

狂犬病組織培養不活化ワクチン

1 定義

狂犬病培養細胞順化ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を精製し、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

狂犬病培養細胞馴化ウイルス RC・HL 株

2.1.2 性状

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。

原種ウイルスは、別に定める規格に適合しなければならない。

2.1.3 継代及び保存

原種ウイルスを、HmLu細胞で継代し、これを種ウイルスとする。

種ウイルスは、継代してはならない。

種ウイルスは、凍結して - 70 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

HmLu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

単層培養法の場合は、1回に処理し、培養した細胞を、また、浮遊培養法の場合は、最終フェーマンター培養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に接種し、32 ~ 34 で培養し、CPE又はG蛋白産生量の極期に採取した培養液の遠心上清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 精製

ウイルス浮遊液をマクロゴール又は相当と認められた方法で精製濃縮し、精製ウイルス浮遊液とする。浮遊培養法の場合は、2.3.4の不活化操作を行った後、精製する。

2.3.4 不活化

精製ウイルス浮遊液を - プロピオラクトン又は相当と認められた方法で不活化し、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。

2.3.5 原液の調整

不活化ウイルス液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整し、原液とする。浮遊培養法の場合には、精製ウイルス浮遊液に相当と認められた保存剤を加え、原液とし、最終バルクで濃度調整を行う。

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、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、浮遊培養の場合は 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。

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洗浄し、0.1vol% モルモット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 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

鶏胚初代細胞を用いる。

3.2.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 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 日目に培養液をウイルス増殖用培養液 1（付記 2）に交換し、32℃ で 8 日間静置培養し、観察する。ただし、96 穴マイクロプレートを用いる場合は、試料 25 μL ずつを 10 穴の培養細胞に接種した後、ウイルス増殖用培養液 2（付記 3）を 0.2mL ずつを加え、37℃ で 10 日間培養し、観察する。

3.2.1.3 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、単層培養法の場合に 1 mL 中 10^{7.5}TCID₅₀ 以上、また、浮遊培養法の場合に 1 mL 中 10^{7.0}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 注射材料及び接種材料

検体を注射材料及び接種材料とする。

3.3.2.1.2 試験動物及び培養細胞

3 日齢以内の乳のみマウス及び鶏胚初代細胞を用いる。

ただし、鶏胚初代細胞は、培養びんに 10mL ずつ分注し、面積が約 36cm² の単層となったものを用いる。

3.3.2.2 試験方法

注射材料 0.02mL ずつを試験動物 10 匹の脳内に注射し、14 日間観察する。

接種材料 2 mL ずつを培養細胞 4 本以上に接種し、37℃ で 60 分間吸着させた後、接種材料を除去し、ウイルス増殖用培養液 1 を 10mL ずつ加え、37℃ で 10 日間静置培養し、観察する。

3.3.2.3 判定

試験動物に狂犬病ウイルスによる症状を認めず、培養細胞に CPE 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。

3.4.2 蛋白窒素定量試験

一般試験法の蛋白窒素定量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。

3.4.3 力価試験

3.4.3.1 試験材料

検体、参照ワクチン（付記 4）、抗体吸着プレート（付記 5）及び酵素標識抗体（付記 6）を用いる。

3.4.3.2 試験方法

検体 6mL にリン酸水素二ナトリウム十二水和物 327.6mg、リン酸二水素カリウム 38.6mg を加えてよく振とう混和する。参照ワクチンは、動物医薬品検査所が指定した方法により溶解する。これらの検体及び参照ワクチンをそれぞれ 30 ~ 60 秒間超音波処理した後、約 200G で 5 分間遠心する。各遠心上清を、あらかじめ 1 w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液で前処理した 450nm のメンブランフィルターでろ過し、そのろ液の 4 mL についてゲルろ過（付記 7）を行う。第 1 画分のピークを含む 8 mL を採取し、抗原希釈液（付記 8）を用いて原液（高用量）、2 倍希釈液（中用量）及び 4 倍希釈液（低用量）を作製する。各抗原液のそれぞれ 100 µL を抗体吸着プレートの各 2 穴に加える。抗原希釈液を 100 µL ずつ 2 穴に加えたものを陰性対照穴とする。プレートを密閉し、37℃ で 60 分間反応させる。洗浄液（付記 9）で 5 回洗浄した後、酵素標識抗体の 100 µL ずつを各穴に入れ、プレートを密閉し、遮光して 37℃ で 90 分間反応させる。洗浄液で 5 回洗浄した後、基質・発色液（付記 10）の 100 µL ずつを各穴に加え、プレートを遮光して常温で 30 分間反応させる。反応終了後直ちに、反応停止液（付記 11）の 50 µL ずつを各穴に加え、主波長 492nm 及び副波長 630nm でそれぞれ吸光度を測定する。検体及び参照ワクチンを加えた各穴の吸光度値から陰性対照穴の吸光度値を引いた値をそれぞれの抗原の吸光度値とする。ゲルろ過後の各抗原液について 2 回繰り返し測定を行った後、検体及び参照ワクチンの各吸光度値から相対力価の計算方法（付記 12）により参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

