

自家参照日本脳炎ワクチンもマウス脳由来の不活化ウイルス液であり (品名) (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(力価は参照日本脳炎ワクチンに対する相対力価を算出し、表示確認試験は実施しない)。毎年、標準品である参照日本脳炎ワクチンの力価を対照として傾向解析を実施し、力価の変動が観察された場合に更新される。

6) 安定性

20()年製造原液3ロットを用いて長期保存試験 (±()C、()ヶ月) 及び加速試験 (25±2°C/75±5%RH、6ヶ月) が実施された。

長期保存試験では、保存開始から()、()及び()ヶ月後に無菌試験、染色試験、たん白質含量試験、総たん白質含量試験、異常毒性否定試験(モルモット試験法)、異常毒性否定試験(マウス試験法)、力価試験、不活化試験(培養細胞及びマウス)、エンドトキシン試験、Vero細胞由来DNA含量試験、抗原含量試験(ELISA)、発熱試験、及び異種血清たん白質含量試験が実施された。()ヶ月の保存期間中に()、()及び()にわずかな低下が認められたものの、十分な免疫原性が維持されていること、実施した全ての試験において規格に適合していることから、品質の変化は認められないと判断された。

また、加速試験では、6ヶ月の保存期間中に()及び()にわずかな低下が認められたものの、実施した全ての試験において規格に適合していることが確認された。

以上の結果から、原液の保存条件は()±()Cとし、有効期間は()ヶ月と設定された。

(2) 製剤

1) 製剤処方

本剤は、有効成分の不活化日本脳炎ウイルス北京株を、たん白質含量として1バイアル中に3.5µg含有する凍結乾燥製剤であり(使用時に0.7mLの注射用水に溶解し、5µg/mLとなる)、安定剤として乳糖水和物25mg、ホルマリン0.014mg(ホルムアルデヒド換算)、L-グルタミン酸ナトリウム5mg、等張化剤として塩化ナトリウム1.16mg以下、塩化カリウム0.03mg以下、緩衝剤としてリン酸二水素カリウム0.03mg以下、リン酸水素ナトリウム水和物0.42mg以下、希釈剤としてTCM-199 0.15mL(1.65mg/0.15mL)を含む。本剤の1製剤単位は、凍結乾燥製剤1バイアル及び溶解液1バイアル(注射用水0.7mLを含む)である。

2) 製造方法

製剤(凍結乾燥製剤及び溶解液)の製造では、スケールの異なる製造ライン() (バイアル数()本)及び製造ライン() (バイアル数()本)が使用される(各製造ラインのスケールは“()”と記載する)。

凍結乾燥製剤

無菌ろ過した添加剤混合液にたん白質濃度が()µg/mLとなるよう原液を添加して最終バルクとし(標準仕込量()[()])、攪拌しながらガラスバイアルに()mLずつ充填して半打栓し、凍結乾燥を行い、窒素ガスを充填した後、全打栓して巻締めする。

最終バルク調製工程、充填工程及び凍結乾燥工程が重要工程とされ、最終バルク調製工程では無菌試験、充填工程では充填量の均一性確認が工程内管理試験として設定されている。また、小分製品が重要中間体に設定されている。

溶解液

日局「注射用水」の注射用水を調製し（標準仕込量 []）、ガラスバイアルに [] mL ずつ充填して巻締めした後、高圧蒸気滅菌機で滅菌する。

充填工程が重要工程とされ、充填量の均一性確認が工程内管理試験として設定されている。また、溶解液の小分製品が重要中間体に設定されている。

凍結乾燥製剤及び溶解液にラベルを貼付して紙箱に装填し、最終製剤とする。

3) 規格及び試験方法

製剤について、無菌試験、含湿度試験、不溶性異物試験、不溶性微粒子試験、重量偏差試験、たん白質含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、pH 試験、エンドトキシン試験、性状確認試験、浸透圧試験、異常毒性否定試験、力価試験、不活化試験（マウス）、気密性試験、異種血清たん白質含量試験及び表示確認試験（ELISA 法）が規格として設定されている。

