの時間を秒単位で測定する。

それぞれの反応値から平行線検定法（付記 4）により参照抗原に対する相対力価を算出し、0.85 ~ 1.25 のものについて混合比を求める。

#### 3.3 原液の試験

##### 3.3.1 力価試験

3.2.2 を準用して試験するとき、検体の参照抗原に対する相対力価は、0.9 ~ 1.1 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 変異試験

3.1.2 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 特異性試験

###### 3.4.3.1 試験材料

検体、参照陽性血清、陰性血清（付記 5）並びにひな白痢陽性鶏（付記 6）及びひな白痢陰性鶏（付記 7）の血液を用いる。

###### 3.4.3.2 試験方法

参照陽性血清、陰性血清、3 例以上の陽性血液及び 3 例以上の陰性血液それぞれ 1 滴（約 0.03 mL）に検体 1 滴（約 0.03mL）ずつを加え、24 ~ 26 に保った反应用ガラス板上でよく混合し、凝集の有無を観察する。

###### 3.4.3.3 判定

参照陽性血清及び陽性血液では 1 分以内に凝集しなければならない、陰性血清及び陰性血液では 2

分以内に凝集してはならない。

#### 3.4.4 力価試験

3.2.2 を準用して試験するとき、試験品の参照抗原に対する相対力価は、0.8 ~ 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、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。

#### 5 その他

##### 5.1 添付文書等記載事項

検査は、常時 20 ~ 25 °C で行われるよう留意し、戸外では直射日光及び塵埃のひどい場所は避ける旨

菌液は、使用前及び使用中、時どきよく振って均等にする旨

#### 付記 1 ひな白痢菌連続培養用培地

1,000mL 中

獣肉製ペプトン又はカゼインペプトン	17.0 g
大豆製ペプトン	3.0 g
ブドウ糖	7.5 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
水	残 量

pH を 7.1 ~ 7.3 に調整し、全量をろ過滅菌し、又はブドウ糖を他の成分とは別に溶解し、高圧滅菌後、両者を混和する。

#### 付記 2 参照抗原

「ひな白痢急速診断用菌液」又は動物医薬品検査所がこれと同等と認めるもの

#### 付記 3 参照陽性血清

ひな白痢菌で生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を免疫して得た血清をプールし、1 mL ずつ分注し、凍結乾燥したひな白痢診断用菌液検定のための血清である。その抗体価は、17 倍に希釈したとき、参照抗原に対する平板凝集反応において、40 ~ 50 秒前後で凝集が出現するように調整されており、独立行政法人農業技術研究機構より配布される。

#### 付記 4 平行線検定法

##### 1 Validity の検定

参照陽性血清を 0.5vol% フェノール加生理食塩液で 7.5、7.5 × 1.5、7.5 × 1.5<sup>2</sup> 倍に希釈する。

これらの希釈血清と参照抗原及び試験品の 6 つの組合せについて、それぞれ抗原及び血清 1 滴ずつを混合し、平板凝集反応を 5 回以上 14 回まで行う。反応温度を 24 ~ 26 °C に保ち、各回の組合せは無作為に作成する。血清と抗原とを混合後、凝集の出現が認められるまでの時間を秒単位で測定する。

得られた数値を常用対数に変換後、参照抗原及び試験品について、次式の計算を行う。ただし、参照抗原に対する参照陽性血清の高用量を  $S_H$ 、中用量を  $S_M$ 、低用量を  $S_L$  とし、試験品に対する参照陽性血清の高用量を  $T_H$ 、中用量を  $T_M$ 、低用量を  $T_L$  とする。

標準品の反応値の合計から

$$\text{参照抗原の直線性} \quad B = S_H - S_L$$

$$\text{参照抗原の曲線性} \quad C = S_H + S_L - 2 \times S_M$$

両検体の用量反応値の合計から

両検体の直線性  $C_B = B + (T_H - T_L)$

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

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

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

## 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、更に試験を追加し、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、 $C_A$  値を付表 2 と対比して合否を判定する。この繰り返しは合否が決定するまで行う。

