

### 3. 3. 1 染色試験←削除済み

### 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、適合しなればならない。

### 3. 3. 3 外来性ウイルス等否定試験

必要であれば、3. 2. 1. 2を準用してウイルスを中和したものについて行う。

### 3. 3. 3. 1 動物接種試験

### 3. 3. 3. 1. 1 成熟マウス接種試験

4～5週齢のマウス10匹以上に、1匹あたり試料0.5mLを腹腔内、0.03mLを脳内にそれぞれ注射して、21日間観察する。この間、いずれの動物も外来性の病原体による感染を示してはならず、また動物の80%以上は生き残らなければならない。

### 3. 3. 3. 1. 2 乳のみマウス接種試験

生後24時間以内の乳のみマウスに、1匹あたり試料0.1mLを腹腔内、0.01mLを脳内にそれぞれ注射して、14日間観察する。注射後1日以内に死亡したマウスは判定対象より除き、この間、20匹以上のいずれの乳のみマウスも外来性の病原体による感染を示してはならず、またその80%以上は生き残らなければならない。

### 3. 3. 3. 1. 3 モルモット脳内接種試験

体重300～400gのモルモット5匹以上に、1匹あたり試料0.1mLを脳内に注射して、14日間観察する。この間、いずれの動物も外来性の病原体による感染を示してはならず、また動物の80%以上は生き残らなければならない。

### 3. 3. 3. 2 培養細胞接種試験

### 3. 3. 3. 2. 1 ヒト培養細胞接種試験

試料10mLをヒト由来培養細胞に接種して、7日間培養後に継代培養してさらに7日間観察する。この間、外来性ウイルスによる細胞変性を認めてはならない。

### 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、適合しなればならない。

### 3. 5. 2 外来性ウイルス等否定試験

必要であれば、3. 4. 1. 2を準用してウイルスを中和したものについて行う。

### 3. 5. 2. 1 動物接種試験

### 3. 5. 2. 1. 1 成熟マウス接種試験

4～5週齢のマウス10匹以上に、1匹あたり試料0.5mLを腹腔内、0.03mLを脳内にそれぞれ注射して、21日間観察する。この間、いずれの動物も外来性の病原体による感染を示してはならず、また動物の80%以上は生き残らなければならない。

### 3. 5. 2. 1. 2 乳のみマウス接種試験

生後24時間以内の乳のみマウスに、1匹あたり試料0.1mLを腹腔内、0.01mLを脳内にそれぞれ注射して、14日間観察する。注射後1日以内に死亡したマウスは判定対象より除き、この間、20匹以上のいずれの乳のみマウスも外来性の病原体による感染を示してはならず、またその80%以上は生き残らなければならない。

### 3. 5. 2. 1. 3 モルモット脳内接種試験

体重300～400gのモルモット5匹以上に、1匹あたり試料0.1mLを脳内に注射して、14日間観察する。この間、いずれの動物も外来性の病原体による感染を示してはならず、また動物の80%以上は生き残らなければならない。

### 3. 5. 2. 2 培養細胞接種試験

### 3. 5. 2. 2. 1 ヒト培養細胞接種試験

試料10mLをヒト由来培養細胞に接種して、7日間培養後に継代培養してさらに7日間観察する。この間、外来性ウイルスによる細胞変性を認めてはならない。

### 3. 5. 2. 2. ニワトリ胚初代培養細胞接種試験

試料25mLをニワトリ胚初代培養細胞に接種し、3代継代培養の後、ニワトリ白血病ウイルスを酵素免疫測定法等の適当な方法により検出を行うとき、その存在を認めてはならない。

また、3代継代培養した細胞について、抗細菌網内皮症ウイルス免疫血清を用いて蛍光抗体法により染色を行うとき、細菌網内皮症ウイルス抗原の存在を認めてはならない。

### 3. 5. 2. 3. ニワトリ腎初代培養細胞接種試験

資料5mLをニワトリ腎初代培養細胞に接種して、14日間観察する。更に、14日目の培養細胞を凍結融解して、別のニワトリ腎初代培養細胞に継代接種し、14日間観察後にモルモット及びニワトリ赤血球を加えて、血球吸着の起こらないことを確認する。

また、これらの観察期間中に外来性ウイルスによる細胞変性を認めてはならない。

### 3. 5. 2. 3. ニワトリ卵接種試験

10～11日齢の卵20個以上に、1個当たり資料0.25mLを漿尿膜上に接種して、3日間観察する。また、同齢の卵20個以上に、1個当たり試料0.25mLを尿膜腔内に注射して、3日間観察する。更に6～7日齢の卵20個以上に、1個当たり試料0.25mLを卵黄嚢内に注射して、12日間観察する。接種または注射後1日以内に死亡した卵は判定対象より除く。これらの試験の間、いずれの卵にも外来性ウイルスの存在による変化を認めてはならず、また卵の80%以上は生き残らなければならぬ。更に死んだ卵からの試料を10個以上の卵に同様の経路で接種または注射し、上と同様に観察する。これらの試験の間、いずれの卵にも外来性ウイルスの存在による変化を認めてはならず、また卵の80%以上は生き残らなければならぬ。

### 3. 3. 3. 2. ニワトリ胚初代培養細胞接種試験

試料25mLをニワトリ胚初代培養細胞に接種し、3代継代培養の後、ニワトリ白血病ウイルスを酵素免疫測定法等の適当な方法により検出を行うとき、その存在を認めてはならない。