4) 標準品又は標準物質

製剤の規格試験において使用する標準品（参照日本脳炎ワクチン、たん白質定量用標準アルブミン）及び標準物質（自家参照日本脳炎ワクチン）は、原液の標準品及び標準物質と同じである。

5) 安定性

製剤（有効成分である不活化日本脳炎ウイルスを、たん白質含量として 10 μ g/mL 含有する製剤）3 ロットを用いて長期保存試験（ \pm °C、ヶ月）、加速試験（25 \pm 2°C/75 \pm 5% RH、6 ヶ月）及び苛酷試験（37 \pm 2°C/75 \pm 5%RH、3 ヶ月）が実施された。

長期保存試験では、製剤の規格試験に加え、無菌試験（グルコース・ペプトン培地）^{※3}、総たん白質含量試験、異常毒性否定試験（マウス試験法）、Vero 細胞由来 DNA 含量試験、抗原含量試験（ELISA）、Cultivable mycoplasma test CFR 及び Non cultivable mycoplasma test が実施された。その結果、保存開始 ヶ月目から含湿度の上昇が認められ、保存 ヶ月目に総たん白質含量の低下傾向が認められたが、全ての試験項目において、設定した試験期間を通して規格に適合することが確認された。加速試験では、長期保存試験と同様の試験（不溶性微粒子試験、重量偏差試験、性状確認試験、浸透圧試験、Cultivable mycoplasma test CFR 及び Non cultivable mycoplasma test を除く）が実施され、6 ヶ月の保存期間中に含湿度の上昇及び総たん白質含量の低下が認められたものの、力価試験を含め全ての規格に適合していた。苛酷試験においても同様の結果が得られた。

^{※3} 生物基「一般試験法」の無菌試験法に定められた培地（チオグリコール酸培地及びソイビーン・カゼインダイジェスト培地）では [] を検出できなかったことから、グルコース・ペプトン培地を用いて無菌試験が実施された（その後、培地調製法の改良により、検出可能となった）。

次に、BK-VJE/004 試験に使用した、たん白質含量の異なる製剤（10μg/mL 製剤、5μg/mL 製剤、2.5μg/mL 製剤）各 1 ロットを用いて長期保存試験（±2℃、ヶ月）、加速試験（25 ±2℃/60±5%RH、6 ヶ月）及び苛酷試験（37±2℃/75±5%RH、3 ヶ月）が実施され、製剤の規格試験に加えて抗原含量試験（ELISA）について評価された。

長期保存試験では、全ての製剤において含湿度の増加及び抗原含量（ELISA）の低下傾向が認められたものの、ヶ月保存の時点で全試験の規格に適合することが確認された。なお、本試験はヶ月まで継続予定である。加速試験では含湿度の増加、ホルムアルデヒド含量及び力価の低下が確認された。その他の試験では保存に伴う変化が認められず、全ての製剤において 6 ヶ月間の保存期間を通して規格に適合することが確認された。また、苛酷試験では抗原含量（ELISA）の低下傾向が認められた他は、加速試験と同様の結果が得られた。

なお、長期保存開始時及びヶ月後のμg/mL 製剤ロットを用いて溶解後の安定性が検証されており、℃又は℃で時間保存した際に抗原含量（ELISA）、力価ともに変化が認められないこと、光照射ux、時間による影響も認められないことが確認された。

<機構における審査の概略>

(1) 生物由来原材料について

申請者から提出された申請資料において、本剤の製造に使用すると説明されているヒト又は動物由来原料のうち、製造年により使用動物の原産国等が異なるものが散見されたことから、機構は市販予定の製剤の製造に使用されるヒト又は動物由来原料を明示するよう求めた。

