

200838008A B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュレトリーサイエンス

総合研究事業

国家検定の国際調和に関する研究

平成18－20年度 総合研究報告書

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡辺治雄

平成21年(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュレトリーサイエンス

総合研究事業

国家検定の国際調和に関する研究

平成18-20年度 総合研究報告書

研究代表者 渡辺治雄

平成21年(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュレータリーサイエンス総合研究事業

国家検定の国際調和に関する研究

研究組織

研究代表者

渡辺治雄 国立感染症研究所 副所長

研究分担者

高崎智彦	国立感染症研究所	ウイルス第一部 室長
佐々木次雄	医薬品医療機器総合機構	品質管理部
堀内善信	医薬品医療機器総合機構	生物系審査部
高橋元秀	国立感染症研究所	細菌第二部 室長
濱口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部 室長
布施 晃	国立感染症研究所	感染症情報センター
鹿野真弓	医薬品医療機器総合機構	生物系第二審査部 部長

研究協力者

蒲地一成	国立感染症研究所	細菌第二部 主任研究官
落合正樹	国立感染症研究所	品質保証室 主任研究官
岩城正昭	国立感染症研究所	細菌第二部 主任研究官
山本明彦	国立感染症研究所	細菌第二部 主任研究官
内藤誠之郎	国立感染症研究所	品質保証室 主任研究官
水上拓郎	国立感染症研究所	血液・安全性研究部 研究官
林 昌宏	国立感染症研究所	ウイルス第一部 研究官

目 次

頁

I. 総合研究報告	
国家検定の国際調和に関する研究	
研究代表者 渡辺治雄 -----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	17
IV. 資料-----	75
・感染研セミナー記録	
ワクチン等の国家検定に係わる国際動向と我が国の現状と課題	

I . 総合研究報告

総合研究報告書

国家検定の国際調和に関する研究

研究代表者 渡辺治雄 国立感染症研究所副所長

研究要旨

3年間の研究活動として「諸外国におけるワクチンの国家管理制度の調査」を実施した。欧米ならびに近隣アジア諸国における生物製剤の国家検定制度との比較を行った結果、自家試験記録の精査、製造所へのGMP査察の実施状況、検定試験実施対象品目や実施頻度、検定費用および相互承認制度に関して多くの異なる点が確認された。国際調和的観点から国内制度の充実を図り、方向性を考える上で貴重な資料となるであろう。

国内ワクチンの品質保証システムの整理・考察としては、感染研における検定業務遂行上必須である「生物学的製剤の国家検定における品質マネジメント指針」およびその英訳版を作成した。また、日本における国家検定実績を整理し、品質保証の観点から改良すべき点を洗い出し、今後の方向性やあるべき姿を提言した。さらに国際的に使用されている規格及び局方試験法の中で我が国に導入されているものに関して、国内に導入された経緯、その後発生した問題点およびそれに対する対応状況を整理し、今後の生物学的製剤の国際調和に資する情報とした。

国際調和を目指した技術的な協同研究としては以下の2点を実施した。ひとつは日本脳炎ワクチンに関して、日本が実施した基礎的な品質管理試験法の研究成果に基づき、国際的に統一可能な試験法を提言した。さらに国内製造所で作製したワクチンをWHOに提供し、それを用いて国際共同標準化試験が実施されることとなった。また、百日咳ワクチンに関しては、台湾NCLの依頼により、台湾国内標準百日咳ワクチンの制定及びその実施における支援を行った。

生物学的製剤基準の安全性試験のひとつである異常毒性否定試験は動物を用いての体重の変化を指標とする試験であるが、遺伝子マーカーを用いての代替法の開発を目指した研究を開始した。インフルエンザワクチンを接種した場合にモルモットにおいて発現される遺伝子を網羅的に解析する方法であり、副反応をより科学的に判定できるものになると期待される。

研究分担者

高崎智彦	国立感染症研究所	ウイルス第一部	室長
佐々木次雄	医薬品医療機器総合機構	品質管理部	
堀内善信	医薬品医療機器総合機構	生物系審査部	
高橋元秀	国立感染症研究所	細菌第二部	室長
濱口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	室長
布施 晃	国立感染症研究所	感染症情報センター	
鹿野真弓	医薬品医療機器総合機構	生物系審査第二部部長	