また、3代継代培養した細胞について、抗細菌網内皮症ウイルス免疫血清を用いて蛍光抗体法により染色を行うとき、細菌網内皮症ウイルス抗原の存在を認めてはならない。

### 3. 3. 3. 2. ニワトリ腎初代培養細胞接種試験

試料5mLをニワトリ腎初代培養細胞に接種して、14日間観察する。更に、14日目の培養細胞を凍結融解して、別のニワトリ腎初代培養細胞に継代接種し、14日間観察後にモルモット及びニワトリ赤血球を加えて、血球吸着の起こらないことを確認する。

また、これらの観察期間中に外来性ウイルスによる細胞変性を認めてはならない。

### 3. 3. 3. 3. ニワトリ卵接種試験

10～11日齢の卵20個以上に、1個当たり試料0.25mLを漿尿膜上に接種して、3日間観察する。また、同齢の卵20個以上に、1個当たり試料0.25mLを尿膜腔内に注射して、3日間観察する。更に6～7日齢の卵20個以上に、1個当たり試料0.25mLを卵黄嚢内に注射して、12日間観察する。接種または注射後1日以内に死亡した卵は判定対象より除く。これらの試験の間、いずれの卵にも外来性ウイルスの存在による変化を認めてはならず、また卵の80%以上は生き残らなければならぬ。更に死んだ卵からの試料を10個以上の卵に同様の経路で接種または注射し、上と同様に観察する。これらの試験の間、いずれの卵にも外来性ウイルスの存在による変化を認めてはならず、また卵の80%以上は生き残らなければならぬ。

### 3. 5. 3 同定試験

試料を適当な培養細胞を用いて増殖させたとき、その増殖は、抗ムンプスウイルス免疫血清によって中和されなければならぬ。

### 3. 3. 4 同定試験

試料を適当な培養細胞を用いて増殖させたとき、その増殖は、抗ムンプスウイルス免疫血清によって中和されなければならぬ。

### 3. 3. 5 神経毒力試験

試験にはムンプスウイルスに対する抗体の証明されないマカカ (*Macaca*) 属又はセルコピテクス (*Cercopithecus*) 属のサルを用いる。

サル 10 匹以上に、1 匹当たり検体 0.5mL ずつを左右各半球視床内に、0.25mL を小脳延髄槽内にそれぞれ注射して、21 日間観察する。この間、いずれの動物も麻ひその他の神経系の障害を示してはならず、かつ動物の 80% 以上は生き残らなければならぬ。ただし、いずれの動物も接種ウイルスあるいは接種材料中の外来性微生物に基づく異常な臨床症状及び死亡を認めてはならない。更に、観察期間終了時に剖検を行うとき、試験動物の中枢神経組織に接種ウイルス若しくは、接種材料中の外来性微生物に基づく異常な病変を認めてはならない。また、臨床的あるいは病理組織学的に免疫不全を示唆する所見若しくは、明らかな免疫学的な基礎疾患を認められた動物については判定対象から除外する。また、剖検時に採血して血中抗体を測定するとき、80% 以上の動物にムンプスウイルスに対する抗体の発現を認めなければならぬ。回ジウイルス株から由来した製剤の連続した試験において、すべての動物についての試験の成績、すなわち、病変の性質、病変の強さ、病変の拡がり並びに観察期間中の症状などを統合して比較評価するとき、各試験間で明らかな差があつてはならぬ。

本剤の製造に適当と認められたウイルス株から由来した製剤の連続した 5 回の製品において神経毒力のないことが確認された場合には、当該ウイルス株由来の以後の製品につい

ては、本試験を省くことができる。

- 3. 3. 6 ウイルス含量試験
- 3. 5. 3 を準用して、ウイルス含量を測定する。
- 3. 3. 7 マーカー試験

試験料についてプラックサイズを測定するとき、その値は参照ウイルスと同程度でなければならぬ。

### 3. 4 最終バルクの試験

- 3. 4. 1 染色試験←削除済み

### 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ぬ。

### 3. 4. 3 ウイルス含量試験

- 3. 5. 3 を準用して、ウイルス含量を測定する。

### 3. 4. 4 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ぬ。

### 3. 5 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

### 3. 5. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%以下でなければならぬ。

### 3. 5. 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ぬ。

### 3. 5. 3 力価試験

適当な培養細胞を用いて検体0.5mL中のPFU、FFU又はCCID<sub>50</sub>を測定するとき、その値は5000以上でなければならぬ。

### 3. 5. 4 表示確認試験

### 3. 5. 4 ウイルス含量試験

- 3. 7. 3 を準用して、ウイルス含量を測定する。

### 3. 5. 5 マーカー試験

試験料についてプラックサイズを測定するとき、その値は参照ウイルスと同程度でなければならぬ。

### 3. 6 最終バルクの試験

### 3. 6. 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ぬ。

### 3. 6. 2 ウイルス含量試験

- 3. 7. 3 を準用して、ウイルス含量を測定する。

### 3. 6. 3 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ぬ。

### 3. 7 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

### 3. 7. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%以下でなければならぬ。

### 3. 7. 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ぬ。

### 3. 7. 3 力価試験

適当な培養細胞を用いて検体0.5mL中のPFU、FFU又はCCID<sub>50</sub>を測定するとき、その値は5000以上でなければならぬ。

### 3. 7. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し、培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5℃以下とする。  
有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称
2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類
3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、それらの名称及び分量
4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量
5. 次の用法及び用量

通常、0.5mLを1回皮下に注射する。

適当な培養細胞に検体を接種し、培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5℃以下とする。  
有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称
2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類
3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、それらの名称及び分量
4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量
5. 次の用法及び用量

