

狂犬病組織培養不活化ワクチン製造用原種ウイルス

1 定義

狂犬病培養細胞順化ウイルス RC・HL 株を HmLu 細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したもので、「狂犬病組織培養不活化ワクチン」の製造のための原種ウイルスである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

狂犬病培養細胞馴化ウイルス RC・HL 株

2.1.2 由来

狂犬病ウイルス固定毒西ヶ原株をマウス脳で 21 代、鶏胚で 296 代継代順化した h 株を鶏胚初代細胞で 8 代、Vero 細胞で 5 代、HmLu 細胞で 20 代継代後、更に同細胞で 3 代限界希釈継代法により、クローニングを行って作出したもので、HmLu 細胞での継代数が 26 代のものを原株とする。

2.1.3 性状

原株及び原種ウイルスは、3 日齢以内の乳のみマウスの脳内に注射すると、発病して死亡させるが、3 週齢以上のマウス、体重約 300g のモルモット、体重約 1.5kg の兎及び 1.5 か月齢の犬の脳内に注射してもほとんど病原性を示さない。

HmLu 細胞で、CPE を伴って増殖する。

2.1.4 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、HmLu 細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。

原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、3 代以内でなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結乾燥して 5 年以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

HmLu 細胞（付記 1）を用いる。

2.2.2 培養液

細胞増殖用培養液（付記 2）及びウイルス増殖用培養液 1（付記 3）を用いる。

2.3 原液

2.3.1 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。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2 原種ウイルスの培養

ウイルス増殖用培養液にそのウイルス含有量が 1 mL 中約 $10^{5.0}$ TCID₅₀ となるように浮遊させた原株ウイルスを培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間吸着後、吸引除去し、ウイルス増殖用培養液 1 を加え、32 ~ 34℃ で 5 ~ 7 日間培養し、CPE の極期に採取し、軽く遠心した上清を原種ウイルス原液とする。

原種ウイルス原液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 原種ウイルスの調整

原種ウイルス原液に 40w/v% のラクトース水溶液を 1/4 量加え、50mL 容量のバイアルに 15mL ずつ分注し、凍結乾燥したものを原種ウイルスとする。

原種ウイルスについて、3.3 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5%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する。対照培養細胞をプールし、培養びん及びカバーグラスを入れたシャーレに継代し、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 赤血球吸着試験及び赤血球凝集試験

3.1.1の観察最終日に、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、2群に分け、0.1vol%のモルモット及び豚の赤血球浮遊液をそれぞれ細胞表面に重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察する。

また、培養液の一部を採取混合し、その0.5mLずつを小分けした試験管10本を用い、その5本に上記の方法で調整した0.3vol%モルモット赤血球浮遊液を等量加え、常温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。残りの5本には等量のホウ酸緩衝食塩液(付記4)を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液(付記5)で調整した0.3vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で18時間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

培養細胞は、モルモット及び豚の赤血球を吸着してはならず、その培養液は、モルモット及び豚の赤血球を凝集してはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1の観察最終日に、培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.2 原種ウイルス原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

3.2.3 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.5.1 及び 2.6.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、中和用血清は、狂犬病ウイルス血清(付記6)を非働化したものを用いる。

3.2.4 ウイルス含有量試験

3.2.4.1 試験材料

3.2.4.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.4.1.2 培養細胞

鶏胚初代細胞を用いる。

3.2.4.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で2日間静置培養する。2日目にウイルス増殖用培養液2(付記7)に交換し、32℃で8日間静置培養し、観察する。

3.2.4.3 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 原種ウイルスの試験

3.3.1 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乾燥物でなければならな

い。溶解したものは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。

3.3.2 真空度試験

一般試験法の真空度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。

3.3.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度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。

3.3.4 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。

3.3.5 ウイルス含有量試験

検体をウイルス増殖用培養液 2 10mL で溶解し、3.2.4 の試験法を準用して試験するとき、1 mL 中のウイルス含有量は、 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.6 効力及び免疫原性確認試験

3.3.6.1 モルモットでの試験

3.5.6.1.1 試験材料

3.5.6.1.1.1 試料

新旧の検体をリン酸緩衝食塩液でそれぞれ溶解し、3.2.4 の試験法を準用して試験した後、1 mL 中のウイルス含有量を約 $10^{7.0}$ TCID₅₀ に調整する。それぞれに - プロピオラクトンを 0.0125vol% になるように加えて、4 で 48 時間感作し、ウイルスを不活化したものを試料とする。

3.5.6.1.1.2 試験動物

体重約 400g のモルモットを用いる。

3.5.6.1.1.3 攻撃ウイルス

狂犬病ウイルス CVS 株（付記 8）を用いる。モルモット咬筋内注射法で、0.2mL 中 10LD₅₀ のウイルスを含むように、2 vol % 馬血清加生理食塩液を用いて調整し、攻撃ウイルスとする。

3.5.6.1.2 試験方法

新旧の試料を 0.5mL ずつを各試験動物 10 匹の内股部皮下に注射し、試験群とする。10 匹は無処置対照群とする。注射後 21 日目に、3 群のそれぞれに攻撃ウイルスを 0.2mL ずつ咬筋内注射し、14 日間臨床観察する。

3.5.6.1.3 判定

発症しなかったものを耐過とみなし、耐過率を算出する。

両試験群の耐過率は、いずれも 70 % 以上でなければならない。この場合、対照群のそれは、20 % 以下でなければならない。

3.5.6.2 犬での試験

3.5.6.2.1 試験材料

3.5.6.2.1.1 試料

3.5.6.1.1.1 の試料を用いる。

3.5.6.2.1.2 試験動物

狂犬病ウイルスに対する抗体陰性の約 4 か月齢の犬を用いる。

3.5.6.2.2 試験方法

新旧の試料 1 mL ずつを各試験動物 3 頭の皮下に注射し、1 か月後にそれぞれから採血し、中和抗体価を狂犬病培養細胞順化ウイルス RC・HL 株を用いて測定する。

3.5.6.2.3 判定

両試験群の中和抗体価は、それぞれ幾何平均値 10 倍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、5 年間とする。

付記 1 HmLu 細胞

ハムスター肺由来の株化細胞で、国立感染症研究所から分与を受けた HmLu-1 細胞から分離されたクローンで、迷入ウイルス及びマイコプラズマの否定されたものである。製造には、クローン作出後 29 代で凍結保存されたものを原株とし、それから継代 20 代以内のものをを用いる。

付記 2 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清又は子牛血清	50 mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.1 ~ 7.3 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 3 ウイルス増殖用培養液 1

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清又は子牛血清	5 ~ 10 mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	10.52 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g

水酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記 5 VAD6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.77 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	5.68 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	40.56 g

ホウ酸緩衝食塩液と等量混合したとき pH を 6.0 になるように調整する。

付記 6 抗狂犬病ウイルス血清

狂犬病ウイルスで免疫した兎又は山羊の血清で、検体中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 7 ウイルス増殖用培養液 2

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.5 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 8 狂犬病ウイルス CVS 株

狂犬病ウイルス CVS 株を 3 週齢マウスの脳内に接種し、症状を示したマウスの脳を採取し、2 vol % 馬血清加生理食塩液を用いて乳剤としたもの

ウイルス含有量は、体重約 400 g のモルモットの咬筋内注射法で測定するとき、0.2mL 中 $10^{2.5}LD_{50}$ 以上でなければならない。