市販予定の製剤の製造に使用されるヒト又は動物由来原料を表 2 に示す。

表 2 本剤の製造に使用されるヒト又は動物由来原料

原材料	動物	部位	原産国	使用する工程
BSA	ウシ	血液	オーストラリア ニュージーランド	MS の調製
牛胎児血清	ウシ	乳	オーストラリア ニュージーランド	最終バルク調製工程
グリセート	ブタ	骨	アメリカ	MS の調製
牛胎児血清 (FCS)	ウシ	血液	日本 (BSE 発生が確認される前) オーストラリア ニュージーランド	MS 及び MCB の調製
牛胎児血清 (CS)	ウシ	血液	オーストラリア ニュージーランド	MS の調製 WS 及び WCB の調製 個別細胞培養工程
トリプシン	ブタ	脾臓	アメリカ カナダ	MS 及び WS の調製 MCB 及び WCB の調製 個別細胞培養工程
注射用α-ブドウ糖	ウシ	乳	アメリカ、カナダ、ニュージーランド、オランダ、ベルギー、ルクセンブルク、ドイツ	MS 及び MCB の調製 WS、MCB 及び WCB の調製 個別細胞培養工程 ウイルス培養工程
注射用α-ブドウ糖	ウシ	胆汁	アルゼンチン、オーストラリア、ブラジル、ニュージーランド	MS の調製
	ヒツジ	胆汁	ニュージーランド	WS 及び WCB の調製 個別細胞培養工程 ウイルス培養工程

■は反芻動物由来原料基準を満たさない、又はその可能性があるもの

本剤のMS及びMCBを調製する際、平成15年5月20日厚生労働省告示第210号、生物由来原料基準の第4の1、反芻動物由来原料基準（3）に掲げる原産国に該当しないウシ由来BSAが使用されていることについて、当分の間、切り替えが猶予される区分に該当する（平成16年2月18日薬食発第0218004号局長通知）ものの、機構は今後の切り替え予定について尋ねた。申請者は以下のように説明した。MSを更新する予定はなく、ウシのと殺方法や個体識別番号等を含めた製造記録は入手できていないものの、当該MSは19■年に調製しており、調製に使用したBSAは米国でBSEに感染したウシが確認される以前のウシの血液に由来することが確認されていること、MS調製時のBSAの濃度は■v/v%の濃度であり、その後のWS調製、ワクチン原液の製造及び製剤の製造において■倍以上に希釈されると推定されることから、本剤の接種によりBSEに感染するリスクは極めて低いと考える。また、日本脳炎ウイルスは、ブタの疫学調査から国内のほとんどの地域において存在していることが確認されており、本剤により日本脳炎の罹患を予防することは、当該原材料を用いることによるリスクを上回ると考える。

機構は、他の生物由来原材料についてもさらに確認を継続中であり、それらの評価については審査報告（2）にまとめて記載する。

(2) ウイルスシードの管理について

本剤の製造用ウイルス株の塩基配列を解析した結果、オリジナルウイルスで■ヶ所の塩基混在部位が検出され、MSでは新たな変異■ヶ所（塩基番号■番）を含む計■ヶ所、WS及び製造時の継代数に相当するウイルスでは■番目の塩基のみの■ヶ所で塩基混在が認められた。これを踏まえ、機構は、今後WSを調製する際には塩基配列を解析し、本剤の開発時に使用したWSと同一であることを確認するよう求めた。

申請者は、今後WSを調製する際にはウイルスの構造たん白質をコードする遺伝子の塩基配列を解析し、MSの構造たん白質の推定アミノ酸配列と比較して、新たなアミノ酸変異がないことを確認すると回答した。

機構は、MSの塩基混在部位に非構造たん白質をコードする領域が含まれること、また、非構造たん白質領域の変異が本剤の有効性、安全性に影響を及ぼす可能性を完全には否定できないことから、WS調製時には構造たん白質だけではなく非構造たん白質をコードする遺伝子の塩基配列を解析する必要はないか、申請者の見解を求めている。また、申請者は現在、市販予定の製剤の製造に使用する新たなWSの塩基配列を解析中であり、ウイルスシードの管理方法については今後提出される回答の内容も踏まえて検討したい（審査報告（2）に記載）。