研究協力者

蒲地一成	国立感染症研究所	細菌第二部	主任研究官
福田 靖	国立感染症研究所	細菌第二部	主任研究官
落合正樹	国立感染症研究所	品質保証室	主任研究官
岩城正昭	国立感染症研究所	細菌第二部	主任研究官
山本明彦	国立感染症研究所	細菌第二部	主任研究官
見理 剛	国立感染症研究所	細菌第二部	主任研究官
小宮貴子	国立感染症研究所	細菌第二部	研究官
内藤誠之郎	国立感染症研究所	品質保証室	主任研究官
水上拓郎	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	研究官
林 昌宏	国立感染症研究所	ウイルス第一部	研究官

A. 研究目的

WHO の国立感染症研究所の査察によって諸外国と日本における生物学的製剤の国家管理制度の違いが指摘された。本研究では、国家検定を含めた我が国のワクチンの品質管理体制、つまりワクチンの有効性および安全性の担保の方策全体の中で、承認審査置づけや GMP 査察のあり方について考察する。具体的な実施状況は、(1) 欧米およびアジア諸国の生物学的製剤の国家管理制度についてアンケートおよび現地調査をもとに調査し、我が国の品質管理体制の在り方の検討資料とする、および各国の調査結果を踏まえて、我が国の生物学的製剤の品質管理のあり方を整理する。(2) 各国 NCL との協同研究の一環として以下のことを行う。

① 日本脳炎ワクチンの力価試験は、現在、株化細胞を用いてのブランク減少法が一般的に用いられている。日本脳炎ウィルス不活化ワクチンを製造しているタイ、ベトナムなどで方法と統一する計画が WHO の SEARO により進行中である。力価試験の判定は標準品の力価を上回ること合格としている。この力価試験に用いる標準品を SEARO 域内で統一するため、タイで候補品が製造された。本候補品を我が国の品質管理試験法で評価し、国際標準品として適当な品質であるかを評価する。同様に、台湾では DPT ワクチンの P ワクチンの力価試験用の国内標準品を作製した。しかし、台湾国内には DPT 製造所がなく、WHO が推奨する試験方法である 4 研究所以上による試験結果を標準品の値とする方法が実施できない。その

ために、ワクチン等の品質管理について協同研究を実施している感染研 (NIID) に台湾政府より標準化の実施の協力要請があった。(3) 異常毒性否定試験の新しいパラメーターの検索を目標にした研究を開始する。ワクチン接種後に発現する遺伝子を網羅的に解析し、副反応と 관련된遺伝子マーカーを検索し、新しい安全性試験の開発を目指す。まずは、全粒子型インフルエンザワクチン、HA ワクチン、新型インフルエンザワクチンを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 生物学的製剤の国家管理制度の調査は 2006 年 8 月から質問票の作成を開始し、10 月に最終案を作成した。アンケートの配布は、本研究班員が直接または関係者を通して調査可能な国に依頼した。過去 3 ヶ年で(1) 当研究所から派遣されている研究協力者を通じて調査した国は、ドイツと英国、(2) 分担研究者が相手国を訪問して調査した国は、ベルギー、オランダ、欧州医薬品審査庁 (EMA)、中国、タイ、ベトナム、韓国、インドネシアおよび米国食品医薬品庁 (FDA) の生物製剤研究センター (CBER) である。

2. 試験法等の国際調和の一環としては、日本脳炎ワクチンの力価試験用の SEARO 標準候補品の評価を日本国内参照品で評価した。力価試験は、日本の生物学的製剤基準に従って、中和力価を平行線定量法を用いて国内標準品に対する SEARO 試験品の相対力価として算出した。日本脳炎ウィルス抗原量は ELISA 法で定量比較

した。また、台湾が作製した国内百日せきワクチンの力価試験用標準品の標準化試験は日本国内の生物学的製剤基準に従い、感染研、化血研および阪大微研で試験を実施した。

3. 生物学的製剤基準には品質管理試験、安全性を担保する安全性試験があり、一般毒性試験として「異常毒性否定試験」が実施されている。本試験は、モルモットを用いる試験であるが、代替法の開発が求められている。インフルエンザワクチンをモデルとし、HA ワクチンの品質管理に適用可能な遺伝子を抽出し、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 法による網羅的遺伝子発現解析法を検討した。