通常、0.5mLを1回皮下に注射する。

## 乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチン

### 1 本質及び性状

本剤は、弱毒生麻しんウイルス（以下「麻しんウイルス」という。）及び弱毒生風しんウイルス（以下「風しんウイルス」という。）を含む乾燥製剤である。溶剤を加えるときは、無色又は帯赤色の澄明な液剤となる。

### 2 製法

#### 2. 1 原材料

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 1 及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 1 をそれぞれ準用したシードロット製剤である。

#### 2. 2 原液

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 2 及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 2 をそれぞれ準用する。

#### 2. 3 最終バルク及び乾燥

乾燥弱毒生麻しんワクチン原液及び乾燥弱毒生風しんワクチン原液を適量ずつ混合し、必要あれば薄めて最終バルクを作る。この際、適当な安定剤などを加えることができる。ただし、抗生物質を加えてはならない。

最終バルクを分注、凍結乾燥する。

最終バルクについて、3. 4 の試験を行う。

### 3 試験

#### 3. 1 個体別培養細胞試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 3 及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 3 をそれぞれ準用する。

## 乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチン

### 1 本質及び性状

本剤は、弱毒生麻しんウイルス（以下「麻しんウイルス」という。）及び弱毒生風しんウイルス（以下「風しんウイルス」という。）を含む乾燥製剤である。溶剤を加えるときは、無色又は帯赤色の澄明な液剤となる。

### 2 製法

#### 2. 1 原材料

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 1 及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 1 をそれぞれ準用する。

#### 2. 2 原液

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 2 及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 2 をそれぞれ準用する。

#### 2. 3 最終バルク及び乾燥

乾燥弱毒生麻しんワクチン原液及び乾燥弱毒生風しんワクチン原液を適量ずつ混合し、必要あれば薄めて最終バルクを作る。この際、適当な安定剤などを加えることができる。ただし、抗生物質を加えてはならない。

最終バルクを分注、凍結乾燥する。

最終バルクについて、3. 4 の試験を行う。

### 3 試験

#### 3. 1 個体別培養細胞試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 1 及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 1 をそれぞれ準用する。

3. 2 ウイルス浮遊液の試験  
乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 4及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 4をそれぞれ準用する。
3. 3 原液の試験  
乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 5及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 5をそれぞれ準用する。
3. 4 最終バルクの試験
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ぬ。
3. 4. 2 ウイルス含量試験  
3. 5. 3を準用して、ウイルス含量を測定する。
3. 4. 3 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ぬ。
3. 5 小分製品の試験  
小分製品について、次の試験を行う。
3. 5. 1 含湿度試験  
一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%以下でなければならぬ。
3. 5. 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ぬ。
3. 5. 3 力価試験  
適当な培養細胞を用いて検体0.5mL中のPFU, FFU又はCCID<sub>50</sub>を測定するとき、麻しんウイルスの値は5000以上、風しんウ
3. 2 ウイルス浮遊液の試験  
乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 2及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 2をそれぞれ準用する。
3. 3 原液の試験  
乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 3及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 3をそれぞれ準用する。
3. 4 最終バルクの試験
3. 4. 1 染色試験←削除済み
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ぬ。
3. 4. 3 ウイルス含量試験  
3. 5. 3を準用して、ウイルス含量を測定する。
3. 4. 4 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ぬ。
3. 5 小分製品の試験  
小分製品について、次の試験を行う。
3. 5. 1 含湿度試験  
一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき、3.0%以下でなければならぬ。
3. 5. 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ぬ。
3. 5. 3 力価試験  
適当な培養細胞を用いて検体0.5mL中のPFU, FFU又はCCID<sub>50</sub>を測定するとき、麻しんウイルスの値は5000以上、風しんウ

イルスの値は1000以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5℃以下とする。

有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称

2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類

3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、

それらの名称及び分量

4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量

5. 次の用法及び用量

通常、0.5mLを1回皮下に注射する。

ルスの値は1000以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5℃以下とする。

有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称

2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類

3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、

それらの名称及び分量

4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量

5. 次の用法及び用量

通常、0.5mLを1回皮下に注射する。



## 乾燥弱毒生麻しんおたふくかぜ風しん混合ワクチン

### 1 本質及び性状

本剤は、弱毒生麻しんウイルス（以下「麻しんウイルス」という。）弱毒生ムンプスウイルス（以下「ムンプスウイルス」という。）及び弱毒生風しんウイルス（以下「風しんウイルス」という。）を含む乾燥製剤である。溶剤を加えるときは、無色又は帯赤色の澄明な液剤となる。

### 2 製法

#### 2. 1 原材料

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 1, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン2. 1及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 1をそれぞれ準用したシードロット製剤である。

#### 2. 2 原液

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 2, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン2. 2及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 2をそれぞれ準用する。

#### 2. 3 最終バルク及び乾燥

乾燥弱毒生麻しんワクチン原液, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン原液及び乾燥弱毒生風しんワクチン原液を適量ずつ混合し, 必要あれば薄めて最終バルクを作る。この際, 適当な安定剤などを加えることができる。ただし, 抗生物質を加えてはならない。

最終バルクを分注, 凍結乾燥する。

最終バルクについて, 3. 4の試験を行う。

### 3 試験

## 乾燥弱毒生麻しんおたふくかぜ風しん混合ワクチン

### 1 本質及び性状

本剤は、弱毒生麻しんウイルス（以下「麻しんウイルス」という。）弱毒生ムンプスウイルス（以下「ムンプスウイルス」という。）及び弱毒生風しんウイルス（以下「風しんウイルス」という。）を含む乾燥製剤である。溶剤を加えるときは、無色又は帯赤色の澄明な液剤となる。

