

生物学的製剤基準の在り方に関する研究

研究分担者

国立感染症研究所 品質保証・管理部 加藤 篤

研究協力者

国立感染症研究所 品質保証・管理部 落合雅樹

国立感染症研究所 ウイルス第一部 林 昌宏

国立感染症研究所 ウイルス第二部 石井孝司

わが国では、生物学的製剤の多くは医薬品医療機器等法(旧薬事法)により特別に定められた医薬品として必要な基準が設けられ、厚生労働大臣の指定する者の検定(国家検定)を受けなければ市場に出す事ができない。ワクチンはこのような生物学的製剤の一つであり、設けられた基準が生物学的製剤基準である。このようなシステムは、国により異なり、薬局方にワクチンの規格基準内容を記載している国もある。日本薬局方は5年に一度改正が行われるが、生物学的製剤基準の改正は、従来から必要に応じて適宜行なわれる不定期なものである。一方、生物学的製剤は、その特性から培養細胞、動物を用いた多くの試験が存在する。こうした試験法は、物理化学試験に比べて試験結果にばらつきが大きく、試験の判定には十分な時間を必要としている。近年、GMPの導入等によりワクチンの品質管理、製造工程が充実し、品質が安定する傾向にある。そのため、生物を使った試験から物理化学試験に置き換えて品質の一貫性を評価するだけでも十分であるという考え方も出てきている。本研究班では、国際的な観点から生物学的製剤基準を考え、狂犬病ワクチン、百日せきワクチン、B型肝炎ワクチンの試験において動物代替試験法の検討をした。

A. 研究目的

ワクチン、抗毒素および血液製剤は保健衛生上特別の注意を要する医薬品として、医薬品医療機器等法（旧薬事法）第42条及び43条により生物学的製剤基準と検定基準が設けられ、ロットごとに行われる国家検定に合格しなければ市場に出す事ができない。生物学的製剤基準には、ワクチンの製法、性状、品質、貯法が書かれ、品質確認試験方法もこの中に含まれる。このような体系のため、ワクチンの製造販売承認審査と生物学的製剤基準の作成は同時に行われる。承認後に生物学的製剤基準に書かれた品質確認試験法の中から国家検定項目が選ばれ、生物学的製剤基準と共に検定基準として告示される。このようなシステムは、

国により異なり、薬局方にワクチンの規格基準内容を記載している国もある。

わが国は、国際的な医薬品の品質管理手順に対応するため GMP (Good Manufacturing Practice: 適正製造規範)を医薬品の製造現場に段階的に進め、加えて2014年には、このGMPをさらに国際的なレベルに上げて拡充させるために PIC/S (Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme: 医薬品 GMP 調査協力の枠組み)への加盟を果たした。この加盟は ISO10725 相当の品質管理システム(QMS)を GMP 調査と公的医薬品試験機関に求め、GMP 調査と品質確認のレベルの底上げを図るものである。一方、これとは別に、WHO(世界保健機関)が定めた

“ワクチンを市場に出す手順に関するガイドライン”に従い、わが国は 2012 年 10 月から SLP (Summary lot protocol: 製造と試験記録等の要約書) 審査を国家検定制度の中に組み入れた。この様に国際的な体裁は整いつつあり、今後はより細かい部分での世界標準化、たとえば標準品の共通化など「品質管理手法」の国際化が進むものと思われる。従来不定期的に生物学的製剤基準の見直しが行われてきたが、これらの医薬品を取り巻く環境の変化は今までに無く大きなもので、これらの変化に対応した生物学的製剤基及び国家検定基準の在り方、記載内容の見直しが求められている。

本研究班では今年度、WHO(世界保健機構)、特にわが国が属する西太平洋事務局(WPRO)と協力し、中国、韓国といった最もわが国に身近な国々の規制と我が国の規制とを比較し、規格が異なる場合には製剤の安全性と有効性の管理制度的に意味のある差なのか否かを検討し、科学的に合理的な生物学的製剤の姿を提案することを計画した。分担研究者と研究協力者とでワーキンググループを組織し、今年度は、主に動物実験代替試験法に関する検討を重ねた。

B. 材料と方法

中国、韓国のワクチン規制当局関係者とのシンポジウム

2012 年、国立感染症研究所は中国の国家医薬検定院の李所長の招きにより、北京で開かれた日中のワクチンに係るシンポジウムに参加した。その後、今回は日本で開催が決められたまま、進展しないうちに、2014 年 3 月に WHO が世界 7 カ国にある生物学的製剤の標準品と標準規格に関する共同研究センター (WHO-cc on standardization and evaluation of biologicals) の会議をドイツのランゲンで開催し、その時に中国の担当者と直接話しをして、WHO-cc 間協

力という形で、第二回シンポジウムを 2015 年 3 月に東京で開催することが決定した。また、韓国もこのときに参加を希望し、日中韓となることが決定した。シンポジウムを 3 つのセッションで構成し、1 つめのセッションは日中韓のワクチンの規制について互いに理解し合う場に、2 つめはワクチンの開発を目指した研究の進捗状況、3 つめはワクチンの品質規格試験の代替試験法の進捗状況についてとした。

動物を用いた日本脳炎ワクチン力価試験代替法に関する研究

抗日本脳炎ウイルスモノクローナル抗体 (Group8, #503) を固層化したプレートに、A 社および B 社から購入した細胞培養日本脳炎ワクチンを無希釈から 2 倍階段希釈で 64 倍まで希釈し、37 にて 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄後に、ペルオキシダーゼ標識抗フラビウイルスモノクローナル抗体 (6B6C) をいれ、室温にて 30 分間インキュベートした。再びプレートを洗浄後、TMB 発色溶液を各ウェルに入れて反応させた。反応を 1 N 硫酸液にて停止させた後、吸光度測定機にて Optical Density (OD) を測定した。

