馬インフルエンザ不活化・日本脳炎不活化・破傷風トキソイド混合（アジュバント加）ワクチン

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 420 号）　新規追加
平成 21 年 7 月 1 日（告示第 861 号）　一部改正

1 定義

馬インフルエンザウイルスを発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を精製・濃縮後、不活化したもの、日本脳炎ウイルスをマウスの脳又は培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したもの及び破傷風菌を培養して得た破傷風毒素を無毒化したものを混合し、アジュバントを添加したワクチン、又は両不活化ウイルス液及び破傷風毒素を無毒化したものにアジュバントを添加したものを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 馬インフルエンザウイルス株

2.1.1.1 名称

別に定める馬インフルエンザウイルスＡ型株

2.1.1.2 性状

発育鶏卵の尿膜腔内で増殖し、鶏赤血球を凝集させる。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では５代以内、種ウイルスでは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。

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

2.1.2 日本脳炎ウイルス株

2.1.2.1 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

2.1.2.2 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。

2.1.2.3 継代及び保存

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

2.1.3 破傷風菌株

2.1.3.1 名称

破傷風菌 Harvard A-47 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

培養ろ液をマウス又はモルモットの皮下に注射するとき、特異な破傷風症状を呈して死亡する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株及び種菌とも、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、その継代数とする。

原株及び種菌は、凍結乾燥して５℃以下で保存する。ただし、特に承認されたものはその条件で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 馬インフルエンザウイルス

2.2.1.1 発育鶏卵

10 ～ 12 日齢のものを用いる。

2.2.2 日本脳炎ウイルス

2.2.2.1 動物又は培養細胞

３～５週齢のマウス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。

2.2.3 破傷風菌

2.2.3.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 馬インフルエンザウイルス

2.3.1.1 ウイルスの培養

各株の種ウイルスをそれぞれ別個に発育鶏卵の尿膜腔内に注射し培養した後、感染尿膜腔液を採取し、これをそれぞれの株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの精製及び濃縮

各ウイルス浮遊液を遠心等の適当と認められた方法で精製濃縮する。この場合、適当と認められた安定剤を加えてもよい。

2.3.1.3 不活化

精製濃縮された各ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化したものをそれぞれの株の不活化ウイルス液とする。不活化ウイルス液を原液としてもよい。その場合、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

不活化ウイルス液について、3.3.1 及び 3.3.2.1 の試験を行う。不活化ウイルス液を原液とする場合、上記の試験に加え 3.5.2 の試験を行う。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液を原液としなかったものについて、不活化ウイルス液を混合し、又は適当と認められた希釈液で濃度調整し、原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.3.2 日本脳炎ウイルス

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

2.3.2.2.1 マウスを用いた培養

種ウイルスをマウスの脳内に接種し、発症極期に脳を採取して作製した乳剤のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.2 の試験を行う。

2.3.2.2.2 培養細胞を用いた培養

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

ろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.2 の試験を行う。

2.3.2.3 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。不活化ウイルス液を原液としてもよい。

不活化ウイルス液について、3.3.1 及び 3.3.2.2 の試験を行う。

2.3.2.4 原液

不活化ウイルス液を原液としなかったものについて、不活化ウイルス液を混合し、原液とする。

原液について、3.5.1 の試験を行う。

2.3.3 破傷風トキソイド

2.3.3.1 培養

適当と認められた培地で培養したものを培養菌液とする。

2.3.3.2 毒素液

培養菌液を除菌ろ過し、毒素液とする。

2.3.3.3 トキソイド化及び精製

毒素液にホルマリンを加えてトキソイド化する。トキソイド化の前又は後に適当と認められた方法で精製する。このトキソイドを含む液をトキソイド液とする。トキソイド液を原液としてもよい。その場合、適当と認められた保存剤及び安定剤を加えてもよい。

トキソイド液について、3.4 の試験を行う。

2.3.3.4 アジュバントの添加

トキソイド液を原液としなかったものについて、トキソイド液を必要な濃度に希釈し、適当と認められたアジュバントを加え調整する。この場合、適当と認められた保存剤を加える。また、適当と認められた安定剤を加えてもよい。これを原液とする。

原液について、3.5.1 の試験を行う。

2.4 最終バルク

各原液を希釈・混合し、最終バルクとする。この場合、適当と認められたアジュバント及び保存剤を加えてもよい。

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、3.6 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 %以上又は 500mL 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する。対照培養細胞をプールし、４本以上の培養びんに継代し、７日間培養し、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

3.1.1 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を２回洗浄後、３群に分け、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。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 赤血球凝集価測定試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を生理食塩液で２倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.2 試験方法

試料 0.4mL ずつに 0.5vol ％となるように調整した鶏の赤血球浮遊液を 0.4mL ずつ加え、60 分間反応させる。

3.2.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた検体の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。

検体の赤血球凝集価は、固有の範囲内になければならない。

3.2.2 ウイルス含有量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を適当と認められた希釈液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞その他適当と認められた細胞をマイクロプレート又は小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.2.2.2 試験方法

マイクロプレート法では、試料 0.1mL をそれぞれ２穴以上の培養細胞に接種し吸着させた後、重層用培地を重層し、37 ℃で５日間培養する。それを適当と認められた方法で固定した後、細胞を染色し観察する。

小試験管法では、試料 0.1mL をそれぞれ４本以上の培養細胞に接種し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。

3.2.2.3 判定

マイクロプレート法では、試料の各希釈段階の平均プラック数からウイルス含有量を算出する。検体のウイルス含有量は、１ mL 中 $10^{7.5}$PFU 以上でなければならない。

