

日本脳炎・ゲタウイルス感染症混合不活化ワクチン

平成18年8月16日付 農林水産省告示第1162号

1 定義

日本脳炎ウイルス及びゲタウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 日本脳炎ウイルス

2.1.1.1 名称

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

マウスの脳内に注射すると、死亡する。豚腎初代細胞で増殖し、がちょう、鶏初生ひな及びはとの赤血球を凝集する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、MPK-aC1 培養細胞又は適当と認められた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。

原株及び種ウイルスは、凍結して -70 以下又は凍結乾燥して5 以下で保存する。

2.1.2 ゲタウイルス

2.1.2.1 名称

ゲタウイルス MI-110 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

馬の皮下、筋肉内又は鼻腔内に接種すると、発熱及び浮腫などの症状を示す。

馬、牛、豚及び猿由来の培養細胞で CPE を伴って増殖し、がちょう赤血球を凝集する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、Vero 細胞又は適当と認められた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。

原株及び種ウイルスは、凍結して -70 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 日本脳炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 ゲタウイルス

2.2.2.1 培養細胞

EFD-C₁細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 日本脳炎ウイルス原液

2.3.1.1 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。

個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液の遠心上清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。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.4 原液の調製

不活化ウイルス液を混合し、日本脳炎ウイルス原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 ゲタウイルス原液

2.3.2.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体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。

個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液を濃縮したものを浮遊液とする。

浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.4 原液の調製

不活化ウイルス液を混合し、ゲタウイルス原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

日本脳炎ウイルス原液とゲタウイルス原液を混合し、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、3.5 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、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.2.1 日本脳炎ウイルス

3.1.1 の試験最終日に培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を 2 回洗浄後、3 群に分け、生理食塩液で調整した 0.1vol% のモルモット、がちょう及び 7 日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはなら

ない。

3.1.2.2 ゲタウイルス

3.1.1 の試験最終日に対照培養細胞の培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄後、2群に分け、生理食塩液で調整した0.1vol %のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液をそれぞれに30mLずつ重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 日本脳炎ウイルス

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.1.2 培養細胞

初代ハムスター腎細胞又は適当と認められた培養細胞を小試験管又は24穴のプレートに培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本又は4穴以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液0.5mLを加え、37℃で7日間培養し、観察する。

3.2.1.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{7.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.2.1.2 ゲタウイルス

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.2.1.2 培養細胞

Vero T細胞を小試験管又は48穴のマイクロプレートに1～2日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを、それぞれ4本又は4穴以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.2.1.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{7.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3 不活化ウイルス液の試験

3.3.1 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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 日本脳炎ウイルス

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.1.1.2 試験動物

3週齢のマウスを用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

注射材料 0.03mL を 10 匹の試験動物の脳内に注射し、14 日間観察する。

3.3.2.1.3 判定

脳炎症状を示して死亡した試験動物を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.3.2.2 ゲタウイルス

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体 5 mL を、100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて 2 ~ 5 で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

Vero T 細胞を培養びんに 2 ~ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

試料の 5 mL を 1 mL につき 3 cm² 以上の Vero T 細胞に接種し、37 で 90 分間吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37 で 10 日間培養し、観察する。

観察最終日に培養液を小試験管 4 本以上に 0.5mL ずつ採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液 (付記 2) を加え、この混合液に、VAD6.2 液 (付記 3) で洗浄調整した 0.33vol % のがちょう赤血球浮遊液を 1.0mL ずつ加え、常温で 60 分間静置後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、培養液にがちょう赤血球の凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.5 小分製品の試験

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均質な懸濁液でなければならず、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 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 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。

3.5.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は 0.1vol % 以下でなければならない。

3.5.5 蛋白窒素定量試験

一般試験法の蛋白窒素定量法を準用して試験するとき、蛋白窒素含有量は、1 mL 中 200 μ g 以下でなければならない。

3.5.6 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定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。

3.5.7 力価試験

3.5.7.1 日本脳炎力価試験

3.5.7.1.1 試験材料

3.5.7.1.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で4倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.7.1.1.2 試験動物

2～3週齢のマウスを用いる。

3.5.7.1.2 攻撃ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株葉検系又は適当と認められた株（付記4）を用いる。

3.5.7.1.3 試験方法

試験動物30匹を試験群、60匹を対照群とする。

試験第1日目及び第4日目に、注射材料0.1mLずつを試験群の腹腔内に注射する。試験第8日目に、試験群及び対照群のそれぞれ30匹に攻撃ウイルス0.2mLずつを腹腔内に注射する。さらに、対照群30匹を10匹ずつ3群に分け、各群に攻撃ウイルスを10倍、100倍及び1,000倍に希釈したものを0.2mLずつ腹腔内に注射する。試験群及び対照群について、14日間観察する。

3.5.7.1.4 判定

脳炎症状を示して死亡した動物及び生き残っても脳炎症状を示している動物を死亡したものとみなし、各群の死亡率及び攻撃ウイルスのLD₅₀を算出する。

試験群の耐過率は、40%以上でなければならない。この場合、攻撃ウイルスを注射した対照群の死亡率は90%以上、また、攻撃ウイルスのウイルス量は、0.2mL中10³LD₅₀以下でなければならない。

3.5.7.2 ゲタウイルス感染症力価試験

3.5.7.2.1 試験材料

3.5.7.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.2.1.2 試験動物

約6週齢のハムスターを用いる。

3.5.7.2.1.3 培養細胞

Vero T細胞を小試験管又は48穴マイクロプレートに培養し、単層となったものを用いる。

3.5.7.2.1.4 中和試験用ウイルス

Vero細胞で増殖させたゲタウイルスAMM-2021株を用いる。

3.5.7.2.2 試験方法

試験動物10匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料1mLずつを試験群の皮下に注射し、注射後21日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

試験群及び対照群の血清は、それぞれ2匹ずつ等量混合し、非働化する。非働化血清をウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。各混合液0.1mLずつを、それぞれ4本又は4穴の培養細胞に接種し、37℃で90分間静置した後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、37℃で7日間培養し、観察する。

3.5.7.2.3 判定

培養試験管又はマイクロプレートの2本又は2穴以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。抗体価2倍以上を中和抗体陽性と判定する。

試験群の血清の80%以上が中和抗体陽性でなければならない。この場合、対照群では、2倍未満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3か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
牛又はやぎ血清	10 ~ 20mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

牛又はやぎ血清は日本脳炎ウイルス及びゲタウイルスに対する中和抗体陰性のもので、56 30 分間非働化したものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	7.01g
ホウ酸	3.09g
水酸化ナトリウム	0.96g
牛血清アルブミン	4.0g
ゼラチン	0.01g
精製水	残 量

牛血清アルブミンを 0.4w/v % 濃度に加えた後、水酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記 3 VAD6.2 液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	20.45g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	20.06g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	22.47g
精製水	残 量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH6.2 に調整する。

付記 4 攻撃ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又は適当と認められた株を生後 3 ~ 4 週齢のマウスに脳内接種し、発症極期に採脳し、リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 10 倍乳剤とする。これを遠心した上清を攻撃ウイルスとし、原液又は必要に応じて希釈して攻撃に用いる。