

ウエストナイルウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成26年11月6日（告示第1554号）新規追加

1 定義

ウエストナイルウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

ウエストナイルウイルス VM-2 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

ウエストナイルウイルスに対する鳥の特異抗血清を用いた蛍光抗体法により、特異蛍光を認める。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、Vero 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の目的以外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、4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1代以内に製造しなければならない。

原株ウイルス、原種ウイルス及び種ウイルスは、凍結して -70°C 以下に保存する。

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

Vero 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 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

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0.1vol %となるようホルマリンを加えて不活化する。さらに0.1vol %のホルマリンを加えて不活化する。2段階の不活化後、これを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

不活化ウイルス液に相当と認められた油性アジュバントを加え、原液とする。

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、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注して小分製品とする。

小分製品について、3.4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。

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。

3.2 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

検体をウイルス増殖用培地で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

Vero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5穴(本)以上の培養細胞に接種し、 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ で5～7日間培養する。

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、1mL当り 1×10^7 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 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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 培養細胞による試験方法

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

不活化ウイルス液を試料とする。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

Vero細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

不活化剤を中和した試料2mLにつき培養面積75cm²のフラスコに単層となった細胞に対して50mLのウイルス増殖用培養液と共に加え、 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ で7日間培養し、観察する。

培養後の細胞を培養液と共に凍結融解し、これを第2回観察試料とする。この試料2mLにつき培養面積75cm²のフラスコに単層となった細胞に対して50mLのウイルス増殖用培養液と共に加え、 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ で7日間培養し、観察する。

培養後の細胞を培養液と共に凍結融解し、これを第3回観察試料とする。この試料1mLにつき、6cm²以上の培養細胞に接種し、6～7日間培養し観察する。

3.3.2.1.3 判定

培養細胞に特異なCPEを認めないとき、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。

3.3.2.2 マウスによる試験方法

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

不活化ウイルス液を試料とする。

3.3.2.2.1.2 試験動物

体重 12 ～ 16 g の Non-Swiss Albino (NSA)系マウスを 8 匹使用する。

3.3.2.2.2 試験方法

試験材料 0.03 mL をマウスの脳内に接種し、28 日間観察する。

3.3.2.2.3 判定方法

異常を示した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。

3.3.3 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。

3.3.4 ホルマリン定量試験

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。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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均質な懸濁液でなければならない。異物及び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。

3.4.2 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。

3.4.3 ホルマリン定量試験

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。

3.4.4 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。

3.4.5 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。

3.4.6 不活化試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.6.1.2 試験動物

3 週齢のマウスを用いる。

3.4.6.2 試験方法

注射材料 0.5mL を 10 匹の試験動物の腹腔内に注射し、14 日間観察する。

3.4.6.3 判定

脳炎症状又は麻痺を示した動物を認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。

試験品に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4.7 力価試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 試料

試験品を試料とする。

3.4.7.2 試験方法

試料、参照品（付記 1）、陰性対照（付記 2）を PBS1（付記 3）で 4 倍希釈したものを 0℃条件下で、8 ～ 10 ワット、105 秒間超音波破壊する。これらに PBS2（付記 4）を添加してポリソルベート濃度を 0.3 %に調整し、96 穴マイクロプレートに 350 μ L ずつ分注して各 10 段階の 2 倍階段希釈液を作

製する。最終のウェルには陰性対照を 150 μ L 分注する。固相化プレート（付記 5）のウェルに各希釈液を 100 μ L ずつ分注して 37 $^{\circ}$ C で 60 分間振とう後、4 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させ、PBS3（付記 6）で洗浄する。希釈液（付記 7）で希釈した検出抗体（付記 8）を各ウェルに 100 μ L ずつ分注して 37 $^{\circ}$ C で 60 分間振とうし、PBS3 で洗浄する。2 vol % 正常山羊血清加希釈液（付記 9）で希釈した標識抗体（付記 10）を 100 μ L ずつ各ウェルに分注して 37 $^{\circ}$ C で 60 分間振とうし、PBS3 で洗浄する。テトラメチルベンチジン（TMB）基質液（付記 11）を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた後、主波長 650 nm、副波長 490 nm で測定する。

3.4.7.3 判定

参照品の力価を 1.0 として、試験品の相対力価を統計学的計算法（付記 12）により算出するとき、試験品の相対力価は、1.0 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、2年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記 1 参照品

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記 2 陰性対照

ワクチンウイルスを接種しない培養細胞について、ワクチンの製造方法と同様に不活化処理及びアジュバントの添加を行った培養液であって、-70 $^{\circ}$ C 以下に保存したもの。

付記 3 PBS1（0.01mol/L リン酸緩衝食塩液）

1,000 mL 中	
塩化ナトリウム	8.5 g
リン酸二水素ナトリウム	0.253 g
リン酸水素ナトリウム	1.19 g
精製水	残量
pH を 7.2 \pm 0.1 に調整する。	

付記 4 PBS2（18vol %ポリソルベート 20 加 PBS）

1,000 mL 中	
ポリソルベート 20	180 mL
PBS1	820 mL

付記 5 固相化プレート

捕捉用レクチン（付記 13）を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、2 ~ 7 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させる。PBS3 で洗浄した後、各ウェルにブロッキング試液（付記 14）を 200 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で振とうしながら 60 分間反応させ、PBS3 で洗浄する。

付記 6 PBS3（0.3vol %ポリソルベート 20 加 PBS）

1,000 mL 中	
ポリソルベート 20	2 mL
PBS1	1,000 mL

付記 7 希釈液

脱脂粉乳 1.15g を 100mL の PBS3 に溶解させた後、ろ紙フィルター又は同等品でろ過する。

- 付記 8 検出抗体
抗ウエストナイルウイルスマウスモノクローナル抗体を希釈液で希釈したもの。
- 付記 9 2 vol %正常山羊血清加希釈液
希釈液に 2 vol %の正常山羊血清を加えたもの。
- 付記 10 標識抗体
ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 山羊血清を 2 vol %正常山羊血清加希釈液で希釈したもの。
- 付記 11 テトラメチルベンチジン (TMB) 基質液
A 液 : 0.4g の TMB を 1,000mL の 26vol % N,N-ジメチルホルムアミドに溶解したもの。
B 液 : 0.02vol %過酸化水素水
A 液と B 液を使用時に等量混合する。
- 付記 12 統計学的計算方法
動物用医薬品検査所が適当と認めたもの。
- 付記 13 捕捉用レクチン
精製レクチンをコーティング緩衝液 (付記 15) で $4 \mu\text{g/mL}$ となるよう希釈したもの。
- 付記 14 ブロッキング試液
1 g のカゼインを 0.15M の塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)
100mL に溶解したもの。
- 付記 15 コーティング緩衝液
1,000 mL 中
炭酸ナトリウム 1.59 g
炭酸水素ナトリウム 2.93 g
精製水 残量
pH 9.7 \pm 0.1 に調整する。