同様に購入した日本脳炎ワクチンを生物学的製剤基準に従い力価試験を実施した。日本脳炎ワクチンを 2 倍階段希釈で 16 倍まで希釈し、4 希釈を 1 群 11 匹の 4 週令のマウスに 1 匹あたり 0.5mL を腹腔内接種した。参照ワクチンも同様に希釈して接種した。初回接種 1 週間後に、2 回目を同様に腹腔内接種した。さらに 1 週間後に、心臓採血し、1 群の血清を等量混合し 1 つにまとめた後、日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価を測定した。

狂犬病ワクチン不活化確認試験代替法に関する研究

狂犬病ワクチンの不活化確認試験は生物学的製剤基準に従い、A 社より購入した狂犬病不活化ワクチンを生後 4 日以内の乳のみマウス 30 匹以上に、1 匹当たり、0.02mL 脳内に注射して 21 日間観察した。この間、乳のみマウスに狂犬病固定毒の感染死又は感染症状を認めるかを観察した。

培養細胞法では、マウス神経芽種 Neuro-2a をプレートで培養し、細胞がシートになった段階でワクチン原液を 0.02 ml で細胞に接種した。3 日間培養後、新たらしい Neuro-2a 細胞をプレート培養上清を 0.05 ml 接種し、さらに 3 日間培養した。培養細胞を固定後、蛍光標識した抗狂犬病ウイルス抗体で細胞を染色し、蛍光顕微鏡で蛍光像を観察した。

百日せきワクチンのマウスヒスタミン増感試験代替法に関する研究

百人せきワクチンのマウスヒスタミン増感試験は生物学的製剤基準に従って行った。A 社の百日せきワクチンを購入ならびに、A 社の原液の一部の提供を受け、試験に供した。4 週齢のマウス 10 匹以上を 1 群とし、ワクチン検体及び毒性参照品の各希釈を 1 匹当たり 0.5mL 腹腔内に注射した。初回注射の 4 日後に 1 匹当たり二塩酸ヒスタミン 4mg を腹腔内に注射し、その 30 分後にマウスの直腸内体温を測定した。物理化学的方法では、百日せき毒素の A サブユニットの ADP リボシル化酵素活性については、蛍光標識した Gi₃C20 ペプチドを基質として検体と反応させ、ADP リボシル化したペプチドを HPLC 法にて測定した。また、百日せき毒素の B サブユニットの細胞結合活性については、糖タンパク質 (Fetuin) を固相化したプレートと反応させ、結合量を抗 B サブユニット抗体、酵素標識抗 IgG を使った ELISA によって測定した。これに加えて CHO 細胞を使ったクロッチング検査を検討した。

B 型肝炎ワクチンの力価試験代替法の検討

B 型肝炎ワクチンは現在 2 社から販売されている。どちらも力価は、マウスにワクチンを接種後、5 週後に産生される抗体量を抗体検出 ELISA で測定して基準値以上の場合を適合にしている。1 つのロットで 128 匹のマウスを使用する試験である。そこで、A 社及び B 社のワクチンを購入し、1 つは生物学的製剤基準に従いマウスを免疫し、その抗体値をもって力値とした。もう一方はワクチンに含まれるそれぞれ抗原量を、抗原補足 ELISA で測定し、抗原含量が力価試験に代わるものと使えるかを検討した。

C. 結果

日本脳炎ワクチン ELISA 法と力価試験:

抗原検出 ELISA はワクチン原液を無希釈から 2 倍階段で 64 倍まで希釈し、抗原量を測定した。その結果 OD 値は希釈に相関して容量依存的に減少した。測定した OD 値を平行線定量法により標準品と相対抗原量価を算出した。本方法によるデータの均一性は高く、原液が同じであればロット間のぶれは非常に小さいことが確認された。従来法である生物学的製剤基準に従って測定した力価試験による相対力価（中和抗体力価）と抗原 ELISA 法による相対抗原量価は比較的良好な相関関係を示した。しかし、製造販売業者が A 社および B 社で異なると、両者を同じグラフにプロットしたときに値が大きく外れ、平行線定量法に関して信頼性に注意すべき解析結果となった。

WHO は英国の NIBSC を中心に日本脳炎ワクチンの新たな標準品作成のための国際共同試験を開始し、感染研もその共同研究に参加を希望した。今後新たに制定される標準品がこの ELISA でどのような値を出すのか検討を行う予定

にしている。

狂犬病ワクチン不活化確認試験：

生物学的製剤基準に従いマウスを使った狂犬病ワクチンの不活化確認試験に適合した検体をマウス神経芽腫由来 Neuro-2 細胞に接種しても狂犬病ウイルス抗原は観察されない。そこで、狂犬病ワクチンに任意の割合で既知の量の生きた狂犬病ウイルスを混ぜ、神経芽腫由来 Neuro-2 細胞に接種し、*in vivo* のマウス接種試験と感度を比較した。Neuro-2 細胞で抗原陽性になる混合ウイルス量はマウス接種で陽性になるよりも少ない量であり、培養細胞の方がマウスよりも検出感度が高いことが示された。また、検出までのかかる日数も短縮された。

