

厚生労働科学研究研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

痘そうワクチンの備蓄戦略の為の品質向上、生産性向上に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大隈 邦夫

平成17(2005)年 3月

厚生労働科学研究研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業

痘そうワクチンの備蓄戦略の為の品質向上、生産性向上に関する研究

平成16年度 研究組織

主任研究者 (班長)

大隈邦夫 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長

分担研究者

森川 茂 国立感染症研究所ウイルス第一部 第一室長

横手公幸 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部 主任部員

研究協力者(順不同)

金谷泰宏 防衛医科大学校防衛医学研究センター 異常衛生環境研究部門 助教授

介田 毅 国立感染症研究所 所長

介根一郎 国立感染症研究所 ウイルス第一部長

佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部長

堀内義信 国立感染症研究所 細菌第二部第五室長

緒方もも子 国立感染症研究所 ウイルス第一部

橋爪 壯 財団法人 日本ポリオ研究所 理事

船津昭信 財団法人 化学及血清療法研究所長・理事長

田代 昭 財団法人 化学及血清療法研究所 常務理事

岡 徹也 財団法人 化学及血清療法研究所 常務理事

寺野 剛 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部長

介永雅彦 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部第二課長

尾堂浩一 財団法人 化学及血清療法研究所 品質保証部第二課長

藤田春雄 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部臨床検査センター長

志垣隆道 財団法人 化学及血清療法研究所 病理部安全性試験センター長

坂口正士 財団法人 化学及血清療法研究所 第二研究部第一室主任部員

金床陽二 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長付

久米田幸介 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部長付

原田精一 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部臨床検査センター

松井 元 財団法人 化学及血清療法研究所 病理部安全性試験センター

上田謙二 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長付

嶽本澄代 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部第二課

金原知美 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長付

熊丸哲也 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部第二課

新村靖彦 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長付

嵯峨秀樹 財団法人 化学及血清療法研究所 製剤部第一課

目 次

I. 総括研究報告

- 痘そうワクチンの備蓄戦略の為の品質向上、生産性向上に関する研究 -- 1
主任研究者 大隈 邦夫

II. 分担研究報告

1. 先行研究のレビュー及び基礎的研究 ----- 9
森川 茂
2. 先行研究のレビュー及び基礎的研究（国内状況） ----- 19
横手 公幸
3. LC16m8の生産方法の検討 ----- 38
横手 公幸
4. 有効性の維持の基礎的検討 ----- 50
横手 公幸

- III. 資料 ----- 56

総括研究報告書

痘そうワクチンの備蓄戦略の為の品質向上、生産性向上に関する研究

主任研究員：大隈 邦夫 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長

研究要旨

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、有効性を保持しながら弱毒に成功した世界で唯一のワクチンである。しかしながら、このワクチンは承認後、すぐにワクチン接種が中止されたことから、広く使われる機会なく、永い間製造されることもなかった。近年、天然痘ウイルスによる生物テロの危機が叫ばれている中、その対策の一環として、この痘そうワクチン LC16m8 は生物テロ対策用の医薬品として、国家備蓄が行われることとなった。本研究では、天然痘ウイルスを用いた生物テロに対する対策をより効率的なものとするため、痘そうワクチンの国家備蓄の為の痘そうワクチンの品質向上及び生産性向上に関する研究を行い、以下の結果を得た。

- 1) これまでに長期保存されている痘そうワクチンの力価推移の解析から、測定年により鶏卵漿尿膜接種によるポック法での力価がばらつくことが明らかとなった。一方、ブラック法では株化細胞を用いるため測定年度による誤差は極小にできると考えられ、ブラック法での力価測定の結果は 2 施設間で良く一致し有意差は認められなかったことから、ブラック法による力価測定法がポック法より優れた試験法であると結論される。この結果から、ブラック法での力価測定結果をワクチン力価としてどのように評価するかを検討する必要がある
- 2) 現在製造されている痘そうワクチン LC16m8 の評価を品質・安全性に関する観点から評価を行った。特に安全性に関しては、痘そうワクチン LC16m8 が作出時に検討されたサル神経毒性試験を現在の製造備蓄ロットで追試し、同様な成績を得た。また、新たに免疫不全 SCID マウス等を用いて評価を行った。
- 3) 痘そうワクチン LC16m8 の品質向上に関して、マスターウイルスシード、ウサギコロニー、ウサギ腎細胞に関する外来性因子の検査を行った。また、生産性向上の予備的検討として継代細胞を用いた LC16m8 株の増殖性の評価を行った。
- 4) 有効期限の延長の基盤となる精度を有する品質試験成績を蓄積することを目的として、予備的検討を行い、原液においては、12 ヶ月までの安定性を確認した。

分担研究者：

森川 茂

国立感染症研究所 ウイルス第 1 部

第 1 室長

横手公幸

財団法人 化学及血清療法研究所 第一

A. 研究目的

本研究では、現在備蓄の為に製造されている痘そうワクチンロットの品質・安全性評価と、生産性の向上を研究することを目的とする。このためには、国内外の痘そうワクチン及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、さらなる科学的データを集積し、現行ワクチンの品質向上の検討課題を明らかにすることが重要である。

痘そうワクチンの備蓄戦略の為に品質向上、生産性向上を遂行する上で、特にワクチンに含まれるワクチニアウイルス LC16m8 の力価を正確に測定することが必須である。本研究では、より正確で安定した測定法を検討することを目的とした。また、海外での第3世代ワクチンの開発につながる研究動向を調査評価して、現行ワクチンの品質向上の検討課題を明らかにする。

品質評価においては、痘そうワクチン LC16m8 は、弱毒生ウイルスワクチンであることから、その品質を保証するためには、シードロットの品質管理、及び細胞基材の品質管理システムを確立することが重要であり、特に外来性因子の否定に関しては、近年の検査法を用いた評価が急がれる。生産性の向上に関しては、現在の幼若ウサギの腎細胞を用いた製造法が生産効率の面で改善・改良すべき余地があることから、継代細胞を用いた増殖性の研究を行う。備蓄において、ワクチンの有効な保存方法と有効期限についての知見により、長期的なワクチン備蓄戦略に資する基礎資料を得ることが期待される。

