

日本脳炎生ワクチン

1 定義

弱毒日本脳炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒日本脳炎ウイルス S₁株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

1 か月齢の豚に接種してもウイルス血症が出現しない。妊娠 1 か月前後の豚に接種しても胎子に感染しない。コガタアカイエカに対する感染率が著しく低下している。乳のみマウスの脳内又は豚腎若しくは豚精巣初代細胞で増殖する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.7.1 の牛腎初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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。種ウイルスは、原種ウイルスから 2 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.7.1 の牛腎初代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 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 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 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別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、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、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、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。

ただし、製造に継代細胞を用いている場合には、3.1.3 及び 3.1.4 の試験を行わなくてもよい。

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本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、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

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。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1の試験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。

3.1.4 迷入ウイルス否定試験

3.1.1の試験最終日に採取した培養液を試料として、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.3.1、2.3.2及び2.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 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 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、2.3.1、2.3.2、2.4.1、2.4.2、2.7.2.1及び2.8.2(牛由来細胞以外の細胞を用いて製造したものにあっては、1.1、2.3.1、2.3.2、2.4.2、2.7.2.1及び2.8.2)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、抗日本脳炎ウイルス血清(付記1)を非働化したものを用いる。

3.2.3 ウイルス含有量試験

マウス接種試験又は培養細胞接種試験により行う。

3.2.3.1 マウス接種試験

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液又は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。

3.2.3.1.1.2 試験動物

2日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.2.3.1.2 試験方法

試料0.02mLずつを4匹以上の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

3.2.3.1.3 判定

脳炎症状を示して死亡したマウスを感染とみなし、LD₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{7.0}LD₅₀以上でなければならない。

3.2.3.2 培養細胞接種試験

3.2.3.2.1 試験材料

3.2.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液(付記2)で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.2.1.2 培養細胞

Vero細胞又はESK細胞その他適当と認められた培養細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.2.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本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

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。

3.2.3.2.3 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、1 mL 中 10^{7.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.4 マーカー試験

3.2.4.1 試験材料

3.2.4.1.1 注射材料

検体及び対照として中山株葉検系を用い、それぞれのウイルスが 1 mL 中に 10^{7.0}TCID₅₀ 又は 10^{7.0}LD₅₀ 以上含まれるように調整したものを、注射材料とする。

3.2.4.1.2 試験動物

3 週齢のマウスを用いる。

3.2.4.2 試験方法

注射材料 0.3mL ずつを 10 匹以上の試験動物の腹腔内に注射し、14 日間観察する。

3.2.4.3 判定

検体を注射したマウスの死亡率は、20 % 以下でなければならない。この場合、対照を注射したマウスの死亡率は、80 % 以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

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液体又は均質な懸濁液でなければならない。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 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。

ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

3.3.6 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、2.3.1 及び 2.3.2 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、抗日本脳炎ウイルス血清を非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.3 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{5.0}LD₅₀ 又は 10^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.8 安全試験

3.3.8.1 試験材料

3.3.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.8.1.2 試験動物

約 1 か月齢の豚を用いる。

3.3.8.2 試験方法

試験動物 3 頭を試験群、1 頭を対照群とする。試験群に注射材料 1 頭分を用法に従って注射し、対照群とともに 3 週間観察する。

3.3.8.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.3.9 力価試験

赤血球凝集抑制反応又は中和試験により行う。

3.3.9.1 赤血球凝集抑制反応

3.3.9.1.1 試験材料

3.3.9.1.1.1 試験動物

3.3.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.9.1.1.2 赤血球凝集抗原

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用いて調製した赤血球凝集抗原（付記 3）を用いる。

3.3.9.1.2 試験方法

3.3.8 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清を 25w/v% カオリン液又はアセトンを加えて処理し、がちょう又は 7 日齢以内の鶏の赤血球で処理した後、非働化する。各処理血清を、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 4）又は適当と認められた希釈液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清に 8 単位の赤血球凝集抗原を加えて 4 で一夜処理した後、VAD 液（付記 5）で調整した 0.33vol% のがちょう又は 7 日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を加え、37 で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.9.1.3 判定

赤血球の凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、20 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍未満でなければならない。

3.3.9.2 中和試験

3.3.9.2.1 試験材料

3.3.9.2.1.1 試験動物

3.3.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.9.2.1.2 中和試験用ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又は JaGAr-01 株その他適当と認められた株を用いる。

3.3.9.2.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞をシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

3.3.9.2.2 試験方法

3.3.8 の試験最終日に試験群及び対照群から得た血清について、中和試験を行う。試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.4mL 中約 200PFU の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 で 90 分間処理する。この各混合液 0.4mL ずつをそれぞれ 4 枚の培養細胞に接種し、37 で 60 分間静置吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 6）を加え、37 で 3 日間培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 7）を重層し、37 で 1 日間培養し、ブラック数を算出する。

3.3.9.2.3 判定

ブラック数がウイルス対照の 50 % 以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の中和抗体価は、20 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 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、1年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記 1 抗日本脳炎ウイルス血清

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で免疫した兔又はモルモットの血清で、検体又は試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 2 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 2.95 g

牛血清 20 ~ 50 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 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 赤血球凝集抗原

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用いて調製した赤血球凝集抗原で、赤血球凝集価は 64 倍以上のもの

付記 4 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 10.52 g

ホウ酸 3.09 g

水酸化ナトリウム 0.96 g

水 残 量

牛血清アルブミンを 0.2w/v% となるように加えた後、水酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記 5 VAD 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

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、pH を 6.0 に調整する。

付記 6 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 20 ~ 50 mL

寒天 10 g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記7 第2次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

ニュートラルレッド

0.5 g

寒天

10 g

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。