4. 「生物学的製剤の国家検定における品質マネジメント指針」の英訳には、WHO Technical Report Series (WHO-TRS) で使用される用語や米国 FDA で使用される用語も参考にした。生物学的製剤の国家検定機関として発足した昭和 23 年以降の検定成績を整理し、かつ国家検定制度に関する諸先輩の考えを当学友会報誌に掲載されていたものから抽出し、国家検定の在り方について提言した。ISO/TC198 (Sterilization of health care products) で作成した ISO 規格の JIS 化作業並びに日米欧薬局方で調和作業を推進してきた「無菌試験法」の現状について考察した。

C. 研究結果

1. 各国における生物学的製剤の管理制度の調査結果 (表 1) :

各国管理制度の比較として、(1) 審査・承

認システムのうちで、相互承認については、EU では審査・承認は個別の加盟国で実施し、相互承認する Decentralized 制度がある反面、バイオ医薬品や先端医療製剤は EMEA が一括審査・承認する Centralized システムとなっている。(2) 国家検定については、EU と米国では国家検定機関 (NCL: 試験機関) が実施している。すべての調査国で国家検定は試験機関による検査結果と製造所が提出するプロトコール、いわゆる SLP の審査を行い合格の判定を下している。EU は SLP の内容としては試験結果だけでなく、製造に関わる情報も求めるが、米国は製造所による自家試験結果が中心で、製造に関する情報は GMP 査察結果を利用している。EU も米国も SLP の様式は基本的には標準記載内容が指示され、米国は電子ファイルの提出を推奨し、事務処理の簡略化が進められている。検定の頻度は、EU は全ロットの SLP と試験を実施し、試験項目は製剤ごとのガイドラインで定められている。米国では基本的に全ロットを実施するが、CBER は製剤の新規性、試験の新規性、原材料の特性等および GMP 査察の適合性などを勘案し必ずしも全ロットを実施するわけではない。また、科学的根拠だけでなく、社会的、政治的状況の変化で試験頻度を増減することもある。検定の事務処理期間は、EU ではワクチン製剤が基本的には 60 日、血液製剤は 30 日であり、NIBSC ではインフルエンザワクチンの 80% は 10 日以内で実施している。EU では動物試験を実施しないために期間の短縮を可能とした。米国の事務処理期間は平均 30 日程度である。検定の費用は、

EUは申請者の負担で、米国は無料(国の負担)である。GMP査察の所轄機関は、英国では医薬品医療機器管理庁、ドイツでは州政府、ベルギーでは健康・環境省などNCLと別組織が実施し、米国ではCBERの専門の部局が行う。査察の頻度は、EUでは基本的に2~3年に一回、米国では2年一度、一週間程度行われる。

国際標準品はWHOが制定するが、実務の大半は英国のNIBSCが行っている。WHO標準品をもとに二次標準品が各国で作られているが、EUではEDQMが、米国ではCBERが制定している。

2. 試験法の国際調和の一環としての技術協力として、日本脳炎ワクチンについてSEARO候補品と日本国内参照品の中和抗体価の比較を行った。4段階の濃度依存的に中和抗体価が誘導され、試験品はいずれの段階でも参照品に比べて高い抗体価を示した。平行線定量法による統計解析の結果、国内参照品に対し相対力価は4.18であったが、平行性が得られなかった。抗原ELISA法の結果は、SEAROの候補品は国内参照品に比較して約20倍高い抗原量を示した。

台湾国内百日せきワクチンの力価試験用の標準品を日本国内では感染研、化血研および阪大微研で試験し、その成績を統計学的に解析した。その結果、1バイアル当たりの単位(IU)は、それぞれ13.6、10.1および37.7であった。3社の値に有意な差は認められず、その加重平均は14.2 IU/バイアルであった。結果は台湾NFDAへ送り、彼らの試験結果と比較した結果、使用動物の系統差や試験実施機関による差は認められな

った。

3. 網羅的遺伝子発現解析を用いた新しい安全性試験の開発：インフルエンザワクチンの迅速で動物の体重変化によらない安全性評価を可能とする試験法の開発を行った。ワクチンを投与されたラットの遺伝子発現についてDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解を行った結果、インフルエンザワクチンの持つ毒性反応と相関する76種類の遺伝子をスクリーニングした。さらに詳細にリアルタイムPCR法でバリデーションした結果、16の遺伝子が候補となることが分かった。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評価できる可能性を示した。