B. 研究方法

a) 長期保存痘そうワクチンにおける力価測定

1. 長期保存痘そうワクチンの力価推移の解析

第1世代の痘そうワクチン(旧ワクチン)としてLister株によるCalf lymph vaccine(1972年に製造され4℃保存されている:製造時の力価は $10^{8.75}$ PFU/mL)と昭和55年度に千葉県血清研究所で製造された乾燥細胞培養痘そうワクチンの経年的な力価の成績を解析した。また、平成11年に千葉県血清研究所に委託して製造された試験製造ワクチンの65月間の力価推移を解析した。

2. 力価試験と安定性試験の方法の比較

試験製造ワクチン(参照品)と乾燥細胞培養痘そうワクチン(財団法人化学及血清療法研究所製造V03, V04, およびV05:財団法人化学及血清療法研究所より分与)の各ワクチンを鶏卵の漿尿膜上接種による生物学的製剤基準に沿った測定法(CAMポック法)と株化ウサギ腎細胞であるRK13細胞を用いたブラック法により求めて、比較検討した。また、ブラック法による力価測定を、国立感染症研究所と財団法人化学及血清療法研究所との施設間差の有無に関して解析した。

3. 先行的レビュー

海外での第3世代ワクチンの開発につながる研究動向を調査評価・考察した。

b) 現在の製造ワクチンの品質・安全性評価

1. ブラックサイズ測定実験

LC16m8株、LC16m0株とLister Original(L0)株をRK13細胞に接種し、37℃、7日間培養した。顕微鏡を用いて形成された各株のブラック(63~202個)サイズを測定し、その平均値を求めた。

2. ウサギ皮膚刺激性実験

LC16m8 ワクチン液、LC16m0 株及び L0 株の 10 倍段階希釈した検体 0.1mL ずつを毛刈りしたウサギの背部に皮内接種し、接種後 3 日目に、生じた発赤径を測定した。

3. 成熟マウス脳内投与実験

LC16m8 ワクチン液、LC16m0 株及び L0 株を希釈して 1×10^8 PFU/mL に調製した各検体 0.03mL を、1 群 5 匹又は 6 匹のマウスに脳内接種し、接種後 21 日間観察し、生存率と平均生存期間（日）を算出した。

4. 幼若マウス脳内投与実験

LC16m8 ワクチン液、LC16m0 株及び L0 株を希釈して 1×10^5 PFU/mL に調製した各検体 0.02mL を、1 群 10 匹の幼若マウスに脳内接種し、接種後 21 日間観察し、生存率と平均生存期間（日）を算出した。

5. 幼若マウス脳内投与 LD50 測定

LC16m8 ワクチン液、LC16m0 株及び L0 株を 10 倍段階希釈した検体 0.02mL を 1 群 10 匹のマウスに脳内接種し、接種後 21 日間観察し、死亡率を算出した。

6. サル脳内投与実験

痘そうウイルス抗体陰性のカニクイザル 6 匹/群に、L0 株及び LC16m8 株の 2×10^7 PFU を左側大脳の視床内に接種した。

接種後 14 日間、一般状態を毎日観察した。生存例は接種後 14 日目に塩酸ケタミン麻酔下で放血安楽死させて剖検し、全身の諸器官を肉眼的に観察した。死亡例は発見次第、剖検した。剖検観察後、脳（頭頂葉、脈絡叢の周辺組織、髄膜）、脊髄（頸部膨大部、腰部膨大部）、心（心房、心室、心嚢）を採取し、RK-13 細胞を用いたブラックアッセイ法でウイルス含量を測定した。

7. SCID マウス腹腔内投与実験

LC16m8 ワクチン液、LC16m0 株及び L0 株

を希釈して $10^{7.3}$ PFU/mL または $10^{5.6}$ PFU/mL に調製した各検体を 0.5mL ずつ、1 群 5 匹の SCID マウスに腹腔内接種し、

接種後 28 日間観察し、生存率及び平均生存期間（日）を算出した。

c) 製造法の品質評価

1. マスターウイルスシード品質評価

マスターウイルスシードについて、ヒト関連ウイルス（計 16 種）、ウサギ関連ウイルス（計 11 種）、ブタ関連ウイルス（計 2 種）、ウシ関連ウイルス（計 9 種）に関する PCR 測定を行った。

2. ウサギコロニー品質評価

ウサギ血清（10 羽分プール）を採取しウサギ関連ウイルスの PCR 5 種及び Rabbit hemorrhagic disease virus に関する ELISA 試験を英国 BioRelience 社に依頼し測定した。

3. WHO ガイドライン

WHO ガイドライン（WHO RECOMMENDATIONS FOR PRODUCTION AND CONTROL OF SMALLPOX VACCINE REVISED 2003）と国内生物学的製剤基準（Japanese Minimum Requirements for Biological Products (MRBP)）の各試験項目について比較検討した。

4. 各細胞株における増殖性実験

25 cm² カルチャーフラスコに RK-13 細胞、MRC-5 細胞、Vero E6 細胞の各細胞を培養し、 2×10^5 PFU/mL に調製した LC16m8 株を 1 mL ずつ接種した。37°C で約 1 時間吸着させた後、ウイルス維持培地（3%FBS 添加 MEM 培地）で 3 回洗浄し、ウイルス維持培地を 5 mL 添加したものを 37°C で 4 日間培養した。培養後、回収したウイルスは、RK-13 細胞を用いたブラックアッセイ法によりウイルス力価を測定した。

5. Vero 細胞増殖曲線

25 cm² カルチャーフラスコに培養した Vero E6 細胞に、 2×10^5 PFU/mL に調製した LC16m8 株を 1 mL ずつ接種した。37°C で約 1 時間吸着させた後、ウイルス維持培地 (3%FBS 添加 MEM 培地) で 3 回洗浄し、ウイルス維持培地を 5 mL 添加したものを 37°C で 4 日間培養した。培養 4、8、16、24、48、96 時間後に、回収したウイルスは、RK-13 細胞を用いたブラックアッセイ法によりウイルス力価を測定した。

d) 安定性に関する予備検討

1. 原薬の凍結融解安定性実験

凍結融解による影響を評価するために、 $-20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ で凍結し $30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ で融解した。凍結融解の繰り返し回数は、5 日毎に最大 5 回行った。

