

狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）

平成24年7月4日(告示第1622号)新規追加
令和2年6月30日(告示第1246号)一部改正
令和2年10月2日(告示第1865号)一部改正
令和3年5月17日(告示第798号)一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した狂犬病培養細胞馴化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の兔及び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。

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、HmLu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、凍結乾燥して5℃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、HmLu細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結乾燥して5℃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、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu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℃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 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。

2.2.3 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 -100°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。浮遊培養を使う場合は、細胞数の増加で集団ダブリングタイムの約3倍で継代1代とみなす。

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 -100°C 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、継代及び保存

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 -100°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、3.2.3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

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ァーメンター培養細胞を、それぞれ個別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培養細胞に接種し、 $32\sim 34^{\circ}\text{C}$ で培養し、CPE又はGたん白産生量の極期に採取した培養液の遠心上清又はろ液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 精製

ウイルス浮遊液をマクロゴール又は適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、精製してもよい。

2.3.4 不活化

精製ウイルス浮遊液を β -プロピオラクトン又は適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、3.4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、不活化ウイルス液又は不活化操作を行った精製ウイルス浮遊液に適当と認められた保存剤を加え、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、浮遊培養法の場合にはリン酸緩衝食塩液で濃度調整し、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1.4.2.1.1.1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

猫白血病ウイルス／猫肉腫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

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス及び日本脳炎ウイルスについて、動生剤基準の一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.5、3.2.6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。

3.1.2.3 効力及び免疫原性確認試験

3.1.2.3.1 モルモットでの試験

3.1.2.3.1.1 試験材料

3.1.2.3.1.1.1 試料

新旧の検体をリン酸緩衝食塩液でそれぞれ溶解し、1 mL中のウイルス含有量を約 $10^{7.0}$ TCID₅₀となるように濃度を調整する。それぞれにβ-プロピオラクトンを0.0125vol%になるように加えて、4℃で48時間感作し、ウイルスを不活化したものを試料とする。

3.1.2.3.1.1.2 試験動物

体重約400gのモルモットを用いる。

3.1.2.3.1.1.3 攻撃ウイルス

狂犬病ウイルスCVS株（付記1）を用いる。モルモット咬筋内注射法で、0.2mL中10LD₅₀のウイルスを含むように、2 vol%馬血清加生理食塩液を用いて濃度を調整し、攻撃ウイルスとする。

3.1.2.3.1.2 試験方法

新旧の試料を0.5mLずつ各試験動物10匹の内股部皮下に注射し、試験群とする。10匹を無処置対照群とする。注射後21日目に、3群のそれぞれに攻撃ウイルスを0.2mLずつ咬筋内注射し、14日間臨床観察する。

3.1.2.3.1.3 判定

発症しなかったものを耐過とみなし、耐過率を算出する。

両試験群の耐過率は、いずれも70%以上でなければならない。この場合、対照群の耐過率は、20%以下でなければならない。

3.1.2.3.2 犬での試験

3.1.2.3.2.1 試験材料

3.1.2.3.2.1.1 試料

3.1.2.3.1.1.1の試料を用いる。

3.1.2.3.2.1.2 試験動物

狂犬病ウイルスに対する抗体陰性の約4か月齢の犬を用いる。

3.1.2.3.2.2 試験方法

新旧の試料1 mLずつを各試験動物3頭の皮下に注射し、1か月後にそれぞれから採血し、中和抗体価を狂犬病培養細胞馴化ウイルスRC・HL株を用いて測定する。

3.1.2.3.2.3 判定

両試験群の中和抗体価は、それぞれ幾何平均値10倍以上でなければならない。

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

猫白血病ウイルス／猫肉腫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。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、動生剤基準の一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.5、3.2.6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

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.1.2 培養細胞

鶏胚初代細胞を用いる。

3.3.1.2 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°C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3）に交換し、32°C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 μ L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4）を0.2mLずつ加え、37°Cで10日間培養し、観察する。

3.3.1.3 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は1mL中10^{7.5}TCID₅₀以上であり、浮遊培養法の場合には1mL中10^{7.0}TCID₅₀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 注射材料及び接種材料

検体を注射材料及び接種材料とする。

3.4.2.1.2 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、培養瓶に10mLずつ分注し、面積が約36cm²の単層となったものを用いる。

3.4.2.2 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2mLずつを培養細胞4本以上に接種し、37°C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°Cで10日間静置培養し、観察する。

3.4.2.3 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。

3.5 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 力価試験

3.5.2.1 試験材料

検体、参照ワクチン（付記5）、抗体吸着プレート（付記6）及び酵素標識抗体（付記7）を用いる。

3.5.2.2 試験方法

検体6 mL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8）を行う。第1画分のピークを含む8 mLを採取し、抗原希釈用液（付記9）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 μ Lを抗体吸着プレートの各2穴に加える。抗原希釈液を100 μ L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°Cで60分間反応させる。洗浄液（付記10）で5回洗浄した後、酵素標識抗体の100 μ Lずつを各穴に入れ、プレートを密閉し、遮光して37°C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11）の100 μ L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12）の50 μ L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13）により参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

3.5.2.3 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。

3.6 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 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

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 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。

3.6.6 たん白窒素定量試験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、たん白窒素の含有量は、1 mL中100 μ g以下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

体重5～10kgの犬及び体重約1kgの猫を用いる。

3.6.7.2 試験方法

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

3.6.7.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

3.6.8 力価試験

3.5.2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。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 狂犬病ウイルスCVS株

狂犬病ウイルスCVS株を3週齢マウスの脳内に接種し、症状を示したマウスの脳を採取し、2vol%馬血清加生理食塩液を用いて乳剤としたもの。

ウイルス含有量は、体重約400gのモルモットの咬筋内注射法で測定するとき、0.2mL中 $10^{2.5}$ LD₅₀以上でなければならない。

付記2 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛胎子血清又は子牛血清 50 mL

イーグルMEM 残 量

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3 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・ブロス 2.95 g

イーグルMEM 残 量

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4 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

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5 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6 抗体吸着プレート

狂犬病ウイルスのGたん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 $^{\circ}$ C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7 酵素標識抗体

狂犬病ウイルスのGたん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8 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9 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10 洗浄液

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

付記11 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 α -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12 反応停止液

水1,000mLに硫酸150mLを加えたもの。

付記13 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。

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

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

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

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

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

上記の式で求めたSPbが0.50以上、SPcの絶対値が0.86以下、SPb $^\wedge$ の絶対値が0.49以下及びSPc $^\wedge$ の絶対値が0.86以下である場合は、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。

$$P = 10^M$$