

出國報告（出國類別：其他/國際會議）

參加生物製劑標準化聯盟舉辦之「人類及獸醫疫苗檢驗之實驗動物替代試驗研討會」

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：戴惠玉副研究員

派赴國家：美國

出國期間：107年10月14日至107年10月20日

報告日期：108年01月04日

目次

摘要.....	2
目的.....	4
過程.....	5
心得與建議.....	27
照片.....	28

摘要

由於動物福祉日漸受重視，各國紛紛成立替代方案研究中心並積極推動替代試驗，以落實實驗動物 3R (取代、減量及精緻化)精神，因而科學家開始著手開發疫苗效價替代試驗。為什麼優先選定效價替代試驗，由於科學家對於各類疫苗產生抗體的機制越來越清楚，包括抗原種類、抗原決定位及特殊結構等，且因效價活體試驗，實驗動物使用數量較多，並且在試驗過程中，多數會使小鼠遭受極大的不適及痛苦，因而促使歐美共同攜手合作開發相關替代試驗。

今(107)年 10 月 16 日至 17 日生物製劑標準化聯盟(IABS)於馬里蘭州貝塞斯達國家衛生研究院(NIH)舉辦「人類及獸醫疫苗檢驗之實驗動物替代試驗研討會」，來自各國衛生主管機關及疫苗製造廠之狂犬病病毒專家齊聚一堂，共同參與狂犬病疫苗效價替代試驗可行性之評估與討論。狂犬病疫苗效價替代試驗之研發、推動及施行，一直是歐、美等國之狂犬病病毒專家的使命及任務，從對狂犬病病毒 G protein 的了解，知道 trimeric G protein 才具有產生中和性抗體的能力開始，因此免疫學家便投入大量心力找尋可辨識 G protein 立體結構之單株抗體，經與不同處理方式後之 G protein 進行測試，發現單株抗體 TJH 1112-1 及 D1-25 做為 coating 及 detection 抗體的組合，可清楚分辨未處理(normal)、熱處理後之降解疫苗(degraded)及 1:1 混合未處理及熱處理之疫苗差異性。

因此 EDQM 開始規劃 BSP148 計畫，主動邀請各國共同參與狂犬病疫苗效價替代試驗之國際合作研究-ELISA G protein 標準化試驗，並用以評估狂犬病疫苗品質及效價。未來 EDQM 將從各國回報數據中計算以 G protein 評估效價時，

狂犬病疫苗應有的效價要求。本次研討會最大的收穫為順利獲邀參與國際合作計畫，並藉此建立國際一流專家人脈及強化國際間交流合作，另效價替代試驗之結果可做為我國未來中華藥典編修之依據。

目的

本次參加生物製劑標準化聯盟舉辦之「人類及獸醫疫苗檢驗之實驗動物替代試驗研討會」，藉此了解國際間動物替代試驗之最新進展及優先開發之項目，尤其是狂犬病疫苗效價替代試驗之發展。本署一直以來以 NIH potency test 來進行狂犬病疫苗效價之測定，然 NIH potency test 有其限制性，如每次試驗所使用的小鼠數量多之外，且狂犬病活病毒需在 BSL2 實驗室進行系列稀釋後進行小鼠腦內注射，小鼠腦內接種須由經驗豐富之獸醫師或技術員操作等，同時因國際間積極推動落實實驗動物 3R 精神，因而促使歐、美等國共同開發效價替代試驗。

很開心在這次研討會中獲得參加生物藥品標準化計畫 148(BSP148)，BSP148 計畫第二階段為國際合作研究計畫，EDQM 已建立 ELISA G protein 測試方法，並將該方法及試劑標準化後，提供官方實驗室、疫苗製造廠及學術研究機構用以評估狂犬病疫苗品質及效價之測定，在 EDQM 的先期測試中發現，以單株抗體 TJH 1112-1 及 D1-25 做為 coating 及 detection 抗體的組合，可清楚分辨未處理(normal)、熱處理後之降解疫苗(degraded)及 1:1 混合未處理及熱處理之疫苗差異性。

當加拿大衛生部生物藥品評估中心(Center for biologics Evaluation, Health Canada)主任 Dean Smith 博士得知本署是今年 IABS 研討會中唯一來自亞洲的官方實驗室，便開心地在圓桌論壇向各國專家介紹，也因此順利在研討會中結識各國狂犬病專家並交換意見，藉此推動國際交流以建立國際人脈。

