

はなく、HA ワクチンにおいても区別する事が可能なため、季節性のインフルエンザワクチンの品質管理に応用できる可能性が示唆されていた。

そこで、これらの遺伝子の内、HA ワクチンの品質管理に適用可能な遺伝子を抽出し、さらに、これらの遺伝子群の内 16 遺伝子を一括に試験管内で定量するシステムである Quanti GenePlex 法を用いて、季節性インフルエンザの品質官に適用可能かについて検討した。その結果、体重減少パターンと同様の結果を示すことが明らかとなり、これらの遺伝子発現を用いる事で、季節性のインフルエンザワクチンの安全性の確認に応用可能である事が明らかとなった。

## B. 研究方法

### 1. 動物

8 週齢の F334/N 系統のラット (オス) を用い、生物学的製剤基準の一般試験法の異常毒性否定試験法に準じて行った。1 群は各 5 匹用いた。

### 2. ワクチン

本研究課題に用いたワクチンは、(財団法人) 化学及血清療法研究所より供出して頂いた、HA ワクチン(HAv)、全粒子不活化ワクチン(WPv)、沈降新型インフルエンザワクチン(PDv)を用いた。HA ワクチン及び全粒子不活化ワク

チンは A/New Caledonia/20/99 (H1N1) 株、A/New York/55/2004 (H3N2) 株及び B/ Shanghai/ 361/ 2002 株の 3 型を混合した。沈降新型インフルエンザワクチンは A/ VIETNAM/1194/2004 (H5N1) 株と PR8 株をリバーシジェネティックス法によって作成した NIBRG-14 で作製した。

また、季節性インフルエンザのワクチンの品質管理への応用の為に市販されているインフルエンザ HA ワクチンを購入した。用いたワクチンは、いずれも A 型株として A/ソロモン諸島/3/2006(H1N1) 、 A/ 広島/52/2005(H3N2)、B 型株として B/マレーシア/2506/2004 を 30  $\mu$ g 以上混合したワクチンで、社団法人北里研究所、化学及血清療法研究所、阪大微生物病研究会、デンカ生研製のものを用いた。本文中ではこれらのメーカーの違いは示さず、便宜的に A, B, C, D 社とする。いずれのワクチンもヒトに接種する最終濃度に合わせて調整し、5mL をモルモットに腹腔内投与した。

### 3. 異常毒性否定試験

生物学的製剤基準に則り行った。8 週齢の F334/N 系統のラットの体重を測定した後、個体識別を行い、1 週間、馴化期間として観察した。この間、毎日体重を測定し、回帰係数が 5 以上のものを、接種個体として用いた。また、

期間中、いずれも異常を示さなかった個体を用いて、PDv、WPv、HAV、及び生理食塩水(SA) (日本薬局方; 大塚生食塩注) をラット腹腔内に5mLを接種した。一群5匹として接種し、4日間の経過を観察し、体重、血液・生化学検査を行った。また、市販されているHAワクチンは5mLを腹腔内に投与した後、1日後の体重、血液・生化学検査を行った。

#### 4. RNA抽出

ワクチンおよび生理食塩水が投与されたラットから肝臓左外葉、左肺、脳、血液を接種後1-4日に採取した。臓器は即座に液体窒素中で凍結させ、ISOGEN試薬(Nippon Gene)中で溶解させた。Total RNAを抽出し、Ambion社のPoly(A) RNA Purist kitを用いてPoly(A)+RNAを精製した。

#### 5. DNAマイクロアレイ解析

Poly(A)+RNAから逆転写酵素を用いた逆転写反応を行なう際に、共通リファレンスはCyanine 3を、サンプル接種したRNAはCyanine 5を取り込ませてサンプルをラベルした。ラベルされたサンプルをスライドガラス上に固定された11,464個の遺伝子特異的配列オリゴDNA(80mer)と結合(ハイブリダイゼーション)させた。各スポットの蛍光強度の比率(Cyanine3と

Cyanine5の比率)をスキャナーおよび解析ソフトで数値化することにより、共通リファレンスに対する各遺伝子の発現量比を検出した。

#### 6. Quantigene Plex (QGP)法による迅速網羅的遺伝子解析

DNAマイクロアレイで用いたサンプルのRNAおよび市販されているHAワクチンを接種した肺サンプルより抽出したRNAを用いてQuantigene Plex (QGP)法を行った。Realtime-PCRでバリデーションされた20遺伝子についてプローブを設計し、サンプルはPre-AmplifierおよびAmplifier, Label probeの結合を行い、Luminexによって蛍光強度を測定した。