### 2 製法

#### 2. 1 原材料

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 1, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン2. 1及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 1をそれぞれ準用する。

#### 2. 2 原液

乾燥弱毒生麻しんワクチン2. 2, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン2. 2及び乾燥弱毒生風しんワクチン2. 2をそれぞれ準用する。

#### 2. 3 最終バルク及び乾燥

乾燥弱毒生麻しんワクチン原液, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン原液及び乾燥弱毒生風しんワクチン原液を適量ずつ混合し, 必要あれば薄めて最終バルクを作る。この際, 適当な安定剤などを加えることができる。ただし, 抗生物質を加えてはならない。

最終バルクを分注, 凍結乾燥する。

最終バルクについて, 3. 4の試験を行う。

### 3 試験

### 3. 1 個体別培養細胞試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 3, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 3及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 3をそれぞれ準用する.

### 3. 2 ウイルス浮遊液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 4, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 4及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 4をそれぞれ準用する.

### 3. 3 原液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 5, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 5及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 5をそれぞれ準用する.

### 3. 4 最終バルクの試験

#### 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ぬ.

#### 3. 4. 2 ウイルス含量試験

3. 5. 3を準用して, ウイルス含量を測定する.

#### 3. 4. 3 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ぬ.

### 3. 5 小分製品の試験

小分製品について, 次の試験を行う.

#### 3. 5. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき, 3.0%

### 3. 1 個体別培養細胞試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 1, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 1及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 1をそれぞれ準用する.

### 3. 2 ウイルス浮遊液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 2, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 2及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 2をそれぞれ準用する.

### 3. 3 原液の試験

乾燥弱毒生麻しんワクチン3. 3, 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン3. 3及び乾燥弱毒生風しんワクチン3. 3をそれぞれ準用する.

### 3. 4 最終バルクの試験

#### 3. 4. 1 染色試験←削除済み

#### 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ぬ.

#### 3. 4. 3 ウイルス含量試験

3. 5. 3を準用して, ウイルス含量を測定する.

#### 3. 4. 4 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ぬ.

### 3. 5 小分製品の試験

小分製品について, 次の試験を行う.

#### 3. 5. 1 含湿度試験

一般試験法の含湿度測定法を準用して試験するとき, 3.0%

以下でなければならぬ。

3. 5. 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ぬ。

3. 5. 3 力価試験

適当な培養細胞を用いて検体 0.5mL 中の PFU, FFU 又は CCID<sub>50</sub> を測定するとき、麻しんウイルス及びムンプスウイルスの値は 5000 以上、風しんウイルスの値は 1000 以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5°C以下とする。

有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称
2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類
3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、それらの名称及び分量
4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量
5. 次の用法及び用量

通常、0.5mL を 1 回皮下に注射する

下でなければならぬ。

3. 5. 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ぬ。

3. 5. 3 力価試験

適当な培養細胞を用いて検体 0.5mL 中の PFU, FFU 又は CCID<sub>50</sub> を測定するとき、麻しんウイルス及びムンプスウイルスの値は 5000 以上、風しんウイルスの値は 1000 以上でなければならぬ。

3. 5. 4 表示確認試験

適当な培養細胞に検体を接種し培養した後、蛍光抗体法等によって行う。

4 貯法及び有効期間

貯法は、5°C以下とする。

有効期間は、1年とする。

5 その他

5. 1 溶剤の添付

添付する溶剤は、注射用水とする。

5. 2 添付文書等記載事項

1. 製造用株の名称
2. ウイルス培養に用いた培養細胞の種類
3. ウイルス培養に抗生物質又は着色剤を用いた場合は、それらの名称及び分量
4. 安定剤を使用した場合は、その名称及び分量
5. 次の用法及び用量

通常、0.5mL を 1 回皮下に注射する

## 細胞培養日本脳炎ワクチン力価試験と抗原 ELISA 法について

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
協力研究者 田島 茂、池田真紀子、林 昌宏、モイ メンリン、  
小滝 徹、大松 勉、倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

**研究要旨:**細胞培養日本脳炎不活化ワクチンは、力価を指標に最終製品が製造されていた従来のマウス脳由来ワクチンと比較して、含有蛋白量が少なく、製造承認の規格は蛋白量で規定されている。したがって抗原 ELISA 法により日本脳炎抗原含量と力価試験の結果が相関する可能性が高いと考えられる。H22 年度も H21 年度に引き続き日本脳炎抗原 ELISA 定量法を評価し、ロット間のばらつき、さらに製造所による違いについて関連を検討した。細胞培養日本脳炎ワクチン抗原定量 ELISA 法を開発し、小分け製品に関して抗原量を検討したところ、マウスを用いた中和力価とそれなりに相関を示したが、製造所が異なる場合、回帰係数が大きく異なり信頼性が失われた。今後、抗原 ELISA の標準品を 1 つに定めると中和力価との相関が成立しない可能性が示唆された。

### A. 目的

細胞培養日本脳炎不活化ワクチンは、2009 年 2 月に製造承認された。力価を指標に最終製品が製造されていた従来のマウス脳由来ワクチンと比較して、含有蛋白量が少なく、製造承認の規格は蛋白量で規定されている。本ワクチンは凍結乾燥品であり、同じ原液であっても凍結乾燥ラインが異なる製品は異なるロットとされる。異なるロットとされる小分け製品に関して、日本脳炎抗原 ELISA 法を確立し、力価に影響を及ぼす日本脳炎抗原量を測定し、ロット間のばらつきおよび原液との相関を検討し、さらに製造メーカーの違い