過程

生物製劑標準化聯盟(international alliance for biological standardization, IABS)為獨立非營利科學聯盟，創立於 1955 年，總部設於瑞士日內瓦，於 2014 年及 2015 年分別在歐洲及北美成立 IABS-EU 及 IABS-NA 協會，並與世界衛生組織(WHO)及世界動物衛生組織(OIE)建立夥伴關係。IABS 的任務為提供與人類及獸醫健康有關之生物藥品開發、生產或管理者間之溝通及交流平台，藉此促進生物藥品的發展及進步、建立商品化生物藥品的管理及標準化。目前 IABS 約有 250 位會員遍及 50 個國家以上。

自 1994 年，IABS 首次在德國蘭根舉辦「與生物藥品發展及管控有關之動物試驗取代、減量及精緻化研討會(Symposium on Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in the Development and Control of Biological Products)」後，至今已舉辦 10 場與實驗動物福祉 3R 精神有關之研討會及座談會。今年於馬里蘭州貝塞斯達國家衛生研究院舉辦「人類及獸醫疫苗檢驗之實驗動物替代試驗研討會」，與會成員包括歐、美衛生主管機關(如歐洲醫藥品品質審查委員會(EDQM)、加拿大衛生部(Health Canada)、美國食品藥物管理局(FDA)及美國農業部(USDA)等)和疫苗製造廠之研發人員及與生物藥品開發、檢驗相關之社團組織及團體。約有 70 位來自各國的專家參與，每位專家皆在該專業領域至少有 10 年以上之豐富研發經驗，今年研討會的主軸為人類及獸醫用狂犬病疫苗替代試驗之進展及成果分享，藉由圓桌論壇(roundtable)討論方式，使與會人員了解目前狂犬病疫苗效價替代試驗之最新發展，及參與生物標準化計畫

(Biological Standardization Program, BSP)之國際合作研究。

今年研討會之開幕式由美國食品藥物管理局生物製品評估和研究中心 (CBER)副主任 Robin Levis 博士、替代性毒理學方法跨部門評估中心(Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM)主任 Warren Casey 博士及生物標準化聯盟北美協會(IABS-NA)主席 Richard Hill 博士共同致詞並歡迎所有與會者的蒞臨，接連 2 天的專題演講主題包括介紹人類及獸醫疫苗動物替代試驗之可行性評估、狂犬病疫苗效價替代試驗之最新發展及試劑可用性及繪製狂犬病疫苗替代試驗之前進藍圖等。內容精采可期，且與本署生物藥品檢驗業務息息相關，茲將專題演講主題彙整如下，藉此瞭解替代方案之發展趨勢及狂犬病疫苗效價替代試驗之最新進展。

本次赴美參加 IABS 研討會之行程表如下所示。

日期	工作紀要
107 年 10 月 14 日	啟程，台灣桃園國際機場-美國舊金山國際機場
107 年 10 月 14 日~15 日	轉機，美國舊金山國際機場-華盛頓巴爾的摩機場
107 年 10 月 16 日~17 日	參加生物製劑標準化聯盟舉辦之「人類及獸醫疫苗檢驗之實驗動物替代試驗研討會」
	<u>地點: 馬里蘭州貝塞斯達國家衛生研究院</u>
	<u>專題演講主題:</u>
	<u>第一天</u>
	Session 1 - Welcome from the Organizers

Session 2 - Setting the Stage for Alternatives to In Vivo
Release Testing

Session 3 - Rabies Vaccines Alternative Testing State of
the Art and Reagent Availability

Session 4 - Charting the Path Forward for Alternative
Testing for Rabies Vaccines

第二天

Session 4 - Charting the Path Forward for Alternative
Testing for Rabies Vaccines (con't)

Session 5 - Rabies Alternative Testing Wrap-up Global
Perspective and Future Considerations

107 年 10 月 18 日

轉機，華盛頓巴爾的摩機場-美國舊金山國際機場

107 年 10 月 19 日~ 20 日

美國舊金山國際機場-台灣桃園國際機場



The banner features the IABS logo on the left and the NTP logo on the right. The central text reads: "Implementing nonanimal approaches to human and veterinary vaccine testing: Achieving scientific and regulatory success for rabies and beyond". Below this, the date and location are given as "October 16-17 2018, Bethesda, Maryland". The background shows a modern building with a glass facade and a cylindrical tower.