#### 7. 倫理面への配慮

本研究課題では、実験計画作成にあたっては、使用動物数を必要最小数とし、実験中の生理的および心理的苦痛を軽減するための最大限の努力をし、目的達成のための方法、実験処置、飼育管理を含めた取扱いの妥当性などについて必要かつ十分な検討を行った。また、国立感染症研究所に設置されている「動物実験委員会」または「動物倫理委員会」でのプロトコルの承認を受けている。

#### C. 研究結果



## 1. 肺組織の網羅的遺伝子発現解析

インフルエンザワクチンの毒性に関して網羅的遺伝子発現解析を行なうために、接種後1、2、3、4日目に肝臓、肺、脳、血液を採取し、合計320サンプルからpoly(A)+RNAを抽出した。本試験では、肺をターゲットとし、肺のサンプルについて逆転写酵素を用いた逆転写反応を行なう際に、共通リファレンスをCyanine 3で、サンプル接種したRNAをCyanine 5でラベルした。その後それらを混合し、スライドガラス上に固定された11,464個の遺伝子特異的配列オリゴDNA(80 mer)と結合(ハイブリダイゼーション)させた。各スポットの蛍光強度の比率(Cyanine3とCyanine5の比率)をスキャナーおよび解析ソフトで数値化することにより、共通リファレンスに対する各遺伝子の発現量比を検出した。

肺のサンプルから取得した遺伝子発現プロファイルを基にして二次元階層クラスタ解析を行なった。その結果、1日目のWPvとPDv接種群が他のサンプル(HAvとSA接種群)と別クラスタを形成しており、他のサンプルとは異なる挙動を示していた。そこで、1日目のWPvとSA接種群の間で発現に有意差のある遺伝子群を統計的( $P < 0.005$ )に抽出した後に、その抽出した76個の遺伝子を用いて、再度ク

ラスタ解析をしておいた(図1)。その結果、大きく5つのクラスタ(Cls1, Cls2, Cls3, Cls4, Cls5)に分類する事が可能となった。Cls1は、WPvとPDv接種群(1日目)を示し、Cls2はWPvとPDv接種群(2日目)を示し、Cls3は更に、HAV接種群(1日目)と、Cls4はWPvとPDv接種群(3日目)を示し、Cls4はWPvとPDv接種群(4日目)を示した。これらの結果は、全粒子ワクチン接種後1日目、2日目、3日目、4日目とスプリットワクチン接種後1日目及びその他のものが明確に異なる遺伝子発現プロファイルを持つ事を示しており、これら76遺伝子を用いる事で、全粒子、スプリットワクチンともに応用する事が可能である事を示唆している。

この内、発現量が高く、各遺伝子機能を代表する18遺伝子を選別し、実際にRealtime-PCR法を用いても同様の結果が得られるかのバリデーション試験を行った。その結果、解析した18遺伝子全てについてマイクロアレイの結果と高い相関関係を示す事が明らかとなり、これらの遺伝子発現解析によって、インフルエンザワクチンの安全性が検討される事が示された(Data not shown)。

## 2. 網羅的迅速遺伝子発現解析法(QuantiGene Plex)の開発と検討

以上の結果より、網羅的遺伝子発現解析がインフルエンザワクチンの安全性試験に応用可能である事が示唆された。そこで、次に我々は市販されている HA ワクチンにおいてもこの方法が妥当であるかを検証することとした。

まず、同定した 19 遺伝子が、QGP 法によって測定できるかを DNA マイクロアレイに用いたサンプルを用いて検討した。その結果、Irf7, Lgals9, Lgals3bo, Cxcl11, Timpl, Tap2, Psmb9, Psmel, Tapbp, C2, Csf1, Mx2, Zbp1, Ifrd1, FLN29 および Cxcl9 は QGP で全て相関係数 0.9 以上の結果が得られた(図 2)。しかし、発現量が総体的に多い B2m, Cdig2, Ngfr はこの測定域では測定不能である事が明らかとなり、この 16 遺伝子で解析する事とした。

### 3. 季節性インフルエンザワクチンの異常毒性否定試験

次に、市販 HA ワクチンを入手し、通常通り異常毒性否定試験を行った。用いたワクチンは 4 社：社団法人北里研究所、化学及血清療法研究所、阪大微生物病研究会、デンカ生研製のものを用いた。本文中ではこれらのメーカーの違いは示さず、便宜的に A, B, C, D 社とする。

その結果、HA ワクチンの A, C, D

社は接種一日後に体重の減少は認められず、体重増加が認められた。しかし、B 社は有意な体重減少が認められた(図 3)。仮に体重減少率、増加率を基準にワクチンの品質をグレード分けすると、A+D 社/C 社/B 社の順であることが明らかとなった。