4. 国内ワクチンの品質保証システムの整理・考察：品質マネジメント指針で使用されているわが国独自の検定関連用語にどのような訳語を与えるべきか、当所「業務運営委員会」及び「検定協議会」に諮り、一定の所内合意を得ながら訳した。国家検定における不合格品を年代別、製剤別、試験別に集計した。検定不合格品は時代を経るにつれて減少してきているが、現在でも突発的に力価試験を中心に不合格製剤が出ている。2000年に乾燥弱毒生麻しんワクチンの4ロットが不合格に、2005年にインフルエンザHAワクチン11ロットが力価試験で不合格に、2004年に沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンがマウス体重減少試験で1ロットが不合格に、2005年に肺炎球菌ワクチンが異常毒性否定試験で1ロットが不合格に、2006年に乾燥弱毒生おた

ふくかぜワクチンが神経毒力試験で3ロットが不合格になっており、国家検定の重要性が示された。

ISO/TC198 で作成した一連の滅菌法及び無菌性保証に関する国際規格がわが国においても滅菌関連の基準やガイドラインとして次々に反映されてきた。しかし、医療機器の滅菌分野においてはこれらのガイドラインと国際規格との間に齟齬が生じていた。それを解消するために、WG1 (EOG 滅菌)、WG2 (放射線滅菌)、WG3 (湿熱滅菌)、WG7 (包装) で作成した ISO 規格の翻訳 JIS 化作業を行った。

D. 考 察

わが国の国家検定システムを、ISO9001 や ICH/Q10 に示す品質マネジメントシステムに基づいて整理することは、大事なことである。特に自家試験記録内容や検定結果に疑義が生じた場合にどのように所内で対応すべきかについては、これまで文書化されたルールが無かった。そのため、感染研内において「生物学的製剤の国家検定における品質マネジメント指針」を整備し、それに基づいて検定を行うシステムを作り上げてきたことは大きな成果である。今回その英訳が完成したことで、国際的にも我が国の制度を発信できることになった。

ワクチンに関しては諸外国においても何らかの形で国家検定が実施されている。日本における国家検定のあるべき姿を提言する上で、我が国のこれまでの国家検定実績の精査、諸先輩の検定に対する考え方の整理、及び各国の国家検定の現状

の整理を行った。まずは、生物製剤の品質管理に携わっている研究者の人員を比較すると、米国 FDA、ドイツのポールエールリッヒ研究所、英国の NIBSC 等と比べ、国立感染症研究所の人員は著しく少ない。しかし、少ない人材でワクチンの国家検定を行いながら品質管理に関する研究、並びに感染症に関する研究についても総合的に高い質を維持していることは特記すべきことである。それは逆に感染症の研究成果を通してワクチンの品質に関しても総合的に考えられるという能力を高めていることでもある。しかし、研究者の努力に負うことが多いこの体制を維持するためには、現在の検定の在り方の根本を見直し、研究者にかかる時間的配分を再考する時期にきているかもしれない。

本年までの生物学的製剤の国家管理制度調査で品質管理の先進国である EU と米国の国家検定制度の詳細が判明した。基本的な枠組みは WHO の方針とも一致するものであったが、それぞれの品質管理に関する歴史や生物製剤に関する科学的立場、あるいは政治的な立場を反映して、その実施の方法は異なっている。例えば、SLP の審査を基本としての、EU では全ロット検定であるのに対して、米国では当初のみ全ロット検定であるが、一定の条件下で検定の頻度を減らしている。日本のシステムは WHO の指摘にもあったように、正式なプロトコール審査を行っていないという点で、どちらのシステムとも異なっている。しかし、実際に行っている我が国の自家試験記録の添付内容は米国のプロトコール審査に用いられている

内容に近いものとなっている。ただし、米国では GMP 査察で製造に関する情報を得て、プロトコール審査の補充としている。日本では生物学的製剤製造所に対する GMP 査察は総合機構が担っており、感染研の検定試験と連携が十分というわけではないという問題がある。

上記の検定にかかる時間的配分や検定制度上の問題点を考慮し、将来の我が国の国家検定制度を見直すとする、例えば、サマリーロットプロトコールの評価と力価試験を中心とした検定に切り替えていくことが一つと考えられる。その場合には、総合機構が行っている GMP 査察結果を現在以上に検定の審査に反映させることができる制度の確立が重要であろう。