百日せきワクチンのマウスヒスタミン増感試験：

マウスヒスタミン増感試験はマウスにワクチン検体あるいは毒性参照品を接種し、マウスの直腸内体温を測定する方法である。一方、物理化学的方法として百日せき毒素の A サブユニットの ADP リボシル化酵素活性と B サブユニットの細胞結合活性がある。この二つの活性は、不活化処理により大きく減少するものの完全に消失するわけではなく残存活性が認められる。この残存活性は、ワクチンの不活化をホルマリンで行うかグルタルアルデヒドで行うか、あるいは、共雑物質の量にも影響を受けるため、百日せきワクチンの製造販売業者毎に固有の特性を持っていた。

B 型肝炎ワクチンの含量確認試験：

B 型肝炎ワクチンは、遺伝子組み換え技術を応用して作製した HBs 抗原にアジュバントを加えたワクチンとして現在二社から国内販売されている。生物学的製剤基準により、どちらの力価試験も

マウスに検体を接種し、その後の抗体価の上昇を抗体量検出 ELISA で行っている。一つの試験で、128 匹のマウスを使い、動物の馴化期間を含めると 5 週間を要する試験である。この製剤について二つの ELISA 法が適応できるか検討した。アジュバント含有ワクチンであるため、アジュバント除去後の HBs 抗原を検出する抗原検出 ELISA と、中和抗体とワクチンを反応させ、残った中和抗体から抗原量を測定する Inhibition ELISA の二つを検討した。どちらの方法も 2 日間で結果が出せ、製造販売会社に固有に参照品で価付けを行うと、相関性の高い結果が得られた。ロットごとの抗原量の一貫性を保証する結果を出すことができた。メーカー毎に適切な標準品を作成できれば、それとの比較において判断が可能である事が判った。しかし、定量性といった問題を解決するには、測定範囲の拡大と直線性を確認しなければならず、それは今後の課題として残った。

日本、中国、韓国のシンポジウム開催：

2015 年 3 月 2-3 日に中国の National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) の担当者 3 名、韓国 *Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS)* の担当者 3 名が集まり国立感染研究所でワクチン研究と品質管理試験に関するシンポジウムを開催した(資料)。それぞれの国のワクチンの品質管理の概要説明から、韓国は日本と同様に生物学的製剤基準を設け、この基準をもとにワクチンを規制しているが、中国は局方の中に規格や試験法を定めていることが判った。

インフルエンザワクチンは他のワクチンと異なり、通常は毎シーズン毎にワクチン株を新たに制定する。そして、その都度、標準抗原、標準抗血清を作成し規格の統一を図っている。この一方で、

A 型 H5 亜型の様な病原性の高いトリインフルエンザウイルスがヒトの世界で流行が懸念されており、それらに備えた準備もワクチンの準備も進められている。ところで、どのような株がヒトの世界で流行するのか判らない状況では、ワクチンの規格に必要な標準抗原、標準血清をあらかじめ準備しておくことは不可能であり、流行が始まってから作成するのは、迅速なワクチンの市場投入ができないと危惧されている。そこで、インフルエンザウイルスのワクチンの主成分である HA 抗原量を物理科学的に測定し、それを持って品質規格とするという試みもされている。実際、中国では A 型 H7N9 インフルエンザワクチンを開発を進めており、従来の標準抗原、標準抗血清を使った方法と、HA 含量を使った方法を比較し、相関性が高いという結果を報告した。

日本脳炎は、東南アジアを中心に流行している蚊を媒介とするウイルス性疾患である。従来、日本脳炎ワクチンは、適当に希釈したワクチンをマウスに接種した後、その血清を集めて日本脳炎ウイルスに体する中和ウイルス抗体価の誘導量で評価してきた。しかし、これには多くの動物と時間を有するために ELISA による抗原測定量に置き換える作業を進めている事が報告された。ワクチンに熱を加えた劣化試験を行い、それを樹来のマウスを用いた評価方法と、ELISA を用いた抗原検出法で比較すると両者の相関性が高いことが報告された。WHO で進められている日本脳炎ワクチン標準品の作成の国際共同研究のなかに韓国も加わって開発中の方法を、各国で試すことが実証への早道と思われた。

D. 考 察

日本脳炎ワクチン力価試験代替法について：

日本脳炎ワクチンの力価試験は、生物学的製剤基準に従いマウスにワクチンを 2 回免疫し、その中和抗体力価を参照品と比較することによって判定している。本方法は、動物（マウス）を用いる評価方法であり、一定の範囲内で必ず結果にバラツキが生じる試験である。そのため試験結果に許容範囲が設定されている。一方、抗原 ELISA 法によるウイルス抗原定量はバラツキが少なく、結果が一定の範囲内に収まる試験である。ワクチン力価と抗原量は異なる概念であり、まったく同一であると考えすることはできない。従って、たとえば最初の 1 ロットについて力価試験を実施し、それに続くその他のロットに関してはウイルス抗原量を比較し、「同量であることを確認する」ことを持って「適」とすることを考慮してもよいと考えられる。

狂犬病ワクチン不活化確認試験について：

狂犬病不活化ワクチンの不活化確認試験は、生物学的製剤基準に従いマウスに検体を接種して、マウスに狂犬病様症状が出ないことで判定している。しかし、この試験は、乳のみマウスを実験に使うことから、母マウスの授乳放棄等の試験実施上の課題があるのに加えて、一定の範囲内で必ず結果にバラツキが生じる試験である。そこで狂犬病ウイルスに感受性の高いマウス神経芽腫由来 Neuro-2 細胞を使って、狂犬病ウイルス抗原陽性になるか否かを持って不活化が十分か否かを判定する方法を構築した。この方法は、感度が高いうえにバラツキが少なく、将来の生物学的製剤基準の改定に向けた取り組みを日本だけでなく国際的に進め、国際規格にすることが望ましいと考えられた。

