

## 審議結果報告書

暫定版

平成 21 年 2 月 13 日  
医薬食品局審査管理課

[販売名] ジェービック V  
[一般名] 乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン  
[申請者] 財団法人 阪大微生物病研究会  
[申請年月日] 平成 17 年 6 月 28 日

## [審議結果]

平成 21 年 1 月 29 日に開催された医薬品第二部会において、本品目を承認して差し支えないとされ、薬事・食品衛生審議会薬事分科会に報告することとされた。

なお、本品目は生物由来製品に該当し、再審査期間は 8 年とし、原体及び製剤とともに劇薬に該当するとされた。

また、添付文書の【接種上の注意】3. (1) 5) の「特発性血小板減少性紫斑病」を「急性血小板減少性紫斑病」に改めることとされた。

本剤については、下記の点を承認条件とした。

本剤は、製造販売後、可及的速やかに重篤な副反応に関するデータを収集し、段階的に評価を行うとともに、その結果を踏まえ、本剤の適正使用に必要な措置を講じること。

審査報告書

平成 21 年 1 月 19 日

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

承認申請のあった下記の医薬品にかかる医薬品医療機器総合機構での審査結果は、以下の通りである。

記

[販売名] ジェービック V

[一般名] 乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン

[申請者名] 財団法人阪大微生物病研究会

[申請年月日] 平成 17 年 6 月 28 日

[剤型・含量] 本剤 1 バイアルを添付の溶剤（日本薬局方「注射用水」）0.7mL で溶解したとき、0.5mLあたり、有効成分である不活化日本脳炎ウイルス北京株を  $2.5\mu\text{g}$ （たん白質含量）含有する皮下注射用凍結乾燥製剤

[申請区分] 医療用医薬品 (I) 新有効成分含有医薬品

[特記事項] 迅速審査

生物学的製剤基準（案）「乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン」が提出されている。

[審査担当部] 生物系審査第二部

## 審査結果

平成 21 年 1 月 19 日

[販売名] ジェーピック V

[一般名] 乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン

[申請者名] 財団法人阪大微生物病研究会

[申請年月日] 平成 17 年 6 月 28 日（製造販売承認申請）

### [審査結果]

提出された資料から、本剤は「日本脳炎の予防」に必要な抗体価が得られることが示され、日本脳炎の予防に対する有効性が得られると判断した。安全性については、接種後の注射部位局所反応、発熱等の副反応が認められるものの忍容性に大きな問題はないと判断した。ただし、本剤は非常に多くの健康小児に接種されると予測されるワクチンであることから、製造販売後調査において早急に情報収集を行い、安全性を確認することが必要と考える。

以上、医薬品医療機器総合機構における審査の結果、本品目については、以下の効能・効果、用法・用量で承認して差し支えないと判断した。

[効能・効果] 本剤は、日本脳炎の予防に使用する。

[用法・用量] 本剤を添付の溶剤（日本薬局方注射用水）0.7mL で溶解する。

初回免疫：通常、0.5mL ずつを 2 回、1～4 週間の間隔で皮下に注射する。ただし、3 歳未満の者には、0.25mL ずつを同様の用法で注射する。

追加免疫：通常、初回免疫後おおむね 1 年を経過した時期に、0.5mL を 1 回皮下に注射する。ただし、3 歳未満の者には、0.25mL を同様の用法で注射する。

[承認条件] 本剤は、製造販売後、可及的速やかに重篤な副反応に関するデータを収集し、段階的に評価を行うとともに、その結果を踏まえ、本剤の適正使用に必要な措置を講じること。

## 審査報告 (1)

平成 20 年 11 月 21 日

### I. 申請品目

[販売名]	ジェーピック V
[一般名]	乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン
[申請者]	財団法人阪大微生物病研究会
[申請年月日]	平成 17 年 6 月 28 日 (製造販売承認申請)
[剤型・含量]	本剤 1 バイアルを添付の溶剤 (日本薬局方「注射用水」) 0.7mL で溶解したとき、0.5mLあたり、有効成分である不活化日本脳炎ウイルス北京株を参照品 (力価) と同等以上、含有する皮下注射用凍結乾燥製剤
[申請時効能・効果]	本剤は、日本脳炎の予防に使用する。
[申請時用法・用量]	本剤を添付の溶剤 (日本薬局方注射用水) 0.7mL で溶解する。 ◎ 初回免疫 : 通常、0.5mL ずつを 2 回、1~4 週間の間隔で皮下に注射する。ただし、3 歳未満の者には、0.25mL ずつを同様の用法で注射する。 ◎ 追加免疫 : 第 1 回の追加免疫には、通常、初回免疫後おおむね 1 年を経過した時期に、0.5mL を 1 回皮下に注射する。以後の追加免疫の接種量もこれに準ずる。ただし、3 歳未満の者には、0.25mL を同様の用法で注射する。
[特記事項]	迅速審査 生物学的製剤基準 (案) 「乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン」が提出されている。