### 4. 季節性インフルエンザワクチンにおける網羅的遺伝子発現解析の応用

今迄のところ、遺伝子発現量を指標に安全性を確認している様な試験は開発されていない。そこで、遺伝子発現を基準として比較する為に、DNA マイクロアレイに用いた全粒子ワクチン接種サンプル、HA ワクチン接種サンプルを用いて 16 遺伝子による QGP 法を行った。その結果、全粒子ワクチンを標準とした時に、発現誘導率が 10% 以下のグレード 1 (Cxcl11, Cxcl9, Zbp1, Mx2, Irf7 および Lgals9)、20% 以下のグレード 2 (Ifi47, Tapbp, Csf1, Timpl, Fln29, Lgals3bp 及び Psmb9)、40% 以下のグレード 3 (C2, Tap2, Ifrd1 及び Psmel) の遺伝子群に分類することが可能となった(図 4)。

次に市販されている HA ワクチン接種後の一日目の肺組織の RNA を精製し、QGP 法を用いて遺伝子発現量を定量化した。その結果、グレード 1、2 および 3 とともに全ての遺伝子で発現量母集団と有為差を認めず、また標準品で



ある全粒子ワクチン接種群と比べても各基準を超えない事が明らかとなった(図5-7)。

最後に各社インフルエンザワクチン接種群、標準値としての全粒子ワクチン接種群、新型インフルエンザワクチンの16遺伝子の発現量を指標に階層クラスター解析を行った結果、変数間のクラスター分類により、異常毒性否定試験と同様に、各社のワクチンの性質はA社/D社/C社/B社の順であることが明らかとなった(図8)。

#### D. 考察

##### 1. 異常毒性否定試験

F344/N系のラット(オス)を用いた異常毒性否定試験の結果、沈降新型インフルエンザワクチン(PDv)及び全粒子インフルエンザワクチン(WPv)接種後1日、2日、3日、4日目において有意な体重減少が認められ、これらはHAワクチン(HAv)接種群、生理食塩水(SA)接種群とは異なる事が明らかとなった。また、各メーカーのHAワクチンを接種した所、統計学的には有意差はないものの、接種後1日目に体重減少を認めたメーカーがあった。このような製剤は異常毒性否定試験ではその違いを検出する事が難しい事が予想された。

##### 2. 網羅的遺伝子発現解析

肺の全サンプルの遺伝子発現変動を指標にしてクラスター解析を行なったところ、1日目の全粒子ワクチン(WPv)とパンデミックインフルエンザワクチン(PDv)が他のサンプルと別クラスターを形成しており、他のサンプルとは異なる遺伝子プロファイルを示していた。この結果はラットの体重変化および白血球数の変化で示している結果と全く一致する事が明らかとなった。また、全粒子ワクチンと生理食塩水接種群で発現量が有意に変化した76遺伝子を抽出し、再度クラスター解析を行った結果、大きく5つのクラスター(C1s1, C1s2, C1s3, C1s4, C1s5)に分類する事が可能となった。C1s1は、WPvとPDv接種群(1日目)を示し、C1s2はWPvとPDv接種群(2日目)を示し、C1s3は更に、HAv接種群(1日目)と、C1s4はWPvとPDv接種群(3日目)を示し、C1s5はWPvとPDv接種群(4日目)を示した。異常毒性否定試験では、全粒子ワクチン(PDv, WPv)接種後1日目に有意な体重減少を示すが、接種後1日目～3日目は体重が回復傾向にあるが統計学的な有意差は認められない。しかし、網羅的遺伝子発現解析法を用いる事で、接種後4日間の変化を有意に分類することが可能となった。また、インフルエンザHAワクチン接種群では、異常毒性否定試験、白血球減法試験を

用いたいずれでも、生理食塩水との差は認められなかった。しかし、網羅的遺伝子発現法を用いる事で、インフルエンザ HA ワクチン接種後の変化を有意にとらえることができた。以上の結果より、網羅的遺伝子発現解析法は、パンデミックインフルエンザワクチンの安全性のみならず、インフルエンザ HA ワクチンの安全性も検討できる程、高感度であることが明らかとなった。

以上のことから抽出された 76 遺伝子は WPv および PDv の持つ毒性反応を鋭敏に検知できる可能性を示している。加えて、HA ワクチン接種後の影響を鋭敏に検出できる遺伝子セットである事が明らかとなった。またバリデーションされた 18 の遺伝子セットを使用することにより、1 日目（および 2 日目）の WPv、PDv 群と、HA ワクチン(HAv)、生理食塩水(SA) 群を明確に区別できることが判明した。