百日せきワクチンのマウスヒスタミン増感試験：

マウスヒスタミン増感試験は、生物学的製剤基準に従いマウスに検体を接種し、マウスの直腸内体温が上昇しないことを確認することで判定している。この試験では、検体の加温に4週間、試験そのものの実施に1週間と最低でも5～6週間以上の試験期間を要する試験である。百日せき毒素のAサブユニットのADPリボシル化酵素活性とBサブユニットの細胞結合活性は、百日せきワクチンの製造方法、特に不活化方法によって製品に特徴的な活性の減少がある。原液が同一の小分け製品であれば、たとえば最初の1ロットあるいは原液についてマウスヒスタミン増感試験を実施し、最初の1ロットに続くその他のロット、あるいは同じ原液から派生する小分け製品にはAサブユニットのADPリボシル化酵素活性とBサブユニットの細胞結合活性を比較し、“同量であることを確認する”ことを持って「適」とすることも考えられる。一方、同じ様に動物代替試験を検討している中国からはCHO細胞を使った試験法が紹介され、物理化学試験の結果との相関性が高いことが示された。物理化学試験への完全移行を考えるのもよいが、残存する酵素活性、細胞結合活性をどこまで許容するのかといった問題を考えると、CHO細胞を使う生物学的アッセイ方法の採用も考慮に値すると考えられた。

E. 結 語

生物学的製剤基準は、製造販売承認申請時に作成され、ワクチン、抗毒素、血液製剤の製法、試験方法と品質規格、貯法等が記載されている。一般的に承認後も、企業努力により見直しが行われるが、生物学的製剤基準の改定のタイミングは、企業側で決められず承認事項のなかでも生物学的製剤に書かれている内容部分の変更は、非常に実行し難い。そのため、わが国では欧米に比べて特に動物

を使った規格試験の代替法の開発が遅れているとの指摘がある。今回、わが国の隣国である、中国、韓国のワクチン規制当局関係者とシンポジウムを行い、互いの現状を紹介する場を持った。規制当局間で国民の健康を守る為に安心して安全なワクチンを供給するという共通認識を持つ事ができた。今後はより具体的にそれらのやり方について議論し、国際標準となるように努力すべきであるという点で一致した。

日本、中国、韓国共通のものとして、百日せきワクチンのADPリボシル化酵素活性および細胞結合、あるいはCHO細胞アッセイを用いた動物代替試験法の開発、わが国及び韓国では、細胞培養日本脳炎ワクチンの抗原定量ELISA法、中国および韓国ではインフルエンザワクチンのHA含量測定法が検討されており、わが国独自のものとしては、培養細胞を用いた狂犬病ワクチン不活化確認試験があり、シンポジウムを継続して、これらの試験法を国際的なものにしていくことが大事である。

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

- 1) Takayama-Ito M, Nakamichi K., Kinoshita H, Kakiuchi, S, Kurane I, Saijyo M, Lim C-K. A Sensitive in vitro assay for the detection of residual rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals*, 42: 42-47 (2014)
- 2) Ochiai M., Horiuchi Y., Yuen CT., Asokanathan C., Yamamoto A., Okada K., Kataoka M., Markey K., Corbel M., Xing D. Investigation in a murine model of possible mechanisms of enhanced local reactions to post-primary diphtheria-tetanus toxoid boosters in recipients of acellular pertussis-diphtheria-tetanus vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 10: 2074-2080 (2014)

- | | |
|-------------------------|--------|
| 3) | 無し |
| H. 知的財産権の出願・登録状況 | 3. その他 |
| 1. 特許取得 | |
| 無し | |
| 2. 実用新案登録 | |

2nd Symposium on Research and Quality Control of Vaccines

Tokyo, Japan, 2-3 March 2015

Conference Room, NIID

Co-organized by

National Institute of Infectious Diseases (NIID), Japan

National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC), China

National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS), Korea



NATIONAL INSTITUTE OF
FOOD AND DRUG SAFETY EVALUATION



Agenda

DAY-1 (Monday, 2 March)

15:00

Opening

- **Opening remarks by the Director General of NIID, Dr. Haruo Watanabe**
- **Comments from WHO HQ and WPRO (by WebEx)**
- **Self-introduction**
- **Group photo**

15:30-17:00 *For The Mutual Understandings*

Session 1. Vaccine Lot Release System of China, Korea and Japan.

Chair: Dr. Ichiro Kurane (NIID)

Vice-Chair: Dr. Junzhi Wang (NIFDC)

- 1.1 “Brief introduction of vaccine lot release system in Japan”
Dr. Masaki Ochiai (NIID)
- 1.2 “Brief introduction of vaccine lot release system in China”
Dr Miao Xu, (NIFDC)
- 1.3 “Brief introduction of vaccine lot release system in Korea”
Dr. Hyejoo Chung (NIFDS)

18:30-20:30

Welcome reception.