によるばらつきも検討した。

### B. 方法

#### 1) 日本脳炎抗原 ELISA 法

抗日本脳炎モノクローナル抗体（Group8, #503）を 96 ウェルプレートに 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で固層化（Overnight, 4°C）し、抗体を捨て磷酸緩衝液（PBS(-)）で洗浄する。そこに凍結乾燥品を溶解し 1 時間室温に放置したワクチンを原液から 2 倍階段希釈で 64 倍まで希釈し、各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  を入れ、37°C にて 1 時間インキュベートする。プレートを 6 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗フラビウイルス

スモノクローナル抗体 (6B6C) を 100  $\mu$ L/well 入れ、室温にて 30 分間インキュベートする。再びプレートを 6 回洗浄した後、TMB 溶液を各ウェルに 100  $\mu$ L 入れて 8 分間反応させる。1 N 硫酸液にて反応を停止した後、吸光度形にて Optical Density (OD) を測定する (図 1)。

#### 2) 使用したワクチン小分け品

製造承認後、平成 22 年 4 月から平成 22 年 12 月まで B 社のロットに関して抗原 ELISA を実施した。標準品 (TJP012) を基準とした Index 値 (相対抗原量価) の算出法は、平行線定量法 (Bioassay Assist) により算出した。また、A 社の 1 ロットに関しても同様にして検討した。

### C. 結果

抗原検出 ELISA はワクチン原液から 2 倍階段希釈して 64 倍まで希釈し、抗原量を測定した。その結果 OD 値は希釈に相関して容量依存性に減少した。測定した OD 値を平行線定量法により標準品と相対抗原量価を算出した。図 2 に示す如く力価試験による相対力価 (中和抗体力価) と抗原 ELISA 法による相対抗原量価は、3 ロットに関しては、中和抗体力価が高くなったが、それ以外は比較的良好的な相関関係を示した。しかし、製造メーカーが異なるロットに関しては大きく外れ (図 3)、平行線定量法に関して信頼性に注意すべき解析結果となった (図 4)。

### D. 考察

日本脳炎ワクチンの力価試験は、マウスにワクチンを 2 回免疫し、その中和抗体力価を参照品と比較することによって判定している。本方法は、動物 (マウス) を用いる評価方法であり。一定の範囲内で結果がぶれる試験であり、許容範囲が設定されている試験である。一方、抗原 ELISA 法によるウイルス抗原定量ははるかに結果が一定の範囲内に収まる試験である。ワクチン力価と抗原量は異なる概念であり、まったく同一であると考えすることはできない。特に日本脳炎ワクチンは中和抗体力価を指標にワクチン行政を実施してきた歴史もあり、安易に力価試験を抗原定量試験に変更すべきではない。しかし、製剤が液状ワクチンから凍結乾燥ワクチンに代わり、原液が同一であっても凍結乾燥ラインが異なる製品は異なるロットとされる現状では、原液が同一の小分け製品であれば、1 ロットを選んで力価試験を実施し、その他のロットに関してはウイルス抗原量を比較し、同量であればそれを持って適とすることも考慮すべきではないかと考えられる。ただし、製造メーカーが異なる場合、平行線定量法による相対抗原量価は回帰係数が大きく異なり、信頼性が失われた。検討した A 社のロットは 1 ロットでありさらに検討が必要であるが、たとえば標準品をそれぞれ別に定めるなど条件を考慮する必要がある。

### E. 結論

細胞培養日本脳炎ワクチン抗原定量

ELISA 法を開発し、小分け製品に関して抗原量を検討したところ、マウスを用いた中和力価とそれなりに相関を示したが、製造メーカーが異なる場合、信頼性が失われた。今後、抗原 ELISA の標準品を 1 つに定めると中和力価との相関が成立しない可能性が示唆された。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