### II. 提出された資料の概略及び医薬品医療機器総合機構における審査の概要

本申請において、申請者が提出した資料及び独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (以下、機構) からの照会事項に対する申請者の回答の概略は、下記のようなものであった。

#### 1. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

日本脳炎は、蚊 (主にコガタアカイエカ) が媒介する日本脳炎ウイルスによって起こる感染症であり、感染した場合の日本脳炎の発症は 250 人に 1 人程度 (*Vaccines*, 4th ed., 2004; WB Saunders, Philadelphia, USA) とされている。感染後 1~2 週間の潜伏期を経て、急激な発熱、頭痛を主訴として発症し、その後、頸部硬直、光線過敏、意識障害、筋硬直、不随意運動等の脳炎症状が発現する。特異的な治療法はなく、高熱、痙攣及び脳浮腫等に対する対症療法が施されるものの、致死率は高く、生存しても痙攣、麻痺、精神発達遅延、精神障害等の精神神経学的後遺症を残すことが多い。日本脳炎患者個人票により確認された 1982~1998 年の日本脳炎患者 330 例の転帰は死亡 56 例 (17.0%)、後遺症 160 例 (48.5%)、全治 101 例 (30.6%)、その他 13 例 (3.9%) である。

日本脳炎は日本のみならず韓国、中国、タイ、ベトナム、インド等の東南アジア・南アジア一帯に広く分布しており、世界的には年間約5万人(*Weekly Epidemiological Record*, 2006; 81: 325-340, WHO)が日本脳炎を発病しているとされる。日本では、下図のように1966年までは毎年1000人以上、ときに5000人を超える患者が発生していたが、その後患者数は激減し1972年以降は100人以下、1992年以降は10人以下の患者発生となっている。この理由として、コガタアカイエカの主要な発生源である水田の減少、日本脳炎ウイルスの主要な増幅動物であるブタの飼育環境の変化等の環境的要因が挙げられるとともに、後述する日本脳炎ワクチンの改良・普及が大きな役割を果たしたと考えられている。