### 3) Quantigene plex 法による迅速網羅的遺伝子発現解析を用いた季節性インフルエンザワクチンの安全性試験法への応用

そこで、さらに抽出した 18 遺伝子セットを用いて実際に季節性のインフルエンザワクチンの安全性を検査することがかのかどうかを検討した。その結果、そもそも QGP の検出範

囲の問題で一部の遺伝子の測定が不可能である事が明らかとなり、最終的に 16 遺伝子を用いて HA ワクチン接種後 1 日目の遺伝子発現量を計測した。その結果、各遺伝子とも標準品と有意差を認め、また、発現基準値を有意に超える事はなかった。また、これらの遺伝子発現を用いて再度クラスター解析を行った結果、異常毒性否定試験で推測された通りの順位であることが明らかとなり、この 16 遺伝子を用いた QGP 法を応用する事でより高感度に、迅速に安全性が判定できる事が示唆された。

現在、インフルエンザワクチンの異常毒性否定試験には接種後 7 日間の観察期間が必要であった。しかし、この方法を用いる事で接種後 1 日後の肺組織を用いる事で、最短で 3 日で遺伝子発現量を測定できることが明らかとなった(図 9)。これらの試験法を用いる事で、より迅速に、また高感度にインフルエンザワクチンの安全性を確認できる事が明らかとなった。

### 4) 遺伝子発現量を元にした新しい安全性試験の提案

今迄、ワクチンは非臨床試験、臨床試験を経て、製造承認され、製造承認されたワクチンと同質のワクチンを製造している確認として国家検定がなされてきた。このロットリリースに



は様々な試験が用いられてきたが、とりわけ動物を用いた安全性試験は、試験結果の調和・およびその解釈が難しいことが指摘されてきた。そのため、欧州では異常毒性否定試験自体を廃止し、米国でもある一定ロットの試験を行った場合、また他に安全性を担保することが可能となれば、FDAでの審査を経て異常毒性否定試験を廃止してよいという勧告を出した。しかし現在迄に汎用性の高い安全性試験法は開発されていなかった。

我々は異常毒性否定試験法に変わる、迅速で高感度、そして国際調和にあったバイオマーカーの探索を行い、インフルエンザワクチンの品質を確認する17の遺伝子を同定することに世界で初めて成功した。また、この遺伝子を用いて、季節性インフルエンザワクチンの品質管理への応用が可能であることも示した。この方法を用いれば、非臨床試験、臨床試験で用いたワクチンの遺伝子プロファイルを作製しておけば、そこから抽出した遺伝子を用いて毎ロット毎に同質性を検討することができるだけでなく、品質的に問題のあったロットや、副作用が報告されたロットの遺伝子発現プロファイルを追加する事で、より安全性の高い遺伝子情報を構築することができる。また、インフルエンザワクチン以外のプロファイルをデータベ

ース化することで、より安全なワクチンの開発にも応用可能である事が示唆される。これらの情報はどのような場所でも応用可能であり有用性・信頼性が高いと言える(図10)。現在、FDAでは医薬品の申請時に Toxicogenomic データの添付を任意で受け付けており、今後このような形で遺伝子情報が共有されていく可能性が高いと言える。

## E. 結論

インフルエンザワクチンの迅速で詳細な安全性評価を可能とする試験法の開発するために、ラットのDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行った。インフルエンザワクチンの持つ毒性反応を鋭敏に検知できる76遺伝子の同定に成功し、さらにリアルタイムPCR法でバリデーションした16の遺伝子を決定した。これらの遺伝子を一括して測定する Quantigene Plex システムを用いる事で、季節性インフルエンザワクチンの安全性を確認することに成功した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

1) 論文発表

Mizukami T, Imai J-I, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine*, 26 :2270-83, 2008

*Biologicals*, 37:8-17, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Kato H, Mizutani T, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine*, 26 :4686-96, 2008

Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J-I, Furuhata K, Tsuruhara M, Hamaguchi I, Yamaguchi K: An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan.