(3) セルバンクシステムについて

本セルバンクシステムは、WHO Expert Committee on Biological Standardization, Annex1, 1998 (Technical Report Series, No.878)における生物学的製剤の製造用細胞基材に関する基準を満たすことを確認しているが、さらにICH-Q5D、WHO Expert Committee on Biological Standardization, Genova - 8 to 12 October 2007への対応状況について確認中である。

(4) 製造方法について

個体別細胞培養工程から至る Vero 細胞の培養において、いずれの段階においても細胞の増殖に関する管理基準が設定されていないことについて、機構は、ウイルス培養工程でのウイルス増殖の恒常性を保つために具体的な管理基準を設定するよう申請者に求めた。

申請者は、所内工程内管理試験として及び、
を行うことにより、細胞培養工程の恒常性を確認していると説明した。また、そのうち個体別細胞培養工程の培養開始時の生細胞率 (%以上) 及び個体別細胞培養工程のウイルス接種前の細胞数 (個/mL 以上) について判定基準を設定し、管理すると回答した。

機構はさらに、ウイルス培養工程を重要工程としながら工程内管理試験を設定していないことから、製造工程が一定に保持されていることを確認できる段階に工程内管理試験を設定するよう求めている。

また機構は、ウイルス培養工程におけるウイルスの接種量を管理するよう申請者に求めた。申請者は、SOP においてウイルス接種時の m.o.i. を とすることを規定しており、ウイルス接種時の操作管理項目として m.o.i. = を設定すると回答し、機構はこれを了承した。

ウイルス不活化の条件として、ウイルス浮遊液におけるウイルス含量の下限值 (10 PFU/mL 以上) が規定されていることについて、機構は、ウイルス不活化工程の恒常性を維持するために、ウイルス不活化の際の条件を一定の範囲に管理するよう求めた。申請者は、不活化開始時の を規定することは、ウイルス不活化工程の恒常性を維持するために重要であると考えたものの、現時点では製造実績が少ないことから、将来的に成績が蓄積できた段階で を一定の範囲に規定したいと回答した。機構は、現在までに得られた製造パラメータ等を踏まえ、不活化工程において一定の恒常性が期待できる範囲を管理値として設定できないか検討中であり、その結果は審査報告(2)にまとめて記載する。

その他の工程についても工程内管理試験を設定しする必要はないか、今後提出される回答等も踏まえて検討し、審査報告 (2) に記載する。

(5) 原薬の規格について

Vero 細胞由来 DNA 含量試験の規格値について、申請者は、製剤化の際に原液を 倍以上希釈することから、WHO で定められた細胞由来 DNA 含量の基準値 (10ng/dose 以下) を満たすために、原液における DNA 含量を ng/mL 以下に設定したと説明した。機構は、規格値と実測値 (< ng/mL) に大きな乖離が認められるため、実測値を踏まえて規格値を見直すよう求めた。

申請者は以下のように説明した。小分け製品を用いて Vero 細胞由来 DNA 含量試験を実施したところ、測定値は < ng/dose と WHO の基準値から 桁以上の乖離があった。そのため、当面は小分け製品で ng/dose 以下となるよう原液の規格値を ng/mL 以下に変更し、成績が蓄積された段階で見直しの有無も含めて検討したい。

また機構は、原液のたん白質含量試験の規格が●●●μg/mL以下と設定されていることについて、小分製品の Vero 細胞由来 DNA 含量を●●●ng/dose以下に管理するためにも、原液のたん白質含量の下限値を定めるよう求めた。

申請者は以下のように説明した。5μg/mL 製剤の場合、凍結乾燥による減量分を考慮してたん白質含量●●●μg/mLの最終バルクを調製するが、原液を●●●倍以上希釈するために、原液のたん白質含量試験の規格値を●●●～●●●μg/mLと設定する。

機構は、原液製造工程の恒常性確保の観点から、可能な試験項目については、現在までに得られた実測値に基づいて規格値を見直すよう求めており、検討結果については審査報告(2)に記載する。