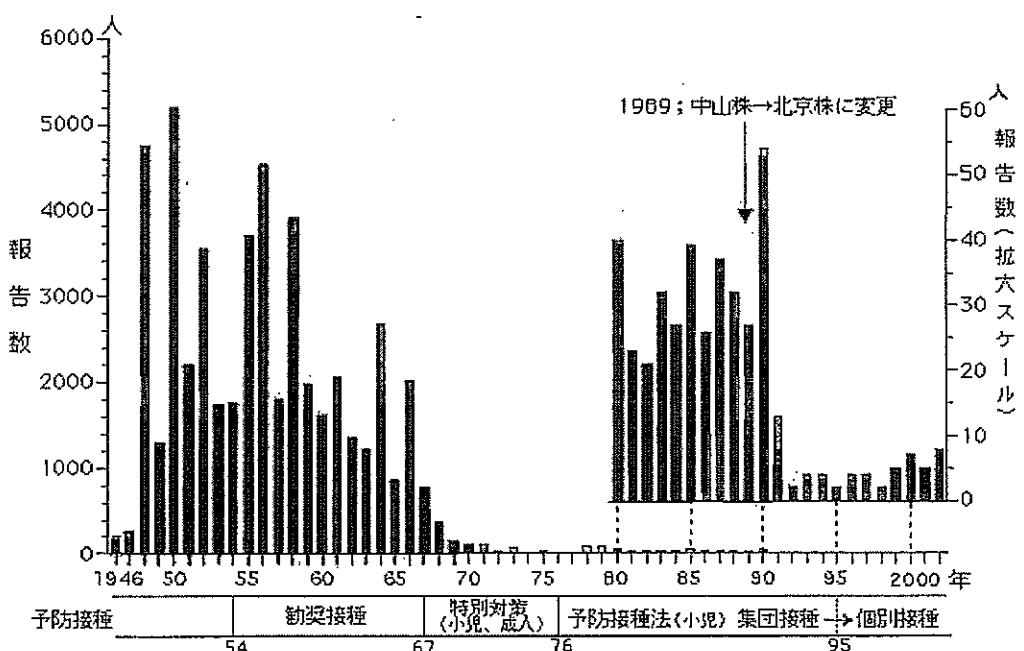


図1 日本脳炎患者数(1946～1964年伝染病統計、1965～1988年伝染病流行予測調査、1999～2002年感染症発生動向調査)  
(IASR2003; 24: 149-150, <http://idsc.nih.go.jp/iasr/24/281/tpc281-i.html> <2008年11月>より引用)

日本脳炎に対するワクチンは、1954年に、日本脳炎ウイルス中山株をマウス脳で増殖させ、その5%脳乳剤の遠心上清にホルマリンを添加し、ウイルスを不活化したものが本邦で最初に実用化されたが、不純物が多く、アレルギー性の中枢神経障害を起こす可能性が指摘されていたことから、純度を向上させる改良が続けられた。1965年にはアルコール、硫酸プロタミン、超遠心法を組み合わせた高度精製ワクチンが開発され、その製造方法が基本として継承され現在に至っている。1988年にはワクチン製造用株が、抗体産生力が高く野生株との交叉反応性が優れているとの理由で中山株から北京株へ変更されている。申請者においても、1965年に超遠心精製日本脳炎ワクチン、1976年に乾燥日本脳炎ワクチン、1988年に北京株日本脳炎ワクチンが開発されている。また、1954年以降、このようなワクチンの改良とともに国の感染症予防対策として接種効率が行われ、1976年からは予防接種法に基づく一般的な臨時接種、1994年からは定期接種とされている。なお、現在（2008年

11月時点)も日本脳炎ワクチンは定期接種として接種されているが、2005年5月30日健感発第0530001号厚生労働省健康局結核感染症課課長通知「定期の予防接種における日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えについて(勧告)」により、積極的な接種勧奨は差し控えられている状況である。

本剤は、ウイルスを増殖させる宿主としてVero細胞(アフリカミドリザル腎臓由来株化細胞)を使用して製造する日本脳炎ワクチンである。従来のマウス脳由来ワクチンにおける、マウスからの迷入ウイルスやマウス脳成分の残存の可能性を完全に否定できない等の品質管理上の問題、大量にマウスを使用することから生産計画を立て難く、また、大量のマウスの安定的な確保という生産管理上の問題、動物愛護等の問題を解決することを目的に開発された。2000年1月より臨床開発が開始され、第I相試験及び第III相試験の成績をもって2000年6月に承認申請がなされた。また、本承認申請後に、用量反応性を検討する臨床試験が実施されている。

## 2. 品質に関する資料

### <提出された資料の概略>

本剤は、日本脳炎ウイルス北京株をアフリカミドリザル腎臓由來のVero細胞で増殖させ、ウイルス粒子をホルマリンにより不活化した後、精製したワクチン(凍結乾燥製剤)である。

#### (1) 原薬

##### 1) 製造方法

###### ① シードの起源及び管理

1968年に国立予防衛生研究所(現・国立感染症研究所)から分与された日本脳炎ウイルス北京株を、乳のみマウス脳で1代継代して得られたウイルスが[REDACTED]のマスターシード(MS)とされ、さらに乳のみマウス脳で1代、成熟マウス脳で1代継代してワーキングシード(WS)が作製された。1970年6月に作製された[REDACTED]のWSである[REDACTED]を本剤のオリジナルウイルスとして、Vero細胞で1代継代したものが本剤のMS、さらにVero細胞で1代継代したものが本剤のWSである。

MSについて、アフリカミドリザル腎培養細胞接種試験、ヒト培養細胞接種試験、ウイルス含量試験、同定試験、無菌試験(直接法)、マイコプラズマ否定試験、Cultivable mycoplasma test CFR、Noncultivable mycoplasma test及び含湿度試験が実施され、WSについても、上記試験のうち含湿度試験を除く全ての試験が実施されている。

