

ひな白痢急速診断用菌液

令和 7 年 6 月 26 日（告示第1015号）一部改正

1 定義

ひな白痢菌の濃厚死菌液にマラカイトグリー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、農林水産大臣が特に認めた場合には、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

製造用培地としてソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地（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、7.5×1.5²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0.03mL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 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

試験品、参照陽性血清及び陰性血清（付記 5）を用いる。

3.4.3.2 試験方法

参照陽性血清及び陰性血清それぞれ 0.03mL に試験品を 0.03mL ずつ加え、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

参照陽性血清では 1 分以内に凝集しなければならず、陰性血清では 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、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℃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、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合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 、 7.5×1.5^2 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 0.03mL 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℃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

参照抗原の直線性 $B = S_H - S_L$

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

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 _B	C _{B'}	C _C	C _{C'}
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	$-2.08 \sim -1.09$	$-1.08 \sim 1.08$	$1.09 \sim 2.08$	≥ 2.09
6	≤ -2.41	$-2.40 \sim -1.41$	$-1.40 \sim 1.40$	$1.41 \sim 2.40$	≥ 2.41
7	≤ -2.73	$-2.72 \sim -1.73$	$-1.72 \sim 1.72$	$1.73 \sim 2.72$	≥ 2.73
8	≤ -3.05	$-3.04 \sim -2.05$	$-2.04 \sim 2.04$	$2.05 \sim 3.04$	≥ 3.05
9	≤ -3.36	$-3.35 \sim -2.37$	$-2.36 \sim 2.36$	$2.37 \sim 3.35$	≥ 3.36
10	≤ -3.68	$-3.67 \sim -2.68$	$-2.67 \sim 2.67$	$2.68 \sim 3.67$	≥ 3.68
11	≤ -4.00	$-3.99 \sim -3.00$	$-2.99 \sim 2.99$	$3.00 \sim 3.99$	≥ 4.00
12	≤ -4.32	$-4.31 \sim -3.32$	$-3.31 \sim 3.31$	$3.32 \sim 4.31$	≥ 4.32
13	≤ -4.64	$-4.63 \sim -3.64$	$-3.63 \sim 3.63$	$3.64 \sim 4.63$	≥ 4.64
14	≤ -4.95	$-4.94 \sim -3.96$	$-3.95 \sim 3.95$	$3.96 \sim 4.94$	≥ 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	1.22	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	0.67	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	0.22	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。