試験回数の合計が 14 回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は試験に不適合とする。

## 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。

$$P = \text{anti log} (4/3 \times 0.176 \times Q)$$

$$P : \text{相対力価}, Q = C_A / C_B$$

### 付記 5 陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1 mL ずつ分注し、凍結乾燥したもので、参照抗原を凝集しないもの

### 付記 6 ひな白痢陽性鶏

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏にひな白痢菌を感染させたもので、参照抗原を用いて試験管凝集反応を行うとき、凝集価が、20 倍以上のもの

### 付記 7 ひな白痢陰性鶏

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏で、参照抗原を用いて試験管凝集反応を行うとき、凝集価が、5 倍未満のもの

付表 1 Validity の検定表

N	標準		2 検 体			
	直線性	曲線性	直線性	直線非平行性	曲線性 (曲線非平行性)	
	B	C	C <sub>B</sub>	C <sub>B'</sub>	C <sub>C</sub>	C <sub>C'</sub>
5	0.35	1.40	0.44	1.02		1.77
6	0.33	1.54	0.48	1.11		1.93
7	0.41	1.66	0.52	1.20		2.09
8	0.44	1.77	0.55	1.29		2.23
9	0.46	1.88	0.58	1.37		2.37
10	0.49	1.98	0.62	1.44		2.50
11	0.51	2.08	0.65	1.51		2.62
12	0.54	2.17	0.68	1.58		2.74
13	0.56	2.26	0.70	1.64		2.85
14	0.58	2.35	0.73	1.71		2.96

Nは、繰り返し数である。

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
5	- 2.09	- 2.08 ~ - 1.09	- 1.08 ~ 1.08	1.09 ~ 2.08	2.09
6	- 2.41	- 2.40 ~ - 1.41	- 1.40 ~ 1.40	1.41 ~ 2.40	2.41
7	- 2.73	- 2.72 ~ - 1.73	- 1.72 ~ 1.72	1.73 ~ 2.72	2.73
8	- 3.05	- 3.04 ~ - 2.05	- 2.04 ~ 2.04	2.05 ~ 3.04	3.05
9	- 3.36	- 3.35 ~ - 2.37	- 2.36 ~ 2.36	2.37 ~ 3.35	3.36
10	- 3.68	- 3.67 ~ - 2.68	- 2.67 ~ 2.67	2.68 ~ 3.67	3.68
11	- 4.00	- 3.99 ~ - 3.00	- 2.99 ~ 2.99	3.00 ~ 3.99	4.00
12	- 4.32	- 4.31 ~ - 3.32	- 3.31 ~ 3.31	3.32 ~ 4.31	4.32
13	- 4.64	- 4.63 ~ - 3.64	- 3.63 ~ 3.63	3.64 ~ 4.63	4.64
14	- 4.95	- 4.94 ~ - 3.96	- 3.95 ~ 3.95	3.96 ~ 4.94	4.95