[REDACTED] WSは1年間の製造に必要な量を下回った時点でMSから調製され、上記試験のうち含湿度試験を除く8試験に適合することを確認した後、新しいWSとして使用される。また、[REDACTED]の顕著な[REDACTED]、[REDACTED]の[REDACTED]、又は[REDACTED]の[REDACTED]がシードに起因することが明らかになった場合に当該シードは廃棄され、同様の手順で更新される。

保存期間中の安定性について、保存開始約1年後のMS及び保存開始約1年後のWSの[REDACTED]は、製造時と比べ顕著な差が認められなかったことから、保存中のシードウ

イルスは安定に保持されていると判断されている。また、WS を新たに調製するために MS を融解する際、及び原液を製造するために WS を融解する際に [ ] を測定し、保存中の安定性を確認することとされている。

## ② セルバンクの起源及び管理

本剤の製造に使用する Vero 細胞は、アフリカミドリザル腎臓由来の株化細胞 (ATCC.CCL81, Vero, [ ]) に由来し、[ ] 培養で [ ] 代継代してマスターセルバンク ([ ] 代；以下、MCB) が、さらに [ ] 培養で [ ] 代、[ ] 培養で [ ] 代継代してワーキングセルバンク ([ ] 代；以下、WCB) が調製された。

MCB 及び WCB について、形態観察試験、無菌試験（直接法）、結核菌培養否定試験、マイコプラズマ否定試験、Cultivable mycoplasma test CFR、Noncultivable mycoplasma test、アフリカミドリザル腎培養細胞接種試験、ヒト培養細胞接種試験、成熟マウス接種試験（筋肉内）、乳のみマウス接種試験（筋肉内）、モルモット接種試験（筋肉内）、ウサギ接種試験（筋肉内）、ニワトリ卵接種試験（尿膜腔内、卵黄嚢内）、細胞同定試験、造腫瘍性試験（ヌードマウス）、軟寒天コロニー形成試験、ウイルス感受性試験、レトロウイルス否定試験（電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性試験、PCR 法による SIV 遺伝子の否定試験）が実施されている（WCB については形態観察試験、細胞同定試験、軟寒天コロニー形成試験、ウイルス感受性試験、レトロウイルス否定試験（電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性試験、PCR 法による SIV 遺伝子の否定試験）を除く）。また、実製造に使用する継代数 ([ ] 代) を超えて培養された細胞 ([ ] 代) について得られた試験成績から、培養期間中の安定性が確認されている。

MCB は [ ] 年間、WCB は [ ] 年間の製造に必要な量を下回った時点で、それぞれ Vero 細胞 (ATCC.CCL81, Vero, 121)、MCB から作製され、上記試験に適合することが確認される。また、細胞生存率の顕著な低下、異種微生物の混入、又は生産物の変化がセルバンクに起因することが明らかになった場合に当該セルバンクは廃棄され、上記手順に従って更新される。

19[ ] 年に調製した WCB を 20[ ] 年までに [ ] 本以上使用しており、[ ] に顕著な変化が認められないことから、保存中のセルバンクは安定に保持されているとしている。また、MCB を [ ] 時及び WCB [ ] 時に [ ] を測定し、保存中の安定性が確認される。

## ③ 製造方法

### 個体別細胞培養工程

WCB を細胞培養用培養液 ([ ] v/v% 子牛血清) [ ] g/L 炭酸水素ナトリウム [ ] mg/L L (+)-グルタミン、[ ] w/v% [ ]、[ ] w/v% [ ]、[ ] w/v% [ ]、  
[ ] w/v% [ ]、[ ] mg (力価) ルエリスロマイシンラクトビオニ酸塩、[ ] mg (力価) ルアムホテリシン B、[ ] v/v% 子牛血清を含む MEM) に播種して [ ] C で [ ] 日間  
[ ] 培養し ([ ] 代細胞)、次に [ ] kg の細胞培養用培養液 ([ ] v/v% 子牛血清) (子牛血清濃度以外は上記培養液の組成と同様) 中、最終濃度 [ ] g/kg のマイクロキャリアを添加して、  
培養液を交換しながら [ ] C で [ ] 日間攪拌培養する ([ ] 代細胞)。培養液量を約 [ ] 倍ずつスケールアップしながら継代を繰り返し、[ ] 代細胞を [ ] 日間培養してウイルス培養

に用いる（培養液量は [ ] kg）。

工程内管理試験として、培養終了時に観察試験（マイクロキャリア）を実施する。また、[ ] 代細胞を別容器で培養した対照細胞について、培養観察、血球吸着ウイルス否定試験、アフリカミドリザル腎培養細胞（Vero 細胞）接種試験、及びヒト培養細胞（ヒト胎児肺由来 HEL 細胞）接種試験を行う。