2. 原薬の安定性実験

実際の保存条件である $-80^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ とそれより過酷な条件である $-20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ での安定性を確認するために、それぞれ 2 ロットの前薬を用いて比較検討した。

3. 小分け材料の安定性評価

小分け製品の 1 次容器であるバイアル瓶とゴム栓 (ブチルゴム) について、超低温 (-20°C 及び -80°C)・長期保存条件における安定性の検討を行った。

C. 研究結果

a) 長期保存痘そうワクチンにおける力価測定

1. 長期保存痘そうワクチンの力価推移の解析

1972 年に製造され 4°C 保存されている Lister 株による旧ワクチンの過去の経年的

な力価測定成績は、製造後 27 年間は徐々に力価の低下が認められたが、29 年目より力価が上昇していた。

昭和 55 年度に千葉県血清研究所で製造され、有効期間中は 4°C で、その後は -20°C で保存されていた乾燥細胞培養痘そうワクチンの 15 年間の経年的な CAM ポック法による力価は、保存 9 年目で力価の有意な低下が見られ、15 年目に大きく力価が低下している。しかし、力価、安定性力価とも測定年により有意に上下していた。

平成 11 年に製造された試験製造ワクチンの 65 月間の力価推移は、力価の \log_{10} 値と保存月数の関係は、一次回帰 ($R^2 = 0.99$)、65 月間に \log_{10} 値で 0.33 低下した。

2. 力価試験と安定性試験の方法の比較

参照品と乾燥細胞培養痘そうワクチン 3 ロットを用いて、生物学的製剤基準に沿った CAM ポック法と RK13 細胞を用いたブラック法により値を求めた。ブラック法による成績を国立感染症研究所と財団法人 化学及血清療法研究所の 2 施設で行い比較した結果、施設間による力価測定成績に有意差は認められなかった。

CAM ポック法での各測定法を平行線定量法により解析した結果、乾燥細胞培養痘そうワクチンの 3 ロットいずれも参照品との平行性は否定されず、力価を平行線定量法によって参照品に対して相対的に求められることが明らかとなった。また、ブラック法での RK13 細胞によるブラック数の対数を用いて平行線定量法により解析した結果、乾燥細胞培養痘そうワクチンの 3 ロット間の用量反応回帰の平行性は否定されず、これらの力価を参照品に対して相対的に求めることが確認された。

平行線定量法で求めた参照品に対する各

ロットの相対力価について、CAM ポック法とブラック法について比較した結果、両測定方法の間で力価に相違が認められたが (\log_{10} 値で 0.3)、相対力価の場合、両方法で一致した結果が得られることが確認された。

3. 先行的レビュー

これまでにワクチニアウイルスでは、TK 遺伝子は病原性・神経病原性に、E3L 遺伝子は IFN 耐性と神経病原性に、K3L は IFN 耐性とマウスでの組織親和性に関与することが明らかとなっている。

また、B13R(caspase1 inhibitor)、B22R(apoptosis inhibitor) を欠損させ IFN・遺伝子を組換えるとマウスでのウイルス増殖が極めて低くかつ抗ワクチニア免疫が強く誘導されることが明らかとなっている。その他第三世代ワクチンの開発につながる研究としては、DNA ワクチン、蛋白ワクチンが行われていた。

b) 現在の製造ワクチンの品質・安全性評価

1. ブラックサイズ測定実験

Lister Original (L0) 株、LC16m0 株及び LC16m8 株各株のブラックサイズの平均値/標準偏差は、4.00/0.72、2.01/0.62、0.46/0.15 (mm) であった。

2. ウサギ皮膚刺激性実験

LC16m8 については、財団法人 化学及血清療法研究所製造 Lot V01 接種群が $10^{4.2}$ PFU、財団法人 化学及血清療法研究所製造 Lot LC0315 接種群が $10^{4.5}$ PFU であった。LC16m0 接種群は $< 10^{1.0}$ PFU であった。L0 接種群は $10^{1.0}$ PFU であった。以上のように、LC16m8 接種群の ErD_{50} 値 (赤斑 10mm が 50% 出現する用量) は LC16m0 及び L0 接種群よりも、 10^3 倍以上高いことが確認された。

3. 成熟マウス脳内投与実験

生存率については、L0 接種群が 2/6、LC16m0 接種群が 4/5 であったのに対して、LC16m8 接種群では死亡は無く 5/5 であった。平均生存期間については、L0 接種群が 10 日、LC16m0 接種群が 17.6 日であったのに対して、LC16m8 接種群では死亡は無く > 21 日であった。LC16m8 接種群の平均生存期間は L0 接種群よりも統計上有意に長かった。

4. 幼若マウス脳内投与実験

生存率については、L0 接種群が 1/10、LC16m0 接種群が 1/10 であったのに対して、LC16m8 接種群では 7/10 であった。LC16m8 接種群の生存率は L0 接種群よりも統計上有意に高かった。平均生存期間については、L0 接種群が 6.3 日、LC16m0 接種群が 6.1 日であったのに対して、LC16m8 接種群では 17.1 日であった。LC16m8 接種群の平均生存期間は L0 接種群よりも統計上有意に長かった。

5. 幼若マウス脳内投与 LD50 測定

L0 接種群では LD50 値が $10^{1.6}$ PFU であったのに対して、LC16m8 接種群では LD50 値が $10^{5.0}$ PFU であり、両者の LD₅₀ 値には 10^3 以上の差があった。

6. サル脳内投与実験

一般状態観察の結果については、L0 接種群では 6 例中 3 例が接種後 3、5、8 日目にそれぞれ死亡し、他の 3 例は接種後 14 日目まで生存したが、いずれの動物にも右側手足の麻痺がみられた。一方、LC16m8 接種群ではいずれの動物においても、死亡及び手足の麻痺等の異常は認められなかった。

剖検の結果については、L0 接種群では死亡した 1 例に硬膜の脳への癒着が認められた。他の動物には異常はなかった。一方、LC16m8 接種群ではいずれの動物においても、