DAY-2 (Tuesday, 3 March)

9:00-10:30 *New Approaches For New Vaccines I*

Session 2a. Researches on Vaccines

Chair: Dr. Junzhi Wang (NIFDC)

Vice-Chair: Dr. Sangja Ban (NIFDS)

- 2.1 “Development of recombinant infectious norovirus”
Dr. Kazuhiko Katayama (NIID)
- 2.2 “Development of research on regulatory science of new viral vaccines (H7N9, Eobla)”
Dr. Junzhi Wang (NIFDC)
- 2.3 “Study on standardization of vaccine immunogenicity test method in Korea ”
Dr. Sangja Ban (NIFDS)

10:30-10:45

COFFEE BREAK

Agenda

10:45-12:15 *New Approaches For New Vaccines II*

Session 2b. Researches on Vaccines *(continued)*

Chair: Dr. Junzhi Wang (NIFDC)

Vice-Chair: Dr. Sangja Ban (NIFDS)

2.4 “The host cellular receptors for EV71”.

Dr. Hiroyuki Shimizu (NIID)

2.5 “Development of EV71 vaccine”

Dr. Zhenglun Liang (NIFDC)

2.6 “Development of HA antigen standard for pandemic influenza vaccine”

Dr. Ho Jung Oh (NIFDS)

12:15-13:15

LUNCH BREAK

13:15-15:00 *New Methods/Tools For Standardization of Vaccines*

Session 3. Alternative Methods for the Quality Control of Vaccines

Chair: Korea Dr. Sangja Ban (NIFDS)

Vice-Chair: Dr. Ichiro Kurane (NIID)

3.1 “A sensitive *in vitro* assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines”.

Dr. Mutsuyo Takayama-Ito (NIID)

3.2 “Alternative methods for toxicity test of DTaP vaccine and potency of rabies vaccine”

Dr. Miao Xu (NIFDC)

3.3 “Alternative method for potency assay of Japanese encephalitis vaccine (inactivated)”

Dr. Ho Jung Oh (NIFDS)

15:00

Closing

- **Closing remarks by the Director General of NIID, Dr. Haruo Watanabe**

15:15-16:00

OPTIONAL

Introduction of NIID, and lab tour

Symposium Participants List

National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC)

**No. 2 Tian Tan Xi Li, Dongcheng Distric,t
Beijing, 100050, P. R. China**

Dr. Junzhi Wang, 王军志
<wangjz@nifdc.org.cn>
Deputy Director General

Dr. Miao Xu, 徐苗<xumiaobj@126.com>
Deputy Director
Institute for Biological Product Control

Dr. Zhenglun Liang, 梁争论
<lzhenglun@126.com>
Head of Hepatitis Virus Vaccines Division
Institute for Biological Product Control

Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS) 187 Osongsaengmyeong 2-ro, Osong-eup, Heungdoek-gu cheongju-si, Chungcheongbuk-do, 363-700, Korea

Dr. Sangja Ban,
반상자<sjban@korea.kr>
Director
Biologics Research Division

Dr. Hyejoo Chung,
정혜주<hjchung58@korea.kr>
Director
National Center for Lot Release

Dr. Ho Jung Oh,
오호정<ohojung@korea.kr>
Team Leader
National Center for Lot Release

Food and Drug Administration Civic Drive, Filinvest Corporate City Alabang, Muntinlupa, Philippine

Ms. Mary Grace E. Gabayoyo,
<mgegabayoyo@fda.gov.ph>
Food Drug Regulation Officer III

National Institute of Infectious Diseases (NIID) 1-23-1 Toyama Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Dr. Haruo Watanbe, 渡邊治雄
<haruwata@niid.go.jp>
Director General,

Dr. Ichiro Kurane, 倉根一郎
<kurane@niid.go.jp>
Deputy Director General,

Dr. Atsushi Kato, 加藤篤
<akato@niid.go.jp>
Director
Department of Quality Assurance and
Radiological Protection,

Dr. Masaki Ochiai, 落合雅樹
<masakio@niid.go.jp>
Chief
Department of Quality Assurance and
Radiological Protection

Dr. Kazuhiko Katayama, 片山和彦
<katayama@niid.go.jp>
Chief,
Department of Virology II

Dr. Hiroyuki Shimizu, 清水博之
<hshimizu@niid.go.jp>
Chief
Department of Virology II

Dr. Mutsuyo Takayama-Ito, 伊藤陸代
<mutsuito@nid.go.jp>
Senior Researcher
Department of Virology I

Dr. Seishiro Naitoi, 内藤誠之郎
<snaito@niid.go.jp>
Senior Researcher
Department of Quality Assurance and
Radiological Protection

Dr. Kentaro Fujita, 藤田賢太郎
<fujiken@niid.go.jp>
Senior Researcher

Presentation Abstract

S1.1 Brief introduction of vaccine lot release system in Japan

Masaki Ochiai (NIID)

The National Institute of Infectious Diseases (NIID), formerly named as National Institute of Health, was established in 1947 as an official research institute attached to the Ministry of Health and Welfare for conducting lot release of biological products including vaccines, and for studying them. At that time, there were a lot of biologicals which did not pass the national test mainly due to the sterile issue. These failed lots had gradually decreased corresponding to the improvement of pharmaceutical jurisprudence such as the implementation of GMP as the Ministerial ordinance in 1980. The decision whether biological products passed or not the lot release has been in principle based on the results from tests alone performed by the NIID for a long time, and manufacturer's in-house test results were just handled as a reference. Therefore, a limitation to ensure the quality of vaccines only by testing was pointed out by the WHO assessor in 2004. According to the international lot release guideline for vaccines, we started to reconsider the Japanese lot release system and steered to put more importance on reviewing the manufacturer's batch records to obtain the significant information in terms of the traceability of critical source materials, active and critical components used in the manufacture of the product, as well as to obtain the results from tests performed by the manufacturer at various stages of production. Thus, protocol review for vaccines was newly implemented in the Japanese lot release system in addition to the independent testing by the NIID in October 2012, and is being used to ensure whether the lot meets the specifications and control criteria described in the marketing authorization dossier.