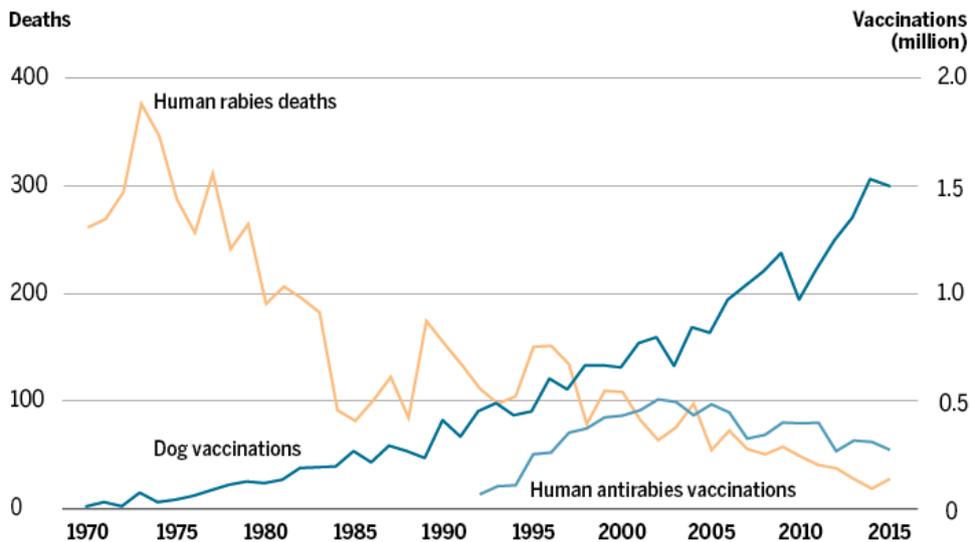
IABS INTERNATIONAL ALLIANCE FOR BIOLOGICAL STANDARDIZATION **NTP** National Toxicology Program
Implementing nonanimal approaches to human and veterinary vaccine testing:
Achieving scientific and regulatory success for rabies and beyond
October 16-17 2018, Bethesda, Maryland

以下就專題演講主題，摘錄重點如下：

(一) 人類生物藥品 - 北美法規觀點 (Human Biologics-North American Regulatory Perspective)

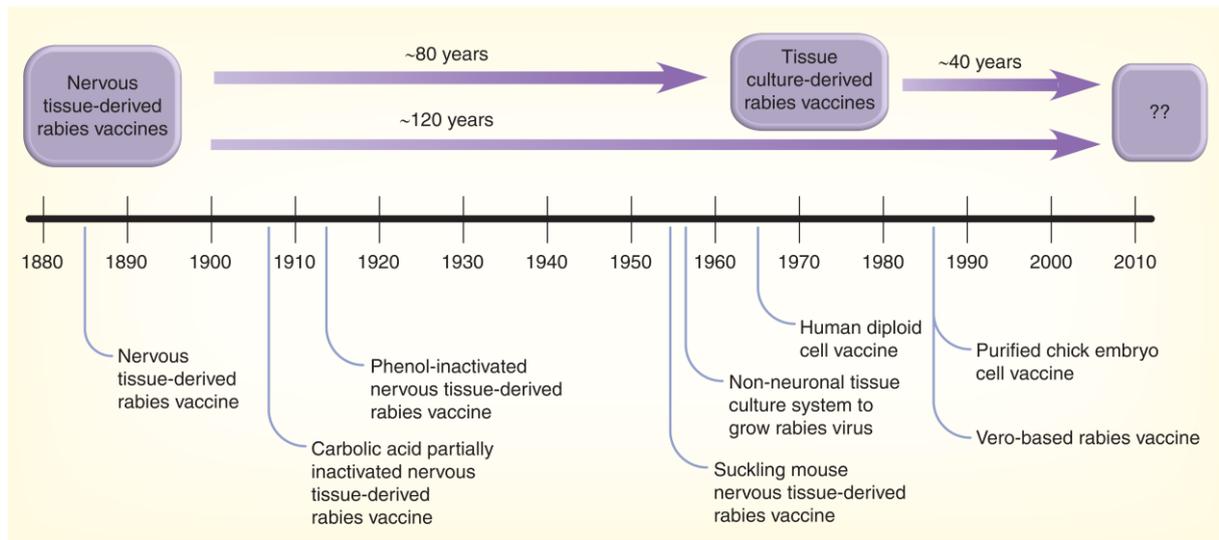
狂犬病病毒 (Rabies virus) 為彈狀病毒科 (Rhabdovirida) 麗莎病毒屬 (Lyssaviruses)，是一種單股 RNA 具套膜病毒，外表有許多醣蛋白刺突 (spikes)，為細胞吸附工具與中和性抗原。狂犬病 (rabies) 由狂犬病病毒引起的一種急性病毒性腦脊髓炎，這種疾病絕大部分都是經由帶病毒動物咬傷後，病毒經由傷口感染人體。一旦發病後，患者會出現與狂犬相似的症狀，如抽蓄並變得具有攻擊性等，致死率幾近 100%。因該病有恐水的臨床特徵，又稱「恐水病」，全球每年約有 59,000 人死於狂犬病。由於兒童是狂犬病的主要受害者，且狂犬病為疫苗可預防發生的疾病，因此世界衛生組織在 2015 年宣布 2030 年全球消滅狂犬病死亡的目標。

