

003

インド日本脳炎ワクチン製造プロジェクト

インド方式日本脳炎ワクチン製造法
手 引 書

昭和 58 年 3 月

国際協力事業団

医	倫
J	R
83	10

107
918
MCA

インド日本脳炎ワクチン製造プロジェクト

インド方式日本脳炎ワクチン製造法 手 引 書

JICA LIBRARY



1014197[6]

昭和 58 年 3 月

国 際 協 力 事 業 団

医 協

J R

83 - 10

國際協力事業團	
受入 期 584. 6. 19日	107
登録No. 105882	91-8
	MCA

はじめに

当事業団は、インド国の要請に基づき、昭和56年3月より、日本脳炎ワクチン製造プロジェクトを実施しています。その目的とするところは、インド国では未開発の日本脳炎ワクチンを現地で製造し、同国の日本脳炎予防対策に寄与しようとするもので、4年の協力期間の内に、製造能力を200万ドーズにもって行く方針です。

本手引書は、上記プロジェクトをより一層効果的に推進するために、インド方式日本脳炎ワクチン製造法について、日本人専門家に専門領域以外の事項についても理解をより深めて載せようとして、細菌製剤協会関係諸機関の手を煩わしてできたものです。

ここに、ご協力賜った方々に深甚なる感謝の意を表すると共に、今後とも関係諸機関の皆様からより一層のご協力を賜りますよう改めてお願いする次第です。

国際協力事業団

医療協力部長 中 沢 幸 一

目 次

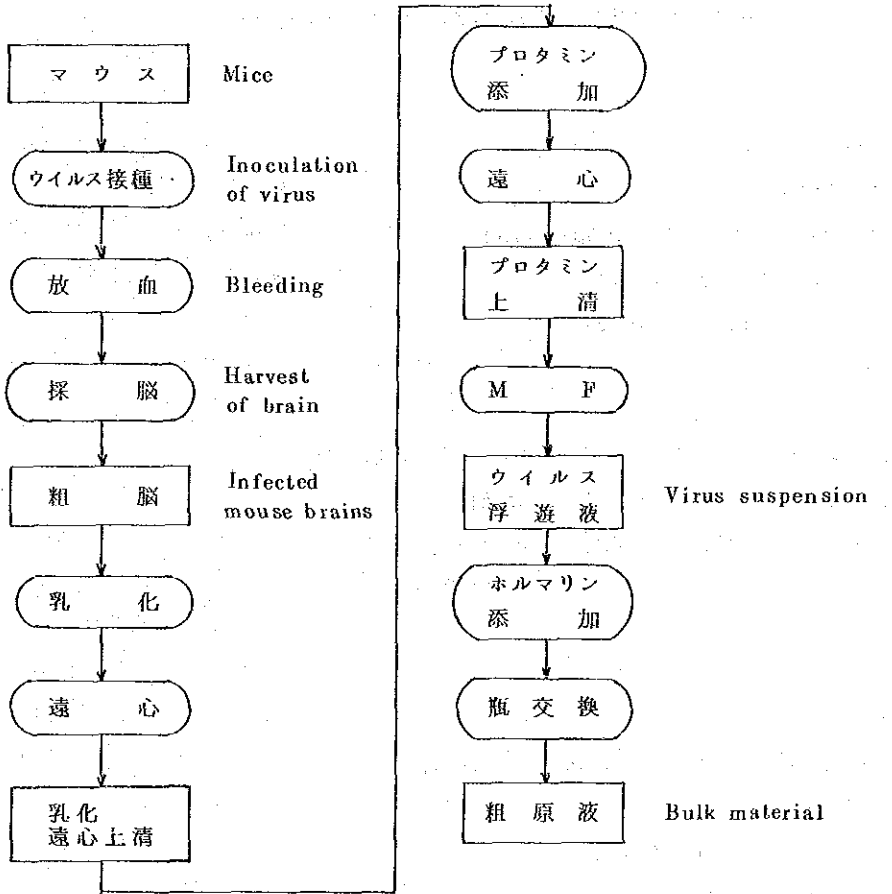
I 手引書作成にあたって	
II Bulk 作製 A	1 頁
III Bulk 作製 B	4 頁
III 最終製品化（分注、凍結乾燥）	8 頁
IV 品 質 管 理	11 頁

1 手引書作成にあたって

この手引書は、国際協力事業団の一プロジェクトとして日本脳炎ワクチンをインドで製造する時のためのものであって、インド方式製造法手引書であります。作成目的は、インドに赴いた専門家が、又はインドよりの研修員の研修を担当された方々が、御自身の専門領域以外の事項について、インドの人より質問を受けた時に応答出来るようにとの配慮からのものであります。従って、これを英訳して手渡すことは意図して居りません。応答の時に便利なよう、技術用語はなるべく多く英語を加えたかったのですが、時間の余裕がなく不充分・不統一となりましたことをお詫びいたします。必要な個所にめいめいで補足していただければ幸いです。

II Bulk 作成 A

フローシート



1 操作手順

1. スタムの調整、Preparation of inoculum

(1) 材料

- (a) 製造用ウイルス株 (予研中山株 Nakayama NIH strain, -70°C 凍結保存)
- (b) 2% 牛血清加 M/75 PBS pH7.4 (-20°C に凍結保存)
- (c) 2 ml 注射器
- (d) 500 ml メスシリンダー
- (e) 1,000 ml フラスコ
- (f) 氷

(2) 操作

- (a) 製造用ウイルスと 2% 牛血清加 M/75 PBS をフリーザーよりとり出し溶解する。
- (b) アンプル 2 本以上より 2 ml 注射器でウイルス液をとり出し、2% 牛血清加 M/75 PBS でウイルス含量が $10^{4.5} \sim 10^{5.5}$ LD 50/0.03 ml になるように希釈する。
- (c) 調整された接種液は氷水中で取扱う。残液は消毒したのち廃棄する。

2 接種

(1) 材料

- (a) 3 ~ 5 W 令マウス
- (b) 接種液 ($10^{4.5} \sim 10^{5.5}$ LD 50/0.03 ml)
- (c) 0.5 ml 注射器 (目盛 0.02 ml)
- (d) ヨードチンキ iodine tincture
- (e) 10 l ポリバケツ

(2) 操作

- (a) (1) で調整した接種液をマウス脳内に 0.02 ml/匹接種する。
- (b) 接種されたマウスは $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ で 4 日間飼育する。
- (c) 接種マウスは毎日観察し、死亡したマウスは廃棄する。

3 採脳

(1) 材料

- (a) ハサミ
- (b) 家庭用洗濯機 (脱水機付) Home washer dryer
- (c) 10 l ポリバケツ
- (d) 中性洗剤 Neutral detergent
- (e) クレゾール Cresol
- (f) 手術用メス Surgical blade

- (g) まな板 Chopping board
- (h) 吸引マイヤー Erlenmeyer flask
- (i) 大動物用注射針
- (j) 真空ポンプ Vacuum pump

(2) 操 作

- (a) 4日後に定型的日本脳炎症状を呈しているマウスを採脳用マウスとする。
- (b) 採脳用マウスの腋下動脈 (axillary artery) をハサミで切断して放血致死させる。
- (c) 適当な数の放血マウスを洗濯機に入れ中性洗剤及びクレゾールで5分間洗滌する。
- (d) さらに5分間水洗し、脱水する。
- (e) 洗滌したマウスを、まな板にならべ、手術用メスで頭部正中線上を真二つに切断する。
- (f) 径の大きな注射針と吸引マイヤーをゴム管で接続し吸引採脳する。

4 プロタミン処理

(1) 材 料

- (a) 天秤 Balance
- (b) ウルトラディスペーサー ultra-disperser
- (c) 冷却遠心機 Refrigerated centrifuge
- (d) P. R試験紙 Litomus paper, (P. R)
- (e) M/150 PBS pH8.0
- (f) 約20ℓステンレスタンク Stainless steel tank
- (g) 1～2ℓメスシリンダー
- (h) 1w/v%硫酸プロタミン protamine sulfate

(2) 操 作

- (a) 粗脳の重量を測定する。
- (b) ウルトラディスペーサー用カップに粗脳及び脳重量の約2倍のM/150 PBSを入れ回転数10,000 rpmで8分間磨砕する。
- (c) その後20ℓステンレスタンクに移し、正確に脳重量の5倍容量 (総計) になるようにM/150 PBSを加える。
- (d) よく混合し、遠心用ボトルに分注し約2,500 G 30分間遠心する。
- (e) 遠心上清を20ℓステンレスタンク Stainless steel tank に集めP R試験紙でPHを確認する。
(PH 7.0 ~ 7.4)
- (f) 乳化遠心上清の液量に対して最終濃度が0.12 w/v%になるようにプロタミン溶液を加える。
- (g) 4℃で30分間放置後 (時々攪拌する) 遠心用ボトルに分注し、約2,500 G 30分遠心する遠心上清