Presentation Abstract

S1.2 Brief introduction of vaccine lot release system in China

Miao Xu (NIFDC)

China is a big country of vaccine production and use, there is about 40 vaccine manufactures to produce nearly 50 kinds of vaccines. In the recent 6 years, there are almost 5000 batches of vaccine released in China per year. To ensure the safety and efficacy of vaccine, lot release plays an important role.

Vaccine lot release have been implemented gradually in China. Began with the 5 EPI vaccine lot release since 2001, launched with all vaccines in China in 2006. Through years of exploration and improvement, China has a complete legal system based on relevant laws, regulations and regulatory requirements to implement and enforce vaccine lot release.

In China, the CFDA is in charge of lot release of biological nationwide and shall designate institutes to undertake lot release of biological products. NIFDC is responsible for implementation the lot release of biological products, including the test and documents review, as well as technical training and guidance to the provincial institutes for lot release. Since October 2013, Shanghai Institute has been authorized for the lot release of flu vaccines within the jurisdiction.

The lot release system has been established strictly according to the WHO guidelines and keep continuously improvement. China NRA passed WHO NRA evaluation in 2011 and the WHO NRA re-evaluation in 2014.

Presentation Abstract

S1.3 Brief introduction of vaccine lot release system in Korea

Hyejoo Chung (NIFDS)

The quality of biologics such as vaccines has been carefully monitored before being released for sale in Korea. National Center for Lot Release (NCLR) of NIFDS, a division which is responsible for national lot release, performs quality testing in the final product, and also reviews the manufacturing process, in-process control and quality control records from raw materials to final product in every lot. In some cases, tests can be exempted according to the “Regulation for designation, approval process, and method of pharmaceuticals for national lot release”. The LIMS (Laboratory Information Management System) is operated for data management, which is computer system designed to capture, analyze, report and manage the data and information via database. We also carry out trend analysis using LIMS. It has been implemented at our center since June, 2003. Raw data created by laboratory equipments are stored in LIMS automatically through LAS (laboratory automation system), however, some data can be inputted semi-automatically. When all the results are met criteria, then Director General of NIFDS issues the Product Release Certificate. To improve our reliability for national lot release, quality assurance system was introduced in 2003. For this, we are developing SOP, validating equipments and facility, maintaining the status of ISO 17025, international quality system for testing, and establishing the Korean National Biological Reference Standards continuously. NIFDS is cooperating actively with WHO in various ways. NIFDS was designated as a WHO collaborating center in 2011 as the 5th center. As terms of reference, we are operating the training program (The Vaccine Hands-on Training), and performing technical services as a WHO contracting laboratory for PQ vaccines. We had finished the 3rd training program in last November successfully. We expect for designation of our center as a WHO GLO/VQ in lot release area.

Presentation Abstract

S2.1 Reverse genetics system of Human and Murine Norovirus

Kazuhiko Katayama^{*1,2}, Reiko Takai-Todaka², Akira Nakanishi³, Kosuke Murakami^{1,2}, Tomoichiro Oka², Susana Guix¹, Tyler M. Sharp¹, Robert L. Atmar¹, Sue E. Crawford¹, and Mary K. Estes¹

**Speaker. ¹Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA; ²National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; ³National Center for Geriatrics and Gerontology, Dept. Aging Intervention, Sec. Gene Therapy, Aichi, Japan.*

Human norovirus (HuNoV) are the leading cause of gastroenteritis worldwide. Replication studies on HuNoV have been hampered due to its inability to grow in conventional cell cultures. We have developed a plasmid-based HuNoV reverse genetic system that can produce viral particles containing packaged infectious genomic RNA with an inserted GFP gene. However, it was not possible to examine the infectivity of these viral particles because of the lack of susceptible cell-lines for HuNoV. To evaluate the validity of this system, we asked if this system could produce infectious particles using the cDNA of other related viruses where permissive cell-lines are available, such as the murine norovirus (MNV). A construct harboring a full-length cDNA of the MNV S7 strain carrying a non-viral EF-1 alpha promoter and hepatitis D virus ribozyme was transfected into HEK293T cells, and the culture supernatant was used to infect mouse leukaemic monocyte macrophage cell line (RAW 264.7) in order to examine the presence of infectious MNV. MNV nonstructural protein expression was analyzed using immunofluorescence (IF), fluorescence microscopy (FM) and Western blotting (WB). The viral protease cleavage of the nonstructural ORF1 polyprotein was observed by WB and IF. Six non-structural proteins close to the predicted sizes were detected, which suggested they were not truncated and all six nonstructural proteins were functional. Progeny MNV produced from our reverse genetics system was marked by mutations or by an introduced reporter gene such as GFP. The progeny virus was infectious in RAW264.7 cells. These results suggest that our plasmid based reverse genetics systems are simple and effective in evaluating the functions of the viral sequences, proteins, and phenotypic characterization of MNV and HuNoV strains. The non-viral promoter used in this system is the key for generating HuNoV infectious clones efficiently, and this plasmid based reverse genetics system for MNV and HuNoV does not require a helper virus. This is the first report of establishing a complete reverse genetics system expressed from cDNA for MNV and HuNoV that allows manipulation of the viral genome, and production of infectious reporter virions.