(6) 製剤の規格について

機構は、小分製品の規格及び試験方法に設定された規格値について、品質の恒常性担保の観点から、ロット分析における成績を踏まえて規定するよう申請者に求めた。これに対し、たん白質含量試験の規格は現行ワクチンの生物学的製剤基準に準じた 80μg/mL以下から●●●μg/mL以下に、エンドトキシン試験の規格は 100EU/mL以下から●●●EU/mL以下に、ホルムアルデヒド含量試験の規格は 0.01w/v%以下から●●●w/v%以下に変更された。

機構は、BK-VJE/002 試験及び BK-VJE/003 試験において 10μg/mL 製剤の安全性が現行ワクチンと比べて劣る傾向が示唆されたことを踏まえ、安全性確保の観点から、製剤の規格値を 10μg/mL 製剤のたん白質含量よりも低く設定するよう求めている。たん白質含量の規格については上限値はもとより、下限値設定の必要性も含めてさらに検討し、審査報告(2)に記載する。

なお、10μg/mL 製剤のたん白質含量は凍結乾燥によって最終バルク調製時の理論値から約●●●%のロスが生じていたが、5μg/mL 製剤及び 2.5μg/mL 製剤では凍結乾燥によりたん白質含量が●●●していたことから、機構は申請者に説明を求めた。

申請者は以下のように説明した。生物基「一般試験法」のたん白質定量法を準用した本剤のたん白質含量試験の定量範囲は●●～●●●μgであることから、たん白質含量を測定する際、10μg/mL 製剤については検体●●●nLを採取し、トリクロロ酢酸による凝集及び沈殿収集後のたん白質含量が約●●●μgとなるよう調製している。これを踏まえ、5μg/mL 製剤は●●●nL(たん白質含量約●●●μg)、2.5μg/mL 製剤は●●●nL(たん白質含量約●●●μg)の検体から調製し、たん白質含量を測定したところ、測定値は最終バルク調製時から●●●した。この問題を解消するため、トリクロロ酢酸により検体中のたん白質を凝集させ、沈殿化させる際、●●●が●●●ほうが●●●であると考えられたことから、●●●は変更せずに●●●を変更した。さらに、製剤に含まれる●●●が●●●の妨害(●●●)を与えることから、その妨害を除去するため、●●●にあらかじめ●●●を加えて補正する等、測定方法を改良した。改良した測定法のバリデーションの結果、検体のたん白質含量が●●～●●●μg/mLの範囲で従来の測定法と同様の真度、精度、直線性が得られることが確認されたことから、製剤のたん白質含量試験として本試験方法を適用することとした。

機構は、以上の申請者の説明を了承した。

また機構は、力価試験の規格について、現時点における品質、非臨床及び臨床の成績を踏まえて規格値を設定するよう求めた。申請者は、5μg/mL 製剤を用いた●●●回の力価試験成

績より参照日本脳炎ワクチンに対する相対力価の平均値及び標準偏差（以下、SD）を求め、平均値±SDが●～●となることから、力価試験の規格を相対力価●以上に設定し、今後成績が蓄積された段階で見直したいと説明した。

機構は、BK-VJE/004試験に使用した2.5µg/mL製剤の相対力価が●であること、10µg/mL製剤及び5µg/mL製剤に比べて2.5µg/mL製剤の有効性が劣る懸念があること等から、これを見直す必要はないか等を検討中であり、今後提出される回答及び専門協議の議論を踏まえて、力価の規格値を最終的に判断したい。

(7) 製剤の安定性について

申請者は、今後製造販売する予定である5µg/mL製剤の有効期間について、以下のように説明した。10µg/mL製剤3ロットを用いて実施された長期保存試験では、●ヶ月までの安定性が確認されている。また、たん白質含量の異なる製剤●ロット（10µg/mL製剤、5µg/mL製剤及び2.5µg/mL製剤をそれぞれ1ロット）を用いて実施されている長期保存試験では、各ロットともに●ヶ月までの安定性が確認されており、たん白質含量の異なる製剤間での安定性に特段の違いは観察されていないことから、5µg/mL製剤は10µg/mL製剤と同様に●℃以下で保存する場合において有効期間を●年間とすることが可能と示唆された。