#### ウイルス培養工程

Vero 細胞にウイルス培養用培養液（子牛血清濃度 [ ] v/v%）及び炭酸水素ナトリウム濃度 [ ] g/L 以外は上記培養液の組成と同様）を [ ] kg まで添加後、m.o.i. が [ ] となるように WS を添加して [ ] ℃ で [ ] 日間培養する。

本工程では工程内管理試験は設定されていない。

#### ウイルス採取工程

[ ] 日後にウイルス培養上清を回収し、フィルターろ過により細胞夾雜物を除去した後、限外ろ過（分画分子量 [ ] ）により濃縮・透析し、[ ] 種の [ ] のフィルターを用いて除粒子ろ過を行う。回収液を [ ] kg に調製し、これをウイルス浮遊液とする。

工程内管理試験として、ウイルス浮遊液について無菌試験（メンプランフィルター法）、マイコプラズマ否定試験及びウイルス含量試験を行う。

#### ウイルス不活化工程

ウイルス浮遊液に最終濃度が [ ] v/v% となるようホルマリンを添加し、[ ] pm で [ ] 分間攪拌した後、攪拌を止め、[ ] ℃ で不活化を行う。不活化開始後 [ ] ～ [ ] 日目にウイルス浮遊液を採取し、その一部を用いて本工程の工程内管理試験である不活化試験（マウス）※<sup>1</sup> を実施する。試験に適合した場合、[ ] から [ ] までの [ ] 倍以上、かつ不活化開始後 [ ] 日以上（上限 [ ] ヶ月）を経過した後に、不活化期間を終了する。一方、試験に不適合となった場合は、判定日より [ ] 週間以内に再度検体を採取し試験を行う。

不活化期間が終了したものを不活化ウイルス浮遊液（重要中間体）とし、使用時まで [ ] ℃ に保存する（標準的仕込量 [ ] kg × [ ] ）。

#### 高度精製工程

不活化ウイルス浮遊液に最終濃度が [ ] v/v% となるよう硫酸プロタミンを添加し、[ ] ℃ で [ ] ～ [ ] 日間保存した後、遠心上清のプロタミン処理不活化ウイルス液を回収して [ ] ～ [ ] % ショ糖密度勾配遠心を行う。ショ糖濃度 [ ] ～ [ ] % の画分について [ ] ～ [ ] % ショ糖密度勾配遠心を行い、ショ糖濃度 [ ] ～ [ ] % の画分を回収して総量が [ ] kg になるまで [ ] mol/L [ ] を加えた後、限外ろ過（分画分子量 [ ] ）により [ ] kg まで濃縮する。さらに [ ] 倍希釈及び [ ] 倍濃縮を [ ] 回、並びに [ ] 倍希釈及び [ ] 倍濃縮を [ ] 回行い、得られた濃縮液 [ ] kg に [ ] v/v% [ ] を総量が [ ] kg になるまで加え、精製ウイルス液とする。

本工程について工程内管理試験は設定されていない。

#### 最終ろ過工程

精製ウイルス液に、ホルムアルデヒド含量が [ ] μg/mL となるようホルマリンを添加し、

※<sup>1</sup> 不活化試験（マウス）では、検体を 20 匹以上のマウスの脳内に接種し 14 日間いずれの動物も異常を示さないとき、当該試験に適合すると判定される。

ろ過滅菌を行う。さらに同一フィルターに [v/v%] を加えて同じ容器に回収し、本剤の原液とする（総量 [kg]）。

工程内管理試験として、本工程で使用したフィルターの完全性試験を行う。

#### ④ 重要工程・重要中間体及びプロセス・バリデーション

以下の 6 工程が重要工程に設定されている。

##### 個体別細胞培養工程

ウイルス培養の細胞基質を調製する工程であることから、重要工程とされた。測定に使用した [ロット] について、ワーキングセルバンクの生細胞率及び各継代時の細胞数に大きな差はみられないことが確認された。

##### ウイルス培養工程

日本脳炎ウイルスを増殖させる工程であることから、重要工程とされた。[ ] はウイルス接種後 [ ] 又は [ ] 日目の培養上清で最も高く、[ ] は [ ] 日目で最も高いことが確認され、ウイルス培養期間はウイルス接種後 [ ] 日間と設定された。

