

# 日本脳炎不活化ワクチン（シード）

平成24年7月4日（告示第1622号）新規追加  
令和2年2月5日（告示第231号）一部改正  
令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合した日本脳炎ウイルスを同規格に適合した株化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 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、適当と認められた細胞で増殖させ、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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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、適当と認められた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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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、適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 株化細胞

Vero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 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.3 マスターセルシード

#### 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 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。

## 2.2.4 ワーキングセルシード

### 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 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℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

## 2.2.5 プロダクションセルシード

### 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 の培養液で増殖させる。

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℃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、3.2.3 の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 プロダクションセルシードの培養

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。

### 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、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、3.3 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適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、3.4 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、3.5 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、3.6 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 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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

サル由来細胞を用いる場合には、馬伝染性貧血ウイルス、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）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。

#### 3.1.2 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。

#### 3.1.3 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 株化細胞の試験

##### 3.2.1 マスタ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 2.1.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.2 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。

###### 3.2.1.3 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。

###### 3.2.1.4 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。

###### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.1 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。

###### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

馬伝染性貧血ウイルス、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）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。

###### 3.2.1.5.2.2 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。

###### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.1.7 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。

## 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

### 3.2.2.1 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。

### 3.2.2.2 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。

### 3.2.2.3 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。

## 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

### 3.2.3.1 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。

### 3.2.3.2 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。

### 3.2.3.3 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。

## 3.3 ウイルス浮遊液の試験

### 3.3.1 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。

#### 3.3.1.1 マウス接種試験

##### 3.3.1.1.1 試験材料

##### 3.3.1.1.1.1 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。

##### 3.3.1.1.1.2 試験動物

約 3 週齢のマウスを用いる。

##### 3.3.1.1.2 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。

##### 3.3.1.1.3 判定

脳炎症状を示して死亡したマウスを感染とみなし、LD<sub>50</sub> を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>7.5</sup>LD<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.3.1.2 培養細胞接種試験

##### 3.3.1.2.1 試験材料

##### 3.3.1.2.1.1 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。

##### 3.3.1.2.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.3.1.2.2 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 °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。

##### 3.3.1.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub> を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.4 不活化ウイルス液の試験

#### 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 不活化試験

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.4.2.1.2 試験動物

3週齢のマウスを用いる。

##### 3.4.2.2 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。

##### 3.4.2.3 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。

### 3.5 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。

### 3.6 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液体又は均質な懸濁液でなければならず、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 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。

#### 3.6.3 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。

#### 3.6.4 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。

#### 3.6.5 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。

#### 3.6.6 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。

#### 3.6.7 力価試験

##### 3.6.7.1 試験材料

###### 3.6.7.1.1 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。

###### 3.6.7.1.2 試験動物

2～3週齢のマウスを用いる。

##### 3.6.7.2 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。

##### 3.6.7.3 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。

#### 3.6.7.4 判定

脳炎症状を示して死亡した動物及び生存しているものの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LD<sub>50</sub>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、攻撃ウイルスのウイルス量は0.2mL中10<sup>3</sup>LD<sub>50</sub>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、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。