ラットを用いたインフルエンザワクチンの網羅的遺伝子解析

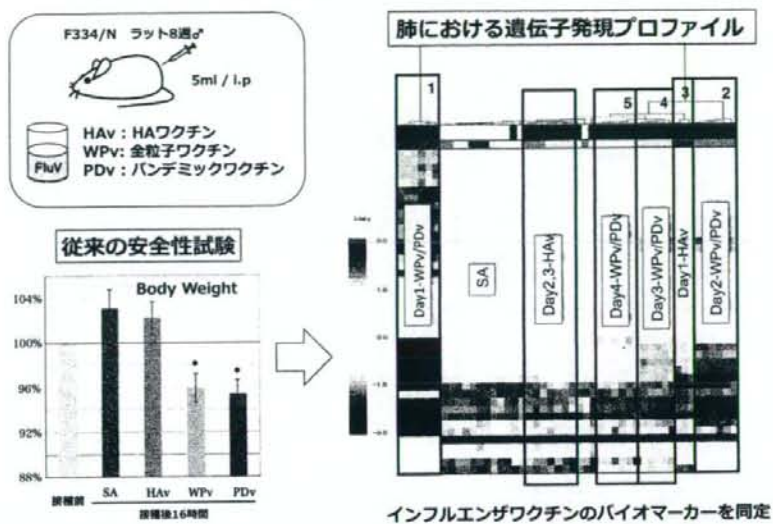


図1：ラットを用いたインフルエンザワクチンの網羅的遺伝子発現解析

網羅的迅速遺伝子発現解析法の予備実験

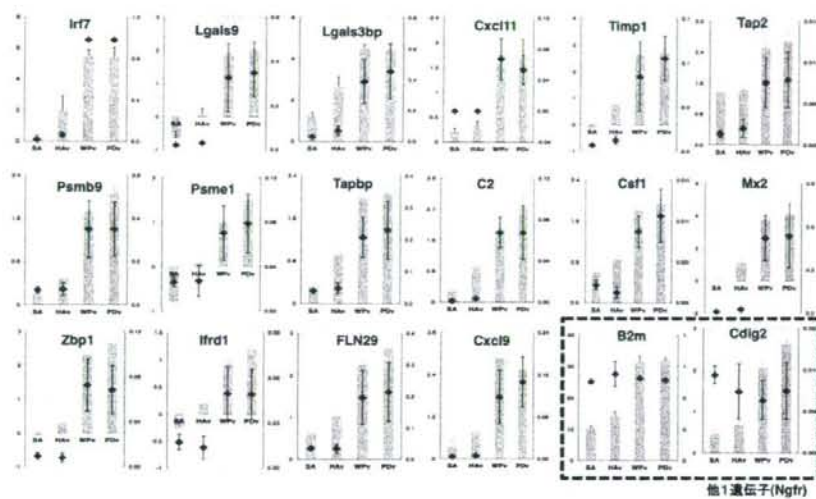
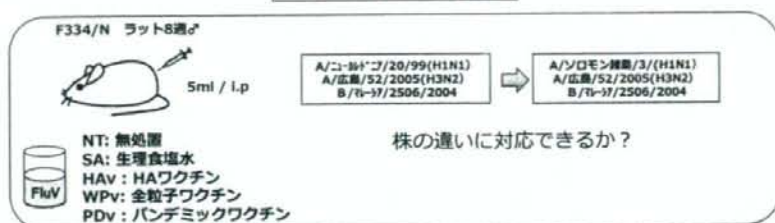