異常は認められなかった。

ウイルス分離の結果については、L0 接種群のうち、死亡した 3 例では、脳由来組織からは $10^{4.1} \sim 10^{6.2}$ PFU/g のウイルスが、脊髄由来組織からは $10^{5.8} \sim 10^{6.6}$ PFU/g のウイルスが検出された。心臓由来組織からはウイルスは検出されなかった。また、生存した 3 例では、いずれの組織からもウイルスは検出されなかった。一方、LC16m8 接種群では、脳、脊髄及び心臓由来のいずれの組織においても、ウイルスは検出されなかった。

7. SCID マウス腹腔内投与実験

生存率については L0 接種群及び LC16m0 ($10^{7.0}$ PFU) 接種群では 0/5 であり、LC16m0 ($10^{5.3}$ PFU) 接種群では 3/5 であったのに対し、LC16m8 ($10^{7.0}$ PFU、 $10^{5.3}$ PFU) 両接種群では観察終了時まで死亡例は無く 5/5 であった。平均生存期間については、L0 接種群で 14 日、LC16m0 ($10^{7.0}$ PFU) 接種群で 18.2 日、LC16m0 ($10^{5.3}$ PFU) 接種群で 26.4 日であったのに対し、LC16m8 ($10^{7.0}$ PFU、 $10^{5.3}$ PFU) 両接種群では ≥ 28 日であった。

b) 製造法の品質評価

1. マスターウイルスシード品質評価

マスターウイルスシードを英国 BioRelience 社にて、ヒト関連ウイルス (計 16 種)、ウサギ関連ウイルス (計 11 種)、ブタ関連ウイルス (計 2 種)、ウシ関連ウイルス (計 9 種) に関する PCR 測定した結果、すべて陰性または未検出であった。

2. ウサギコロニー品質評価

ウサギ血清 (10 羽分プール) について、ウサギ個体感染の可能性のある外来性因子

6 種を PCR 及び ELISA 法により、英国 BioRelience 社に依頼し測定した結果、いずれも陰性であることが確認された。

3. WHO ガイドライン

WHO ガイドラインと国内生物学的製剤基準を比較した結果、生物学的製剤基準では対照細胞の観察期間が 1 週間であるのに対して、WHO ガイドラインでは 2 週間であった。また、生物学的製剤基準では対照細胞でのみ外来性ウイルス等否定試験を行うのに対して、WHO ガイドラインでは対照細胞及び原液において外来性ウイルス等否定試験を行うことが定められていた。

4. 各細胞株における増殖性実験

RK-13 細胞で培養したウイルス力価は $10^{8.23}$ PFU /Flask、MRC-5 細胞で培養したウイルス力価は $10^{7.42}$ PFU /Flask、Vero E6 細胞で培養したウイルス力価は $10^{6.27}$ PFU /Flask であった。Vero E6 細胞における増殖性は他の細胞基質と比較して最も低く、RK-13 細胞よりも約 100 倍低かった。

5. Vero 細胞増殖曲線

Vero E6 細胞における増殖は、培養 16 ～24 時間後に急激に増加した。

c) 安定性に関する予備検討

1. 原薬の凍結融解安定性実験

凍結融解による影響を評価の結果、少なくとも 4 回の凍結融解までは原薬の安定性に影響を及ぼさないのではないかと考えられた。

2. 原薬の安定性実験

実際の保存条件である -80°C とそれより過酷な条件である -20°C での安定性を確認するために、それぞれ 2 ロットの原薬を用いて比較検討した結果、 -80°C ではウイルス含量に変化は認められず 1 年間安定な成績

であった。また、 -20°C では保存初期にウイルス含量にやや低下傾向が認められたものの $10^{8.0}$ PFU/mL を維持していた。

3. 小分け材料の安定性評価

各種文献の調査及び材料メーカーとの協議確認により、用いているゴム栓は、使用温度範囲は -50°C ～ 150°C であり、使用温度が脆化温度（脆くなる温度） -48°C 以上であれば、バイアルとの密着性には問題はないことが確認された。また、製剤に用いているゴム栓は、凍結乾燥工程における -30 ～ -40°C の温度や時間では問題が発生した事象は認められていないことが確認された。

D. 考察

長期保存痘そうワクチンの力価推移の解析から、測定年により力価がばらつくことが明らかとなった。これは、旧ワクチンでは各測定年での標準偏差を考慮すると鶏卵の感受性にばらつきがあるためと考えられる。一方、ブラック法では株化細胞を用いるため測定年度による誤差は極小にできると考えられる。また、2施設間での測定結果も良く一致し、有意差は認められなかったことから本試験法がCAMポック法より優れた試験法であると結論される。

近年の研究から、病原性遺伝子のノックアウトと免疫賦活遺伝子の導入、DNA ワクチンや蛋白ワクチンが基礎的実験レベルで検討されている。また、その他の研究においては、ワクチニアウイルスに関する多くの細胞レベルでの評価研究や、遺伝子レベル、蛋白レベルでの研究が盛んに行われている。今後 LC16m8 株の物性に関しても、遺伝的表現型、細胞感受性、遺伝子解析、抗原性・免疫原性に関する研究が必要である。

動物を用いた安全性評価実験においては、

ウサギ皮膚刺激性実験結果及びサル脳内投与実験結果は、LC16m8 株樹立時に検討された結果と同様であった。また、今回新たに成熟マウス脳内投与実験、幼若マウス脳内投与実験、SCID マウス腹腔内投与実験を実施し、LC16m8 株の高い安全性成績を得た。特に SCID マウス腹腔内投与実験は、生ワクチンの接種禁忌である免疫抑制状態の患者に対する安全性を示唆するものであり、更なる検討が必要と考える。また、最近の研究では、マウス、ウサギ、サルを用いた有効性動物実験が多く発表されている。本ワクチン LC16m8 においても免疫原性、感染防御、免疫の機序に関する研究が必要である。

痘そうワクチンは、現在生物薬品で求められている多くの外来性因子否定に関する成績がなかったが、今回の研究の結果、マスターウイルスシード、ウサギコロニー、ウサギ腎細胞に関して、ヒト、ウシ、ブタ、ウサギに感染する多くのウイルスはすべて陰性であった。