**H. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得

なし

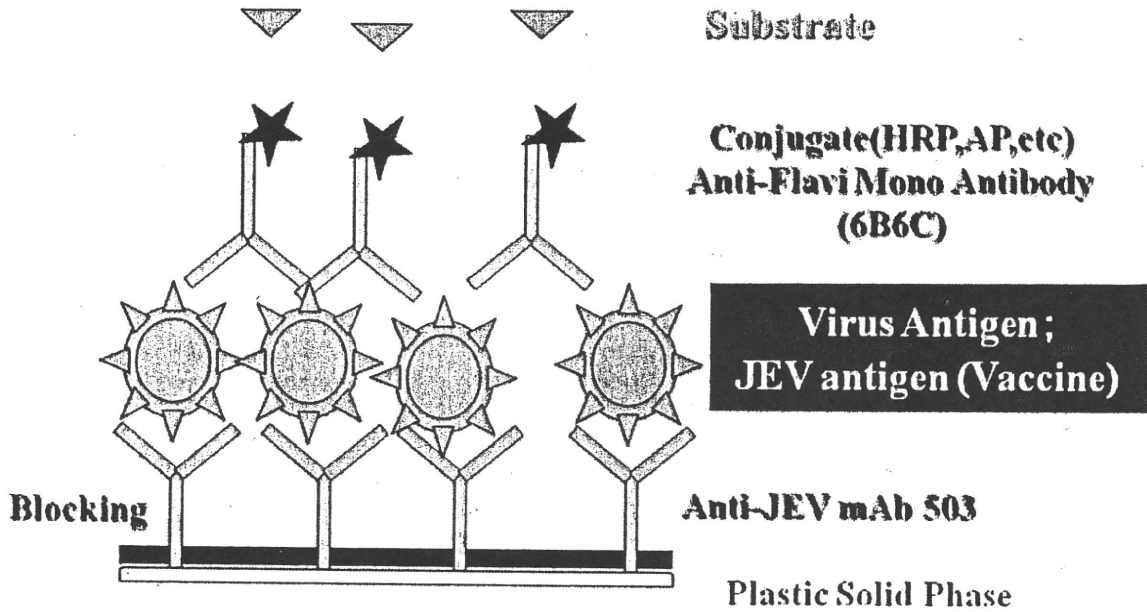
2. 実用新案登録

なし

3. その他

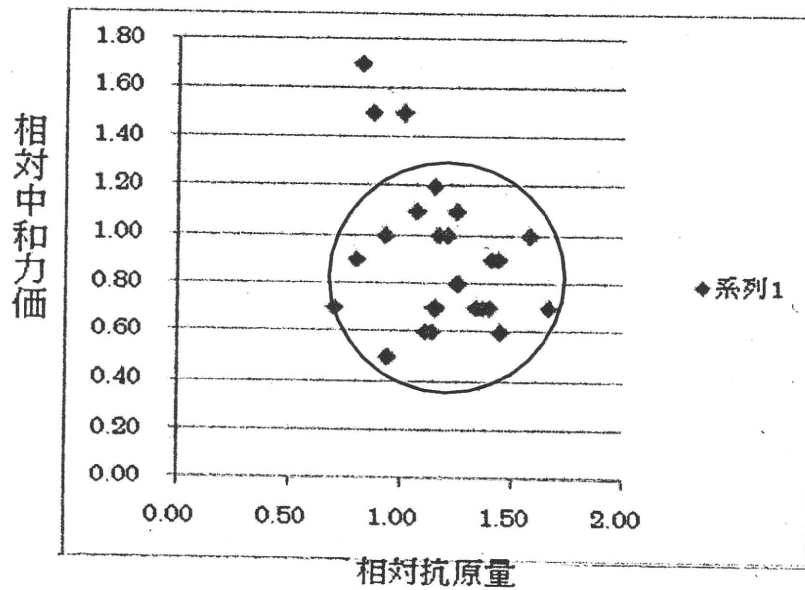
なし

【図1】 日本脳炎ワクチン抗原 ELISA 法



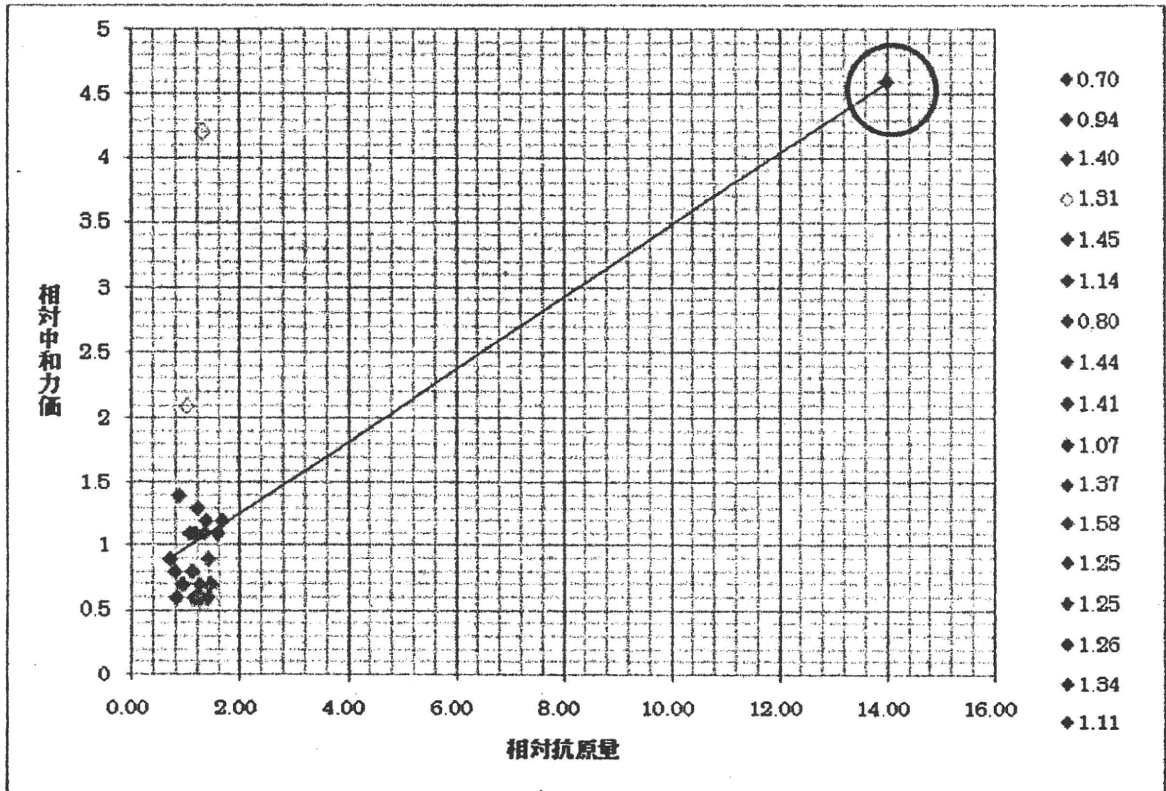
96 ウェルプレートに抗日本脳炎ウイルス単クローン抗体 (mAb503) を固層化し、日本脳炎抗原を捕捉する。

【図2】 平行線定量法 (BioAssay assist) により算出された Index (相対抗原価) と力価試験による相対力価間の相関関係 (1社)



