

ものを使用した。

【ウイルス培養】

25 cm² カルチャーフラスコに各細胞を培養し、 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 6mL 添加したものを 35°C、37°C または 39°C で 4 日間培養した。培養後、凍結融解によりウイルスを回収した。

【評価】

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。

b) 吸着温度の影響

【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。LC16m0 株と Lister Original (L0) 株は、千葉県血清研究所より入手し化血研で培養したものをを使用した。

【使用細胞株】

RK-13 細胞は千葉県血清研究所から入手し 5%FBS 添加 MEM 培地で培養したものをを使用した。MRC-5 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から購入し 10%FBS 添加 MEM 培地で培養したものをを使用した。Vero E6 細胞は国立感染症研究所から入手し 5%FBS 添加 D' MEM 培地で培養したものをを使用した。

【ウイルス培養】

25 cm² カルチャーフラスコに各細胞を培養し、 2×10^5 PFU/mL に調製した LC16m8 株を 1 mL ずつ接種した。37°C または 40°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 6mL 添加したものを 37°C で 4 日間培養した。培養後、凍結融解によ

りウイルスを回収した。

【評価】

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。

c) ウイルスハーベストのタイミングの検討

【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。

【ウイルス培養】

850 cm² ローラーボトルにウサギ初代腎細胞 (PRK) を培養し、 1×10^7 PFU/mL に調製した LC16m8 株を 10mL ずつ接種した。30°C で 1~2 時間吸着させた後、ウイルス維持培地を 90mL 添加したものを 30°C で 4 日間培養した。

【評価】

培養開始から 48、69、74、79、93 時間後に観察を行い、顕微鏡下の CPE の状態を撮影し、各 CPE の数をカウントした。

d) 吸着工程の有無

【使用ウイルス】

LC16m8 株は、化血研で製造したワクチン液を使用した。

【ウイルス培養】

490 cm² ローラーボトルに培養した PRK 細胞に、 8.3×10^6 PFU/mL に調製した LC16m8 株を 6mL ずつ接種した。吸着を行わないものはただちに 54mL の維持培地を追加し、30°C で培養を開始した、吸着を行うものは、30°C で約 2 時間吸着させた後、維持培地を 54mL 添加し、30°C で培養を開始した。3 日間培養後、強く振とうすることにより細胞を剥がし、遠心により細胞と培養上清を分離した。約 1 割の培養上清に細胞を浮遊さ

せ、ピペッティング後に凍結を行った。その後、凍結融解によりウイルスを回収した。

【評価】

培養開始から 33 時間後、55 時間後、及び 73 時間後に観察を行い、顕微鏡下の CPE の状態を撮影し、各 CPE の数をカウントした。

C. 研究結果

a) 細胞基質と温度感受性の関連性検討

RK-13 細胞を用いて 37°C、39°C、40°C で培養した場合のウイルス力価は L0 株でそれぞれ $10^{7.45}$ PFU /Flask、 $10^{7.31}$ PFU /Flask、 $10^{6.33}$ PFU /Flask、LC16m0 株でそれぞれ $10^{8.42}$ PFU /Flask、 $10^{8.21}$ PFU /Flask、 $10^{6.56}$ PFU /Flask、LC16m8 株でそれぞれ $10^{8.23}$ PFU /Flask、 $10^{7.98}$ PFU /Flask、 $10^{5.85}$ PFU /Flask であった。(図 1)

Vero E6 細胞を用いて 37°C、39°C、40°C で培養したウイルス力価は、L0 株でそれぞれ $10^{6.87}$ PFU /Flask、 $10^{6.57}$ PFU /Flask、 $10^{5.12}$ PFU /Flask、LC16m0 株でそれぞれ $10^{6.87}$ PFU /Flask、 $10^{6.63}$ PFU /Flask、 $10^{3.80}$ PFU /Flask、LC16m8 株でそれぞれ $10^{6.27}$ PFU /Flask、 $10^{5.39}$ PFU /Flask、 $10^{3.17}$ PFU /Flask であった。

(図 2)

MRC-5 細胞を用いて 37°C、39°C、40°C で培養したウイルス力価は、L0 株でそれぞれ $10^{8.09}$ PFU /Flask、 $10^{7.40}$ PFU /Flask、 $10^{6.92}$ PFU /Flask、LC16m0 株でそれぞれ $10^{7.98}$ PFU /Flask、 $10^{7.80}$ PFU /Flask、 $10^{7.15}$ PFU /Flask、LC16m8 株でそれぞれ $10^{7.42}$ PFU /Flask、 $10^{7.19}$ PFU /Flask、 $10^{6.63}$ PFU /Flask であった。

(図 3)

いずれの株においても、39°C 培養におけるウイルス増殖性は 37°C での増殖性とほとんど差がなかった。また、40°C 培養における LC16m8 と LC16m0 株の温度感受性 (37°C

培養との力価の比) はほぼ同等であった。

MCR-5 での温度感受性は RK-13 細胞や Vero E6 細胞での温度感受性と比較して大いに低かった。

b) 吸着温度の影響

吸着温度を 37°C と 40°C にしたウイルス力価はそれぞれ、L0 株で $10^{8.47}$ PFU /Flask 及び $10^{8.22}$ PFU /Flask、LC16m0 株で $10^{8.89}$ PFU /Flask 及び $10^{8.68}$ PFU /Flask、LC16m8 株で $10^{8.82}$ PFU /Flask 及び $10^{8.64}$ PFU /Flask であった。(図 4)

いずれのウイルスにおいても、吸着時の温度の違いはウイルスの増殖性にほとんど影響を与えなかった。このことから、ウイルスが細胞に入り込む過程においては温度の影響を受けないことが示唆された。

c) ウイルスハーベストのタイミングの検討

ウイルスの培養時間と各サンプリングポイントにおける CPE 数を示した。(図 5)

サンプル 1 では培養開始から 74 時間までは CPE の増加が見られたが、79 時間では細胞がほとんど剥がれ落ち、CPE の数が減少していた。

サンプル 2 では培養開始後 69 時間までは CPE の増加が見られたが、74 時間後以降は CPE の減少が見られた。このことから、通常ハーベストを行っている 67 時間前後のタイミングの妥当性が示唆された。

d) 吸着工程の有無

ウイルスの培養時間と各サンプリングポイントにおける CPE 数を示した。(図 6) どのサンプリングポイントにおいても、吸着工程の有無にかかわらず、CPE の数にほとんど差がなかったことから、ウイルスの培

養に吸着工程の有無が影響を与えないことが示唆された。

D. 考察

LC16m8 株は、30°Cの低温で、ウサギ初代腎細胞で継代を重ねることにより確立された温度感受性株である。増殖限度温度は同じく温度感受性株である親株の LC16m0 株よりも低く、また、Vero 細胞では増殖が悪いことが知られていた。今回、ワクチンの大量培養及びタンク培養で広く用いられており、他の株による痘そうワクチンの製造に使用実績のある Vero 細胞、及び他の株による痘そうワクチンの製造に使用実績のある MRC-5 細胞を用いて、温度感受性の特質がどのように変化するかを確認した。その結果、細胞基質が変わっても、37°C培養と 39°C培養における L0 株、LC16m0 株、LC16m8 株の株間のウイルス増殖性の傾向は、ほぼ同じであった。また、40°C培養における LC16m8 株と LC16m0 株の温度感受性 (37°C培養との力価の比)は、RK-13 細胞や Vero E6 細胞で、ほぼ同等であった。MRC-5 での温度感受性は他の細胞に比較して大いに低かった。以上のことから、LC16m8 株の増殖性は、培養温度よりも細胞基質の種類により影響を受けることが確認されたが、今回使用した細胞では、大きく高いウイルス増殖を認めなかった。