機構は、5µg/mL製剤の長期保存試験成績は現時点で1ロットの●ヶ月までのデータしか示されておらず、●年間の有効期間を設定することは困難と考えているが、2ロット目の5µg/mL製剤の長期保存試験が既に開始されており、今後得られる最新の成績も含めて製剤の有効期間を最終的に判断したい。

3. 非臨床に関する資料

(i) 薬理試験成績の概要

<提出された資料の概略>

(1) 効力を裏付ける試験

提出された薬理試験として、力価試験、遺伝子型の異なるウイルス株に対する中和抗体価の交叉反応性を検討した試験が実施されている。さらに、現行ワクチンとの比較を目的として、マウス、モルモット及びラットにおける中和抗体産生能を検討した試験並びに日本脳炎ウイルス（北京株）を用いた攻撃試験（能動免疫及び受動免疫）が実施されている。

1) 力価試験

日本脳炎ワクチンの力価試験方法は、従来、1濃度の検体希釈液を試料としてマウスに免疫し、得られた血清について、ニワトリ胚細胞を用いたプラーク減少法（CEF法）により50%阻止血清希釈率の逆数として中和抗体価が測定されていた（旧法）が、2001年9月25日に国立感染症研究所から「力価試験方法の変更に関する通達」が出され、2001年11月1日以降は、3濃度以上の検体希釈液を試料としてVero細胞を用いたプラーク減少法（Vero法）により中和抗体価を求め、かつ、平行線定量法により参照品との相対力価を算出する方法（新法）に変更されている。

① 旧法による力価

本剤3ロット(たん白質含量10 μ g/mL製剤)及び参照日本脳炎ワクチンについて、それぞれ16倍及び8倍希釈液が調製された。4週齢の雌Slc:ddYマウス(1群16匹)に、各希釈液を1匹あたり0.5mLずつ腹腔内に1週間隔で2回投与し、1週間後に採血された血清について、中和抗体価が測定された。その結果、本剤各ロットの中和抗体価(log₁₀)は3.85、3.66、3.89と、いずれも参照日本脳炎ワクチン(それぞれ2.72、2.72、3.13)より高い値を示した。

② 新法による力価

3種類のたん白質含量の製剤(10 μ g/mL、5 μ g/mL及び2.5 μ g/mL製剤)並びに参照日本脳炎ワクチンについて、適切な濃度の希釈液が本剤は6希釈ずつ、参照日本脳炎ワクチンは4希釈調製された。4週齢の雌Slc:ddYマウス(1群16匹)に、各希釈液を1匹あたり0.5mLずつ腹腔内に1週間隔で2回投与し、1週間後に採血された各希釈液免疫血清の中和抗体価が測定された。その結果、各製剤の参照日本脳炎ワクチンに対する相対力価は、1.51、0.59及び0.30であり、ワクチンのたん白質含量の減量に伴い用量依存的な力価の低下が観察された。

2) 交叉反応性(PT136-06)

4週齢の雌Slc:ddYマウス(1群16匹)に、本剤3ロット(10 μ g/mL製剤)又は参照日本脳炎ワクチンを1匹あたり0.5mLずつ腹腔内に1週間隔で2回投与し、1週間後に採血された血清について北京株を含む7種類のウイルスに対する中和抗体価(Vero法)を測定し、本剤と参照日本脳炎ワクチンが比較された。7種類の異なるウイルスは、ヒト由来分離株として北京株、中山株及びJaTH160株、国内の蚊由来分離株としてJaGAR01株及び三重44-1株、タイ国の蚊由来分離株としてThCMAr44/92株及びThCMAr67/93株が用いられた。本剤による免疫血清の各株に対する交叉中和反応性は参照日本脳炎ワクチン免疫血清と同様の傾向を示し、中和抗体価はそれぞれ参照日本脳炎ワクチンよりも高い値を示した。