ISO 規格の JIS 化にもそれなりの制約はあるが、可能な限り JIS 化することが国際的には必要と考えられる。1995 年以来続けてきた「無菌試験法」の国際調和作業が終了し、第 15 改正日本薬局方第二追補（平成 21 年 9 月）に収載される。日本脳炎ワクチンの SEARO 標準品は、抗原 ELISA の結果から抗原が凝集している可能性が示唆された。そのため、希釈することにより凝集物が拡散し、抗原性が偏り中和力価が用量依存的な結果にならなかったと思われる。標準品作製においては品質管理が重要であることが再認識された。

3 種のインフルエンザワクチンを用いて、異常毒性否定試験に替わる試験法の検討として、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、ワクチン接種後に認められる体重変動や白血球減少などの生物

学的な指標とその遺伝子発現が相関する 76 種類の遺伝子群（バイオマーカー）の同定に成功した。これらの遺伝子の発現は、個々のワクチンタイプの違いによる生物学的指標の変化と相関するばかりでなく、HA 成分ワクチンにおいても変化を区別する事が可能である。これらの遺伝子群の内、HA ワクチンの品質管理に適用可能な 16 遺伝子を一括に試験管内で定量的に測定すると、季節性インフルエンザの品質管理法であるマウス体重減少パターンと相関する変動が得られた。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示唆された。

欧米を中心に新たに開発されたワクチンの実用化が相次いでいる。こうした状況に対応するために、欧州では EU 諸国内の国家検定機関の技術面における相互連携が行われている。アジアにおいても、今後各国間の検定体制のグローバル化および技術面での標準化に向けての連携が重要である。

E. 結論

わが国の生物学的製剤（特にワクチン）の品質保証およびロットリリースの制度において、国際的な調和を図れる点は何かを判断するために、まずは各国における生物学的製剤の品質管理および保証の実態調査をおこなった。その結果、わが国と各国の間には制度上の差があることが分かってきた。また品質を管理する上での試験法における国際的調和を図る上での問題点の検討を行い、改良すべき点を明らかにした。今後のわが国の国家検

定制度の在り方を考えた場合に、将来的にはサマリーロットプロトコールの評価を基盤としてそこに必要な安全性試験と力価試験を加えた制度に切り替えることを検討する時事にきている。その変更に必要な制度および構造上の問題点を洗い出すことも必要である。

F. 健康危害情報

なし

G. 論文発表

1. 研究発表

1. Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Two vaccine toxicity-related genes *Agp* and *Hpx* could prove useful for pertussis vaccine safety control. *Vaccine*, 25: 3355-3364, 2007
2. Naito S, Meyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K: Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of adjuvant. *Vaccine* 25: 8762-8770, 2007
3. 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 S, Yamaguchi K: Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine*, 26 :2270-83, 2008
4. 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
5. Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J-I, Furuhashi 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. *Biologicals*, 37:8-17, 2009
6. Kubota T., Matsuoka M., Chang T-H., Taylor P., Sasaki T., Tashiro M., Kato A., and Ozato K. Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type 1 infection gene expression. *J. Biol. Chem.*, 37: 2560-2570, 2008.
7. Kenri T., Okazaki N., Yamazaki T., Narita M., Izumikawa K., Matsuoka

M., Suzuki S., Horino A., and Sasaki T. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. J. Med. Microbiology, 57:469-475, 2008.

8. Kimura N., Someya T., Yamagiwa Y., Kokubo M., and Sasaki T. Japanese Perspective on Biological Indicators. Biological Indicators for Sterilization Processes, DHI Publishing, LLC, p.195-210. 2009.

2) 学会発表

1. 浜口功, 今井順一, 百瀬暖佳, 河村未佳, 水上拓郎, 内藤誠之郎, 前山順一, 加藤博史, 益見厚子, 倉光球, 滝沢和也, 水谷哲也, 落合雅樹, 山本明彦, 堀内善信, 野村信夫, 渡辺慎哉, 山口一成. 遺伝子発現解析 (QuantiGene Plex 法) を用いたワクチンの新しい安全性評価法確立の試み, 第11回ワクチン学会(横浜)・2007.12.

2. 水上拓郎, 今井順一, 浜口功, 河村未佳, 百瀬暖佳, 内藤誠之郎, 前山順一, 益見厚子, 倉光球, 滝沢和也, 野村信夫, 渡辺慎哉, 山口一成. 網羅的遺伝子発現解析によるパンデミックインフルエンザワクチン(H5N1)の安全性・有効性評価法開発の試み

第11回ワクチン学会(横浜)・2007.12.