また、ウイルスが細胞に侵入する過程において温度の影響を受けるか確かめるために、ウイルス吸着温度を 37°Cまたは 40°Cとして力価を比較したが、培養 4 日後の力価に変化は認められなかった。このことから、ウイルスの吸着には温度の影響を受けないことが確認された。

高いウイルス収率を維持するためには、適切な培養時間が必要であるが、培養時間

が長くなると細胞基質の破損のためにウイルスが逃げやすくなるため、ウイルス回収のタイミングも重要である。今回、培養時間と CPE の数の関係を調べることによって、現行のウイルス培養時間に妥当性があることが確認された。

これまで、細胞基質に効率よくウイルスを感染させるためには、吸着の工程は必須であると思われていたが、LC16m8 株では、吸着の有無はウイルスの収率に影響を与えないことが確認された。

E. 結論

LC16m8 株のウイルス増殖性は、宿主の影響を受けることが確認された。LC16m8 株のウイルス吸着時における温度感受性の性質は、関連性がないことが確認され、吸着の有無はウイルスの増殖性と収率に影響を与えないことが確認された。現在の製造方法において、ハーベストを行うタイミングは最適であることが確認された。

本研究の成績は、ワクチンの安定製造に有効であると期待される。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

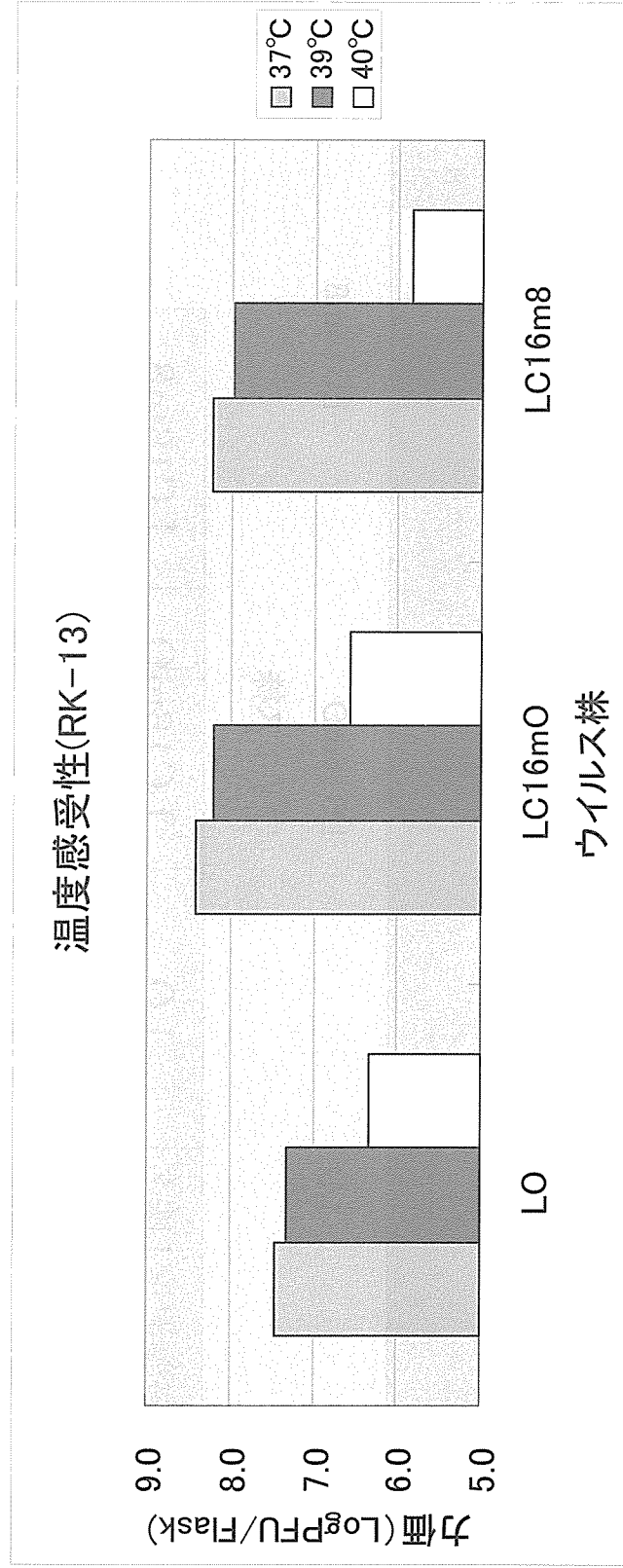
特に無し。

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

以上

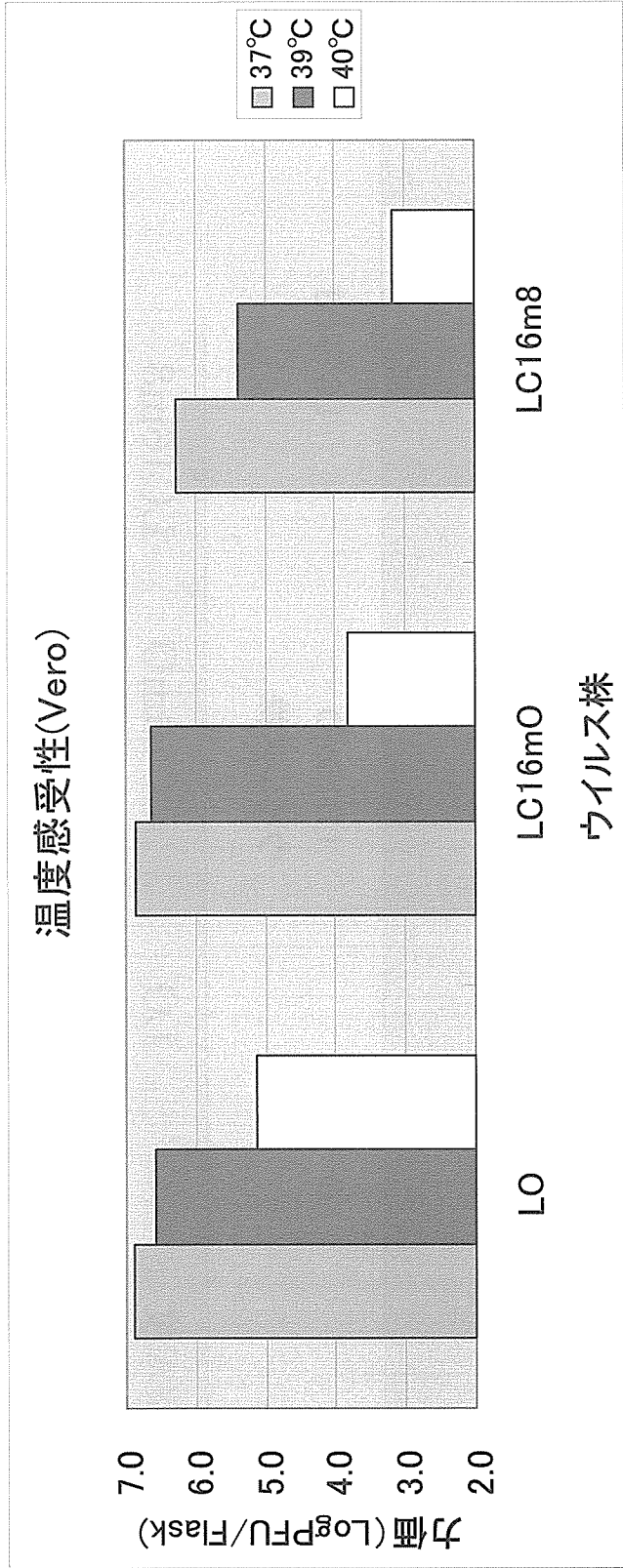
図1 細胞基質と温度感受性の関連性 (RK-13)