3) 中和抗体価産生の確認

本剤と現行ワクチンの免疫原性を比較するため、マウス及びモルモットにおける中和抗体産生能が検討された。また、毒性試験で得られたラットの血清中の中和抗体価を測定し、比較された。

① マウスにおける中和抗体産生能(PT136-05-1)

本剤(10 μ g/mL製剤)及び現行ワクチンを16倍希釈し、それぞれ4週齢の雌Slc:ddYマウス(1群10匹)に、1匹あたり0.5mLずつ皮下又は腹腔内に1週間隔で2回投与した。1週間後に採血されたプール血清について北京株ウイルスに対する中和抗体価(Vero法)を測定した。その結果、抗体価(log₁₀)は、本剤の皮下投与3.04、腹腔内投与2.77、現行ワクチンの皮下投与3.03、腹腔内投与2.88であり、本剤は投与経路にかかわらず現行ワクチンと同程度の中和抗体産生能を示した。

② モルモットにおける中和抗体産生能(QT106-01)

本剤の原液及び現行ワクチンの原液のたん白質含量を $10\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製し、入荷時の体重が $204\sim 238\text{g}$ の雄 Hartley モルモット (1群 6匹) に、それぞれ 1匹あたり 1.0mL ずつ 3回 (初回投与日を 0日とし、0、7、28日) 皮下投与した。初回投与後 21日目及び 42日目に心臓より部分採血した血清について北京株に対する中和抗体価 (Vero法) を測定した結果、平均抗体価 (\log_{10}) は本剤 2回投与後 4.53、3回投与後 5.14、現行ワクチン 2回投与後 3.85、3回投与後 4.95 であり、本剤は現行ワクチンと同程度の中和抗体産生能を示した。

③ ラットにおける中和抗体産生能 (PT136-08)

5週齢の Crj:CD(SD)IGS ラットを用いて、本剤 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$ 製剤) を雌雄各 12匹、現行ワクチンを雌 2匹に、 $0.35\text{mL}/\text{kg}$ を 1週間隔で 4回皮下投与した。最終投与日から 1週間後に採血した血清について北京株に対する中和抗体価 (Vero法) を測定した結果、本剤を投与した全てのラットで中和抗体産生が認められ、平均抗体価 (\log_{10}) は本剤 4.33、現行ワクチンは 4.62 であった。

以上の結果から、本剤は、マウス、ラット及びモルモットにおいて、動物種や投与経路にかかわらず現行ワクチンと同様に日本脳炎ウイルスに対する中和抗体産生能を示すことが確認された。

4) 攻撃試験

① 能動免疫したマウスにおける防御能の確認 (PT136-03)

本剤 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$ 製剤) 及び現行ワクチンの 4 、 4^2 、 4^3 、 4^4 、 4^5 倍希釈液が調製された。各希釈液は、4週齢の雌 Slc:ddY マウス (1群 10匹) に 1匹あたり 0.5mL ずつ皮下に 1週間間隔で 2回投与され、1週間後に北京株の腹腔内 0.5mL ($6.5\times 10^8\text{PFU}$) 又は静脈内 0.1mL ($1.3\times 10^8\text{PFU}$) 投与により攻撃された。攻撃後 21日間経過観察し、各群の生存率よりそれぞれ ED_{50} (50%のマウスが生存するワクチンの希釈倍数) が算出された。本剤の ED_{50} は腹腔内攻撃では $4^{4.65}$ 、静脈内攻撃では $4^{4.51}$ に対し、現行ワクチンの ED_{50} はそれぞれ $4^{4.68}$ 、 $4^{4.00}$ であり、攻撃の経路にかかわらずほぼ同程度であった。

② 受動免疫したマウスにおける防御能の確認 (PT136-01)