をプロタミン遠心上清と称する。

5 MF 漏過及び不活化 Membrane filtration and inactivation of virus

(1) 材 料

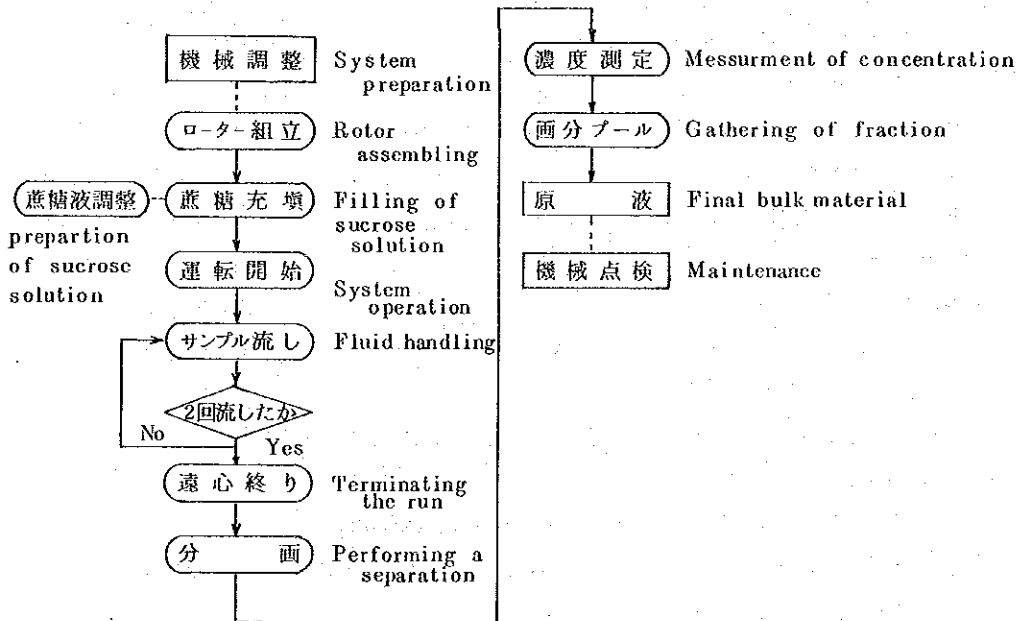
- (a) MFホルダー (φ = 293mm) Membrane filtration holder
- (b) 10ℓ 装置瓶
- (c) 10 V/V%ホルマリン
- (d) 100~200ml メスシリンダー
- (e) サンプリング用ピペット 中試験管装置瓶

(2) 操 作

- (a) プロタミン遠心上清をMF漏過する。漏液は10ℓ装置瓶に集める。
- (b) 漏液について生物学的製剤基準 (Minimum Requirement of Biological Products) に従って無菌性(1)(2)(3)PHウイルス含量を測定する。
- (c) 上記試験用のサンプルを採取後、最終濃度0.1v/v%になるようにホルマリンを添加する。
- (d) 4℃で35日間以上作用させ不活化する。不活化が終了したものを粗原液と称する。

III Bulk 作成 B

フローシート



1 機械の調整

- (1) オイルポンプのオイルレベル及びミストオイル (mist oil) のオイルレベルを点検する。もし、少ないようだったら十分注入する。
- (2) 上部シャフトのつまりとチャンバー内のよごれを点検する。チャンバー内は、特に水分、ふたの部分はOリングの下の水分を注意する。
- (3) その他クーラント (coolant) 系やセパレーター (separator) からの水抜きなど機械全体に異常がないかを調べる。

2 ローターの組立

- (1) ローターボウルの両端にOリングを入れる。
- (2) ドライブピン (drive pin) を差し込んだローアーキャップをローターボウル (rotor bowl) に取付ける。
- (3) ローターコア (rotor core) を入れアッパーキャップ (upper cap) を取付ける。
- (4) テフロンインサート (teflon insert) をアッパーキャップの上部に付ける。

3 ローターの取付と蔗糖液の充填

- (1) 電源を入れる
- (2) リフトを用いて、ローターを上部シャフトに取付け、チャンバー内にローターを納める。
- (3) 上下のアセンブリー (assembly) を取付け次の配線を行う。

(a) Oil Feed Line	(g) Seal Coolant Line
(b) Oil Return Line	(h) Seal Coolant Return Line
(c) Oil Mist Line	(i) Sample Feed Line
(d) Main Air Line	(j) Tachometer Cable
(e) Brake Air Line	
(f) Exhaust Air Line	
- (4) コンプレッサースイッチを入れ、空気供給を行う。
- (5) "Run" スイッチを入れオイル系を作動させ "Vacuum" スイッチを入れ、クーラント系を働かせるこの時、オイル系の各ゲージを点検し、クーラント水の流量を調節する。
- (6) ローターを薬品で滅菌し、PBSで洗う。
- (7) ボトムから、2.5% sucrose 加PBSを入れ、ローター一杯につめる。
- (8) ボトムから60%蔗糖液を60~80 ml/min の流速で1,800 ml 充填する。充填量はトップから出るPBSの量をはかることにより行う。

4 機械の運転及びウイルス液の遠心

- (1) 蔗糖液の充填が終わったら、各ゲージ、各配線が正常かを再確認し "Drive" スイッチを入れ回転数

35,000 rpm にセットする。この時必ず "Auto" で運転する。

- (2) 回転数 5,000~8,000 rpm に達したら、PBS を下→上又は上→下に何回も流し、ローター内の空気を抜く。そのまま、回転が上がるまで 6~8 ℓ/h で PBS を流しつづける。(空気圧は約 1 kg/cm²)
- (3) ウイルス液はあらかじめタンクに入れ周囲を冷しておくが、回転数が 35,000 に達したら、下から上へ流し始める。この時、空気がローター内に入らないように注意する。ウイルス液がローター内を完全に通過し終わったら、流速を 90~100 ml/min に調節し、通常下から上へ流す。
- (4) 機械運転中は、30~60 分おきに、次の個所をチェックする。
 - (a) Chamber Vacuum
 - (b) Rotor Speed
 - (c) Turbine Pressure
 - (d) Sample Flow-rate
 - (e) Main Air Pressure
 - (f) GPC Air Pressure
 - (g) Oil Pressure
 - (h) Mist Air Pressure
 - (i) Mist Oil Drop
 - (j) Bearing Oil Flow-rate
 - (k) Seal Coolant Level
 - (l) Seal Coolant Flow-rate
- (5) ウイルス液が流れ終わったら、排出液を再びタンクに戻し、リサイクルさせる。
- (6) 全てのウイルス液が流れ終わったら、PBS に切換え、数分間、上から下、下から上へと流した後、流れを止め約 35,000 rpm の回転のまま 1 時間回し続ける。
- (7) 1 時間後ブレーキをかけ、回転を停止させる。回転が止まるのに、40 分~50 分かかるので、その後分画作業に入る。

5 分画作業及び密度測定

- (1) 空気圧を 0.5~0.7 kg/cm² に調節し、下部アセンブリー (assembly) に、分画針を取付ける。
- (2) 上記の空気圧で分画を行う。速度は 25~50 ml/min、分画量は 100 ml ずつ、又は、一部 50 ml ずつ行う。
- (3) 屈折計 (refract meter) で各画分の蔗糖濃度を測定する。
- (4) 各画分の蛋白窒素量 (protein nitrogen) を Folin 法により測定する。(必要な時のみ)

6 画分プール

- (1) 蔗糖濃度の測定された画分は、ウイルス部分の画分のみ (通常蔗糖濃度 35~51%) 約 1 ℓ を瓶に集める。
- (2) 原液として 4℃ 冷蔵庫に保存する。

7 遠心後の遠心機の処置

- (1) 各配線を外し、上下のアセンブリーを取外す。
- (2) ローターを、チャンバーから取り出す。

- (3) 全てのスイッチを切る。
- (4) ローターの上部キャップ、コア、下部キャップ、Oリング、ローターボウルの順に分解し、中性洗剤でよく洗浄し、乾燥させる。テフロンインサート (Teflon insert) とドライブピンを紛失しないように注意する。

8 機械の点検

- (1) 次の項目は遠心終了後毎日実施する。
 - (a) Oil Mist Lubrication : オイルのレベルをチェックする。
 - (b) Centrifugal Separator : 液がたまっていたら抜く。
 - (c) Rotor Chamber と O-Ring : よこれ、水分がついていればふきとる。
 - (d) Seal Coolant Reservoir : 常にきれいにしておく。
- (2) 毎週実施するもの
 - (a) Vacuum pump : オイルレベルをチェックする。
 - (b) Oil Reservoir : オイルレベルをチェックする。
 - (c) Exhaust Housing : 分解し清掃する。更に Top Pivot のずれを 2~3mm/1000 に修正する。
 - (d) Compressor の点検

9 蔗糖液の作成

材料：蔗糖

攪はん用ミキサー

M/50 pH8 PBS

メンブラン フィルター (293mm)

20ℓ ステンレスタンク

- (1) 蔗糖 10kg に対し、PBS 6.5ℓ の割合で、ミキサーでミックスしよくとかす。この時、NaOH 溶液を少し加え pH8.0 前後に調整する。(60% 溶液になるようつくる)
- (2) よくとけたら、0.45μ のメンブランフィルターで漏過する。
- (3) 屈折計で 60% になっていることを確かめ、無菌試験を行う。