培養温度 株名	LO	LC16m0	LC16m8
37°C	7.45	8.42	8.23
39°C	7.31	8.21	7.98
40°C	6.33	6.56	5.85

(単位: Log PFU/Flask)

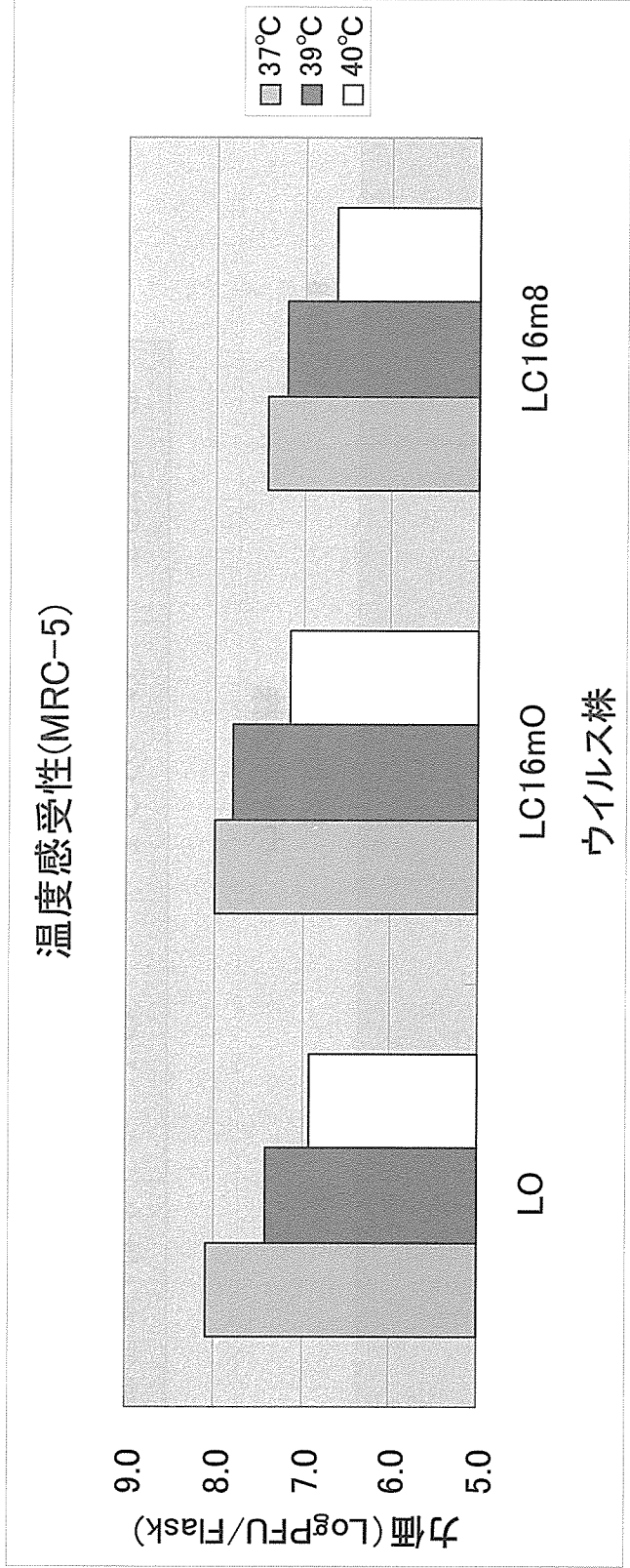
図2 細胞基質と温度感受性の関連性 (Vero)



培養温度 株名	LO	LC16m0	LC16m8
37°C	6.87	6.87	6.27
39°C	6.57	6.63	5.39
40°C	5.12	3.80	3.17

(単位: Log PFU/Flask)

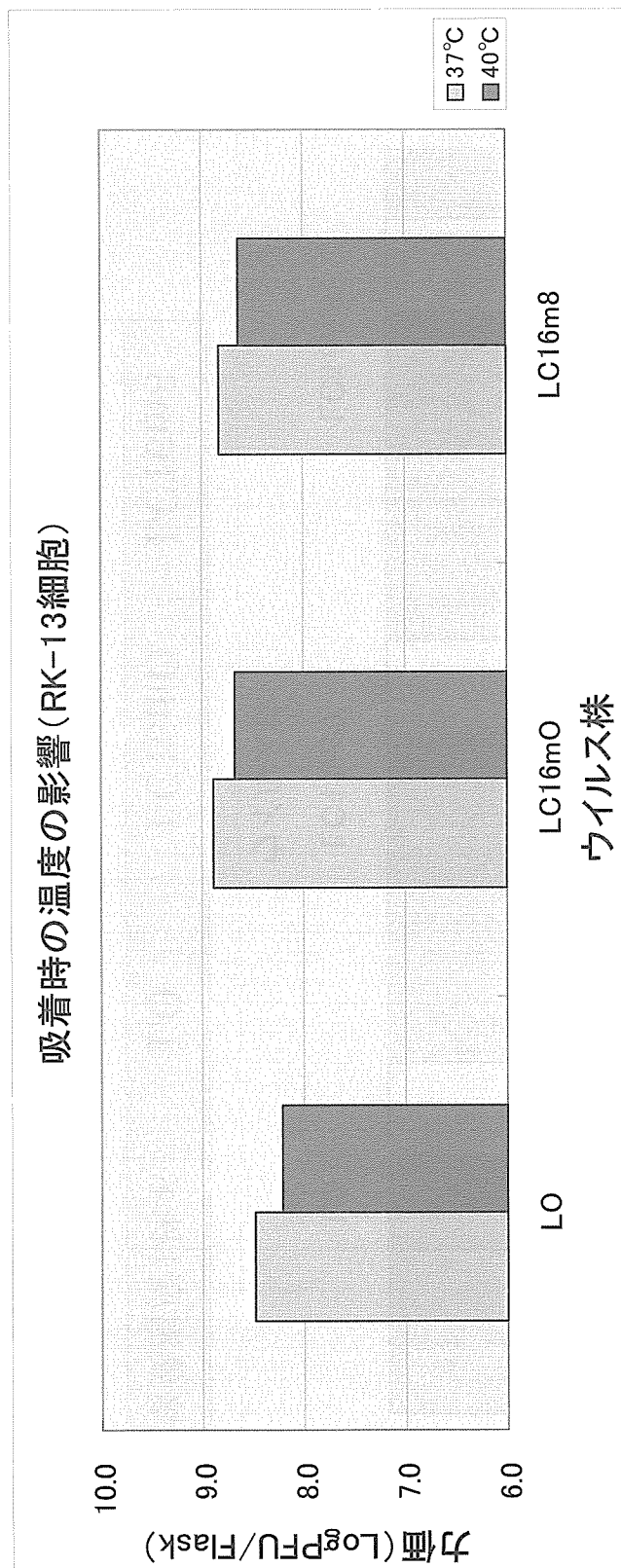
図3 細胞基質と温度感受性の関連性 (MRC-5)