相対抗原量は TJP012 (標準抗原) を基準とした。

【図3】 平行線定量法 (BioAssay assist) による算出された Index (相対抗原価) と力価試験による相対力価間の相関関係 (2社)



製造メーカーが変更されると相関関係が大きくはずれ信頼性が失われた。

【図4】 製造メーカー間の回帰係数の違い

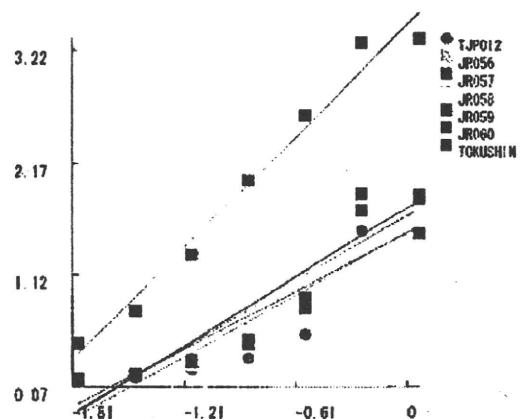
要因	平方和	自由度	平均平方和	F
検体間	8.39599	6	1.39933	17.855**
回帰	21.52794	1	21.52794	274.695**
平行性	1.23113	6	0.20519	2.618*
用室間	33.89803	48	0.70621	
誤差	2.74296	35	0.07837	
合計	33.89803	48		

回帰係数			切片
TJPO12	0.953		1.499
JRC56	1.019		1.657
JRC57	1.022		1.658
JRC58	1.004		1.645
JRC59	1.071		1.735
JRC60	0.894		1.486
TOKUSHIN	1.733		3.456
共通の回帰係数:	1.101		

	相対力価	95%信頼区間	
JRC56	1.25286	0.61733	2.62128
JRC57	1.24875	0.61521	2.61191
JRC58	1.25887	0.62042	2.63498
JRC59	1.33579	0.65995	2.81152
JRC60	1.11057	0.54386	2.30016
TOKUSHIN	14.00534	6.09268	46.98179





## 組換えヒトパピローマウイルスワクチンの規格試験についての研究

分担研究者 終元 巖 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長  
研究協力者 松尾理加 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

**研究要旨：**2価ヒトパピローマウイルスワクチン「サーバリックス」（製造所：グラクソ・スミスクライン株式会社）の VLP 力価試験に用いられる参照ロットワクチンの切り替えの妥当性を検討した。新旧参照ロット間の力価に有意差は検出されず、感染研と製造所のデータの間にも乖離は認められないことから、参照ロット切り替えの妥当性が示された。参照ロットの切り替えは一部変更承認申請に該当し、試験品の提供を受けて試験を行うことは法的には求められていないが、少なくとも切り替え時に製造所のバリデーションデータを確認し、感染研においても新旧参照ロットの比較試験を最小限行うことが重要と考えられた。

### A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（HPV）は子宮頸癌の原因ウイルスとして知られており、近年欧米にて HPV に対する感染予防ワクチン（HPV ワクチン）が開発され、2006 年から販売されている。HPV ワクチンは、HPV のキャプシド蛋白質 L1 を遺伝子組換え酵母細胞や昆虫細胞／組換えバキュロウイルス系で発現させ、ウイルス様粒子（VLP）に再構成させた「遺伝子組換え蛋白質ワクチン」である。その作製にはシードロットシステムが導入されており、高度に均一な品質のワクチン生産が期待される。我が国でも 2 価 HPV ワクチン（サーバリックス：グラクソ・スミスクライン株式会社）が 2009 年 10 月に承認され、2009 年 12 月から販売が開始されている。

サーバリックスの生物学的製剤規準においては、力価試験として従来型の動物を用いた試験ではなく、有効成分である VLP の含量を測定する試験

（VLP 力価試験）が設定されている。この VLP 力価試験は、VLP の高次構造を認識する抗 L1 マウスモノクローナル抗体を用いて、立体構造を保持した VLP 量を酵素免疫測定法（ELISA）にて定量する。その際、VLP 含量値ではなく、参照ロットとなる小分けワクチン（臨床試験にて有効性が示されたロット）に対する相対力価値が規格値として設定されている。本年度は、一部変更承認申請として予定されている参照ロットの切り替えの妥当性を製造所と共同で検討し、参照ロット切り替えに関するプロトコルの確立を試みた。

### B. 材料と方法

#### VLP 力価試験

グラクソ・スミスクライン社から提供を受けたサーバリックスの旧参照ロット（DHPV005A9）及び新参照ロット（AHPVA96A）を 0.1%カゼイン及び 0.1%ポリソルベール 20 を含むり

ン酸緩衝液生理食塩溶液 (PBS) で希釈して、試料溶液とした。HPV16 VLP 標準物質及び HPV18 VLP 標準物質を 2 倍希釈で 11 段階に希釈し標準溶液とした。

希釈した試料溶液及び標準溶液に含まれる VLP 含量を、抗 HPV16 L1 蛋白質ウサギポリクローナル抗体及び HPV16 VLP の主要な中和エピトープを認識するマウスモノクローナル抗体又は抗 HPV18 L1 蛋白質ウサギポリクローナル抗体及び HPV18 VLP の主要な中和エピトープを認識するマウスモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法により、それぞれ測定した。

#### VLP 含量および相対力価の算出

標準溶液の測定値から SoftMax Pro ソフトウェアにて 4 パラメータ回帰近似法を用いて検量線を作成し、試料溶液に含まれる VLP 量を算出した。得られた VLP 量から、旧参照ロットに対する新参照ロットの相対力価を算出した。