Presentation Abstract

S2.2 Development of research on regulatory science of new viral vaccines(H7N9, Ebola)

Junzhi Wang (NIFDC)

Regulatory science aims to contribute to the development of new tools, standards, and approaches to assess the safety, efficacy, quality, and performance of regulated products. NIFDC devotes herself to applying regulatory science into the R&D of new vaccines, by cooperating closely with vaccine manufacturers and other relative institutes for filling the gaps to accelerate R&D of new vaccines, especially during dealing with the emergency. For example, during the 2009 H1N1 pandemic, NIFDC developed alternative detection methods and national references which served as the key indicator of vaccine quality control and succeeded making outstanding contribution to accelerate the development of H1N1 vaccine in China. Similarly, during the 2013 H7N9 pandemic, NIFDC has developed H7N9 anti-serum references and H7N9 antigen references promptly, which was very helpful to promote the development of H7N9 vaccines. Recently, NIFDC is cooperating with entities on the quality control of Ebola vaccines, which is expected to promote the development of such a new kind of viral vaccine. The above examples demonstrate that scientific regulation plays an important role in the development of new vaccines.

Presentation Abstract

S2.3 Research on the Standardization of Vaccine Immunogenicity Evaluation Assays in Korea

Sangja Ban (NIFDS)

Clinical development of vaccines requires specific assays to demonstrate the immunogenicity of the vaccine. These assays should measure the immune responses that correlate with protection against diseases such as antibody titers for neutralization of viruses or opsonization of bacteria and etc. Validation of these assays is required per regulatory guidelines.

In Korea, vaccine evaluation projects were performed from 2006 led by NIFDS including immunogenicity, safety and efficacy of vaccines, sero-prevalence of vaccine preventable diseases and establishment and validation of immunogenicity assays for 12 kinds of vaccines. In the establishment and validation of vaccine evaluation assays, *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine and pneumococcal vaccines were targeted with the funding from NIFDS.

Hib was one of the most common cause of bacterial meningitis in Korean children prior to the vaccine. After Hib vaccination, Hib meningitis became rare. To maintain such success, Hib vaccination should be implemented continuously. ELISA for detecting anti-PRP antibody level and serum bactericidal assay (SBA) for measuring antibody function were established and evaluated along with assay specificity, sensitivity and precision at the Ewha Center for Vaccine Evaluation Study (ECVES) in Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea. With such success, newly developed Hib vaccine (EuHib™, LG Life Sciences, Republic of Korea) and Hib containing combination vaccine (Euforvac-Hib™, LG Life Sciences, Republic of Korea) could be evaluated and finally licensed in the Republic of Korea and considered satisfactory as WHO pre-qualified vaccine.

Streptococcus pneumoniae is a major human pathogen responsible for the majority of bacterial pneumonia as well as invasive pneumococcal diseases. Use of conjugate vaccines has dramatically reduced the incidence of invasive diseases, and there are active efforts to further improve the conjugate vaccines. To evaluate pneumococcal vaccines, ELISA and opsonophagocytosis assay (OPA) were developed. 3rd generation ELISA to quantify the level of circulating antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide were established for 13 serotypes. OPA has been developed to overcome the limitations of the ELISA method, a bioassay measuring the capacity of antibodies to opsonize pneumococci. OPA is preferred method for estimating antibody function. Moreover, OPA was established with multiplexed method at the WHO reference laboratories at the University of Alabama at Birmingham. These third-generation ELISA and multiplexed OPA has been established and evaluated for assay specificity, sensitivity and precision at the ECVES with funding from NIFDS, as well. With these efforts, ECVES has participated in the working group to establish the serotype-specific opsonic titers for the new reference serum, 007sp by the US FDA, to validate its performance as a standard, and to reassign values to 13 pneumococcal serotypes. Moreover, from this year, the efforts to establish the standard methods for vaccine immunogenicity evaluation will be expanded to establishment of quality control sera for vaccine evaluation. With judicious use, it should be available worldwide for at least more than 10 years.

Presentation Abstract

S2.4 The host cellular receptors for EV71

Hiroyuki Shimizu (NIID)

Enterovirus A (HEV-A) is one of the four species of HEV in the genus *Enterovirus* in the family *Picornaviridae*. Among HEV-A, coxsackievirus A16 (CVA16) and enterovirus 71 (EV71) were the major causative agents of hand, foot, and mouth disease (HFMD). Recently, a growing epidemic of atypical but self-limiting HFMD caused by coxsackievirus A6 (CVA6) has been reported worldwide. Some other types of HEV-A are commonly associated with herpangina. Although HFMD and herpangina due to HEV-A are common febrile diseases in children EV71 can cause various neurological diseases, such as aseptic meningitis and fatal encephalitis mainly in infants and young children. Thus, EV71 infections have caused thousands of deaths in young children, particularly in Western Pacific countries, including Malaysia, Taiwan, China, Cambodia, and Vietnam, posing a serious threat to public health in the region.

Recently, a number of cell-surface molecules have been identified to be involved in the early stage of EV71 infection. By using different materials and technical approaches, our group (Nature Med., 15:287-294, 2009) and Dr Koike and colleagues (Nature Med., 15:798-801, 2009) have identified two human transmembrane proteins, P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) and scavenger receptor class B, member 2 (SCARB2), respectively, as functional receptors for EV71. To elucidate the molecular basis for EV71 interaction with PSGL-1, we used a combination of mutational and structural analysis. We demonstrated that tyrosine sulfation at the N-terminal region of PSGL-1 plays a critical role in the PSGL-1-binding to EV71. On the other hand, an amino acid residue of the capsid protein VP1 of EV71 (VP1-145) controls virus tropism by changing the accessibility of VP1-244 to the sulfated N-terminus of PSGL-1. VP1-145 of EV71 might be responsible for distinct in vitro and in vivo phenotypes of EV71, including the receptor usage. In this regard, I will discuss the involvement of viral and cellular factors in viral replication and pathogenesis in EV71 infection.