培養温度 株名	LO	LC16mO	LC16m8
37°C	8.09	7.98	7.42
39°C	7.40	7.80	7.19
40°C	6.92	7.15	6.63

(単位: Log PFU/Flask)

図4 吸着温度の影響 (RK-13)



吸着温度 株名	LO	LC16m0	LC16m8
37°C	8.47	8.89	8.82
40°C	8.22	8.68	8.64

(単位: Log PFU/Flask)

図5 ウイルスハーベスタのタイミング

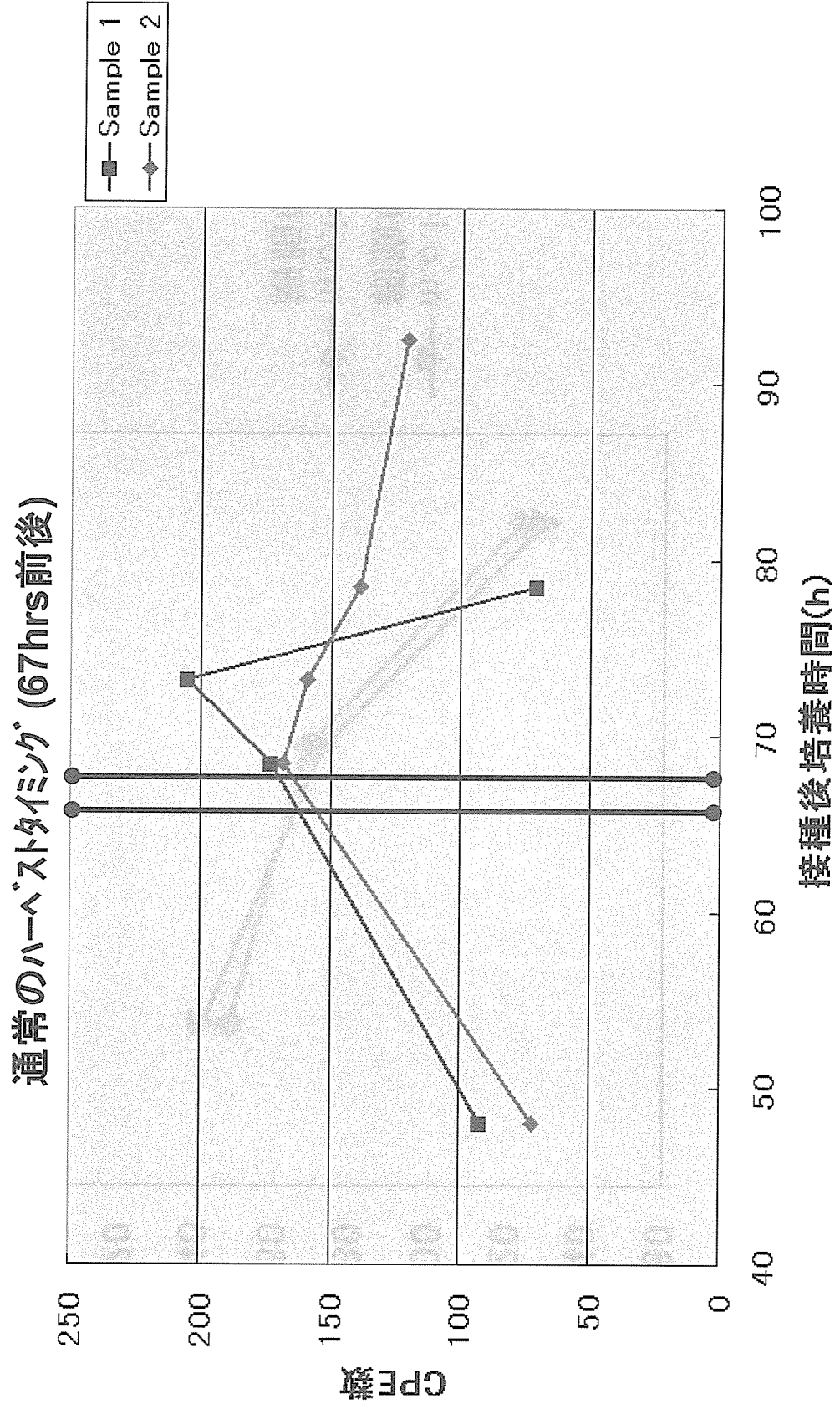
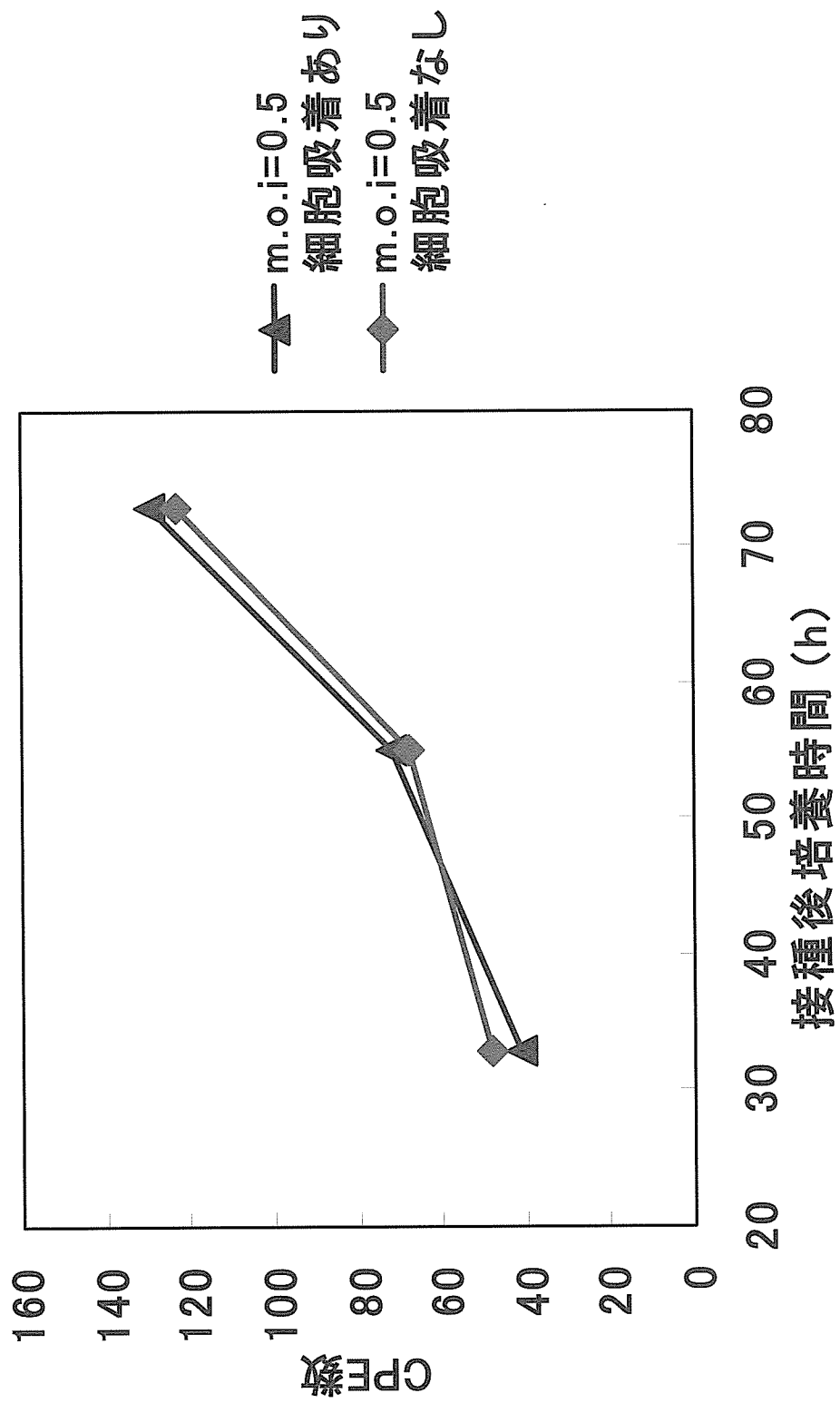