10 主なトラブルとその対処

- (1) クーラント貯留槽へのリーク
 - (a) 回転数を落す (状況によるが、25,000rpm くらいまで)
 - (b) 上、下の流れをかえてみる。
 - (c) 最終的には上下のアセンブリーを外し、Face seal、Spring、O-Ring Seal を点検、整備する。(但し、回転数が 20,000rpm 以下に下ってから行なうのが安全である。通常ローアセンブリの不備の方が多い。)

(2) 流れのつまり

- (a) 空気圧を上げ、上下の流れを何回もかえてみる。
- (b) 回転数を落す(20,000rpmくらいまで)。
- (c) なお、流れない時は、完全に停止させる。
- (d) 主に下部シャフトがつまっているので、上のサンプルフィードラインをとめ、ローアセンブリーを外し、ブラシか又は細い針金でローシャフトをつつく。もし上部シャフトだったら、同様に行う。
- (e) 再び回転を上げ、液を流し始める時、ローター内に空気が入っているので流れにくいですが、あせらず行う。

Ⅲ 最終製品化(分注、凍結乾燥)

1 資材受入

業者より受けとった資材は、規格試験した後、合格製品を資材保管庫にロット別に整理する。

2 規格試験

分注機を円滑に移動させるために規格品を使用することが必要であり、各資材について最低限下記の規格数値を測定しておく。なお、規格外資材は、使用に耐えないことからメーカー返品となるので事前に十分な打ち合わせが必要である。

(1) 自動瓶

- (a) 全高(Total height)
- (b) 胴径(External diameter of body)
- (c) 口外径(External diameter, neck rim)
- (d) 口内径(Internal diameter, neck mouth)

(2) ゴム栓

- (a) カサ厚(Flange thickness)
- (b) カサ径(Flange diameter)
- (c) 足径(Neck diameter)

(3) アルミキャップ

- (a) 全高
- (b) 全外径
- (c) 内径(Internal diameter)

3 分注準備及び滅菌

(1) 資材準備及び滅菌

(a) ゴム栓

洗濯機を使い、漏過された清浄な水で30分間溢水洗浄を打った後、10分間脱水する。無塵的容器に移して、121℃で90分間高圧蒸気滅菌した後120分間乾燥する。

(b) 自動瓶 (Vial)

回転式刷毛洗浄機 (Rotary bottle-brushing machine) にて洗瓶後、漏過された清浄な水で洗剤が完全に除かれるまですすぎを行い、滅菌罐に規定本数を整列させ、180℃で3時間乾燥熱風滅菌機 (Hot-air oven for dry heat sterilization) にて滅菌する。

(c) アルミキャップ

滅菌罐に規定数量を入れ、高圧蒸気滅菌機 (Autoclave) にて121℃90分間滅菌を行った後、30分間乾燥を行う。

(2) 分注器具、機材準備及び滅菌

分注作業をするために必要な器具、機材は、漏過された清浄な水で洗浄、乾燥後、包装紙で露出部分のない様包装し、高圧蒸気滅菌機又は、乾燥熱風滅菌機にて121℃90分又は、180℃3時間の滅菌を行う。

4 充填 (Filling)、打栓 (Stoppering)

(1) 本 剤

充填、打栓工程は、入口ターンテーブルより中間ターンテーブルまでを使用する。(自動瓶挿入ターンテーブル、充填機、全半打栓機、中間集積用ターンテーブル) 分注当日、準備滅菌されたポンプ、ノズル、ゴム管の接続を行い、同様、準備滅菌された資材を用いて無菌的に規定量を分注し、半打栓 (Half-Stoppering) を行う。

分注、打栓作業に要する人員及び業務内容は次の通りである。

2名 — 自動瓶供給 (乾燥熱風滅菌機より自動瓶を取り出し、入口ターンテーブルに供給する。)

1名 — 充填機、半打栓機の監視及び充填量測定

1名 — 半打栓機へのゴム栓供給

3名 — 中間ターンテーブルでの充填済み自動瓶集積及び凍結乾燥機チャンバーへの運搬

(2) 溶 剤 (Solvent)

溶剤の場合は、本剤 (Lyophilized vaccine) と違い凍結乾燥工程がないため充填から巻締めまでの工程を連続で行う。全ラインを使用し、中間集積機は、コンベアーとして可動させる。準備滅菌物は、本剤と同一であるが溶剤及び無塵化のためのフィルターが必要となる。

分注作業に要する人員及び作業内容は次の通りとなる。

2名 — 自動瓶供給 (乾燥熱風滅菌機より自動瓶を取り出し、入口ターンテーブルに供給する。)

1名 — 充填機、半打栓機、巻締機 (Capping machine) の監視及び充填量測定

1名 — 全打栓機、巻締機へのゴム栓、キャップの供給

1名——最終ターンテーブルよりの製品の取り出し及びトレーへの整列

1名——巻締後製品の滅菌、オートクレーブで121℃90分間

5 充填片付け

充填終了後は、充填に使用された資材、機材を無菌室から搬出し、資材の残数整理、機材の洗浄片付けを行い、無菌室の清浄化に努める。

6 凍結乾燥

(1) 準備、滅菌

(a) 凍結乾燥開始2日前にフィルターの滅菌を行う。(オートクレーブで121℃90分間滅菌120分乾燥)

(b) 同日に無菌室及び凍結乾燥機チャンバーのホルマリン燻蒸 (Formalin vapouring) による滅菌を行う。

(c) 凍結乾燥前日にチャンバー内のホルマリンガスを除去する。真空ポンプにより、チャンバーを真空引き(約30分間)する。a) で準備したフィルターを通し屋外の新鮮な空気をチャンバーに入れ常圧にもどし(約30分間)、これを24時間繰り返す。

(2) ローディング

チャンバー内の棚板を約+15℃に冷却し、充填されたバイアルを棚板に整列する。

(3) 予備凍結

ローディング終了後棚板を冷却し、製品を共晶点 (the eutectic point) 以下の温度で凍結する。(約-15℃)

(4) コンデンサー冷却

2)~3)の作業中にコンデンサーを冷却する。

(5) 一次乾燥 (Primary drying)

(a) 予備凍結終了後チャンバー、コンデンサー間のバタフライ弁 (Butterfly valve) を開き、装置全体を真空引きし、高真空になった後、製品の昇華が始まると棚板を加熱する(-20℃前後)。

(b) (a)の状態ではチャンバー側真空度とコンデンサー側真空度がほぼ一致するまで乾燥する。

(6) 二次乾燥 (Secondary drying)

(a) チャンバー側真空度、コンデンサー側真空度がほぼ一致すれば、自動温度コントローラーにより棚板温度を徐々に上昇させ約+26℃に設定する。

(b) (a)の状態では約8時間維持する。

(7) 封栓

二次乾燥終了後チャンバー、コンデンサー間のバタフライバルブを閉じ、加熱スイッチを切り、超高純度窒素ガスをフィルターを通しチャンバー内に入れ、バイアルにゴム栓を挿入する。