継代細胞を用いて、LC16m8 株の増殖性を評価した。ワクチンの大量培養及びタンク培養で広く用いられている Vero 細胞においては、RK-13 細胞に対してウイルス力価が約 $1/100$ と低かった。今後より感受性の高い細胞の探索が必要である。

安定性試験に関して、凍結融解実験を行った結果、少なくとも 4 回の凍結融解までは原薬の力価の安定性に影響を及ぼさないのではないかと考えられた。

製造における中間製品である原液・原薬の安定性を -20°C 、 -80°C で検討した結果、 -20°C では保存初期にウイルス含量にやや低下傾向が認められたものの $10^{8.0}$ PFU/mL を維持していた。今後、更なる経過を検討する必要がある。

製剤の容器と施栓系材料について調査を行い、更なる検討の必要性が明らかとなった。

E. 結論

痘そうワクチン LC16m8 は、昭和 55 年に製造承認を取得した際に安全性に関する動物試験が実施されたが、その後平成 14 年に緊急で製造されるまで永い間製造されることもなく、追加の確認はなされていなかった。今回、平成 14 年に財団法人 化学及血清療法研究所が製造承認を承継し、平成 15 年に財団法人 化学及血清療法研究所において製造したロットを用いて、過去取得された安全性動物実験を実施した結果、同様に安全性が高いことを示す成績が得られた。痘そうワクチン LC16m8 のマスターウイルスシード、及びウサギコロニー、ウサギ腎細胞について CPMP のガイドラインに基づき、外来性因子検査を行い、すべて陰性であった。WHO のガイドラインは国内の生物製剤基準と検査項目が異なることが明らかとなったことより、今後両者の整合性を計る必要性が明らかとなった。継代細胞（RK-13 細胞、MRC-5 細胞、Vero E6 細胞）を用いて、LC16m8 株の増殖性を評価した結果、Vero E6 細胞は RK-13 細胞に対してウイルス力価が約 1/100 と低かった。凍結融解実験の結果、4 回までの凍結融解は、力価に影響がないことが明らかとなった。原薬を-20℃保管では、1 年間安定な成績であった。ワクチンの長期備蓄を考慮すると、CAM ポック法は、鶏卵のウイルスに対する感受性を考慮する必要がある。この点、株化細胞 RK13 を用いたブラック法が優れていることが明らかになった。

F. 健康危険情報
特に無し。

G. 研究発表
特に無し。

H. 知的財産の出願・登録状況
特に無し。

以上

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
（分担）研究報告書

痘そうワクチンの備蓄戦略の為の品質向上、生産性向上に関する研究

分担研究課題：先行研究のレビュー及び基礎的研究

分担研究者：森川 茂 国立感染症研究所 ウイルス第 1 部 第 1 室長
協力研究者：介根一郎 国立感染症研究所 ウイルス第 1 部 部長
協力研究者：緒方もも子 国立感染症研究所 ウイルス第 1 部
協力研究者：堀内善信 国立感染症研究所 細菌第 2 部 室長
協力研究者：寺野 剛 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部 部長
協力研究者：嶽本澄代 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部

研究要旨：バイオテロ対策として痘そうワクチンの製造が再開され国家備蓄されている。平成 13 年度より製造の再開されている乾燥細胞培養痘そうワクチンの備蓄可能期間に関しては不明である。これまでに長期保存されている痘そうワクチンの力価推移の解析から、測定年により鶏卵漿尿膜接種によるポック法での力価がばらつくことが明らかとなった。これは、各測定年で用いた鶏卵の感受性にばらつきがあるためと考えられる。一方、平成 11 年に製造された試験製造ワクチンの 65 月間の力価推移では、力価の \log_{10} 値と保存月数の関係は一次回帰 ($R^2=0.99$) したが、これは参照品を用いてあらかじめ鶏卵の感受性に差の無いものを用いたためである。この結果は、長期の備蓄を考えた時、感受性の安定した鶏卵の確保が必須であることを意味する。一方、ブラック法では株化細胞を用いるため測定年度による誤差は極小にできると考えられる。また、ブラック法での力価測定の結果は 2 施設間で良く一致し有意差は認められなかったことから、ブラック法による力価測定法がポック法より優れた試験法であると結論される。ポック法とブラック法を比較すると、両試験方法での力価には \log_{10} 値で 0.3（実数値で 2 倍）程度の差が認められたが、相対力価ではよく一致した。この結果から、ブラック法での力価結果をワクチン力価としてどのように評価するかを検討する必要がある。

A. 研究目的

バイオテロ対策の一環として乾燥細胞培養痘そうワクチンの製造が再開され国家備蓄されている。本ワクチンは、生物学的製剤基準では -20°C 以下の保存で 3 年間と定められている。乾燥細胞培養痘そうワクチンは、昭和 55 年度に千葉県血清研究所により 1 ロック

のみ製造・保存されたが -20°C での保存期間 9 年目で生物製剤に定める有効力価を下回り、保存 15 年目で力価が大幅に低下したため廃棄された。これまでの長期保存ワクチンの力価測定の経験から、力価測定及び安定性試験に用いられる鶏卵のワクチニアウイルスに対する感受性は必ずしも一定でない。痘そうワク

チンの備蓄戦略の為の品質向上、生産性向上を遂行する上で、特にワクチンに含まれるワクチニアウイルス LC16m8 の力価を正確に測定することが必須である。本研究では、より正確で安定した測定法を検討することを目的とした。また、海外での第3世代ワクチンの開発につながる研究動向を調査評価して、現行ワクチンの品質向上の検討課題を明らかにする。

B. 研究方法

1) 長期保存痘そうワクチンの力価推移の解析：

第1世代の痘そうワクチン（旧ワクチン）として Lister 株による Calf lymph vaccine（1972年に製造され 4℃保存されている：製造時の力価は $8.75 \log_{10}/\text{mL}$ ）の過去の経年的な力価測定成績を解析した。また、乾燥細胞培養痘そうワクチンとしては、昭和55年度に千葉県血清研究所で製造され、有効期間後に -20℃で保存され廃棄されるまでの15年間の経年的な力価及び安定性力価（37℃、4週間保存後の力価）の成績を解析した。また、平成11年に千葉県血清研究所に委託して製造された試験製造ワクチンの65月間の力価推移を解析した。