##### ウイルス採取工程

ウイルスの増殖及び回収の程度を確認するとともに、次工程の出発物質としての適格性を確認する工程であるため、重要工程とされた。ウイルス培養上清からウイルス浮遊液に至る各検体 [ロット] についてウイルス含量及び抗原含量（ELISA）を、[ロット] についてたん白質含量及び Vero 細胞由来 DNA 含量を測定した結果、本工程により恒常的にウイルスの回収及び Vero 細胞由来 DNA の除去が行われていることが確認された。

##### ウイルス不活化工程

不活化ワクチンとしての安全性を確保するため、重要工程とされた。[ロット] の製造実績から、不活化開始後 [ ] 週間でウイルスが十分に不活化されることが確認され、その [ ] 倍の期間である [ ] 週間（[ ] 日間）が不活化期間の下限として設定された。

##### 高度精製工程

不活化ウイルス浮遊液に含まれる不純物を効果的に除去する工程であることから、重要工程とされた。[ ] 添加又は非添加の不活化ウイルス浮遊液について、経時的に抗原含量（ELISA）及び Vero 細胞由来 DNA 含量を測定した結果、[ ] 处理により Vero 細胞由来 DNA が効果的に除去され、かつ、抗原含量に影響を及ぼさない期間は [ ] ～ [ ] 日間とされた。また、[ ] ロットにおける [ ] 回のショ糖密度勾配遠心の結果、ウイルス画分のピークはいずれもショ糖濃度 [ ] ± [ ] % 付近であり、[ ] ～ [ ] % の分画を回収することとされた。[ ] ロットについて、不活化ウイルス浮遊液から原液に至る各検体の抗原含量（ELISA）、たん白質含量及び Vero 細胞由来 DNA 含量を測定した結果、本工程により Vero 細胞由来 DNA は [ ] % 程度まで除去されること、また、有効成分が恒常的に回収されることが確認された。

##### 最終ろ過工程

無菌性の確保及び異物の除去を目的とする工程であり、ワクチンの品質に大きな影響を及ぼす工程であることから重要工程とされた。

また、不活化ウイルス浮遊液は、高度精製工程を開始するまで長期にわたり [ ] ℃ で保存される可能性があるため、重要中間体に設定された。抗原含量試験（ELISA）の結果、不活化

開始後 [ ] ヶ月までの安定性が確認されたとして、不活化ウイルス浮遊液の保存期間は [ ] ヶ月とされた。

#### ⑤ ウィルス安全性評価

ウイルス不活化工程において、ウイルス浮遊液にインフルエンザウイルス (IFV)、単純ヘルペスウイルス 1型 (HSV-1)、又はヒトポリオウイルス Sabin1型 (HPV) を添加し、これにホルマリンを加えて [ ] 日目まで経時的に検体を採取し、各ウイルス含量を測定した。その結果、本剤の不活化工程は上記ウイルスの不活化に有効であることが確認された(表1)。

表1 ウィルスクリアランス指數(平均値)

		IFV (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL)	HSV-1 (PFU/mL)	HPV (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /0.1mL)
ウイルス含量	不活化前	[ ] * [ ]	[ ] X [ ]	[ ]
	不活化後	[ ] ([ ])	[ ] ([ ])	[ ]
ウィルスクリアランス指數 (log <sub>10</sub> )		>6.3 (>6.0～>6.5)	>5.1 (>5.1)	5.80 (5.00～6.13)

\* 最小値～最大値

#### ⑥ 製造工程の開発の経緯

20 [ ] 年製造の原液ロット [ ]～[ ]：ロット [ ] は BK-VJE/001 試験、BK-VJE/002 試験及び BK-VJE/003 試験に使用) から、20 [ ] 年製造の原液ロット [ ]～[ ]：ロット [ ] は BK-VJE/004 試験に使用) に至る開発段階において、[ ]～[ ] ( [ ]、[ ]、[ ] 等)、[ ] 工程で使用する [ ] に変更が加えられた。各製造工程における製造パラメータ及び原液の規格試験成績を、製造方法の異なるロット間で比較した結果、これらの変更は原液の品質に特段の影響を及ぼすものではないと判断された。