本剤の原液、現行ワクチンの原液及び日本脳炎ウイルス JaTH160 株 (攻撃ウイルス株) の不活化液を用いて 4週齢の雌 Slc:ddY マウス (1群 50匹) に免疫され、それぞれ免疫血清が採取された。得られた血清は 1、3、10、32 倍に希釈され、3週齢の雌 Slc:ddY マウス (1群 25匹) にそれぞれ 1匹あたり 0.4mL ずつ皮下投与された。投与 1日後に各群 5匹ずつ全採血され、血清中の JaTH160 株に対する中和抗体価が測定された。残りのマウスは 10匹ずつ 2群に分けられ、各群に対して 1匹あたり (i) 1×10^2 又は (ii) $1\times 10^4\text{PFU}$ の JaTH160 株が腹腔内投与により攻撃された。攻撃後 21日間観察され、各群の生存率より 50%発症を防御する中和抗体価 (\log_{10}) が算出された。その結果、攻撃時の中和抗体価依存的な攻撃ウイルスによる発症防御効果が観察され、本剤、現行ワクチン及び JaTH160 株不活化液による免疫血清を受動免疫したマウスにおける 50%発症を防御する中和抗体価 (\log_{10}) は、(i) で 1.22、1.40 及び 1.02、(ii) で 1.13、1.44 及び 1.19 であった。

以上の結果から、本剤により誘導される中和抗体は現行ワクチンにより誘導される中和抗体と同様の防御能を示すことが確認された。

(2) 安全性薬理試験成績の概要

本剤を溶剤（日局注射用水）0.7mLで溶解したとき、単位容積あたりの有効成分の力価、抗原含量及びたん白質含量は、現行日本脳炎ワクチンと同程度であると考えられた。このことから、本剤の臨床投与量として、現行ワクチンと同様に3歳以上で0.5mLが計画され（体重あたりの投与量は0.035mL/kg）、以下の安全性薬理試験においては、予定される臨床投与量の10倍量である0.35mL/kgが用いられた。なお、これらの試験で使用された本剤は、たんぱく質含量10 μ g/mLの製剤である。

1) 中枢神経系に及ぼす影響（B04I161）

5週齢の雄Crj:CD(SD)IGS系ラット（1群6匹）を用いて、本剤又は現行ワクチン0.35mL/kgが背部皮下に単回投与された。本剤及び現行ワクチンはいずれもラットの一般症状及び行動に影響を及ぼさなかった。

2) 心血管系に及ぼす影響

本剤のイヌを用いた反復投与毒性試験（1週間隔で4回皮下投与）において、心電図及び脈拍数に異常が認められなかったことから、心血管系に関する試験は実施されなかった。

3) 呼吸器系に及ぼす影響（B000865）

13又は14週齢の雄日本白色種ウサギ（1群4匹）を用いて、本剤0.35mL/kgをウレタン麻酔下で皮下に投与し、評価項目として呼吸数及び1回換気量が評価された。本剤投与後120分まで、呼吸数及び1回換気量はいずれの測定点においても対照群（生理食塩液投与群）と比較して有意な差は認められなかった。

4) 腎機能に及ぼす影響（B000865）

7週齢の雄Crj:CD(SD)IGS系ラット（1群6匹）を用いて、本剤0.35mL/kgを皮下に単回投与された。投与後1時間毎に6時間まで尿排泄累積量が測定され、さらに6時間後の蓄尿中のNa⁺、K⁺及びCl⁻濃度が測定された。その結果、本剤投与6時間後までの尿量及び尿中電解質排泄量は対照群（生理食塩液投与群）と比較して有意な差は認められなかった。

以上のことから、本剤は中枢神経系、心血管系、呼吸器系及び腎機能に対して影響を及ぼさないとされた。

<機構における審査の概略>

機構は、BK-VJE/002試験及びBK-VJE/003試験において現行ワクチンに比べ本剤接種後の中和抗体価が高値を示している（臨床の項参照）ことを踏まえ、本剤と現行ワクチンの免疫原性・用量反応性を詳細に比較し、説明するよう求めた。