3. 内藤誠之郎, 前山順一, 水上拓郎, 長谷川秀樹, 浜口功, 山口一成. 経皮ワクチンに関する研究-抗原の皮膚送達促進による免疫効果の増強とインフルエンザ

HA ワクチンへの応用, 第11回ワクチン学会(横浜)・2007.12.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 実用新案登録
なし

2. その他
なし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J-I, Furuhashi K, Tsuruhara M, <u>Hamaguchi I</u> , 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	Biologicals	37	8-17	2009
<u>Hamaguchi I</u> , 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	4689-4696	2008
Mizukami T, Imai J-I, <u>Hamaguchi I</u> , 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	2270-2283	2008

Naito S, Meyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K	Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of adjuvant	Vaccine	25	8762-8770	2007
Hamaguchi I, Imachi J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K	Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control	Vaccine	25	3354-3364	2007

その他

「ワクチン等の国家検定に係わる国際動向と我が国の現状と課題」記録集
 国立感染症研究所セミナー 平成20年12月2日

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷



An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan

Takuo Mizukami, Atsuko Masumi, Haruka Momose, Madoka Kuramitsu, Kazuya Takizawa, Seishiro Naito, Jun-ichi Maeyama, Keiko Furuhashi, Momoka Tsuruhara, Isao Hamaguchi*, Kazunari Yamaguchi

Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1, Gakuen, Mushashi-murayama City, Tokyo, 208-0011, Japan

Received 19 June 2008; revised 26 July 2008; accepted 31 July 2008

Abstract

Vaccines differ from other pharmaceutical products. The quality and safety of batches are regulated to high standards by national regulatory authorities. Various quality control and safety tests have been developed, including the abnormal toxicity test (ATT), which is described in the World Health Organization (WHO) guidelines and in each country's pharmacopoeia. However, the criteria for abnormal results are not well defined in these guidelines. In addition, the animal grade to be used in ATT, classified on the basis of microbial colonization, was not designated in either guideline.

In this study, we report a new and improved method of performing ATT, including statistical, histopathological analysis and hematological findings. It is based on the observation that there are body weight changes characteristic to each vaccine, and such standardized changes can be used as references for evaluating test vaccines. In addition, histopathological data are useful for determining vaccine quality and safety. Combined with histopathological examination, the improved ATT will be of great use for evaluating the consistency, quality and safety of different batches of vaccine. The results of these analyses were similar using either 'clean' or specific pathogen-free guinea pigs.

© 2008 The International Association for Biologicals. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Abnormal toxicity test; General safety test; Vaccine; Quality control

1. Introduction and history

Vaccination is one of the most effective and beneficial strategies for preventing and controlling human infectious diseases around the world. Various vaccines have been developed and can successfully prevent infectious diseases such as diphtheria, Haemophilus influenzae b (Hib), pertussis, tetanus, polio, and influenza [1]. Vaccines are considered to

differ from other pharmaceutical products because they are primarily intended for use in healthy people, including children. Vaccine production processes are also highly variable, depending on the target infectious disease. Current vaccines consist of inactivated, killed or live attenuated, antigenic components purified directly from organisms or produced by recombinant DNA technology. In addition, adjuvant is added to some vaccines to induce increased immunogenicity. On account of the complex production processes, vaccines are regulated by the national regulatory authorities of individual countries, on a lot-to-lot or batch-to-batch basis, and require high levels of quality and safety control.

To control and maintain vaccine quality, various quality control and safety tests have been developed, and are used to

Abbreviations: ATT, abnormal toxicity test; MRBP, minimum requirements for biological products; CFR, Code of Federal Regulations; SPF, specific pathogen-free.

* Corresponding author. Tel.: +81 44 561 0771; fax: +81 44 561 9722.

E-mail address: 130hama@nih.go.jp (I. Hamaguchi).

test the starting materials, materials under processing and the final products [2]. Among them, the abnormal toxicity test (ATT) (also known as the general safety test, innocuity test, or test for freedom from abnormal toxicity) has been developed to detect non-specific toxicity and/or contamination exogenous substances, and its inclusion in the national vaccine control regime is recommended by the WHO [3]. Many countries, including Japan [4] and the United States (21 CFR 610.11) [5], (but not EU countries) require ATT as a batch release testing to be performed on mice or guinea pigs for vaccines, sera and immunoglobulins [6]. In the EU, ATT is still included in some pharmacopeia European monographs and is required for the licensing and product validation process.

