

日本脳炎不活化ワクチン

省 略

平成 14 年 10 月 3 日（告示第 1567 号） 一部改正

平成 16 年 12 月 13 日（告示第 2152 号） 一部改正

1 定義

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ワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 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

2.1.2 性状

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。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、マウスの脳で継代する。

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 動物又は培養細胞

3 ~ 5 週齢のマウス又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相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

2.3.2.1 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 の試験を行う。

2.3.2.2 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 の試験を行う。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は相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。

2.3.4 原液

不活化ウイルス液を混合し、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

原液を混合し、適当と認められた希釈液で濃度調整し、最終バルクとする。
この場合、適当と認められた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、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

静置培養の場合は、個体別培養細胞の 1 % 以上を、ファーメンター培養の場合は、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。

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 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 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。

3.2.1.1 マウス接種試験

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 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。

3.2.1.1.1.2 試験動物

約 3 週齢のマウスを用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料 0.03mL 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。

3.2.1.1.3 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^{7.5}LD₅₀ 以上でなければならない。

3.2.1.2 培養細胞接種試験

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

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小試験管に培養し、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。

3.2.1.2.3 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^{7.5}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 試験材料

3.3.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.1.2 試験動物

3 週齢のマウスを用いる。

3.3.2.2 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。

3.3.2.3 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 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液体又は均質な懸濁液でなければならない。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 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサ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。

3.5.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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。

3.5.6 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 試験材料

3.5.7.1.1 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。

3.5.7.1.2 試験動物

2 ~ 3 週齢のマウスを用いる。

3.5.7.2 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（付記 2）を用いる。

3.5.7.3 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。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 倍に希釈したものを 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。

3.5.7.4 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。

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 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

牛血清又はやぎ血清

0 ~ 50 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 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 2 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する。