2) 力価試験と安定性試験の方法の比較：

試験製造ワクチン（参照品）と乾燥細胞培養痘そうワクチン（財団法人 化学及血清療法研究所製造 V03, V04, および V05:財団法人 化学及血清療法研究所より分与）の各ワクチンを鶏卵の漿尿膜上接種による生物学的製剤基準に沿った測定法（CAM ポック法）と株化ウサギ腎細胞である RK13 細胞を用いたブラック法により求めて、比較検討した。また、RK13 細胞を用いたブラック法による力価測定を、国立感染症研究所と財団法人 化学及血清療法研究所で行い、施設間差の有無に関して解析した。

3) 先行的レビュー：

海外での第3世代ワクチンの開発につながる研究動向を調査評価して、現行ワクチンの品質向上の検討課題を考察した。

C. 結果：

1) 長期保存痘そうワクチンの力価推移の解

析：

1972年に製造され 4℃保存されている Lister 株による旧ワクチンの過去の経年的な力価測定成績を図1に示す。各測定年の力価は生物学的製剤基準に沿った CAM ポック法を3-5回行った平均と標準偏差を示している。その結果、製造後27年間は徐々に力価の低下が認められたが、29年目より力価が上昇していた。

昭和55年度に千葉県血清研究所で製造され、有効期間中は4℃で、その後は-20℃で保存されていた乾燥細胞培養痘そうワクチンの15年間の経年的な CAM ポック法による力価及び安定性力価を図2に示す。保存9年目で力価の有意な低下が見られ、15年目に大きく力価が低下している。しかし、力価、安定性力価とも測定年により有意に上下していた。

平成11年に製造された試験製造ワクチンの65月間の力価推移を図3に示す。各測定時の力価は CAM ポック法を3-6回行った平均と標準偏差を示している。その結果、力価の \log_{10} 値と保存月数の関係は一次回帰し ($R^2=0.99$)、65月間に \log_{10} 値で 0.33 低下した。

2) 力価試験と安定性試験の方法の比較：

参照品と乾燥細胞培養痘そうワクチン3ロットを生物学的製剤基準に沿った CAM ポック法と RK13 細胞を用いたブラック法により求めた。鶏卵の漿尿膜上接種による測定法では、各ワクチンの力価測定を3回行った。ブラック法では、3ロットそれぞれを3回測定した平均力価をもって1回の力価試験の成績とし、これを3回行った。

まず、ブラック法による成績を国立感染症研究所と財団法人 化学及血清療法研究所の2施設で行い比較した結果、表1に示すように、施設間による力価測定成績に有意差は認められなかった。

次に、各測定法を平行線定量法により解析した結果、図4、5に示すように CAM ポック法におけるある希釈でのポック数の対数を用いて、平行線定量法に解析した結果、乾燥細胞培養痘そうワクチンの3ロットいずれも参照品との平行性は否定されず、力価を平行線定量法によって参照品に対して相対的に求められることが明らかとなった。また、ブラック法での RK13 によるブラック数の対数を用いて平行線定量法により解析した結果、ポック

法と同様、乾燥細胞培養痘そうワクチンの3ロット間の用量反応回帰の平行性は否定されず、これらの力価を参照品に対して相対的に求めうることが確認された。

平行線定量で求めた参照品に対する各ロットの相対力価について、CAM ポック法とブラック法について比較した (図6)。その結果、絶対値を用いた場合、両測定方法の間で力価に相違が認められたが (\log_{10} 値で0.3)、相対力価の場合、図に示したように両方法で一致した結果が得られることが確認された。

3) 先行的レビュー:

これまでにワクチニアウイルスでは、TK 遺伝子は病原性・神経病原性に、E3L 遺伝子は IFN 耐性と神経病原性に、K3L は IFN 耐性とマウスでの組織親和性に関与することが明らかとなっている。また、B13R(caspase1 inhibitor), B22R(apoptosis inhibitor)を欠損させ IFN・遺伝子を組換えるとマウスでのウイルス増殖が極めて低くかつ抗ワクチニア免疫が強く誘導されることが明らかとなっている。第三世代ワクチンの開発につながる研究としては、DNA ワクチン、蛋白ワクチンとも、EEV 膜蛋白 (A33, B5R) と IMV 膜蛋白 (L1, A27) の単独、混合による効果が検討され、混合免疫が DNA ワクチン、蛋白ワクチンとも有効であることが示されている。また、C57BL/6 mice における CTL の主要標的蛋白として B8R, A19L, A47L, A42R, K3L が同定されている。

D. 考察

長期保存痘そうワクチンの力価推移の解析から、測定年により力価がばらつくことが明らかとなった。これは、旧ワクチンでは各測定年での標準偏差を考慮すると鶏卵の感受性にばらつきがあるためと考えられる。一方、平成11年に製造された試験製造ワクチンの65月間の力価推移では、力価の \log_{10} 値と保存月数の関係は一次回帰 ($R^2=0.99$) したが、これは参照品を用いてあらかじめ鶏卵の感受性に差の無いものを用いたためと考えられる。この結果は、長期の備蓄を考えた時、感受性の安定した鶏卵の確保が必須であることを意味する。

一方、ブラック法では株化細胞を用いるため測定年度による誤差は極小にできると考えられる。また、2施設間での測定結果も良く

一致し、有意差は認められなかったことから本試験法が CAM ポック法より優れた試験法であると結論される。CAM ポック法とブラック法を比較すると、両試験方法での力価には \log_{10} 値で0.3 (実数値で2倍) の差が認められたが、相対力価ではよく一致した。この結果から、ブラック法での力価結果をワクチン力価としてどのように評価するかを検討する必要がある。

近年の研究から、病原性遺伝子のノックアウトと免疫賦活遺伝子の導入、DNA ワクチンや蛋白ワクチンが基礎的実験レベルで検討されている。今後、これらと当該ワクチンの有効性の比較を含めて検討される必要がある。