7 巻 締

巻締工程は、本剤の場合中間ターンテーブルの集積テーブルを利用し、凍結乾燥の終了した製品を同テーブルに再挿入し、巻締機及び最終ターンテーブルを使用する。

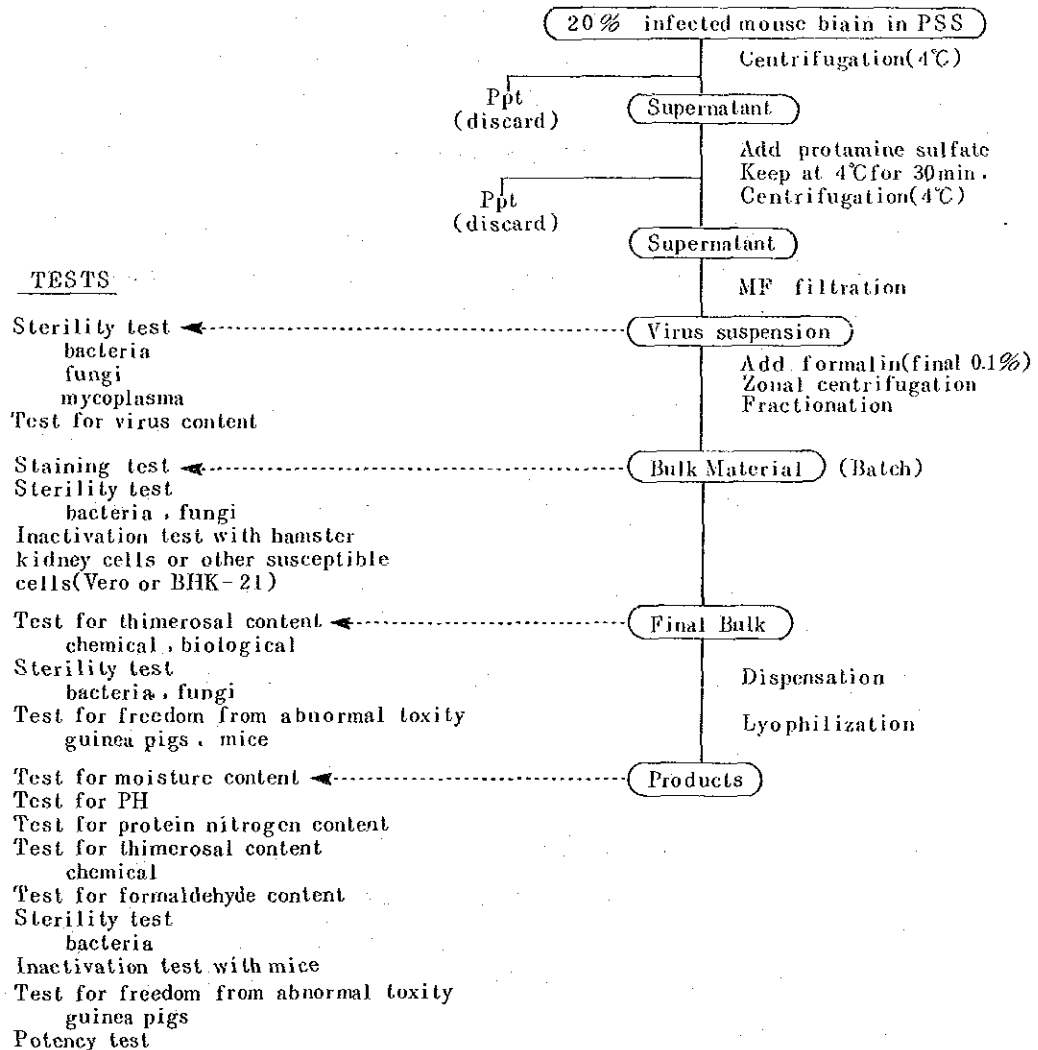
巻締に要する人員及び業務内容は次のとおりである。

- 1名 — 凍結乾燥終了製品をチャンバーより運搬し中間ターンテーブルに挿入。
- 1名 — 巻締機の監視及びホッパーへのアルミキャップ投入。
- 2名 — 最終ターンテーブルでの巻締終了製品の収納。

溶剤の場合は、4-②で記載した通り凍結乾燥工程がないため、充填、打栓及び巻締の各工程を連続で行う。

V 品質管理

テスト一覧表 PROCEDURE OF JE VACCINE PRODUCTION



1 ウイルス含量試験 Test for virus contents

- (1) ホルマリン添加前のウイルス浮遊液よりサンプリングした検体を、日本脳炎抗体を含まないウシ血清を2v/v%になるように加えたM/75 PBSで希釈して、適当な対数的等間隔の3以上の階段希釈をつくる。
- (2) 生後、約4週のマウス10匹以上を1群とし、各希釈に1群ずつを用い、1匹あたり0.03mlを脳内に注射する。
- (3) 注射後、14日間観察し、Read-Muench法によりウイルス量を計算する。

2 染色試験 Staining test

検体約10mlをとり、2,000kgで約30分間遠心して沈殿をとり、スライドガラスに塗抹し、乾燥、火えん固定後グラム染色して標本をつくり、これを1,000倍に拡大して鏡検する。

グラム染色法

- (1) 火えん固定後、クリスタルバイオレット(1.5%クリスタルバイオレットエタノール溶液2ml、シュウ酸アンモニウム0.8g、水98ml)で30秒~1分間染色→水洗
- (2) ルゴール液(ヨウ素1.0g、ヨウ化カリウム2.0g、液状石炭酸0.45ml、水を加えて100ml)を1分間作用させる。
- (3) エタノールで30秒~1分間洗浄、水洗。
- (4) サフラニン液(2.5%サフラニンエタノール溶液10ml、水90ml)で1分間染色→水洗。
- (5) 乾燥
- (6) 鏡検

グラム陽性菌……………黒褐色

グラム陰性菌……………赤色

各条医薬品の本質において定める含有細菌以外のものを認めないとき、この試験に適合とする。

3 不活化試験 Inactivation test

- (1) マウスでの不活化試験
生後約4週のマウス10匹以上に、1匹当たり検体0.03mlを脳内に注射して14日間観察する。
いずれの動物にも異常がなかった場合、適合とする。
- (2) 培養細胞での不活化試験

(a) 検体の透析

透析膜(Visking Co. Cellulose tubing 36/32など)を45cm位の長さに切り、よく水洗いしてから再蒸留水で洗い、30分間煮沸滅菌する。一方の端を結紮して、検体を入れ、他方の端を結んで透析槽で24時間以上透析する。透析槽にはpH7.2のPBSをできるだけ大量(検体量の100倍以上)に入れ、槽内で循環しながら透析する。透析槽に冷却装置をつけて冷却しながら行う。透析液は3回以上取替える。透析する検体の量はLotおよびBatch sizeにより算出する。(最終バル

ク 200ml 以上)

透析の終了した検体は、Millipore filter (GS) で漏過し除菌する。

(b) 培養細胞の作製

BHK-21 (またはVERO) 細胞を Roux (大) に培養する。培養液は細胞増殖用としては、Eagle MEM に仔牛血清 5%、TPB (Tryptose phosphate Broth) を 0.3%、抗生物質としてペニシリン 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml を加え、炭酸水素ナトリウムを 0.11% に添加したものを使用する。細胞の維持用としては増殖用の仔牛血清濃度を 2% にしたものを用いる。細胞の消化液には EDTA-Trypsin 液を用いる。

(c) 検体の接種

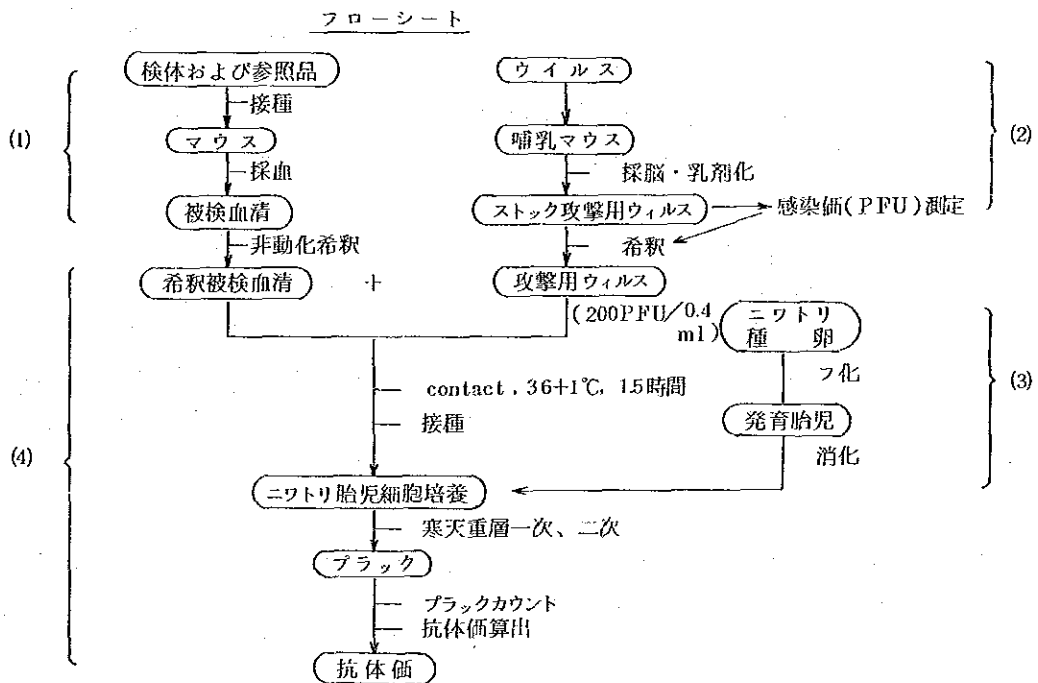
フルシートになった培養細胞の増殖用培養液を維持用培養液に交換する。Roux (大) 1 本につき透析した検体 40ml を加える。対照として、検体の代わりに PBS を添加したものをおく。14 日間観察し、細胞変性効果 (CPE) の有無を確かめ、培養液を生後 4 週のマウス 10 匹以上にそれぞれ 0.05 ml ずつ脳内に接種する。接種後 14 日間飼育観察する。

(d) 結果の判定

培養細胞及びマウスに異常が認められなかったものを適合とする。

4 力価試験 Potency test

検体をマウスに接種し、産生された中和抗体をニワトリ胎児細胞培養上のブラック減少法により測定する。



(1) 免液血清の作製

(a) 検体および参照品の復原と希釈

検体および参照品を、接種前日もしくは当日、希釈液で適当な希釈倍数に希釈する。凍結乾燥された検体および参照品は、指示された容量の蒸留水で溶解してから希釈する。溶解は希釈を行う少くとも30分以前に行う。