#### 2) 特性解析

本剤の原液は、現行ワクチンの生物学的製剤基準(以下、生物基)に示された原液の試験(染色試験、無菌試験、不活化試験(培養細胞及びマウス)<sup>※2</sup>)に適合することが確認されている。さらに、以下の特性について、現行ワクチンと比較されている。

##### 遺伝子解析

塩基配列解析の結果、オリジナルウイルスでは [ ]ヶ所の塩基混在が認められたが、Vero 細胞での継代を重ねるにつれて塩基の混在は減少し、WS (Vero 細胞で [ ]代目) では全て消失することが確認された。一方、MS (Vero 細胞で [ ]代目) では [ ]番目の塩基に新たな変異が検出され、この変異に伴う塩基混在は、原液製造時の継代数に相当するウイルス(Vero 細胞で [ ]代目)においても維持されていることが確認された。

##### SDS-PAGE・ウェスタンブロッティング

<sup>※2</sup> 不活化試験(培養細胞及びマウス)では、検体を BHK 細胞に接種し 14 日間細胞変性を認めない、かつ、BHK 細胞の培養上清を 10 匹以上のマウスの脳内に接種し 14 日間いずれの動物も異常を示さないとき、不活化試験に適合すると判定される。

SDS-PAGE 後のゲルを CBB 染色又は銀染色した結果、本剤原液、現行ワクチン原液とともにウイルス由来のたん白質と考えられる 5 本のバンドが検出された (61.8kDa : Envelope たん白質と M たん白質の複合体、53.5kDa : Envelope たん白質、41.4kDa : Core たん白質 (3 量体)、27.6kDa : Core たん白質 (2 量体)、8.3kDa : M たん白質)。また、抗日本脳炎ウイルスモノクローナル抗体 [REDACTED] 又は抗日本脳炎ウイルスポリクローナル抗体 (マウス抗血清) を用いたウェスタンプロット解析においても、ウイルス由来たん白質と考えられるバンドが確認された。なお、CBB 染色、銀染色及びポリクローナル抗体を用いたウェスタンプロット解析において、本剤原液では [REDACTED] kDa 付近の [REDACTED] に相当するバンドが、現行ワクチン原液では [REDACTED] kDa 付近の [REDACTED] に相当するバンドが最も [REDACTED] バンドとして検出された。

#### ゲルろ過クロマトグラフィー

[REDACTED] ガラムによる解析の結果、本剤原液、現行ワクチン原液ともに溶出時間 [REDACTED] 分にウイルス由来と考えられるピークが検出された。また、現行ワクチン原液では溶出時間 [REDACTED] 分にも高いピークが検出されたが、現行ワクチン原液を透析し、本剤原液の安定剤に置換したところ、本剤原液と同様の分離パターンになったことから、[REDACTED] 分のピークは現行ワクチン原液の TCM-199 に含まれるアミノ酸やソルビトール等に由来すると考えられた。

#### ショ糖密度勾配遠心法

抗原含量試験 (ELISA) 及び吸光度測定 (波長 280nm) の結果、本剤原液は糖濃度 [REDACTED] ~ [REDACTED] % に、現行ワクチン原液は糖濃度 [REDACTED] ~ [REDACTED] % にウイルスピーカーが認められ、本剤原液中のウイルス密度は現行ワクチンと比べて [REDACTED] 可能性が考えられた。

#### 電子顕微鏡観察

本剤、現行ワクチンとともに直径約 50nm のウイルス粒子が観察され、ウイルス粒子以外の夾雑物はほとんど認められないとされた。

#### Envelope たん白質の糖鎖構造解析

AAL (ヒイロチャワンタケレクチン) 染色では本剤、現行ワクチンとともに [REDACTED] 、SSA (ニホンニワトコレクチン) 染色及び MAM (イヌエンジュレクチン) 染色では両者と [REDACTED] が認められた。これにより Envelope たん白質の N 型糖鎖に [REDACTED] が結合していること、[REDACTED] 付加の割合は少ないと、また、そのほとんどが [REDACTED] 結合ではなく [REDACTED] 結合していることが示唆された。また、PHA-E<sub>4</sub> (インゲンマレクチン E<sub>4</sub>) 染色の結果、本剤で [REDACTED] 、現行ワクチンで [REDACTED] がみられたことから、本剤の Envelope たん白質の糖鎖は [REDACTED] 残基の [REDACTED] 位側が分歧した [REDACTED] 本鎖構造であるのに対し、現行ワクチンは [REDACTED] 本鎖構造、[REDACTED] 本鎖構造、あるいは [REDACTED] 位側が分歧した [REDACTED] 本鎖構造を有している可能性が示唆された。