図6 吸着工程の有無



平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金
(国際健康危機管理ネットワーク強化研究事業)

分担研究報告書

分担研究課題：有効性の維持の基礎的検討

分担研究者：横手公幸 財団法人 化学及血清療法研究所
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
協力研究者：倉根一郎 国立感染症研究所 ウイルス第一部 部長
協力研究者：緒方もも子 国立感染症研究所 ウイルス第一部
協力研究者：堀内善信 国立感染症研究所 細菌第二部 第五室長
協力研究者：寺野 剛 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部長
協力研究者：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
協力研究者：土山浩文 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部長付
協力研究者：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
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 第二課

* 研究要旨 痘そうワクチンの -20°C での長期保存安定性を評価する為に、化血研製造 3 ロットについて安定性試験を開始した。併せて、原薬について、 -20°C 及び -80°C での 24 ヶ月までの安定性を確認した。さらに、長期備蓄を考慮した保存安定性の評価においては、長期的に安定した力価試験の実施が望まれる為、力価試験に関する検討を行った。現行のふ化鶏卵漿尿膜接種によるポック法と比較して、株化細胞を使用するブラック法は測定年度による差は小さくなると考えられる。ブラック法の分析法バリデーションを実施し、現行法と同等以上の精度を有していること、ワクチンの力価試験として適格性を有していることを確認した。しかし、ポック法と同じ検体をブラック法で測定した場合、 $0.2\sim 0.3 \text{ LogPFU/mL}$ 程度高い測定結果となったことから、試験法の変更については力価基準の変更と併せて、引き続き検討する必要がある。また小分け製品の 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。併せて、ガラスアンンプル化の検討にも着手した。更に、小分製剤（旧千葉県血清研究所製造）の痘そうワクチン（Lot No. 2 及び No. 3）について、安定性評価に着手した。

A. 研究目的

平成 14 年製造以降の製造ロットは -20°C 保存となっているが、その保存条件での長

期安定性についてのデータがない為、ワクチン備蓄戦略に資する基礎資料を得る目的で化血研製造 3 ロットについて安定性試験

を開始した。併せて、製剤化（凍結乾燥）工程前の原薬について、 -20°C 及び -80°C での24ヵ月間の安定性を評価した。

さらに、長期備蓄を考慮した保存安定性を評価するためには、長期的に安定した力価試験の実施が望まれるが、現在生物学的製剤基準に規定されているふ化鶏卵を利用したポック法には、培養基材である卵自体の感受性に起因するばらつきがあることが分かっている。そこで、より簡便で長期的に安定した力価試験を実施するために、本研究では細胞培養によるブラック法を力価試験として導入できるか評価することを目的として検討を行った。

また、施栓系材料（バイアル、ゴム栓及びガラスアンプル）の安定性評価を実施した。更に、小分製剤（旧千葉県血清研究所製造）の痘そうワクチン（Lot No.2 及び No.3）について、安定性評価に着手した

B. 研究方法

a) 乾燥細胞培養痘そうワクチンの保存安定性試験

乾燥細胞培養痘そうワクチン3ロット（V03、V04、V06）を -20°C ～ -35°C で保管した。安定性試験開始時のデータとして、生物学的製剤基準に準じて、性状確認試験、含湿度試験、力価試験、無菌試験、重量偏差試験、安定性試験（ 37°C 、4週間加温後の力価）を実施した。保存3ヵ月目は性状確認試験、含湿度試験、力価試験を測定した。力価試験に関しては、安定性試験の途中で試験法変更の可能性があることから、ポック法及びブラック法両方で測定した。

b) 原薬の安定性実験

製剤化（凍結乾燥）工程前の原薬の安定性を評価する為に、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 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ に、それぞれ2ロットの原薬を保管し、継時的に24ヵ月目までの力価を測定した。

c) ブラック法とポック法の比較実験

参照細胞培養痘そうワクチン（参照品）及び乾燥細胞培養痘そうワクチン3ロット（V03、V04、V05）について、ふ化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（ポック法）とウサギ腎由来の株化細胞であるRK13細胞を用いたブラック法の結果について解析を行った。

d) ブラック法の分析法バリデーション

薬審第755号審査課長通知「分析法バリデーションに関するテキスト」に従いパラメータを選択し、ブラック法の分析法バリデーションを実施した。

①真度：参照細胞培養痘そうワクチンを6回測定し、測定結果をポック法により値付けされた使用書の値と比較した。

②併行精度：参照細胞培養痘そうワクチンを6回測定し、相対標準偏差を評価した。

③室内再現精度：内部標準品（化血研で製造された乾燥細胞培養痘そうワクチンV05）を3試験日・3測定者で測定を行い、相対標準偏差を評価した。

④直線性・範囲・定量限界：約3～9 LogPFU/mLの濃度となるように調製した7検体を測定し、ウイルス含量の計算値と測定値間の回帰直線の評価及び残差分析を行った。また、100～2000 PFU/mLの濃度となるように調製した6検体を測定し、ブラック数の計算値と測定値間の回帰直線の評価