(b) 接種

希釈された検体および参照品を1希釈につき11～12匹のマウスの腹腔内に、0.5mlずつ7日間隔で2回接種する。

(c) 採血

第2回接種の7日後に心臓から採血する。各マウスより等量0.6mlの血液を採りプールする。

(d) 血清分離

採血した血液は36℃フラン器に約30分間おいたのち、管壁についた血餅をおとしてから冷却遠心機で1,000rpm、5～10分遠心し、血清を分離する。

(e) 保存

血清は使用時まで、ディープフリーザー(−20℃)に保存しておく。

(2) 攻撃用ストックウイルスの作製

(a) ウイルス希釈

シードウイルス(感染価約 $10^9 \sim 10^{10}$ PFU/ml)を希釈液で、 $10^3 \sim 10^4$ 倍に希釈する。

(b) 接種

生後2～5日の哺乳マウスの脳内に希釈されたシードウイルスを0.02ml接種する。

(c) 採脳

3～4日目に発症した哺乳マウスの頭部を消毒用エタノールでよく拭き、眼科用はさみとピンセットで脳を取り出す。

(d) 保存

感染マウス脳は超低温槽(−70℃～−80℃)に入れ、使用時まで保存する。

(e) 感染マウス脳乳剤の作製

(i) 乳剤化

超低温槽に保存された感染マウス脳を取出し、室温で融解する。上皿天秤で秤量し、必要量の感染マウス脳をホモカップに移す。10%の乳剤になるように希釈液を加えて、氷水中で冷却しながら乳剤化する。

(ii) 乳剤の遠心

乳剤は高速遠心用チューブにカピラールに移す。8,000～10,000rpm、30分間遠心し、その上清をカピラールピペットでビンに移す。

(iii) 保存

ビンをよく振盪して均質化したのち、ストックチューブに2mlずつ入れ超低温槽に保存する。

(-) 感染価の測定

凍結された攻撃用ストックウイルスを取出し、予めウイルス量を測っておく。(感染価測定は中和試験の項参照)

(3) 培養細胞の作製

(a) 種卵の消毒

気室の部分の卵殻にヨードチンキを塗り、さらに消毒用エタノール綿でヨードをよく拭きとる。

(b) ニワトリ胎児の取出し

卵殻をはさみで気室にそって切りとり、歯科用のピンセット(先端の曲ったもの)で胎児の頭をひっかけて取出し、ペトリ皿に入れる。

(c) 頭部、内臓の除去と洗浄

眼科用はさみとピンセットを使い、ペトリ皿の中で、胎児の頭を切り取り、次いで、腹部を切開し内臓を除去する。頭と内臓を切除された胎児は、予め洗浄液を入れた洗浄ビンに移す。必要数の胎児の頭部・内臓除去が終わったら、洗浄ビンを強く振って胎児に付着した血液をなるべくよくおとし、ステンレス製メッシュ籠に胎児を流し込み、その上からさらにPBS(-)をかけて血液をよく洗い流す。血液の付着のひどい時にはメッシュ籠から洗浄ビンに胎児をもどし、PBSを入れて、強く揺る洗浄を数回繰返す。

(d) 胎児の細切と消化

よく血液をおとした胎児をメッシュ籠からロートを使って胎児細切用シリンダーに移し、内筒を押し、胎児を消化フラスコ中に押出す。消化フラスコに0.25%トリプシン液を注ぎ振盪してよく搅拌する。消化液の量は、2~3gの胎児一匹につき5ml位がよい。消化フラスコに攪拌子(stirring bar)を入れ、マグネチックスターラーの上ののせてゆっくり搅拌しながら消化する。

消化が終わったら、漏過装置を使って骨や未消化の肉片を除去した後、遠心管に分注し、1,000rpmで約10分間遠心する。

(e) 細胞浮遊液の作製

LE液を適量加え遠心管を振ってよく混合し、これをガーゼ1枚を張ったロートを通して漏過する。細胞浮遊液をチュルク氏液で40倍または、80倍に希釈し、血球計算板を使って、細胞数を算出する。算出した細胞数をもとにLE液、HSA抗体を含まない仔牛血清をそれぞれ添加し、細胞数が400~600万cells/mlになるように調整する。

さらに、細胞浮遊液をガーゼ2枚を張ったロートを通して、もう一度漏過する。

(f) ペトリ皿への分注と培養

でき上がった細胞浮遊液は10mlの分注器で内径70mmのペトリ皿に8mlずつ分注し、36°C CO₂-フラン器中で一日培養する。

(4) 中和試験 Neutralization test

(a) 被検血清の非働化

被検血清を希釈液10倍に希釈してから、56℃の恒温槽に入れ、30分間加熱非働化する。

(b) 被検血清の希釈

10倍に希釈され非働化された血清をさらに所定の希釈倍数(32倍)に中和用希釈液で希釈し、所定の量(1.2ml)ずつ小試験管に入れる。

(c) ストック攻撃用ウイルス浮遊液の希釈

予め、ウイルス含量を測り、超低温槽に保存されてあるストックウイルス浮遊液を取出し、融解したのち、0.4mlあたり200PFUの感染ウイルス粒子を含むように、中和試験用希釈液で希釈する。

(d) 被検血清と攻撃用ウイルス浮遊液の混合

小試験管に入れられた被検血清1.2mlに200PFU/0.4mlを含むウイルス浮遊液を等量加える。よく振盪攪拌したのち、35±1℃フラン器内で1.5時間おく。別に攻撃用ウイルス浮遊液と希釈液の等量を混合したものをおく。contactが終了したら氷水中につけておく。

(e) ニワトリ胎児細胞の洗浄

ペトリ皿の培養上清を吸引装置を使って吸引除去する。次に細胞洗浄液を8~10mlずつ静かにペトリ皿に注ぎ軽く揺ったのち、洗浄液を吸引除去する。

(f) 培養細胞への接種

contactの終わったウイルス浮遊液・被検血清の各混合を、ペトリ皿1枚につき0.4mlずつ4枚の培養細胞に接種する。また、別につくったウイルス浮遊液と希釈液の混合を10枚以上の細胞培養に0.4mlずつ接種し、対照とする。

(g) ウイルス吸着

接種の終わったペトリ皿は、前後左右に傾けて接種液が細胞面すべてにゆきわたるようにし、ナンバーをつけてtrayに並べ35±1℃のCO₂-フラン器内に1.5時間をおく。

(h) 寒天培養の重層(第一次)

ウイルスの吸着が終わったら、フラン器からペトリ皿を取出し、寒天培地を1ペトリ皿あたり8ml重層する。寒天重層培地は予め加圧滅菌し、56℃の恒温槽に入れ、あたためておいた3%寒天液と別記の栄養液とをすばやく混合し、よく攪拌してから、寒天重層用サイフォンで入れる。5~10分室温放置し、寒天がかたまったらペトリ皿を倒立(底を上)にしてtrayに並べCO₂-フラン器に入れる。

(i) 培養

35±1℃のCO₂-フラン器内で2日間培養する。

(j) 寒天培地の重層(第二次)

中性赤の入った寒天培地を8と同様に1ペトリ皿あたり4ml重層し、さらに1日培養する。

寒天重層用培地

第一次重層用

10倍 Earle 液	9.0ml
2%ラクトアルブミン水解物溶液	2.25ml

4%ブドウ糖液	9.0ml
7%炭酸水素ナトリウム液	2.9ml
10%酵母エキス液	0.45ml
ペニシリン・ストレプトマイシン液	0.2ml
(ペニシリンG 10万単位、および硫酸ジヒドロストレプトマイシン100mg)	
蒸留水	0.5ml

寒天 0.9g を蒸留水 45.0ml に加え、滅菌し、冷却して 45℃ とする。これに漏過滅菌した上記を混合する。

第二次重層用

10倍 Earle 液	100ml
1,200倍ニュートラルレッド液	100ml
寒天	10g

蒸留水 800g に寒天を加え、滅菌し、冷却して約 45℃ とする。これに 10倍 Earle 液、滅菌した 1,200倍ニュートラルレッド液を混合する。

(k) ブラックの計数

第二次寒天重層の翌日、ブラックが認められるようになったら、すべてのペトリ皿のブラックを印をつけながら数え、プロトコールに記入する。

(l) 抗体価の算出

(i) Poisson の分布にあうかどうかの検定

得られた対照ブラックが Poisson の分布に従うかどうかを決めるには χ^2 を求め (自由度: $n - 1$) これを χ^2 表 (付表 2) にてらして確率を調べて判定する。

(ii) チャート法による中和抗体価の算出

対照ブラック数の平均値を算出する。

各血清希釈のブラック数の平均を算出し、対照ブラックの平均値に対する減少率を算出する。数表 (付表 1) を使って、血清の希釈倍数とブラック減少率から中和抗体価を算出する。