Nは、繰り返し数である。

付表3 相対力価の簡易計算表

	Q 0										Q 0									
	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	1.01	1.02	1.02	1.03	1.03	1.04	1.04	1.05	1.00	0.99	0.99	0.98	0.98	0.97	0.97	0.96	0.96	0.95
0.1	1.06	1.06	1.07	1.07	1.08	1.08	1.09	1.10	1.10	1.11	0.95	0.94	0.94	0.93	0.93	0.92	0.92	0.91	0.91	0.90
0.2	1.11	1.12	1.13	1.13	1.14	1.14	1.15	1.16	1.16	1.17	0.90	0.89	0.89	0.88	0.88	0.87	0.87	0.86	0.86	0.85
0.3	1.18	1.18	1.19	1.20	1.20	1.21	1.21	1.22	1.23	1.23	0.85	0.85	0.84	0.84	0.83	0.83	0.82	0.82	0.81	0.81
0.4	1.24	1.25	1.25	1.26	1.27	1.28	1.28	1.29	1.30	1.30	0.81	0.80	0.80	0.79	0.79	0.78	0.78	0.78	0.77	0.77
0.5	1.31	1.32	1.32	1.33	1.34	1.35	1.36	1.36	1.37	1.38	0.76	0.76	0.75	0.75	0.75	0.74	0.74	0.73	0.73	0.73
0.6	1.38	1.39	1.40	1.41	1.41	1.42	1.43	1.44	1.44	1.45	0.72	0.72	0.72	0.71	0.71	0.70	0.70	0.70	0.69	0.69
0.7	1.46	1.47	1.48	1.48	1.49	1.50	1.51	1.52	1.52	1.53	0.68	0.68	0.68	0.67	0.67	0.66	0.66	0.66	0.66	0.65
0.8	1.54	1.55	1.56	1.57	1.57	1.58	1.59	1.60	1.61	1.62	0.65	0.65	0.64	0.64	0.64	0.63	0.63	0.62	0.62	0.62
0.9	1.63	1.64	1.64	1.65	1.66	1.67	1.68	1.69	1.70	1.71	0.61	0.61	0.61	0.60	0.60	0.60	0.60	0.59	0.59	0.59
1.0	1.72	1.73	1.74	1.75	1.75	1.76	1.77	1.78	1.79	1.80	0.58	0.58	0.58	0.57	0.50	0.57	0.56	0.56	0.56	0.56
1.1	1.81	1.82	1.83	1.84	1.85	1.86	1.87	1.88	1.89	1.90	0.55	0.55	0.55	0.54	0.54	0.54	0.53	0.53	0.53	0.53
1.2	1.91	1.92	1.93	1.94	1.95	1.97	1.98	1.99	2.00	2.01	0.52	0.52	0.52	0.51	0.51	0.51	0.51	0.50	0.50	0.50
1.3	2.02	2.03	2.04	2.05	2.06	2.07	2.09	2.10	2.11	2.12	0.50	0.49	0.49	0.49	0.48	0.48	0.48	0.48	0.47	0.47
1.4	2.13	2.14	2.15	2.17	2.18	2.19	2.20	2.21	2.23	2.24	0.47	0.47	0.46	0.46	0.46	0.46	0.45	0.45	0.45	0.45
1.5	2.25	2.26	2.27	2.29	2.30	2.31	2.32	2.34	2.35	2.36	0.44	0.44	0.44	0.44	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.42
1.6	2.37	2.39	2.40	2.41	2.43	2.44	2.45	2.47	2.48	2.49	0.42	0.42	0.42	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.40	0.40
1.7	2.51	2.52	2.53	2.55	2.56	2.58	2.59	2.60	2.62	2.63	0.40	0.40	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.38	0.38	0.38
1.8	2.65	2.66	2.67	2.69	2.70	2.72	2.73	2.75	2.76	2.78	0.38	0.38	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.36	0.36	0.36
1.9	2.79	2.81	2.82	2.84	2.85	2.87	2.89	2.90	2.92	2.93	0.36	0.36	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.34	0.34	0.34
2.0	2.95	2.96	2.98	3.00	3.01	3.03	3.05	3.06	3.08	3.10	0.34	0.34	0.34	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.32	0.32
2.1	3.11	3.13	3.15	3.16	3.18	3.20	3.21	3.23	3.25	3.27	0.32	0.32	0.32	0.32	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
2.2	3.28	3.30	3.32	3.34	3.36	3.37	3.39	3.41	3.43	3.45	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.29	0.29	0.29	0.29
2.3	3.47	3.49	3.51	3.52	3.54	3.56	3.58	3.60	3.62	3.64	0.29	0.29	0.29	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.27
2.4	3.66	3.68	3.70	3.72	3.74	3.76	3.78	3.80	3.82	3.84	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.26	0.26	0.26	0.26
2.5	3.86	3.88	3.91	3.93	3.95	3.97	3.99	4.01	4.03	4.06	0.26	0.26	0.26	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
2.6	4.08	4.10	4.12	4.14	4.17	4.19	4.21	4.24	4.26	4.28	0.25	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.23	0.23
2.7	4.30	4.33	4.35	4.37	4.40	4.42	4.45	4.47	4.49	4.52	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22
2.8	4.54	4.57	4.59	4.62	4.64	4.67	4.69	4.72	4.74	4.77	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
2.9	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.93	4.95	4.98	5.01	5.04	0.21	0.21	0.21	0.21	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

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、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。