E. 結論

ワクチンの長期備蓄を考慮すると、CAM ポック法は、鶏卵のウイルスに対する感受性を考慮する必要がある。この点、株化細胞 RK13 を用いたブラック法が優れていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2004) Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57:55-57.
- 2) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers. *Archives of Virology* 149. 1279-92.
- 3) Mizitani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochemical Biophysical Research Communication* 319: 1228-1234.
- 4) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I,

- Morikawa S. (2004) Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* 327: 169-74.
- 5) Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS letter* 5;577(1-2):187-92
 - 6) Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto SI, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y. (2004): A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int Immunol.*, 16(10): 1423-30
 - 7) Iwasaki, T., Inoue, S., Tanaka, K., Sato, Y., Morikawa, S., Hayasaka, D., Moriyama, M., Ono, T., Kanai, S., Yamada, A. and Kurata, T. (2004): Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch. Virol.*, 149(6): 1139-1154.
 - 8) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *Journal of Medical Virology* 75:295-299
 - 9) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: (2005) The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. *Vaccine* (in press).
 - 10) Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Fukushi, S., Mizutani, T., Notomi, T., Kanda, H., Minekawa, H., Matsuyama, S., Hoang Thuy Long, Nguyen Thi Hong Hanh, Kurane, I., Tashiro, M., Morikawa, S.. (2005): Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Methods* (in press)
 - 11) Saijo, M., Niikura, M., Maeda, A., Kurane, I., Sata, T., Kurata, T., and Morikawa, S. (2005): Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Virol.*, (in press)
 - 12) Hatakeyama, S., Moriya, K., Saijo, M., Morisawa, Y., Kurane, I., Koike, K., Kimura, S., and Morikawa, S. (2005): Persisting humoral antiviral immunity among the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology*, in press.
 - 13) 森川 茂 (2004): ウイルス性出血熱、アニムス、第9巻第1号、15-20
 - 14) 小田切孝人, 二宮愛, 板村繁之, 西藤岳彦, 宮島直子, 森川茂, 西條政幸, 田代真人 (2004): SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果. *インフルエンザ (メディカルレビュー社)* 5:35-42.
 - 15) 森川 茂 (2004): サル痘、感染症の事典、朝倉書店、pp107-109
 - 16) 森川 茂 (2004): ラッサ熱、獣医公衆衛生学 (第3版)、文永堂出版、pp91-92
 - 17) 森川 茂 (2004): 南米型出血熱、獣医公衆衛生学 (第3版)、文永堂出版、pp92-93
 - 18) 森川 茂 (2004): ニパウイルス感染症、家庭医学大全科、法研、pp2770
 - 19) 森川 茂 (2004): リンパ球性脈絡髄膜炎、共

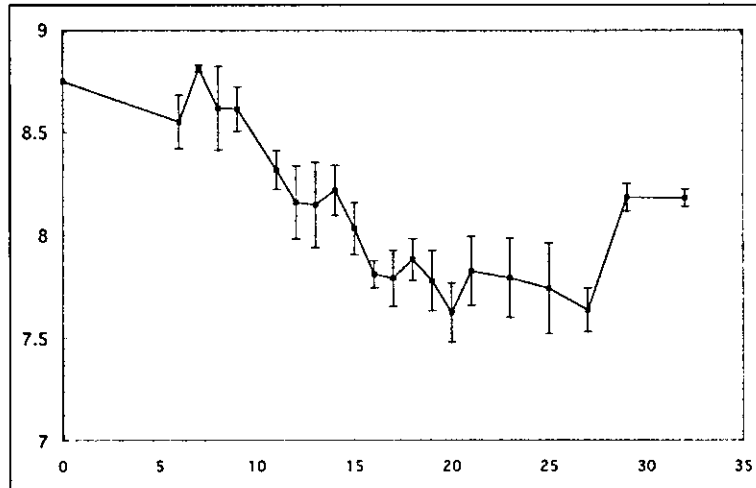
- 通感染症ハンドブック、日本獣医師会、pp230-231
- 20) 森川 茂 (2004): マールブルグ病、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp78-79
- 21) 森川 茂 (2004): サル痘、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp144-145
- 22) 森川 茂 (2004): ニパウイルス感染症、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp128-129
- 23) 森川茂 (2004): サル痘、新興再興感染症—SARS の教訓 [からだの科学 (増刊)] 日本評論社、pp188-191
- 24) 森川茂 (2004): 天然痘ワクチンの復活 小児科臨床 (特大号/ワクチンのすべて) 67: 11
- 25) 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. (2004) クリミア・コンゴ出血熱. ウイルス 54:223-228.
- 4) 西條政幸. 母親から感染したと考えられるクリミア・コンゴ出血熱の4歳女児例. 第36回日本小児感染症学会, 2004年11月, 東京
- 5) 山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV の継代培養による変異ウイルスの出現. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 6) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウスとラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 7) 西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂. SARS コロナウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発を評価. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 8) 森川茂, 長谷川秀樹, 西條政幸, 前田秋彦, 倉根一郎, 尾崎泰子, 佐多徹太郎. 倉田毅, 小島朝人. ワクチニアウイルス LC16m8 株の有効性と遺伝子構造の解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 9) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 須崎百合子, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. LC16m8 株痘そうワクチンによるカンクイザルにおけるサル痘発症予防効果. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染の検討. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 11) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV 感染細胞におけるアポトーシスに関するシグナル伝達系の網羅的検討. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜
- 12) 水谷哲也, 福士秀悦, 村上正晃, 西條政幸, 倉根一郎, 平野俊夫, 森川茂. SARS コロナウイルスの感染に誘導されるシグナル伝達の解析. 第27回日本分子生物学会年会. 2004年12月,
2. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特許取得: 該当なし
3. 学会発表
- 1) Saijo M, Tang Q, Kurane I, Morikawa S. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 5th Japan-China Virology Conference. June, 2004, Osaka
- 2) Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. Research activities towards the control of viral hemorrhagic fever (University of Hokkaido). June 2004, Sapporo
- 3) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged heperpermeability induced by TNF-alpha of Hantaan virus-infected endothelial cell monolayers. International Conference on Hantavirus infections. June 2004, Seoul, South Korea