及び残差分析を行った。さらに、上記の測定結果から、適正な真度・精度・直線性を有したウイルス濃度の範囲と定量限界を評価した。

⑤特異性：陰性対照の試験結果及び直線性の試験結果から、試験系の特異性を評価した。

⑥頑健性：ウイルス接種後の細胞の培養温度 (34、35、36°C)、ウイルス接種後の細胞培養時の CO₂ 濃度 (4.5、5.0、5.5%)、ウイルスから二次重層までの培養時間 (48、72 時間)、試験に使用する RK13 細胞の継代数 (10 継代目、20 継代目、30 継代目)、試験に使用する RK13 細胞のまきこみ濃度 (25 × 10⁴ cells/mL、50 × 10⁴ cells/mL)、FBS ロット (2 ロット) について、相対標準偏差を評価した。また、分散分析により、測定条件による影響を評価した。

e) 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。併せて、ガラスアンンプル化の検討にも着手した。

f) 小分剤の安定性評価

旧千葉県血清研究所製造の痘そうワクチン (LotNo. 2 及び No3) について、安定性評価に着手した。

C. 研究結果

a) 乾燥細胞培養痘そうワクチンの保存安定性試験

安定性試験開始時、3 ヶ月後の測定結果は全て適合であった (図 1)。

b) 原薬の安定性実験

原薬を -80°C ± 5°C に保存した結果、24 ヶ月目まで力価の低下は認められなかった (図 2)。-20°C ± 5°C に保存した場合、3 ヶ月目までに力価の低下傾向が認められたが、その後 24 ヶ月目までに明らかな力価の低下は認められなかった (図 3)。

c) ブラック法とポック法の比較実験

感染研と化血研でそれぞれの検体を両試験法で 3 回ずつ測定した結果について、施設、測定法、検体についての三元配置として分散分析を行い、分散分析表を得た (図 4)。測定に用いた検体間に力価の異なるものが含まれており、測定法により有意な結果の違いが認められた。さらに測定法毎に施設が異なると、結果に有意な違いが認められる可能性が示唆された (施設 × 方法の交互作用)。

さらに、得られた測定値について検体毎に、測定法に関わらずあるいは測定法別に平均値を求め、施設間、測定法間の結果の比較を行った (図 5)。測定法ごとの比較では、施設間でよく一致した結果が得られていることが示されたが、ブラック法ではポック法より力価が平均約 0.3 Log PFU 程度高く計測される可能性が考えられた。

分散分析における誤差を用いて、現行基準値、7.7 LogPFU/mL と WHO 等の基準である 8.0 LogPFU/mL について、有意差として識別されるか否かを評価した。その結果、力価が 7.7 LogPFU/mL の場合、95%信頼区間は 7.482 ~ 7.918、逆に力価 8.0 LogPFU/mL の場合の測定値は、信頼区間は 7.782 ~ 8.218 LogPFU/mL となり、それぞれ有意に識別されると考えられた。

d) ブラック法の分析法バリデーション
バリデーションの結果、評価したパラメータは全て判定基準に適合しており、試験法の適格性が確認された。

①真度：参照細胞培養痘そうワクチンを6回測定した結果、全て使用書に付された測定範囲内であり、真度は98.5～101.5%と100%を挟んで±5%の範囲内であった（図6）。

②併行精度：参照細胞培養痘そうワクチンを6回測定し、相対標準偏差を評価した結果、1.02%と判定基準の2%以下であった。（図6）。

③室内再現精度：内部標準品を3試験日・3測定者で測定した結果、相対標準偏差は0.98%と判定基準の5%以下であった（図7）。

④直線性・範囲・定量限界：ウイルス濃度約3～9 LogPFU/mLの範囲において、添加量と測定値間には相関係数0.9998で $y = 0.9977X + 0.205$ という回帰式が得られた。

また、約100～2000PFU/mL（10～200 Plaque /well）の範囲において、ウイルス濃度とブラック数の間に相関係数 $R=0.9971$ 、 $y = 0.9928X + 2.0817$ という回帰式が得られた。いずれも相関係数は0.95以上、直線の傾きは 1 ± 0.1 の範囲という判定基準を満たしており、y切片の値は室内再現制度で求めた誤差範囲 $3SD=0.258$ LogPFU/mL以内であった。また、残差をプロットした図において、残差は残差の中心（0）を挟んで上下にばらついており、一定の傾向は認められなかった。

この結果から、2.0 LogPFU/mL以上で適正な真度・精度・直線性を有したウイルス含量の測定が可能であることが分かった。

（図8）

⑤特異性：陰性対照でブラックが認められないこと、ワクチン溶液をバルク溶液で希釈し測定した場合に直線性が認められたことから、本試験系の特異性が確認された。

⑥頑健性：ウイルス接種後の細胞の培養温度（34、35、36℃）、ウイルス接種後の細胞培養時のCO₂濃度（4.5、5.0、5.5%）、ウイルスから二次重層までの培養時間（48、72時間）、試験に使用するRK13細胞の継代数（10継代目、20継代目、30継代目）、試験に使用するRK13細胞のまきこみ濃度（ 25×10^4 cells/mL、 50×10^4 cells/mL）、FBSロット（2ロット）を変化させて測定を行った結果、いずれの場合も相対標準偏差は5%以下であった。

また、ウイルスから二次重層までの培養時間、試験に使用するRK13細胞の継代数、試験に使用するRK13細胞のまきこみ濃度、FBSロットについては、分散分析で有意差は認められなかった。ウイルス接種後の細胞の培養温度とCO₂濃度については、分散分析では危険率0.05以下となったが、平均値の差、分散ともに室内再現精度の範囲内であり、有意な差ではないといえる。

よって、本試験法は上記の測定条件において、頑健性を有しているといえる。

e) 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℃及び-80℃）・長期保存条件における安定性の検討を行った。JIS 架橋ゴムの物性評価に従い反発弾性試験、動的貯蔵弾性及び損失弾性等を実施した結果、使用温度が脆化温度（脆くなる温度）-48℃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。尚、当該ゴム栓においては、 -35°C 付近に動的粘弾性ピークが確認できた。

また、ガラスアンプル化の検討にも着手し、痘そうワクチンでの情報収集に着手した。(参考資料)

f) 小分製剤の安定性評価

旧千葉県血清研究所製造の痘そうワクチン (Lot No. 2 及び No. 3) について、安定性評価に関する計画書 (プロトコール) を立案し、関係する機関 (厚生労働省) との協議に着手した。

D. 考察

痘そうワクチンの備蓄戦略に資するデータを取得するため、 -20°C における乾燥細胞培養痘そうワクチンの保存安定性に関しては、今後引き続き研究を継続する。

また、製造における中間製品である原液・原薬の安定性についても、更に検討を行う必要がある。

ブラック法は分析法バリデーションにより適格性が確認されたが、ポック法との測定法間差の有無については例数が不十分であり、結論を得るには至っていない。WHO ガイドラインや欧米の基準が 8.0 LogPFU/mL であること、現行ポック法における 7.7 LogPFU/mL の基準を満たす力価のワクチンの力価はブラック法では 8.0 LogPFU/mL と測定されると考えられることから、測定法をポック法からブラック法に変更する場合、基準を 8.0 LogPFU/mL に変更する必要となる可能性がある。国際標準品候補を用いた試験方法の評価を含め、今後さらに検討を行う必要がある。

E. 結論

長期備蓄を考慮した保存安定性を実施するためには、より長期的に安定した測定結果が得られるブラック法への試験が望まれるが、試験法を変更する際に力価基準も変更となる可能性があり、引き続き慎重に検討を進めていく必要がある。