#### **C. 研究結果**

新旧参照ロットに含まれる HPV-16 VLP および HPV-18 VLP の含量、および旧参照ロットに対する新参照ロットの相対力価を表 1、表 2 に示す。3 回の試験の平均値は、HPV16: 0.99 (標準偏差 : 0.02)、HPV18: 1.03 (標準偏差 : 0.04) であった。新旧参照ロットに含まれる VLP 含量に差があるかを、対応のある t 検定により検定した結果は、HPV16 および HPV18 とともに 5% の有意水準で有意差は検出されなかった。

グラクソ・スミスクライン社のバリデーションデータでは、旧参照ロットに対する新参照ロットの相対力価は、31 回の試験の平均値で HPV16: 0.96

(標準偏差 : 0.06)、30 回の試験の平均値で HPV18: 1.01 (標準偏差 : 0.08) と報告されている。感染研とグラクソ・スミスクライン社のデータを比較した box plot を図 1 に示す。等分散を仮定しない Welch の検定の結果は、感染研とグラクソ・スミスクライン社のデータの間、HPV16 および HPV18 とともに 5% の有意水準で有意差は検出されなかった。なお有意差は認められなかったが、感染研の試験値がグラクソ・スミスクライン社の試験値より若干高めとなる傾向が認められた。

#### **D. 考察**

感染研の試験で新旧参照ロット間の力価に有意差は検出されず、感染研とグラクソ・スミスクライン社のデータの間にも乖離は認められないことから、AHPVA96A を新しい参照ロットとして VLP 力価試験に用いるのは妥当と考えられる。

サーバリックスの生物学的製剤基準での VLP 力価試験の規格は、参照ロットに対する相対力価で、HPV16: 0.78 - 1.45、HPV18: 0.79 - 1.47 と規定されている。新規参照ロットを用いた今後の VLP 力価試験では、グラクソ・スミスクライン社のバリデーションデータにもとづいて、HPV16 では 0.96、HPV18 では 1.01 を、試験で得られた相対力価に乗じた値が規格内に収まる必要があると考えられた。

#### **E. 結語**

サーバリックスの VLP 力価試験に用いられる参照ロットワクチンの切り替えが、科学的に妥当であることを確認した。参照ロットワクチンの有効期間が 2-8°C で 3 年間であることから、今後も同様の切り替えが行われると考えられる。参照ロットの切り替えは一部変更承認申請に該当し、試験品の

提供を受けて試験を行うことは法的には求められていないが、少なくとも切り替え時に製造所のバリデーションデータを確認し、国立感染症研究所においても新旧参照ロットの比較試験を最小限行うことが、今後の HPV ワクチンの品質管理上、重要と考えられる。

#### F. 健康危害情報

無し

#### G. 研究発表

論文発表

(欧文)

1. R. Kusumoto-Matsuo, T. Kanda,

and **L. Kukimoto**. Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes to Cells*, 16: 23-33, 2011.

(和文)

無し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

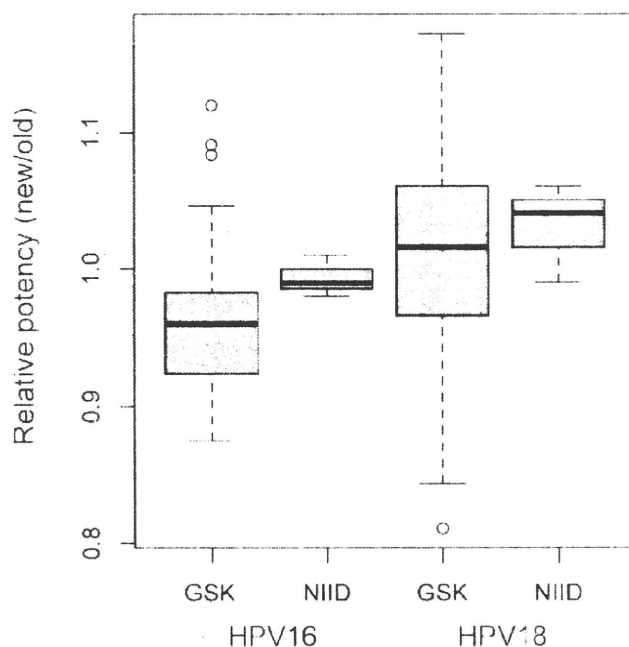
無し

【表 1】 新旧参照ロットに含まれる HPV-16 VLP 含量

試験日 (YY/MM/DD)	HPV-16 L1 VLP (µg/mL)		Ratio AHPVA096A / DHPV005A9/Q
	AHPVA096A (new)	DHPV005A9/Q (old)	
2010/08/24	33.5	33.9	0.99
2010/08/26	30.8	30.6	1.01
2010/08/31	36.0	36.6	0.98
平均	33.4	33.7	0.99
標準偏差	2.6	3.0	0.02

【表 2】 新旧参照ロットに含まれる HPV-18 VLP 含量

試験日 (YY/MM/DD)	HPV-18 L1 VLP (µg/mL)		Ratio AHPVA096A / DHPV005A9/Q
	AHPVA096A (new)	DHPV005A9/Q (old)	
2010/08/24	30.0	28.2	1.06
2010/08/26	30.7	29.6	1.04
2010/08/31	30.8	30.9	1.00
平均	30.5	29.6	1.03
標準偏差	0.4	1.4	0.04



【図 1】 感染研 (NIID) とグラクソ・スミスクライン社 (GSK) のデータ比較