(iii) 試験の成績を比較し、検体の力価が参照品と同等以上であるとき適合とする。

附表 1 - 1

	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
10	0.163	0.464	0.765	1.066	1.367	1.668	1.969	2.270	2.571	2.872
11	0.183	0.484	0.785	1.086	1.387	1.688	1.989	2.290	2.591	2.892
12	0.204	0.505	0.806	1.107	1.408	1.709	2.010	2.311	2.612	2.913
13	0.225	0.526	0.827	1.128	1.429	1.730	2.031	2.332	2.633	2.934
14	0.246	0.547	0.848	1.149	1.450	1.751	2.052	2.353	2.654	2.955
15	0.267	0.568	0.869	1.170	1.471	1.772	2.073	2.374	2.675	2.976
16	0.288	0.589	0.890	1.191	1.492	1.793	2.094	2.395	2.696	2.997
17	0.309	0.610	0.911	1.212	1.513	1.814	2.115	2.416	2.717	3.018
18	0.330	0.631	0.932	1.233	1.534	1.835	2.136	2.437	2.738	3.039
19	0.351	0.652	0.953	1.254	1.555	1.856	2.157	2.458	2.759	3.060
20	0.372	0.673	0.974	1.275	1.576	1.877	2.178	2.479	2.780	3.081
21	0.393	0.694	0.995	1.296	1.597	1.898	2.199	2.500	2.801	3.102
22	0.414	0.715	1.016	1.317	1.618	1.919	2.220	2.521	2.822	3.123
23	0.435	0.736	1.037	1.338	1.639	1.940	2.241	2.542	2.843	3.144
24	0.456	0.757	1.058	1.359	1.660	1.961	2.262	2.563	2.864	3.165
25	0.477	0.778	1.079	1.380	1.681	1.982	2.283	2.584	2.885	3.186
26	0.498	0.799	1.100	1.401	1.702	2.003	2.304	2.605	2.906	3.207
27	0.518	0.819	1.120	1.421	1.722	2.023	2.324	2.625	2.926	3.227
28	0.539	0.840	1.141	1.442	1.743	2.044	2.345	2.646	2.947	3.248
29	0.560	0.861	1.162	1.463	1.764	2.065	2.366	2.667	2.968	3.269
30	0.581	0.882	1.183	1.484	1.785	2.086	2.387	2.688	2.989	3.290
31	0.602	0.903	1.204	1.505	1.806	2.107	2.408	2.709	3.010	3.311
32	0.623	0.924	1.225	1.526	1.827	2.128	2.429	2.730	3.031	3.332
33	0.644	0.945	1.246	1.547	1.848	2.149	2.450	2.751	3.052	3.353
34	0.665	0.966	1.267	1.568	1.869	2.170	2.471	2.772	3.073	3.374
35	0.686	0.987	1.288	1.589	1.890	2.191	2.492	2.793	3.094	3.395
36	0.707	1.008	1.309	1.610	1.911	2.212	2.513	2.814	3.115	3.416
37	0.728	1.029	1.330	1.631	1.932	2.233	2.534	2.835	3.136	3.437
38	0.749	1.050	1.351	1.652	1.953	2.254	2.555	2.856	3.157	3.458
39	0.770	1.071	1.372	1.673	1.974	2.275	2.576	2.877	3.178	3.479
40	0.791	1.092	1.393	1.694	1.995	2.296	2.597	2.898	3.199	3.500
41	0.812	1.113	1.414	1.715	2.016	2.317	2.618	2.919	3.220	3.521
42	0.833	1.134	1.435	1.736	2.037	2.338	2.639	2.940	3.241	3.542
43	0.853	1.154	1.455	1.756	2.057	2.358	2.659	2.960	3.261	3.562
44	0.874	1.175	1.476	1.777	2.078	2.379	2.680	2.981	3.282	3.583
45	0.895	1.196	1.497	1.798	2.099	2.400	2.701	3.002	3.303	3.604
46	0.916	1.217	1.518	1.819	2.120	2.421	2.722	3.023	3.324	3.625
47	0.937	1.238	1.539	1.840	2.141	2.442	2.743	3.044	3.345	3.646
48	0.958	1.259	1.560	1.861	2.162	2.463	2.764	3.065	3.366	3.667
49	0.979	1.280	1.581	1.882	2.183	2.484	2.785	3.086	3.387	3.688
50	1.000	1.301	1.602	1.903	2.204	2.505	2.806	3.107	3.408	3.709
51	1.021	1.322	1.623	1.924	2.225	2.526	2.827	3.128	3.429	3.730
52	1.042	1.343	1.644	1.945	2.246	2.547	2.848	3.149	3.450	3.751
53	1.063	1.364	1.665	1.966	2.267	2.568	2.869	3.170	3.471	3.772
54	1.084	1.385	1.686	1.987	2.288	2.589	2.890	3.191	3.492	3.793
55	1.105	1.406	1.707	2.008	2.309	2.610	2.911	3.212	3.513	3.814

Plaque reduction rate (%)

付表 1 - 2

	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
56	1.126	1.427	1.728	2.029	2.330	2.631	2.932	3.233	3.534	3.835
57	1.147	1.448	1.749	2.050	2.351	2.652	2.953	3.254	3.555	3.856
58	1.167	1.468	1.769	2.070	2.371	2.672	2.973	3.274	3.575	3.876
59	1.188	1.489	1.790	2.091	2.392	2.693	2.994	3.295	3.596	3.897
60	1.209	1.510	1.811	2.112	2.413	2.714	3.015	3.316	3.617	3.918
61	1.230	1.531	1.832	2.133	2.434	2.735	3.036	3.337	3.638	3.939
62	1.251	1.552	1.853	2.154	2.455	2.756	3.057	3.358	3.659	3.960
63	1.272	1.573	1.874	2.175	2.476	2.777	3.078	3.379	3.680	3.981
64	1.293	1.594	1.895	2.196	2.497	2.798	3.099	3.400	3.701	4.002
65	1.314	1.615	1.916	2.217	2.518	2.819	3.120	3.421	3.722	4.023
66	1.335	1.636	1.937	2.238	2.539	2.840	3.141	3.442	3.743	4.044
67	1.356	1.657	1.958	2.259	2.560	2.861	3.162	3.463	3.764	4.065
68	1.377	1.678	1.979	2.280	2.581	2.882	3.183	3.484	3.785	4.086
69	1.398	1.699	2.000	2.301	2.602	2.903	3.204	3.505	3.806	4.107
70	1.419	1.720	2.021	2.322	2.623	2.924	3.225	3.526	3.827	4.128
71	1.440	1.741	2.042	2.343	2.644	2.945	3.246	3.547	3.848	4.149
72	1.461	1.762	2.063	2.364	2.665	2.966	3.267	3.568	3.869	4.170
73	1.482	1.782	2.084	2.385	2.686	2.987	3.288	3.589	3.890	4.191
74	1.502	1.803	2.104	2.405	2.706	3.007	3.308	3.609	3.910	4.211
75	1.523	1.824	2.125	2.426	2.727	3.028	3.329	3.630	3.931	4.232
76	1.544	1.845	2.146	2.447	2.748	3.049	3.350	3.651	3.952	4.253
77	1.565	1.866	2.167	2.468	2.769	3.070	3.371	3.672	3.973	4.274
78	1.586	1.887	2.188	2.489	2.790	3.091	3.392	3.693	3.994	4.295
79	1.607	1.908	2.209	2.510	2.811	3.112	3.413	3.714	4.015	4.316
80	1.628	1.929	2.230	2.531	2.832	3.133	3.434	3.735	4.036	4.337
81	1.649	1.950	2.251	2.552	2.853	3.154	3.455	3.756	4.057	4.358
82	1.670	1.971	2.272	2.573	2.874	3.175	3.476	3.777	4.078	4.379
83	1.691	1.992	2.293	2.594	2.895	3.196	3.497	3.798	4.099	4.400
84	1.712	2.013	2.314	2.615	2.916	3.217	3.518	3.819	4.120	4.421
85	1.733	2.034	2.335	2.636	2.937	3.238	3.539	3.840	4.141	4.442
86	1.754	2.055	2.356	2.657	2.958	3.259	3.560	3.861	4.162	4.463
87	1.775	2.076	2.377	2.678	2.979	3.280	3.581	3.882	4.183	4.484
88	1.796	2.097	2.398	2.699	3.000	3.301	3.602	3.903	4.204	4.505
89	1.817	2.118	2.419	2.720	3.021	3.322	3.623	3.924	4.225	4.526
90	1.837	2.138	2.439	2.740	3.041	3.342	3.643	3.944	4.245	4.546

(550×) (×1100) (×2200) (×4400) (×8800) (×17600) (×35200)

使 用 法

表の取値は、各血清希釈（列）でえられたブラック減少率（行）から求められる50%のブラック減少率を得るための対数抗体価である。

例 血清希釈40倍のとき、63%のブラックを得た。この血清で50%のブラックをえるための対数抗体価は？

表の左の第1列のブラック減少率の63%と血清希釈の40の交点の1.874が求める値である。

図は各血清希釈（斜線）、ブラック減少率（縦軸）と50%ブラック減少率（横軸）の関係を現わすグラフである。

例 縦軸の63%点より、横軸に平行に線を伸ばし、血清希釈40倍の線との交点より横軸に垂直に線を下し、その横軸との交点の値1.874が求める値である。

付表 2

χ^2 表

(自由度 ϕ と上側確率 P とから χ^2 を求める表)

$$P = \int_{\chi^2}^{\infty} \frac{1}{\Gamma\left(\frac{\phi}{2}\right)} e^{-\frac{\chi^2}{2}} \left(\frac{\chi^2}{2}\right)^{\frac{\phi}{2}-1} \frac{d\chi^2}{2}$$