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

図1 小分けの安定性試験

ロット番号	Lot.V03		Lot.V04		Lot.V06	
	0M	3M	0M	3M	0M	3M
試験項目						
検体採取	2005.5	2005.8	2005.5	2005.8	2005.5	2005.8
性状確認 試験	溶解前	異常を認めず	異常を認めず	異常を認めず	異常を認めず	異常を認めず
	溶解後	異常を認めず	異常を認めず	異常を認めず	異常を認めず	異常を認めず
含湿度試験	0.42%	0.87%	0.47%	0.81%	0.47%	0.86%
ウイルス含量試験(RK-13)	8.8	8.83	8.79	8.91	8.49	8.6
力価試験(卵)	8.54	8.45	8.48	8.44	8.35	8.26
無菌試験(MF法)	菌の発育を認めず	—	菌の発育を認めず	—	菌の発育を認めず	—
重量偏差試験	適合	—	適合	—	適合	—
安定性試験 (卵)	加温後	7.84	7.88	—	7.93	—
	力価減少率	1/3.8	—	1/3.8	—	1/3.1
安定性試験 (細胞)	加温後	8.37	—	8.38	—	8.22
	力価減少率	1/2.6	—	1/2.6	—	1/1.7

図2 原薬の長期安定性試験成績

1) -80°C安定性成績

保管月数	0	1	2	3	6	9	12	18	24
SY4(LC0314)	9.07	9.15	9.17	8.79	9.04	9.13	9.33	9.25	9.22
SY5(LC0315)	9.14	9.19	9.15	9.23	9.20	9.18	9.29	9.26	9.27

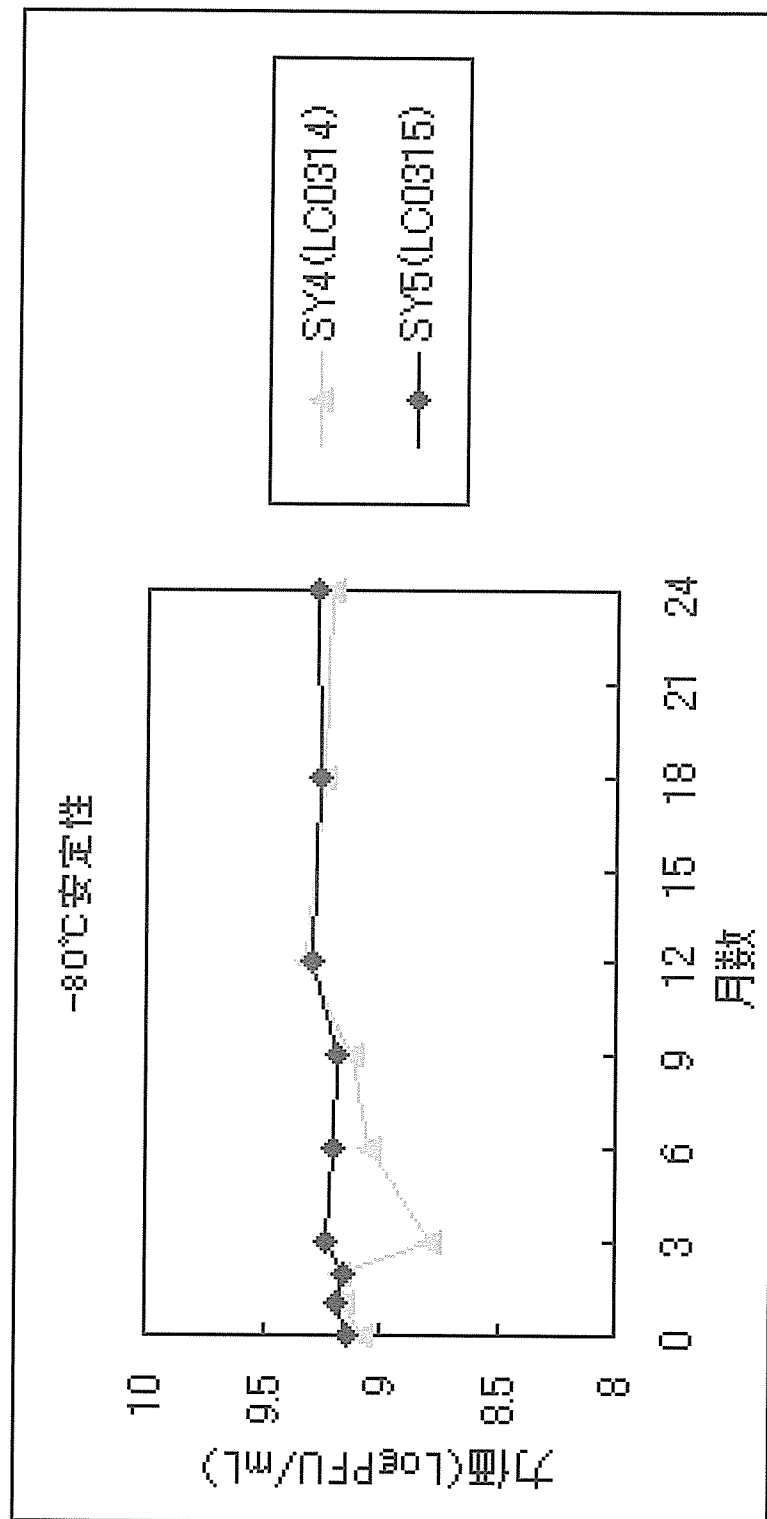


図3 原薬の長期安定性試験成績

2) -20°C安定性成績

保管月数	0	1	2	3	6	9	12	18	24
SY2(LC0312)	9.12	8.89	8.97	8.45	8.80	8.53	8.89	8.85	8.71
SY3(LC0313)	8.99	8.74	8.47	8.37	8.47	8.80	8.72	8.69	8.60

