

日本脳炎・豚パルボウイルス感染症混合生ワクチン

1 定義

弱毒日本脳炎ウイルス及び弱毒豚パルボウイルスを、それぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を混合し、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 日本脳炎ウイルス

2.1.1.1 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

2.1.1.2 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仔に感染しない。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巢初代細胞で増殖する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、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。

2.1.2 豚パルボウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒豚パルボウイルス HT₁/SK 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

子豚に注射しても临床上異常を認めず、ウイルス血症及びウイルス排出を認めない。また、妊娠豚に注射しても胎仔・胎盤感染及び死亡を認めない。

豚腎由来細胞に接種したとき、32℃での増殖は 37℃での増殖を上回る。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、豚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 日本脳炎ウイルス

2.2.1.1 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。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 豚パルボウイルス

2.2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.6.1 の豚腎初代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に相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

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原液とする。

原液について、3.2.1、3.2.2.1、3.2.3.1 及び 3.2.4.1 の試験を行う。

2.3.2 豚パルボウイルス

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。

2.3.2.2 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、3.2.1、3.2.2.2、3.2.3.2 及び 3.2.4.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

日本脳炎ウイルス原液及び豚パルボウイルス原液を混合し、相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

静置培養の場合は、個別培養細胞の 1 % 以上を、ファーメンター培養の場合は、個別培養細胞の 1 vol% 以上又は 500mL 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 の観察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

3.2.2.1 日本脳炎ウイルス

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のものにあっては、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。

3.2.2.2 豚パルボウイルス

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、2.4.2 及び 2.7.2.1 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、抗豚パルボウイルス血清（付記 2）を非働化したものを用いる。

3.2.3 ウイルス含有量試験

3.2.3.1 日本脳炎ウイルス

マウス接種試験又は培養細胞接種試験により行う。

3.2.3.1.1 マウス接種試験

3.2.3.1.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1.1 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。

3.2.3.1.1.1.2 試験動物

2 日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.2.3.1.1.2 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。

3.2.3.1.1.3 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。

3.2.3.1.2 培養細胞接種試験

3.2.3.1.2.1 試験材料

3.2.3.1.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 3）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.1.2.1.2 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。

3.2.3.1.2.2 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。

3.2.3.1.2.3 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^{7.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.3.2 豚パルボウイルス

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

豚腎初代細胞又は ESK 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。

3.2.3.2.2 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、ウイルス増殖用培養液 1 mL を加え、31 ~ 32℃ で 10 ~ 14 日間培養後、ペロナル緩衝食塩液（付記 4）（以下「VBS」）という。）で調整した 0.5vol% の非凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液をそれぞれ 0.4mL ずつ加え、室温で 60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.3.2.3 判定

赤血球の凝集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^{5.7}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 日本脳炎ウイルス

3.2.4.1.1 試験材料

3.2.4.1.1.1 注射材料

検体及び対照として中山株薬検系を用い、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。

3.2.4.1.1.2 試験動物

3 週齢のマウスを用いる。

3.2.4.1.2 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。

3.2.4.1.3 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。

3.2.4.2 豚パルボウイルス

3.2.4.2.1 試験材料

3.2.4.2.1.1 試料

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

3.2.4.2.1.2 培養細胞

豚腎初代細胞又は ESK 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。

3.2.4.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 8 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 1 mL を加え、2 群に分け、31 ~ 32℃ 及び 37℃ でそれぞれ 10 ~ 14 日間培養する。培養終了時に、3.2.3.2.2 の赤血球浮遊液をそれぞれ 0.4mL ずつ加え、室温で 60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.4.2.3 判定

検体のウイルス含有量は、32℃ で培養するとき、37℃ で培養する場合より 100 倍以上高くなければならない。

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 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及び抗豚パルボ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

3.3.7.1 日本脳炎ウイルス

3.2.3.1 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 $10^{5.0}LD_{50}$ 又は $10^{5.0}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の豚パルボウイルスを、抗豚パルボウイルス血清を非働化したもので中和したものを試料とする。

3.3.7.2 豚パルボウイルス

3.2.3.2 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 $10^{5.0}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の日本脳炎ウイルスを、抗日本脳炎ウイルス血清を非働化したもので中和したものを試料とする。

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それぞれ注射し、対照群とともに 21 日間観察する。

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

3.3.9.1 日本脳炎ウイルス

赤血球凝集抑制試験又は中和試験により行う。

3.3.9.1.1 赤血球凝集抑制試験

3.3.9.1.1.1 試験材料

3.3.9.1.1.1.1 試験動物

3.3.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.9.1.1.1.2 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 5）を用いる。

3.3.9.1.1.2 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 6）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 7）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。

3.3.9.1.1.3 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。

3.3.9.1.2 中和試験

3.3.9.1.2.1 試験材料

3.3.9.1.2.1.1 試験動物

3.3.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.9.1.2.1.2 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。

3.3.9.1.2.1.3 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。

3.3.9.1.2.2 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られた血清について、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。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 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 8）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 9）を重層し、37 で 1 日間培養し、ブラック数を算出する。

3.3.9.1.2.3 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。

3.3.9.2 豚パルボウイルス

3.3.9.2.1 試験材料

3.3.9.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.3.9.2.1.3 赤血球凝集抗原

豚パルボウイルス 90HS 株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 10）

を用いる。

3.3.9.2.2 試験方法

注射材料 5 mL ずつを、5 匹の試験動物の腹腔内に 4 週間隔で 2 回注射し、第 2 回目の注射後 14 日目に得られた各個体の血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を VBS で 5 倍に希釈し、等量の 25w/v% カオリン液を加え、室温で 20 分間処理する。遠心後の上清に鶏又はモルモットの赤血球を加え、室温で 15 分間処理し、再度遠心し、上清を採取する。これを VBS で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液に 8 単位の赤血球凝集抗原を等量加え、4 で一夜処理する。これに 3.2.3.2.2 の赤血球浮遊液を加え、室温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.9.2.3 判定

赤血球凝集を阻止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。

赤血球凝集抑制抗体価 20 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80 % 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、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兎又はモルモットの血清で、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 2 抗豚パルボウイルス血清

豚パルボウイルス 90HS 株又は適当と認められた株で免疫した兎又はモルモットの血清で、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 3 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

又は牛血清アルブミン 1 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 4 ベロナール緩衝食塩液 (pH7.2)

1,000mL 中

バルビタール 0.575 g

バルビタールナトリウム 0.375 g

塩化ナトリウム 8.5 g

水 残 量

付記 5 日本脳炎ウイルス赤血球凝集抗原

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 6 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 7 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 8 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 9 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。

付記 10 豚パルボウイルス赤血球凝集抗原

豚パルボウイルス 90HS 株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