										P	ϕ
.95	.90	.75	.50	.25	.10	.05	.025	.01	.005		
.01993	0.158	0.102	0.455	1.323	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88	1	
0.103	0.211	0.575	1.386	2.77	4.61	5.99	7.33	9.21	10.60	2	
0.352	0.584	1.213	2.37	4.11	6.25	7.81	9.35	11.34	12.84	3	
0.711	1.064	1.923	3.36	5.39	7.78	9.49	11.14	13.28	14.86	4	
1.145	1.610	2.67	4.35	6.63	9.24	11.07	12.83	15.09	16.75	5	
1.635	2.20	3.45	5.35	7.84	10.64	12.59	14.45	16.81	18.55	6	
2.17	2.83	4.25	6.35	9.04	12.02	14.07	16.01	18.48	20.3	7	
2.73	3.49	5.07	7.34	10.22	13.36	15.51	17.53	20.1	22.0	8	
3.33	4.17	5.90	8.34	11.39	14.68	16.92	19.02	21.7	23.6	9	
3.94	4.87	6.74	9.34	12.55	15.99	18.31	20.5	22.2	25.2	10	
4.57	5.58	7.58	10.34	13.70	17.28	19.68	21.9	24.7	26.8	11	
5.23	6.30	8.44	11.34	14.85	18.55	21.0	23.3	26.2	28.3	12	
5.89	7.04	9.30	12.34	15.98	19.81	22.4	24.7	27.7	29.8	13	
6.57	7.79	10.17	13.34	17.12	21.1	23.7	26.1	29.1	31.3	14	
7.26	8.55	11.04	14.34	18.25	22.3	25.0	27.5	30.6	32.8	15	
7.96	9.31	11.91	15.34	19.37	23.5	26.3	28.8	32.0	34.3	16	
8.67	10.09	12.79	16.34	20.5	24.8	27.6	30.2	33.4	35.7	17	
9.39	10.86	13.68	17.34	21.6	26.0	28.9	31.5	34.8	37.2	18	
10.12	11.65	14.56	18.34	22.7	27.2	30.1	32.9	36.2	38.6	19	
10.85	12.44	15.45	19.34	23.8	28.4	31.4	34.2	37.6	40.0	20	
11.59	13.24	16.34	20.3	24.9	29.6	32.7	35.5	38.9	41.4	21	
12.34	14.04	17.24	21.3	26.0	30.8	33.9	36.8	40.3	42.8	22	
13.09	14.85	18.14	22.3	27.1	32.0	35.2	38.1	41.6	44.2	23	
13.85	15.65	19.04	23.3	28.2	33.2	36.4	39.4	43.00	45.6	24	
14.61	16.47	19.94	24.3	29.3	34.4	37.7	40.6	44.3	46.9	25	
15.38	17.29	20.8	25.3	30.4	35.6	38.9	41.9	45.6	48.3	26	
16.15	18.11	21.7	26.3	31.5	36.7	40.1	43.2	47.0	49.6	27	
16.93	18.94	22.7	27.3	32.6	37.9	41.3	44.5	48.3	51.0	28	
17.71	19.77	23.6	28.3	33.7	39.1	42.6	45.7	49.6	52.3	29	
18.49	20.6	24.5	29.3	34.8	40.3	43.8	47.0	50.9	53.7	30	
26.5	29.1	33.7	39.3	45.6	51.8	55.8	59.3	63.7	66.8	40	
34.3	37.7	42.9	49.3	56.3	63.2	67.5	71.4	76.2	79.5	50	
43.2	46.5	52.3	59.3	67.0	74.1	79.1	83.3	88.4	92.0	60	
51.7	55.3	61.7	69.3	77.6	85.5	90.5	95.0	100.4	104.2	70	
60.4	64.3	71.1	79.3	88.1	96.6	101.9	106.6	112.3	116.3	80	
69.1	73.3	80.6	89.3	98.6	107.6	113.1	118.1	124.1	128.3	90	
77.9	82.4	90.1	99.3	109.1	118.5	124.3	129.6	135.3	140.2	100	
-1.64	-1.28	-0.674	0.000	+0.674	+1.282	+1.645	+1.96	+2.33	+2.58	y_P	

例 1. $\phi=10, P=0.05$ に対する χ^2 の値は 18.31 である。これは自由度 10 の χ^2 分布に従う確率変数が 18.31 以上の値をとる確率が 5% であることを示す。

例 2. $\phi=54, P=0.01$ に対する χ^2 の値は、 $\phi=60$ に対する値と $\phi=50$ に対する値とを用いて、 $88.4 \times 0.4 + 76.2 \times 0.6 = 81.1$ として求める。

例 3: $\phi=145, P=0.05$ に対する χ^2 の値は、Fisher の近似を用いて、 $\frac{1}{2}(y_P + \sqrt{2\phi - 1})^2 = \frac{1}{2}(1.645 + \sqrt{289})^2 = 173.8$ として求める。(y_P は表の下端にある)

5 表示確認試験 Identity test

中和試験による。(力価試験の項参照)

6 異常毒性否定試験 Test for Freedom from Abnormal Toxicity

(1) モルモット試験法 Test in guinea pigs

動物： 使用前5日間以上観察して異常を示さず、かつ、その体重が順調に推移した、体重約350gのモルモット2匹以上を用いる。

接種法： モルモット1匹あたり、検体5mlを腹腔内に接種する。

検体： 最終バルク材料及び小分品について本試験を行う。

判定： 検体接種より7日間以上体重及び発育状態を観察し、いずれのモルモットも異常を示さない時、この試験に適合とする。

(2) マウス試験法 Test in mice

動物： 使用前5日間以上観察して異常を示さず、かつ、その体重が順調に推移した、約5週令のマウス2匹以上を用いる。

接種法： マウス1匹あたり、検体0.5mlを腹腔内に接種する。

検体： 最終バルク材料について本試験を行う。

判定： 検体接種より7日間以上体重及びその他の発育状態を観察し、いずれのマウスも異常を示さない時、この試験に適合とする。

7 無菌試験法 Sterility test

(1) 細菌否定試験法 Test for bacterial sterility

(a) 培地 Culture media

液状チオグリコール酸培地(I)を用いる。

液状チオグリコール酸培地(I) Fluid Thioglycolate Medium (I)

寒天	0.75 g
L-シスチン	0.5 g
塩化ナトリウム	2.5 g
カゼイン製ペプトン	15.0 g
酵母エキス	5.0 g
ブドウ糖	5.0 g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5 g
0.1w/v% レサズリン液	1.0ml

水1,000mlに寒天以下ブドウ糖までを加えて加温して溶かす。加温をとめ、チオグリコール酸ナトリウムを溶かし、pHを7.0~7.2とし、ついで新たに作ったレサズリン液を加えて混和する。このとき、液は澄明である。ついで、所定量ずつ分注して滅菌し、25℃まで急冷する。

培地の分注量が 15 ml の場合は 20mm × 150mm の試験管を用いる。

培地は約 25℃ にしゃ光して保存する。培地の上部 30% までが淡赤色になるまでは使用できる。30% 以上が淡赤色になった場合は、1 回にかぎり、100℃ に加温し、25℃ まで急冷したものを植継試験にのみ使用してもよい。

培地の性能試験は、つぎの(i)および(ii)による。

(i) 発育試験 Growth tests

溶血レンサ球菌をブイオン培地に約 36℃ で 24 時間培養したもの、および液傷風菌を肝片加肝臓ブイオン培地その他の適当な嫌気性培地に約 36℃ で 24～48 時間培養したものを原液とする。各原液を生理食塩液でそれぞれ 100 万倍に希釈して試料とする。培地 1 本当たりそれぞれの試料 1ml を移植し、36 ± 1℃ および 31 ± 1℃ で培養するとき、72 時間以内に、いずれの温度においても各菌が明かに増殖して混濁を示す。

(ii) 酸化還元性試験 Redox tests

36 ± 1℃ および 31 ± 1℃ に 7 日間おくと、培地はいずれも上部 60% 以上が淡赤色を示さない。

(b) 検体の数量および移植量 Sampling, volume of inoculum and number of culture vessels

表 1 の試験を行なうに十分な量をとる（以下「汲取検体」という。）

表 1 汲取検体の採取量と移植数量

	検体の採取量	培地数	培地への移植
最終バルク	12 ml	16 本	(1ml ずつ 8 本 0.5ml ずつ 8 本
原液その他	6 ml	16 本	(0.5ml ずつ 8 本 0.25ml ずつ 8 本