神戸

13) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎,
西條政幸. Efficient replication of SARS coronavirus
on the cells expressin mouse ACE2.第 27 回日本分
子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸

図1.長期保存による旧痘そうワクチンの力価推移の解析

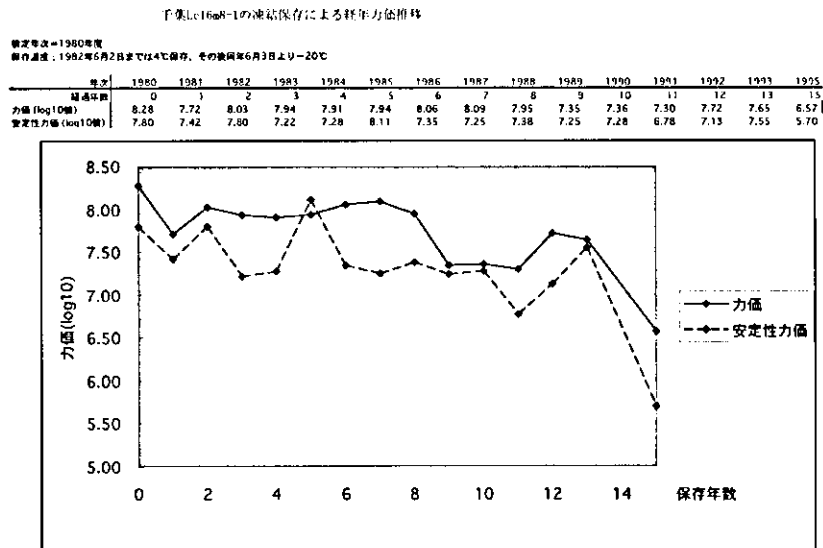
旧痘そうワクチン(Lister, Calf lymph)の力価推移



旧痘そうワクチン: 1972年に製造されたLister株によるCalf lymphワクチン。製造時のCAMポック力価は8.75 log10/mL。保存温度は4℃。力価は、CAMポック法により測定しlog10/mLで表記した。縦棒はSD。

図2.長期保存による乾燥細胞培養痘そうワクチンの力価推移の解析

乾燥細胞培養痘そうワクチン(千葉lot 1)の力価推移

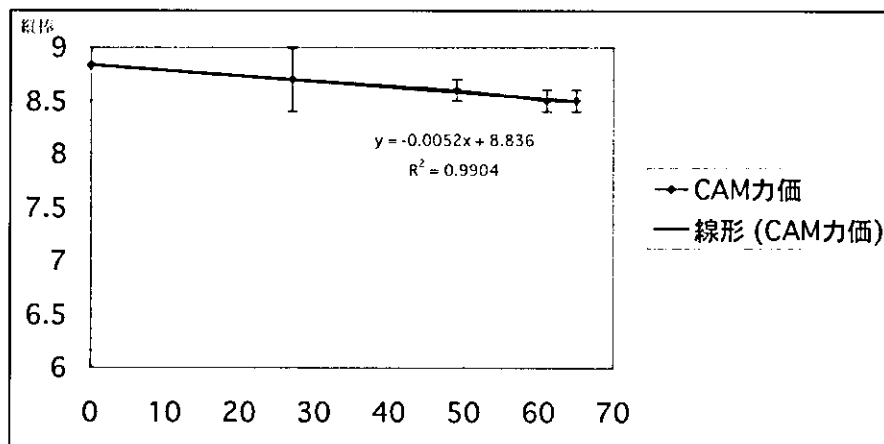


保存温度は、国家検定合格後2年間(有効期間)は4℃、その後-20℃に保存

図3. 平成11年に製造された試験製造ワクチンの65月間の力価推移の解析

乾燥細胞培養痘そうワクチン（試験製造品）の力価推移

	平成11年 1999年9月 (チバ)	平成13年 2001年12月 (6回)	平成15年 2003年10月 (3回)	平成16年 2004年10月 (3回)	平成17年 2005年2月 (4回)
保存月数	0	27	49	61	65
CAM力価	8.83	8.7	8.6	8.5	8.5
S D		0.3	0.1	0.1	0.1



保存温度は、製造後2年間は4℃、その後は30℃に保存

表1. プラック法による力価測定の結果の比較

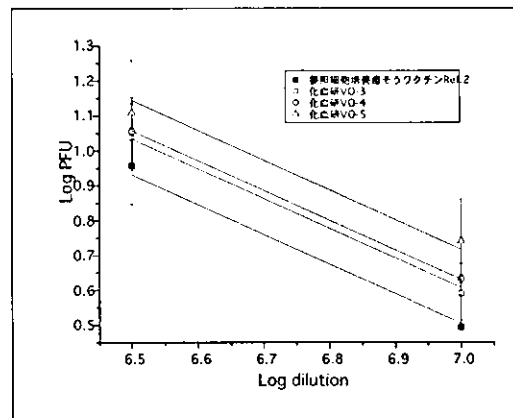
RK13細胞によるプラック法の施設間差 (参照品)

検体		参照品	V03	V04	V05
化血研	1	8.60	8.83	8.86	8.61
	2	8.49	8.61	8.50	8.66
	3	8.55	8.73	8.62	8.72
感染研	1	8.59	8.71	8.77	8.70
	2	8.50	8.58	8.59	8.66
	3	8.42	8.63	8.63	8.64

	偏差平方和	自由度	平均平方和	F ₀	P	F
検体間	0.095	3	0.032	3.471	0.041	3.239
施設間	0.013	4	0.003	0.362	0.832	3.007
誤差	0.146	16	0.009			
全体	0.255	23				

以上の解析から、施設間による力価測定に有意差は無い

図4. CAMポック法の平行線定量法による解析



CAMでのある希釈でのポック数の対数を用いて、平行線定量法による参照品に対する相対力価を求めることができるか検討した結果、いずれの検体（ワクチンのロット）も参照品との平行性は否定されず、力価を平行線定量法によって参照品に対して相対的に求められる。