#### ウイルス脂質の定性、定量分析

TLC 法による脂質分析の結果、現行ワクチンは本剤に比べて [REDACTED] 、[REDACTED] 及び [REDACTED] の含有量が [REDACTED] ものの、[REDACTED] に対する相対的な [REDACTED] 含量が [REDACTED] こと、脳組織に特徴的なガングリオシドが検出されたことから、両者のウイルスの脂質二重膜に違いがあることが示唆された。

### 3) 不純物

製造工程由来不純物として、培養工程で使用する血清及び抗生物質、不活化工程で使用するホルマリン、高度精製工程で使用する硫酸プロタミン並びに Vero 細胞由来の DNA 及びたん白質について評価されている。

異種血清たん白質含量試験では原液の [ ] ロット中 [ ] ロットが検出限界以下となり、残り [ ] ロットも [ ] ng/mL と、他の細胞培養ワクチンの生物基に適合する範囲内（最終バルク中の含量が 50ng/dose 以下）である。また、原液の抗生物質残存試験（Minimum Inhibitory Concentration 法：MIC 法）では、カナマイシン硫酸塩含量が [ ] ng（力価）/mL、エリスロマイシンラクトビオニ酸塩 [ ] ng（力価）/mL と推定され、アムホテリシン B は検出限界以下となつたとされている。

ホルマリンは不活化工程で添加されるものの、その後のショ糖密度勾配遠心及び限外ろ過によって、ほぼ完全に除去される。また、硫酸プロタミンは、本剤よりも [ ] 倍以上高濃度で使用された現行ワクチンにおいて、[ ] 回のショ糖密度勾配遠心により [ ] %以上除去されることが確認されており、製造方法に違いがあるものの、本剤においても [ ] 回のショ糖密度勾配遠心及びその後の濃縮・透析により、ほとんどの硫酸プロタミンが効果的に除去されるとしている。

Vero 細胞由来 DNA はウイルス採取工程及び高度精製工程で恒常に除去され、原液 [ ] ロットの実測値 ([ ] ~ [ ] ng/mL) から、[ ] 倍以上希釈される小分製品での含有量は、WHO (WHO Expert Committee on Biological Standardization, Annex I, 1998 (Technical Report Series, No.873)) で定められた細胞由来 DNA 含量の基準値 (10ng/dose 以下) を大きく下回るとしている。また、Vero 細胞由來たん白質含量は、ウイルス浮遊液に至る工程で約 [ ] %、ショ糖密度勾配遠心で [ ] %以上除去され、小分製品 [ ] ロットでは [ ] ~ [ ] ng/mL であった。

#### 4) 規格及び試験方法

原液について、無菌試験、染色試験、不活化試験（培養細胞及びマウス）、力価試験、異常毒性否定試験（モルモット試験法）、発熱試験、抗原含量試験（ELISA）、異種血清たん白質含量試験、Vero 細胞由来 DNA 含量試験、たん白質含量試験、総たん白質含量試験及びエンドトキシン試験が規格として設定されている。

#### 5) 標準品又は標準物質

国立感染症研究所から供給されるマウス脳由来の不活化ウイルス液凍結乾燥品である参考日本脳炎ワクチン（力価試験用）は、2~8°Cの冷暗所で、たん白質定量用標準アルブミンは遮光して 4°C以下で保存され、いずれも国立感染症研究所により有効期間が定められる。

標準物質として日本脳炎標準抗原（抗原含量試験用：本抗原の抗原含量を [ ] 単位/mL と設定）及び自家参考日本脳炎ワクチン（抗原含量試験の試験成立条件の指標、及び力価試験の自家参考品）が設定されている。標準抗原はマウス脳由来の不活化ウイルス液であり（[ ] 品、[ ] °C 保存）、規格は生物基「乾燥日本脳炎ワクチン」の 3.3 小分製品の試験に適合することとされている。残り本数が [ ] 本になった場合、又は抗原含量試験（ELISA）において自家参考日本脳炎ワクチンの抗原含量が [ ] 単位/mL 以上を示し試験が成立しなくなつた場合に、標準抗原は更新される。更新時には規格に適合することが確認されるとともに、自家参考日本脳炎ワクチンの抗原含量をもとに補正され、抗原含量が決定される。