小分製品等の試験を行なう場合には、表 2 および表 3 の試験を行なうに十分な数の小分容器を無作為に抽出してとる（以下「抜取検体」という。）。

表 2 ロットまたは分注区分ごとの小分容器数と抜取小分容器数

小分容器数	抜取小分容器数	小分容器数	抜取小分容器数
10 以下	1	201～250	6
11～50	2	251～300	7
51～100	3	301～350	8
101～150	4	351～400	9
151～200	5	401 以上	10

表3 小分容器の表示液量および1容器当たりの移植数量

表示液量	1容器当たりの移植量	1容器当たりの培地数	培地への移植
1ml未満	表示量	1本	表示量 1本
1ml以上1.5ml未満	1ml	1または2本	(1ml 1本 または0.5mlずつ2本)
1.5ml以上3ml未満	1.5ml	2本	(1ml 1本 0.5ml 1本)
3ml以上	3ml	4本	(1mlずつ2本 0.5mlずつ2本)

(c) 培養および観察 Culture and observation

培地に検体を移植したのち、十分に混ぜる。また、培養後2日目にふたたびよく混ぜる。

検体を移植した培地を2分し、それぞれ36±1℃で7日間以上培養し、2日目、3日目、6日目、および7日目に菌の発育の有無を観察する。7日目の観察で菌の発育の有無が疑わしい場合は、さらに10日目に観察する。

検体によって培地が混濁した場合、その他必要な場合には、培養の最終観察日に、新しい培地に植継ぎ、元の温度で3日間以上培養して観察する。

(2) 真菌否定試験法 Test for mycotic sterility

(a) 培地

真菌否定試験用培地

寒天	0.5g
カゼイン製ペプトン	5.0g
肉製ペプトン	5.0g
ブドウ糖	20.0g
チオグリコール酸ナトリウム	2.0g
水	1,000ml

製法は、液状チオグリコール酸培地(1)に準ずる。ただし、pHは5.7～6.0とする。

また、保存剤としてチメロサルを用いた検体を試験する場合のほかは、チオグリコール酸ナトリウムを省略することができる。

この培地は、*Aspergillus niger* および *Candida albicans* を接種し、25～28℃で5日間培養するとき、それぞれよく発育する。

(b) 検体の数量および移植量

(1)細菌否定試験法の(b)を準用する。ただし、表1の汲取検体の採取量は検体の区分にかかわらず8mlとし、8本の培地へ1mlずつ移植するものとする。汲取小分容器数は表示液量の如何にかかわらず表2による。表3において、表示液量1ml以上の場合は、すべて1容器当たり1mlを1本の培地へ移植するものとする。

(c) 培養および観察

培地に検体を移植したのち、十分に混ぜ、25～28℃に10日間以上培養する。培養後2日目にふたたびよく混ぜる。

培養の2日目、3日目、7日目および10日目に、真菌の発育の有無を観察する。10日目の観察で、真菌の発育の有無が疑わしい場合は、さらに14日目に観察する。

検体によって培地が混濁した場合、その他必要な場合には、培養の最終観察日に、新しい培地に植継ぎ、25～28℃で7日間培養する。

(3) マイコプラズマ否定試験法 Test for mycoplasma sterility

(a) 培地

マイコプラズマ否定試験用培地を用いる。

(b) 検体の数量

汲取検体は、8 ml とする。

検体の採取の日に移植を行なえないときは、検体を-20℃以下に保存する。

(c) 培養および観察

直接塗抹培養法および増菌培養法による。

(i) 直接塗抹培養法 Direct smear culture method

マイコプラズマ否定試験用培地(平板用)(以下平板培地という。)1枚当たり検体0.1mlを接種する。1検体当たり培地20枚以上を用いる。

検体を接種したのち、表面を乾燥し、36±1℃において接種数の半数ずつを、好気性および嫌気性で培養する。

(ii) 増菌培養法 Enriching culture method

10ml入りマイコプラズマ否定試験用培地(増菌用)20本に1本当たり検体0.2mlを移植する。1検体当たり培地20本以上を用いる。

検体を移植したのち、36±1℃培地の半数ずつを好気性および嫌気性で4日以上培養し、各培地から0.1mlずつをとり、それぞれ1枚の平板培地に接種し、表面を乾燥したのち、前と同条件で培養する。

移植後の各培養は、試験の終了するまで、2～5℃に保存する。

(i) 観察

それぞれの平板培地を5日間以上培養したのち、疑わしい集落を認めた場合は、ディーネス染色液で染色して鏡検する。

マイコプラズマ否定試験用培地(増菌用)

ウシ心筋浸出液培地	87.5ml
20 w/v 酵母エキス液	2.5ml
ウマ血清	10.0ml

細切したウシ心筋に2倍重量の水を加え、かき混ぜて2～5℃に約24時間おいたのち、煮沸

し、ろ紙でろ過する。ろ液に肉製ペプトンを1.0 w/v%に、また塩化ナトリウムを0.5 w/v%になるように加えて溶かし、滅菌する。pHは7.8～8.0とする。この「ウシ心筋浸出液培地」を54～55℃とし、上記の割合に20 w/v%酵母エキス液およびウマ血清を加えて混和し、さらに54～55℃に30分間おいたのち、分注する。ただし、ウマ血清はウマ血清分液15.0mlで置きかえることができる。

この培地に*M. pneumoniae* および他のマイコプラズマの1株を接種して、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で4日間培養するとき、いずれもよく増殖する。

または適当な品質の乾燥製品を記載に従って溶かし、適当な血清を10 v/v%になるように加えて混和し分注して用いてもよい。

マイコプラズマ否定試験用培地(平板用)

マイコプラズマ否定試験用培地(増菌用)に寒天1.4 w/v%を加えたものを平板に固める。

8 化学試験 Chemical tests

(1) 水素イオン濃度測定法 Test for Hydrogen Ion Concentration

(2) 蛋白窒素定量法 Test for Protein Nitrogen Content

(3) チメロサル定量法 Test for Thimerosal Content

チメロサル定量法は、(a)によってチメロサル含量を、(b)によってチメロサルの生物活性量を定量する方法である。適否の判定は、別に規定する場合を除き(c)によって行なう。

(a) チメロサル化学定量

(b) チメロサル生物活性定量

操作法

試験用菌株として表皮ブドウ球菌40・12・A株を用いる。試験用菌株を普通寒天培地に2代以上連日継代し、さらに $35 \sim 37^\circ\text{C}$ に約18時間培養したものをブイヨン培地にうえ、 $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で約18時間培養して試験菌液とする。

内径90mmのペトリざらに普通寒天培地約20mlを入れて平板に固める。別に、溶かした普通寒天培地を約 45°C に冷却し、その約100mlに試験菌液0.1mlを加えて十分に混ぜ、その4mlを普通寒天培地平板の上に分注して平等にひろげて固め、試験用培地とする。試験用培地は調製した日のうちに用いる。1試験には、2枚以上の培地を用いる。

外径7.9～8.1mm、内径5.9～6.1mm、高さ9.9～10.1mmのステンレス鋼製の滅菌した円筒4筒を試験用培地上の半径約25mmの円周上に、おのおのが中心に対して約 90° の間隔となるように10～13mmの高さから垂直に落とす。

0.02 w/v%チメロサル標準液をM/75リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液を用いて適当にうすめ試験用培地上に起こる発育阻止円の直径がそれぞれ約20および約12mmとなるようにした2希釈をつくる。このときの希釈度をそれぞれ α および β とする(以下、これらの希釈を「 S_H 」および「 S_L 」という。)。 $\alpha : \beta$ の値は、通常、1 : 4とする。

検体をM/75リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液でそれぞれ α 倍および β 倍にうすめる(以下、これらの希釈を「 U_H 」および「 U_L 」という。)

試験用培地上の4本の円筒にそれぞれ S_H 、 S_L 、 U_H および U_L をみだし、 $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で16~18時間培養したのち、各平板について、それぞれの発育阻止円の直径を0.5 mmまで正確に測定し、それぞれ合計して、 ΣS_H 、 ΣS_L 、 ΣU_H および ΣU_L とする。

検体のチメロサル生物活性濃度 C (%)をつぎの式によって求める。

$$C = 0.02 \times \frac{1}{\alpha} \times I$$

ただし、

$$\log I = \frac{(\Sigma U_H + \Sigma U_L) - (\Sigma S_H + \Sigma S_L)}{(\Sigma U_H + \Sigma S_H) - (\Sigma U_L + \Sigma S_L)} \times \log \frac{\beta}{\alpha}$$

もし、検体の α 倍および β 倍希釈による発育阻止円が過大または過小であって測定に支障をきたす場合には、 $\alpha : \beta$ の比率を变えることなく、希釈度を α' および β' とし、 β' 倍希釈による発育阻止円の直径が約12 mm以上となるようにして測定をくりかえす。このときの $C = 0.02 \times \frac{1}{\alpha'} \times I$ とする。

(c) 判定

化学定量法によるチメロサル濃度が0.012~0.007 w/v%であり、かつ、生物活性定量法による濃度が0.006 w/v %以上のとき、この試験に適合とする。

(4) ホルムアルデヒド定量法 Test for Formaldehyde Content

(5) 含湿度測定法 Test for Moisture Content