小試験管法では、培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$ を算出する。検体のウイルス含有量は、１ mL 中 $10^{7.5}TCID_{50}$ 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 馬インフルエンザウイルス

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 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の９～ 10 日齢のものを用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを６個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、32 ～ 36 ℃で培養し、３日間隔で尿膜腔液を２代まで継代する。２代目の尿膜腔液に 3.2.1.2 の赤血球浮遊液を加え、観察する。ただし、赤血球の凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量に混合して３代まで継代し、３代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後判定する。

3.3.2.1.3 判定

赤血球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。

3.3.2.2 日本脳炎ウイルス

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.2.1.2 試験動物

約３週齢のマウスを用いる。

3.3.2.2.2 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。

3.3.2.2.3 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。

3.4 トキソイド液の試験

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。

3.4.2 無毒化試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試料

検体を 1/60　mol/L リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で希釈し、最終バルクの３倍濃厚なトキソイド液を作る。また、最終バルクと同等な濃度のトキソイド液を作り、37 ℃に 20 日間置いて試料とする。

3.4.2.1.2 試験動物

体重 300 ～ 400g のモルモットを用いる。

3.4.2.2 試験方法

試験動物４匹以上を１群として、それぞれの試料を１匹当たり５ m Ｌずつ皮下注射し、21 日間観察する。

3.4.2.3 判定

観察期間中、いずれの動物も毒素による中毒症状その他の異常を認めてはならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 CCA 価測定試験

3.5.2.1 試験材料

検体及び標準インフルエンザワクチン（CCA 用）（付記１）を試験材料とする。

3.5.2.2 試験方法

ミラー・スタンレイ変法によって CCA 価を測定する。

3.5.2.3 判定

検体の CCA 価は、１ mL 中固有の範囲内になければならない。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 チメロサール定量試験

一般試験法のチメロサール定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.6.5 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、0.2vol ％以下でなければならない。

3.6.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、１ mL 中 0.5mg 以下でなければならない。

3.6.7 蛋白窒素定量試験

一般試験法の蛋白窒素定量試験法を準用して試験するとき、蛋白窒素の含有量は１ mL 中 100 μg 以下でなければならない。

3.6.8 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。

3.6.9 力価試験

3.6.9.1 馬インフルエンザウイルス

3.6.9.1.1 試験材料

3.6.9.1.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈して注射材料とする。

3.6.9.1.1.2 試験動物

４週齢のマウスを用いる。

3.6.9.1.1.3 赤血球凝集抗原

試験品に含有するそれぞれのウイルス株の赤血球凝集抗原を用いる。

3.6.9.1.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを 20 匹の試験動物の腹腔内に注射した後、４群に分け、14 日後に得られた血清を各群ごとにプールして赤血球凝集抑制試験を行う。被験血清を RDE、トリプシン、過ヨウ素酸カリウム又は適当と認められた方法で処理する。これを２倍階段希釈し、各希釈液 0.2mL に 0.4mL 中８単位の赤血球凝集抗原を 0.2mL ずつ加えて 37 ℃で 60 分間処理する。これに 3.2.1.2 の赤血球浮遊液を 0.4mL ずつ加え、60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。又は、これを２倍階段希釈し、各希釈液 25 μ L に 50 μ L 中 8 単位の赤血球凝集抗原を 25 μ L ずつ加え 37 ℃で 60 分間処理する。これに、3.2.1.2 の赤血球浮遊液を 50 μ L ずつ加え、60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.6.9.1.3 判定

赤血球凝集の抑制された最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。４群中、２群以上の赤血球凝集抑制抗体価は、８倍以上でなければならない。

3.6.9.2 日本脳炎ウイルス

3.6.9.2.1 試験材料

3.6.9.2.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.6.9.2.1.2 試験動物

２～３週齢のマウスを用いる。

3.6.9.2.1.3 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週齢のマウスの脳内に注射し、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 倍乳剤とし、これを遠心した上清を攻撃ウイルスとする。

3.6.9.2.2 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日及び第４日に注射材料 0.1mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。

試験第８日に試験群及び対照群それぞれ 30 匹に攻撃ウイルス 0.2mL ずつを腹腔内に注射する。更に、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 0.2mL ずつを腹腔内に注射する。試験群及び対照群について、14 日間観察する。

3.6.9.2.3 判定

脳炎症状を示して死亡した試験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 LD_{50} 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 10^3LD_{50} 以下でなければならない。

3.6.9.3 破傷風菌

3.6.9.3.1 試験材料

3.6.9.3.1.1 注射材料

試験品、標準沈降破傷風トキソイド（付記２。以下「標準品」という。）及び破傷風試験毒素（付記３。）（以下「毒素」という。）を用いる。

3.6.9.3.1.2 試験動物

約５週齢のマウスを用いる。

3.6.9.3.2 試験方法

試験品及び標準品をそれぞれ生理食塩液で対数的等間隔に階段希釈する。試験品及び標準品の各希釈液を、１群 10 匹以上のマウスに、１匹当たり 0.5mL ずつ外股部皮下に注射する。４～６週後に、ゼラチン加 1/60 mol/L リン酸緩衝食塩液で希釈した毒素を、それぞれ約 $100LD_{50}$/0.5mL ずつ外股部皮下に注射して７日間観察する。

3.6.9.3.3 判定

試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、試験品の力価は、40 国際単位以上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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記１　標準インフルエンザワクチン（CCA 用）
国立感染症研究所から配布される標準品で、その１ mL に 1,000CCA 単位を含むもの

付記２　標準沈降破傷風トキソイド
国立感染症研究所から配布される標準品

付記３　破傷風試験毒素
国立感染症研究所から配布される試験毒素