

日本脳炎生ワクチン（シード）

平成23年10月4日（告示第 1911号）新規追加
平成25年1月22日（告示第 257号）一部改正
令和2年2月5日（告示第 231号）一部改正
令和2年12月11日（告示第 2406号）一部改正
令和5年3月28日（告示第 486号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒日本脳炎ウイルスを同規格に適合した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at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 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の2.14に適合したハムスター腎初代培養細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の2.14に適合したハムスター腎初代培養細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.14 に適合したハムスター腎初代培養細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 初代細胞を用いる場合

2.2.1.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.14 に適合したハムスター腎初代細胞又は製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

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。

2.2.1.3 マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード)

2.2.1.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)は、2.2.1.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)について、3.2.1 の試験を行う。

2.2.2 株化細胞を用いる場合

2.2.2.1 株化細胞

HmLu-1 細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2.3 マスターセルシード

2.2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -70°C 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.3.1 の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20 代以内でなければならない。

2.2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して -70°C 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.3.2の試験を行う。

2.2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して -70°C 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.3.3の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 培養細胞の培養

2.3.1.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）を用いる場合

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個別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、3.4の試験を行う。

2.3.1.2 プロダクションセルシードを用いる場合

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個別培養細胞に異常を認めてはならない。

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の細胞で培養し、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、3.5の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて混合し、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、3.6の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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。

3.1.1.3 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。

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性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。

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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。

3.1.1.8 マーカー試験

ワーキングシードウイルス又は原液において、マーカー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。

3.1.1.8.1 試験材料

3.1.1.8.1.1 注射材料

検体及び対照として中山株薬検系を用い、ウイルス含量を 1 mL 中に $10^{7.0}$ TCID₅₀ 又は $10^{7.0}$ LD₅₀ 以上含まれるように適当と認められた希釈液で調整したものを注射材料とする。

3.1.1.8.1.2 試験動物

3 週齢のマウスを用いる。

3.1.1.8.2 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。

3.1.1.8.3 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。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 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。

3.1.2.3 マーカー試験

3.1.1.8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、マスターシードウイルス又は原液において、マーカー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。

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 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。

3.1.3.2 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。

3.2 初代細胞の試験

3.2.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.2.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 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。

3.2.1.3 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 株化細胞の試験

3.3.1 マスターセルシードの試験

3.3.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.3 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。

3.3.1.4 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。

3.3.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.3.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2を準用して試験するとき、

適合しなければならない。

3.3.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.3.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2 及び 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.7 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 ワーキングセルシードの試験

3.3.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2.2 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。

3.3.2.3 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。

3.3.3 プロダクションセルシードの試験

3.3.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.3.2 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。

3.3.3.3 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。

3.4 個体別培養細胞の試験

個体別培養細胞の 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。

3.4.1 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。

3.4.2 赤血球吸着試験

3.4.1 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回洗浄した後、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分間静置した後、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。

3.4.3 封入体染色試験

3.4.1 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。

3.4.4 迷入ウイルス否定試験

3.4.1 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。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 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。

3.5.2.1 マウス接種試験

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 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。

3.5.2.1.1.2 試験動物

2日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.5.2.1.2 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。

3.5.2.1.3 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、1mL中10^{7.0}LD₅₀以上でなければならない。

3.5.2.2 培養細胞接種試験

3.5.2.2.1 試験材料

3.5.2.2.1.1 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。

3.5.2.2.1.2 培養細胞

Vero細胞、ESK細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.5.2.2.2 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°C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°Cで7日間培養し、観察する。

3.5.2.2.3 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。

3.5.3 マーカー試験

3.1.1.8 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、マスターシードウイルス又はワーキングシードウイルスにおいて、マーカー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。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 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。

3.6.5 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。

3.6.6 ウイルス含有量試験

3.5.2 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}LD₅₀ 又は 10^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.6.7 安全試験

3.6.7.1 試験材料

3.6.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.7.1.2 試験動物

約 1 か月齢の豚を用いる。

3.6.7.2 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、対照群と共に 3 週間観察する。

3.6.7.3 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。

3.6.8 力価試験

赤血球凝集抑制反応又は中和試験により行う。

3.6.8.1 赤血球凝集抑制反応

3.6.8.1.1 試験材料

3.6.8.1.1.1 試験動物

3.6.7 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.8.1.1.2 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 2）を用いる。

3.6.8.1.2 試験方法

3.6.7 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 3）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 4）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。

3.6.8.1.3 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。

3.6.8.2 中和試験

3.6.8.2.1 試験材料

3.6.8.2.1.1 試験動物

3.6.7 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.8.2.1.2 中和試験用ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株薬検系、JaGAr-01 株又は適当と認められた株を用いる。

3.6.8.2.1.3 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。

3.6.8.2.2 試験方法

3.6.7 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°C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°C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 5）を加え、37°Cで 3 日間培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 6）を重層し、37°Cで 1 日間培養し、プラック数を算出する。また、中和試験用ウイルス液 0.4mL ずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、プラック数を算出する。

3.6.8.2.3 判定

プ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、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 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

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 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で、赤血球凝集価が 64 倍以上のもの。

付記 3 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、pH を 9.0 に調整する。

付記 4 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 5 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

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 6 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

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。