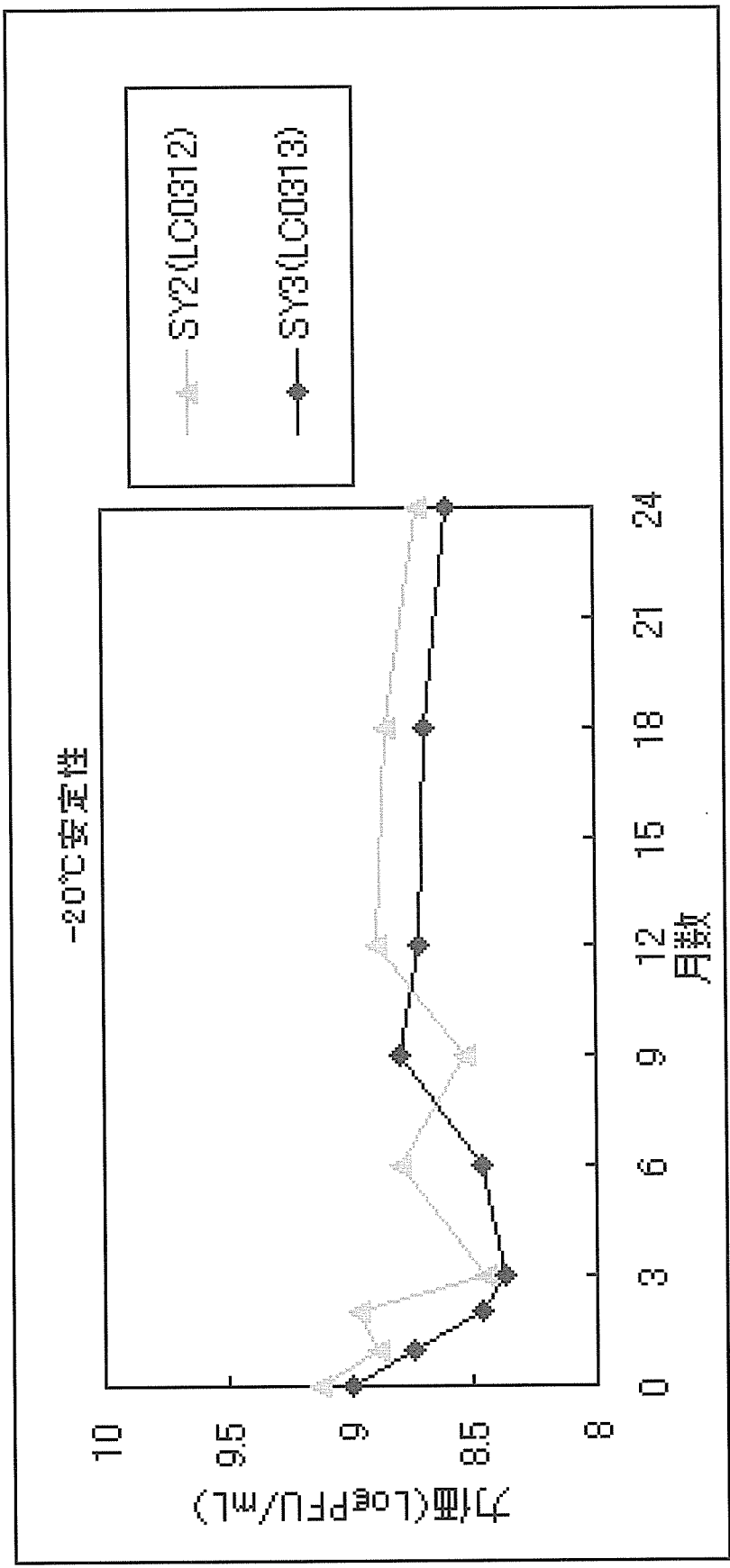


図4 ポック法とブラック法の測定結果

	化血研データ			感染研データ				
	参照品	V03	V04	V05	参照品	V03	V04	V05
ブラック法	8.78	8.84	8.84	8.75	8.67	8.74	8.83	8.82
	8.72	8.66	8.82	8.80	8.88	8.94	8.95	8.91
	8.77	8.77	8.73	8.77	8.91	8.93	8.92	8.92
ホック法	8.60	8.83	8.86	8.61	8.59	8.71	8.77	8.70
	8.49	8.61	8.50	8.66	8.50	8.58	8.59	8.66
	8.55	8.73	8.62	8.72	8.42	8.63	8.63	8.64

分散分析表

要因	偏差平方和	自由度	平均平方和	分散比
施設	0.01367	1	0.01367	1.7742
方法	0.41627	1	0.41627	54.0316 *
検体	0.07844	3	0.02615	3.3938 *
施設x方法	0.04877	1	0.04877	6.3302 *
方法x検体	0.02834	3	0.00945	1.2262
施設x検体	0.00547	3	0.00182	0.2368
施設x方法x検体	0.00481	3	0.00160	0.2080
誤差	0.24653	32	0.00770	
合計	0.84230	47		

図5 ポック法とブラック法の差の解析

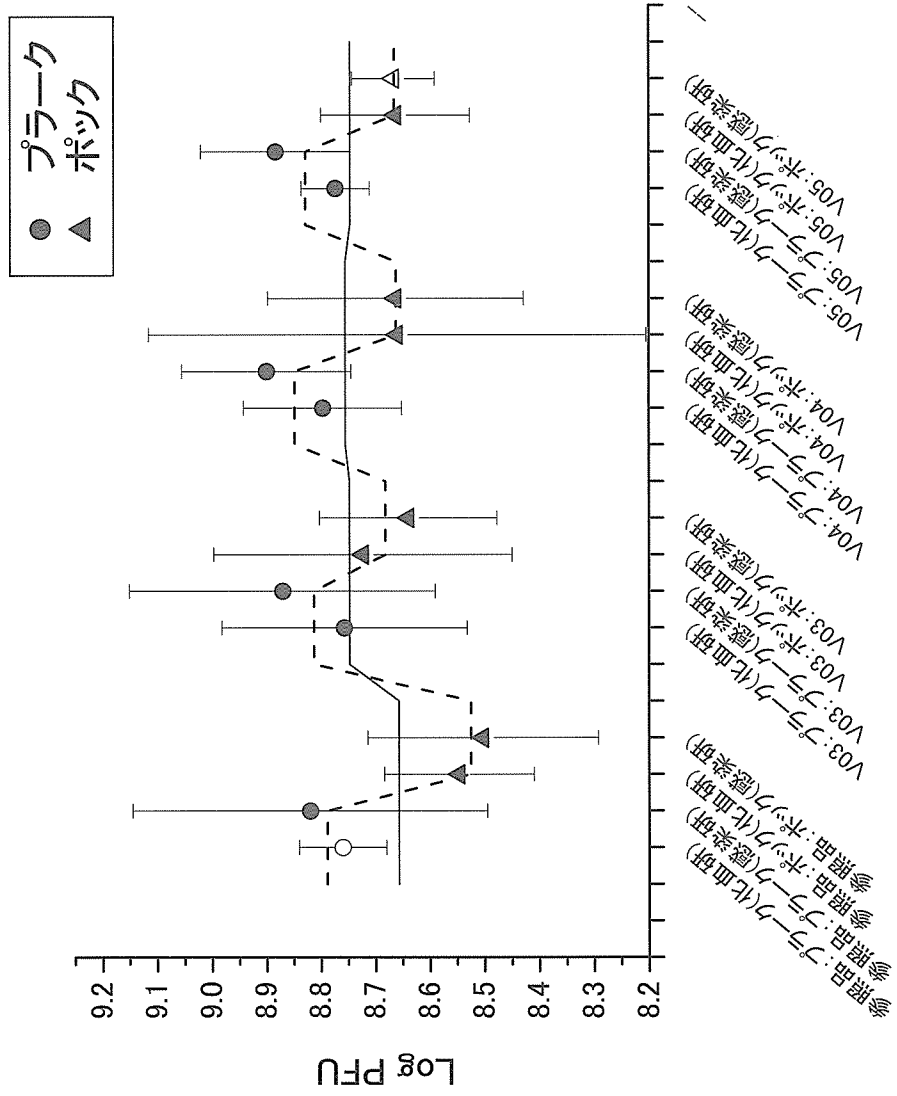


図6 プラック法のバリデーション

1) 真度・併行精度

	測定値	測定値／使用書値
測定1	8.73	101.5%
測定2	8.68	100.9%
測定3	8.65	100.6%
測定4	8.69	101.0%
測定5	8.62	100.2%
測定6	8.47	98.5%

使用書の値 : 8.6±0.3 LogPFU/mL
測定結果 : 8.47~8.73 LogPFU/mL
真度 : 98.5~101.5%

平均 : 8.64 LogPFU/mL
標準偏差 : 0.088 LogPFU/mL
相対標準偏差 : 1.02%