3.4.3.3 判定

検体の参照ワクチンに対する相対力価は、0.683 以上でなければならない。

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。

3.5.2 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

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 マクロゴール定量試験

一般試験法のマクロゴール定量法を準用して試験するとき、マクロゴールの含有量は、1 mL 中 0.5mg 以下でなければならない。

3.5.6 蛋白窒素定量試験

一般試験法の蛋白窒素定量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。

3.5.7 安全試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.1.2 試験動物

体重 5 ~ 10kg の犬及び体重約 1 kg の猫を用いる。

3.5.7.2 試験方法

注射材料 5 mL ずつを 2 頭の犬に、2 mL ずつを 2 頭の猫に皮下注射し、10 日間臨床観察する。

3.5.7.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

3.5.8 力価試験

3.4.3 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年間とする。

付記 1 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 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 2 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・プロス 2.95 g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 3 ウイルス増殖用培養液 2

1,000mL 中

ブドウ糖 5 g

L - グルタミン 0.4 g

牛胎子血清又は子牛血清 5 ~ 25 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 4 参照ワクチン

動物医薬品検査所が配布する参照狂犬病組織培養不活化ワクチンを動物医薬品検査所が指定した濃度となるように調整したもの

付記 5 抗体吸着プレート

狂犬病ウイルスの G 蛋白を認識するモノクローナル抗体を精製したものについて動物医薬品検査所が指定した濃度に調整した後、96 穴プレートの各穴に 100 μ L ずつ加えて密閉し、37 で 18 時間吸着させたもの
抗体吸着プレートはリン酸緩衝食塩液で 4 回洗浄した後使用する。

付記 6 酵素標識抗体

狂犬病ウイルスの G 蛋白を認識するモノクローナル抗体を、ペルオキシダーゼで標識し、凍結乾燥したものについて、下記の希釈用液で動物医薬品検査所が指定した濃度に調整したもの
100mL 中
牛血清アルブミン 0.3 g
ポリソルベート 20 0.05 mL
リン酸緩衝食塩液 残 量
450nm メンブランフィルターでろ過する。

付記 7 ゲルろ過

動物医薬品検査所が指定するカラムを用い、抗原希釈用液を移動相とし、流速毎分 1 mL で液体クロマトグラフ法により画分を分取する。
検出波長は、280nm とする。

付記 8 抗原希釈用液

1,000mL 中
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 54.66 g
リン酸二水素カリウム 6.44 g
水 残 量
pH を 7.2 に調整後、450nm メンブランフィルターでろ過する。

付記 9 洗浄液

リン酸緩衝食塩液にポリソルベ - ト 20 を 0.05vol % となるように加えたもの

付記 10 基質・発色液

1,000mL 中
クエン酸 21.0 g
無水リン酸水素二ナトリウム 28.4 g
水 残 量
溶解した液を 450nm メンブランフィルターでろ過する。その液 20mL に *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩 10mg を加えて溶解する。使用直前に過酸化水素 (30) を 5 μ L 添加する。

付記 11 反応停止液
水 1,000mL に硫酸 150mL を加えたもの

付記 12 相対力価の計算方法

1 Validity の検定

得られたそれぞれの吸光度値を 1,000 倍し、常用対数に変換後、参照ワクチン及び検体について各用量の合計値を求め、次式の計算を行う。ただし、参照ワクチンの低用量を S_1 、中用量を S_2 、高用量を S_3 とし、検体の低用量を T_1 、中用量を T_2 、高用量を T_3 とする。

$$\text{検体差 SPa} = (S_1+S_2+S_3)-(T_1+T_2+T_3)$$

$$\text{直線性 SPb} = (S_3-S_1)+(T_3-T_1)$$

$$\text{曲線性 SPc} = [(S_1+S_3)-2S_2]+[(T_1+T_3)-2T_2]$$

$$\text{直線非平行性 SPb}' = (S_3 - S_1)-(T_3-T_1)$$

$$\text{曲線非平行性 SPc}' = [(S_1+S_3)-2S_2]-[(T_1+T_3)-2T_2]$$

上記の式で求めた SPb が 0.50、 SPc の絶対値が 0.86、 SPb' の絶対値が 0.49 及び SPc' の絶対値が 0.86 である場合は、Validity の検定に適合する。

2 相対力価の計算

1 の Validity の検定で適合と判定された場合は、次式により相対力価を求める。

$$M = - (4 \times \text{SPa} \times \log 2) \div (3 \times \text{SPb})$$

さらに、 M の真数 (M の逆対数 10^M) を求めることにより検体の参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

$$P = 10^M$$