According to the WHO guidelines [3], the method of ATT is simple: 5 ml of vaccine is injected intra-peritoneally into guinea pigs and the animals are observed for 7–12 days. If there are no abnormal health signs, the product passes the test. The most frequently used signs to determine the safety of the vaccine are death rate and abnormal body weight changes.

In Japan, ATT was introduced in 1948 after immunization with a certain lot of diphtheria toxoid caused severe adverse events claiming 84 deaths in Kyoto and Shimane prefectures [7]. Since then, ATT has been conducted to test the safety of vaccine and blood products, both by the manufacturers and by the National Regulatory Authority, National Institute of Infectious Diseases (NIID).

ATT was described in the “minimum requirements for biological products (MRBP)” in article 42(1) of the Pharmaceutical Affairs Law in Japan, which defines the manufacturing methods, quality control and test methods applicable to pharmaceuticals [4]. According to the MRBP, the guinea pigs are required to survive without any abnormal signs during the observation and the body weight should return to its starting level within a specified time [8]. However, the criteria for abnormal signs are not detailed in either guideline. In addition, the required grade (defined by microbial colonization) of guinea pigs to be used in ATT is not designated in these guidelines. It has been suggested that animal grade is important in order to minimize the variation between test results and the effects of infectious agents on experimental results. When ATT was introduced in Japan in 1948, hemolytic streptococcal infection in guinea pigs was one of the most serious problems affecting body weight changes and test results. In 1971, a ‘clean’ grade of animals derived from specific pathogen-free (SPF) guinea pigs were introduced in ATT, which cleared problems caused by the infections. Nevertheless, it was thought that the clean grade guinea pigs were generated from SPF animals and were maintained under the SPF condition; they were fed with non-sterilized food and not monitored regularly for pathogens. Ideally, SPF and inbred animals should be used for ATT [9] and better methods could reduce the number of animals needed for research [10]. In Japan, inbred guinea pigs sufficiently well-characterized with respect to vaccine quality control testing are not available. In addition, it has been suggested that conventional guinea pigs are not suitable for evaluating liver toxicity, due to the natural occurrence of focal liver necrosis in clinically normal guinea

pigs [11,12]. Thus, a change from “clean” to SPF animals for ATT is urgently required in Japan.

In this study, we report an improved method of ATT, including statistical and histopathological analyses. The trend in body weight changes following the inoculation of each vaccine, together with statistical and pathological analyses, were used to evaluate consistency among different vaccine batches. We also report that body weight changes and histopathological trends were not affected by changing the animal grade.

2. Materials and methods

2.1. Animals

According to the minimum requirements for biological products (MRBP) in Japan [4], we purchased female Hartley guinea pigs (280–300 g body weight, ‘clean’ grade and SPF grade) from SLC (Shizuoka, Japan). Both clean and SPF guinea pigs were derived from same Nakaizu colony. They were housed in solid-bottomed metal cages and fed on standard guinea pig chow. The temperature was maintained between 24–26 °C. Five guinea pigs were caged together during the tests. All of our experiments were performed as national control tests for vaccines and in accordance with the guidelines for animal experiments of the National Institute of Infectious Diseases, Japan.

2.2. Abnormal toxicity test (ATT)

Prior to ATT, the body weights of the guinea pigs (clean grade and SPF grade) were monitored for 7 days. Only animals with no abnormal signs were used for the test. Each injection group consisted of two animals selected randomly from the healthy animals. Vaccines (Table 1) at a dose of 5 ml were injected intra-peritoneally into each guinea pig. Vaccines used in this study were test specimens for vaccine testing and some vaccines were provided from manufactures for detailed examination. Body weight was monitored for 7 days after the injection. At day 7, the guinea pigs were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and processed for histopathological analysis. For hematological analysis, 2 ml peripheral blood was collected from the heart and immediately submitted to automatic measurements of peripheral blood leukocytes (PBL), mean corpuscular hemoglobin (HGB), red blood cells (RBC), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV) and platelets (PLT) by automatic hemacytometer, the Celltac MEK-5254 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan).

Animals were considered to have passed the test if there was no abnormal histopathological changes and no significant difference ($P < 0.01$) in the body weight curves between the test vaccine and reference population.

2.3. Statistical analysis

Significant differences were calculated using the *z*-test for the body weight changes and Student’s *t*-test for other