図 2 : 網羅的遺伝子発現解析の予備実験

### 従来のバイオアッセイ



### Seasonal HAワクチン接種後の体重変動

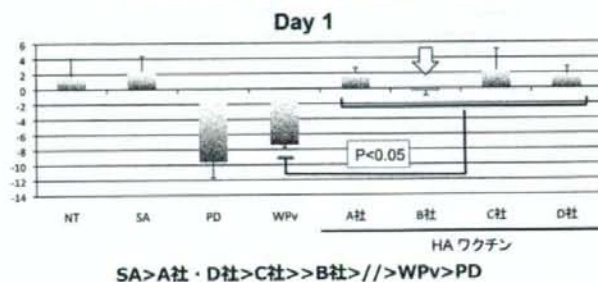


図3：季節性インフルエンザワクチンの異常毒性否定試験



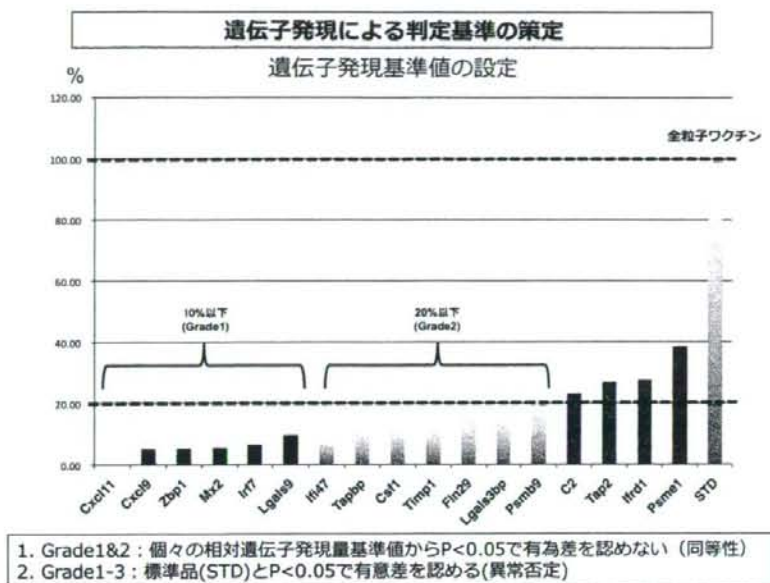


図 4 : 遺伝子発現による判定基準の策定

Seasonal-HA vaccine投与による遺伝子発現変動

Grade\_1

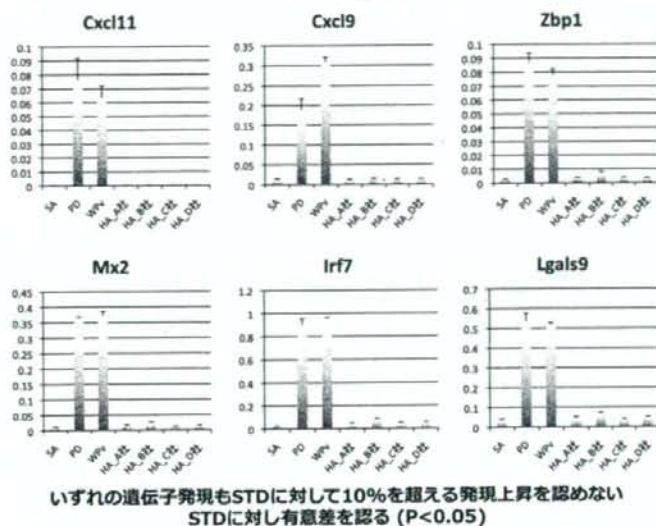
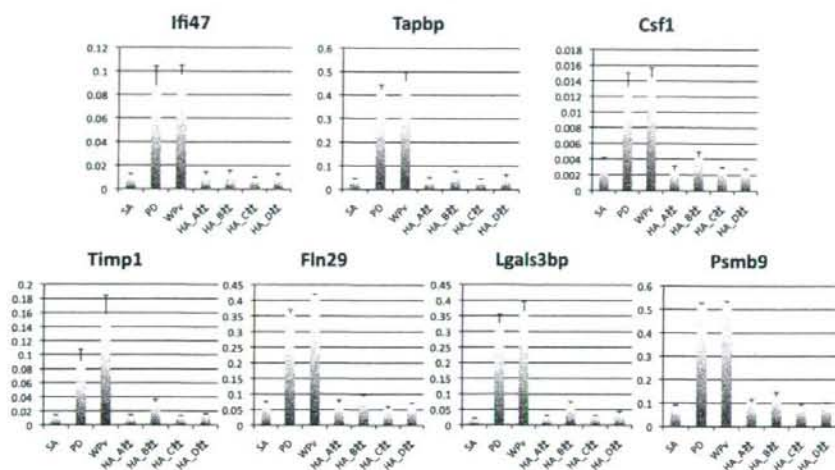


図5：季節性インフルエンザワクチン投与による遺伝子発現変動

Seasonal-HA vaccine投与による遺伝子発現変動

Grade\_2

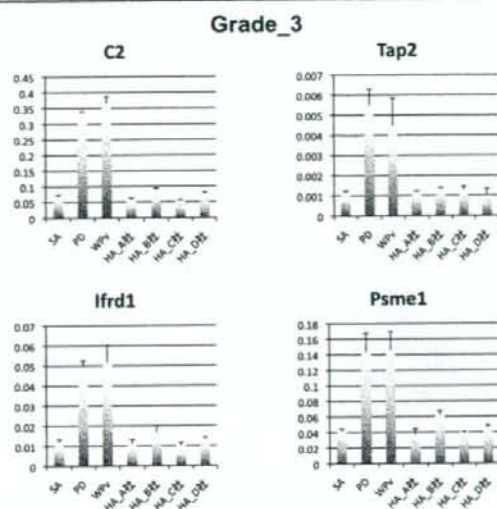


いずれの遺伝子発現もSTDに対して20%を超える発現上昇を認めない  
STDに対し有意差を認める (P<0.05)