Presentation Abstract

S2.5 Development of EV71 vaccine

Zhenglun Liang (NIFDC)

Both EV71 and CA16 are the major pathogens of hand, foot and mouth disease (HFMD), which associated with a wide spectrum of diseases in infants and children under 5 years old, even death. The number of reported HFMD cases in Mainland China was 1,175 million, leading to 3,210 deaths from 2008-2014. Vaccine is the most effective and economic method to prevent infectious diseases. How to ensure the safety, effect and controllable quality in the R&D of new vaccines is a worldwide problem. The project is intent to solve key technical bottlenecks of new vaccines. It carried out selection of vaccine strain, preparation of standard materials, and establishment of animal models and development of quality-control standards, etc. The quality control and evaluation key technical system for the new HFMD vaccines was first established in the world to ensure that the safety, effect and controllable quality of domestic EV71 vaccine, CA16 vaccine and combination vaccine, and to promote the research and development process.

Presentation Abstract

S2.6 Development of HA antigen standard for pandemic influenza vaccine

Ho Jung Oh (NIFDS)

The vaccination is the best way to prevent pandemic influenza. For pandemic influenza vaccine production, WHO recommends new vaccine strain(s) annually because influenza viruses undergo frequent antigenic drift in their surface antigen proteins. The hemagglutinin (HA) of the influenza virus is the major surface antigen inducing protective immune responses, and HA content determination is required for production and quality control of influenza vaccine. The single radial immunodiffusion (SRID) assay is the standard test method for HA content determination and reference reagent is essential for this assay. Reference reagents are developed and supplied by essential regulatory laboratories (ERLs). However, this is very time consuming step for vaccine production and quality control, therefore it is difficult to manage the pandemic outbreak promptly. WHO recommends that national regulatory authorities (NRAs) do some researches to minimize pandemic impact. In order to shorten HA reference reagent production period, we prepared various antigen reagent from different HA subtypes by using recombinant technology and generated 5 HA vectors (H1N1, H5N1, H7N3, H7N9, H9N2) for HA protein production. These HA proteins will be evaluated for SRID assay for vaccine quality control test.

Presentation Abstract

S3.1 A sensitive *in vitro* assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines.

Mutsuyo Takayama-Ito (NIID)

Rabies is a viral disease transmitted through bites from rabid animals and can be prevented by vaccines. Clinically used rabies vaccines are prepared from inactivated rabies viruses grown in cell cultures or embryonated eggs. In Japan and across the world, tests that confirm complete inactivation, such as the *in vivo* suckling mouse assay, in which suckling mice are intracerebrally inoculated with vaccine products, are required for quality control. In this study, we developed a novel cell-based immunofluorescence assay that does not require mice for testing rabies vaccine inactivation for human use. The sensitivity of this cell-based *in vitro* assay was 5.7 times that of the *in vivo* suckling mouse assay, with a detection limit of one focus forming units per ml of test sample. This newly developed *in vitro* assay may replace the established *in vivo* suckling mouse assay for confirming viral vaccine inactivation.

Presentation Abstract

S3.2 Alternative methods for toxicity test of DTaP vaccine and potency of rabies vaccine

Xiao Ma and Miao Xu* (NIFDC)

**Speaker*

NIFDC attaches much importance to the development of alternative methods for vaccines quality control. Here are two examples, including DTaP vaccine and rabies vaccine. Mice Histamine Sensitization Test (HIST), the current method for determining the toxicity of aP is a *in vivo* method with large range of variation. The alternative enzyme-HPLC method has been established by NIFDC, which can make the toxicity test more accurately and conveniently. Another alternative method for pertussis toxicity based on the Chinese hamster ovary cell (CHO) has also been established. By the validation, the precision/ selectivity/specificity of methods are satisfied. The comparison between the current method and alternative methods has been carried out. Rabies vaccine play a key role in the prevention of human rabies, and the NIH methods remains the gold standard for rabies vaccine potency testing. But the NIH methods need too many mice and its Coefficient of Variation is quite high. So the other method is needed urgently. NIFDC is trying to develop the single dilution method and ELISA method for the potency testing.

Presentation Abstract

S3.3 Alternative method for potency assay of Japanese encephalitis vaccine (inactivated)

Ho Jung Oh (NIFDS)

Traditionally, we have performed *in vivo* potency assay as a quality control test for the Japanese encephalitis vaccine. Since ICATM (International Cooperation on Alternative Test Method) has founded, the animal testing has been difficult to be carried out more and more. Therefore, to comply with 3R strategy, NIFDS established *in vitro* potency assay (ELISA) of antigen titer determination for the Japanese encephalitis vaccine using monoclonal antibody. To verify *in vitro* potency assay which can be substituted for the existing *in vivo* potency assay, we performed method validation, comparison test and statistical analysis in multi-site collaborative study. When method validation was done according to the ICH guidelines, *in vitro* potency assay met all acceptance criteria. As results of the collaborative study, *in vitro* potency assay showed it's faster (4 wks → 4 hrs) and easy performance without pre-treatment such as mice immunization. Also it showed better precision and reproducibility compared with the conventional *in vivo* assay. In conclusion, we established alternative *in vitro* potency assay which can be replaced *in vivo* assay requiring many animals and much time for the Japanese encephalitis vaccine.