図6：季節性インフルエンザワクチン投与による遺伝子発現変動



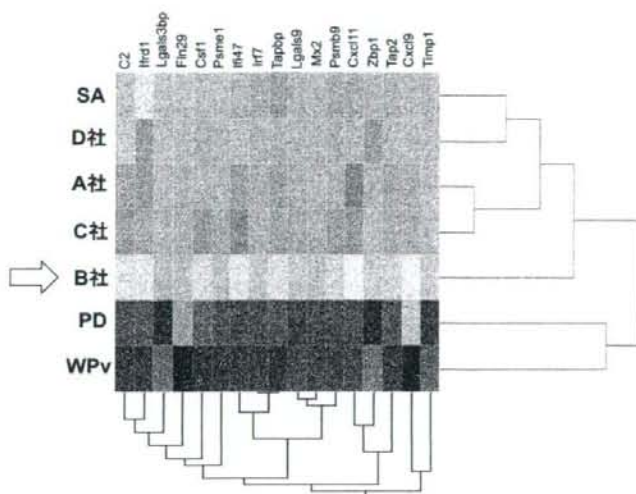
Seasonal-HA vaccine投与による遺伝子発現変動



いずれの遺伝子発現もSTDに対して50%を超える発現上昇を認めない  
STDに対し有意差を認める ( $P < 0.05$ )

図 7 : 季節性インフルエンザワクチン投与による遺伝子発現変動

17遺伝子による階層型クラスター解析(Ward法)



異常毒性否定試験の結果から推測される順位と全く同じ！

図 8 : 17 遺伝子による階層型クラスター解析

### QuantiGene Plex (QGP)による網羅的迅速遺伝子発現解析

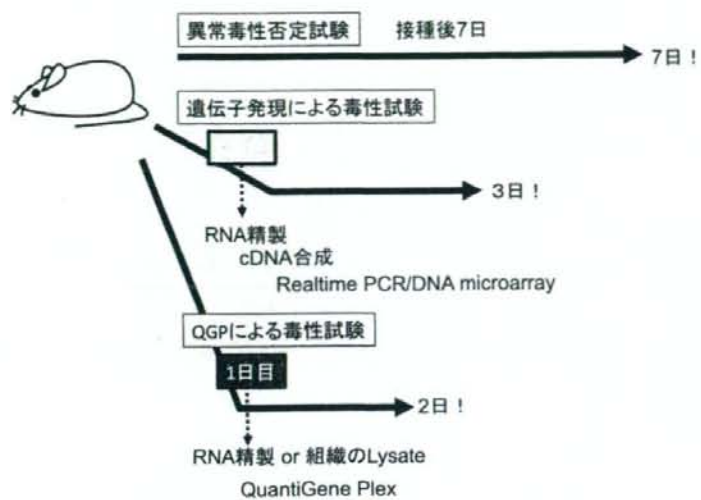


図9：QGPによる網羅的遺伝子発現解析



網羅的遺伝子発現解析を用いた  
新しいワクチンのロットリリース及び品質管理方法

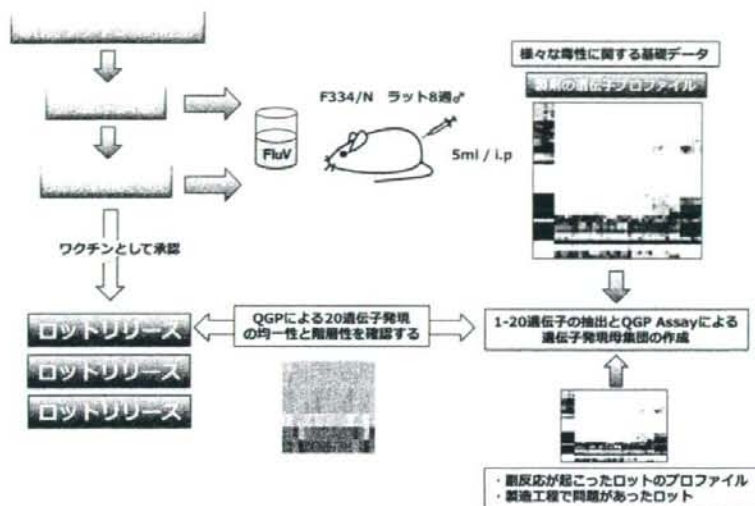


図10：網羅的遺伝子発現解析を用いた新しいワクチンのロットリリース及び品質管理方法

## ヨーロッパ視察報告

国立感染症研究所・血液・安全性研究部 浜口 功

平成20年9月7日より9月13日まで、欧州におけるワクチンに関する規制当局の対応について、英国 NIBSC（国立生物学的製剤研究所）、MHRA（医薬品医療機器品質管理庁）、DH（英国厚生省・予防接種部）、EMWA（欧州医薬品庁）およびドイツ PEI（ドイツ連邦血清・ワクチン研究所）を訪問し、意見交換を行ったので報告する。

### 1. ヨーロッパのワクチンに関する医療制度

イギリスにおけるワクチン制度はきわめてユニークである。日本の厚生労働省にあたるイギリス保健省（DH）にワクチン専門部署があり、予防接種のポリシーメーカーから、接種状況の把握、国民への啓蒙および宣伝活動、およびワクチンメーカーとの供給契約まで行っている。ワクチンの供給に関しては、コストベネフィットの優れているワクチン製剤を選択し、メーカーとダイレクトに期限付きの供給契約を結び、ワクチン行政にあてられる予算を効率よく執行している。たとえば、HPV ワクチンについても市販承認をうけている2社のワクチンのうち GSK 社のものと3年契約の供給契約を行ってルーチン接種の準備を始めたところである。接種に使われるワクチンは DH と契約した分配、保管を担当する会社で保管され、で各臨床医に輸送されている。またワクチンの接種状況は臨床医からウェブをとおして、DH に集められている。このため接種者、未接種者の把握ができ、この情報をもとに、臨床医は未接種者の家庭に接種を勧める電話や手紙を送っている。またポリシーメーカーには専門のコミティーを作り、いろいろな分野から人材を招集する。外国からも積極的に専門家を招き、効果的にイギリスの予防接種に必要なポリシーを作成している。またワクチンの学童への接種は臨床医の負担を軽減させるため、トレーニングを受けた看護師が学校に出向き、接種を行っているとのことであった。ワクチンの重要性を深く認識し、責任部署の一元化をはかることにより、ポリシーメーカーの迅速性、高いワクチン接種率の維持、さらにはワクチンに費やす医療費のスリム化をうまく行っている感想を持った。

またドイツでは公的保険によりワクチン接種の費用はカバーされているが、ワクチンの接種は強制的なものではない。イギリスとは異なり、すべてのワクチンを国が買い上げることはないが、テロや新型インフルエンザに関するワクチンは特別な扱いを考慮している。

## 2. ヨーロッパにおけるワクチン開発から承認にいたるプロセス

### 2. 1 臨床試験

ワクチンの開発において臨床試験は重要なプロセスである。ドイツにおいては第一相の臨床試験に 100~150 万ユーロのコストがかかる。ドイツ政府はアカデミックグループ発の有望なワクチン開発については、積極的に臨床試験をサポートするシステムをとっている。しかし、引き続き政府のサポートのもとで、第二相試験以降に進むかどうかは厳密な評価の上で決定されている。また政府が GMP ファシリティを提供し、莫大なワクチン開発のためのコストを軽減するシステムもあるがまだ余り稼働していない。

ワクチンの開発にあたっては初期の段階から NIBSC (イギリス) や PEI (ドイツ) が科学的なアドバイスをを行うこともあるし、非臨床試験、臨床試験においては MHRA や PEI それに EMEA も必要に応じて科学的アドバイスをを行っている。

臨床試験実施のための審査については、ヨーロッパでは EU 各国共通のシステムを 2004 年より採用している。すなわち臨床試験の申請は各国の NRA と “Leading” 倫理委員会の両方で独立して行われる。両者の承認が得られない場合臨床試験はできない。この過程において、各国の NRA は共通の指令やガイドラインをミニマムの要求事項としているが、同じ申請書であっても、国による判断が異なることがある。この場合には、国間の協議が必要となる。ドイツにおいては、PEI 内には臨床試験担当部門があり、審査の過程で 2 回の試験実施者とのやり取りを行い、平均 73 日で審査結果を示している。この間、PEI 内の専門部門からのアドバイスを積極的に受け入れている。申請件数は年々増えているが、メーカーのものは 81%、医師主導のものも 73% が positive と判定されている。

### 2. 2 製造販売承認

ワクチンの製造販売申請の審査はバイオテクノロジーを用いた等の新規製法によるワクチン製剤や、今後ヨーロッパ全体で市販される可能性が見込まれる製剤に関しては、EMEA における Centralized Procedure がとられている。申請書を正、副の Rapporteur で独立して意見をとりまとめ、CHMP の審査チームが最後に承認の可否の決定および報告を行う。審査の決定は法的に 210 日と設定しており、審査の遅延に対する問題はおこっていない。日本においては、市販申請審査決定の直前に承認前検査として Batch release に関する試験項目に関して検討を行っているが、ヨーロッパでは NRA で承認審査を始める前にメーカーと NCL で規格、Batch release に関する試験項目について協議される事もある。また Centralized Procedure 以外にも 2 カ国以上の国間で行う