狂犬病病毒可感染所有的哺乳類動物，自然界中，罹病的野生動物是主要的傳染原及病毒儲存宿主，而罹病的家犬則是人畜共通傳染病的主要傳染原，除此之外，在美加地區，部分蝙蝠身上可分離出狂犬病病毒。全球狂犬病控制聯盟科學主任 Louise Taylor 博士表示，為了有效清除狂犬病病毒並避免狂犬病爆發，應至少使 70% 的狗接受狂犬病疫苗的接種。以斯里蘭卡為例，由於逐年增加犬的疫苗接種率，狂犬病死亡的人數也逐年降低，另斯里蘭卡大量投入暴露後疫苗接種，進一步有效控制並減少死亡人數(圖一)。



圖一：斯里蘭卡犬狂犬病疫苗接種率與人類狂犬病死亡率關係圖

回顧狂犬病疫苗的發展，1885年法國科學家巴斯德首次以乾燥去活化之狂犬病病毒作為狂犬病疫苗，施打在遭受狂犬咬傷的9歲小孩，並成功醫治，往後的一年間，巴斯德陸續治癒了350位患者，只有一名小孩不幸死亡，因此開啟了狂犬病疫苗的發展。狂犬病疫苗的製程，從早期源自脊髓的神經組織，經碳酸(carbonic acid)、酚(phenol)等化學物質去活化處理後，成為不活化疫苗，繼而逐漸發展以乳鼠神經組織來源之狂犬病疫苗，Kissling RE博士首度建立以非神經組織培養狂犬病病毒，他利用正常初代倉鼠腎細胞(primary hamster kidney cells)成功繁殖狂犬病病毒後，陸續許多科學家開發以肺臟細胞株WI-38培養，逐漸改以人類雙套細胞MRC-5培養狂犬病病毒，並在1970年中，人類雙套細胞疫苗(human diploid cell vaccine, HDCV)首次獲得疫苗製造許可證，另外還有純化雞胚胎細胞培養之狂犬病疫苗及Vero細胞培養之狂犬病疫苗(圖二)。



圖二：人類狂犬病疫苗之發展時間表

在美國，擁有人類狂犬病疫苗藥物許可證的廠商共有 2 家公司，分別為 Sanofi Pasteur 及 GSK(前身為 Novartis Vaccines and Diagnostics)。Sanofi Pasteur 以人類雙套細胞(MRC-5 cells)培養狂犬病病毒並製造狂犬病疫苗，病毒株為 Pitman-Moore Strain，疫苗商品名為 IMOVAX。然 GSK 主要在純化的雞胚胎細胞(primary chicken fibroblasts)培養狂犬病病毒，病毒株為 Fixed Rabies virus strain- Flury LEP，疫苗商品名為 RabAvert (Rabipur)。早期狂犬病疫苗取自動物之神經組織並經去活化處理後製成，成分較為複雜。EB Seligmann 博士建立了 NIH potency test，並於 1966 年發表在 Laboratory Techniques in Rabies 期刊，並作為第一個神經組織來源之狂犬病疫苗申請藥物許可證時之效價試驗。NIH potency test 做法如下，將小鼠分為試驗組及參考組，每組約 16-20 隻小鼠，並在第 0 天及第 7 天以不同稀釋階之試驗疫苗及參考疫苗免疫小鼠後，在第 14 天以腦內接種活的狂犬病病毒，之後每天觀察並記錄小鼠存活率，並在第 28 天計算效價及百分之 50 之有效劑量(LD₅₀)。然 NIH Potency test 有許多的缺點，例如每

次試驗約需 300 隻小鼠，且須在第 0 天及第 7 天免疫小鼠，第 14 天腦內接種活病毒，活病毒須在 BSL-2 等級以上之實驗室操作，且每次試驗間存在高度變異性(25-400%)。以美國為例，狂犬病疫苗效價試驗需重複測試以獲得兩個有效試驗的幾何平均值，此結果作為效價之判定，實驗須耗費 6 週才能完成。上述種種不便因素促使效價替代試驗的開發。

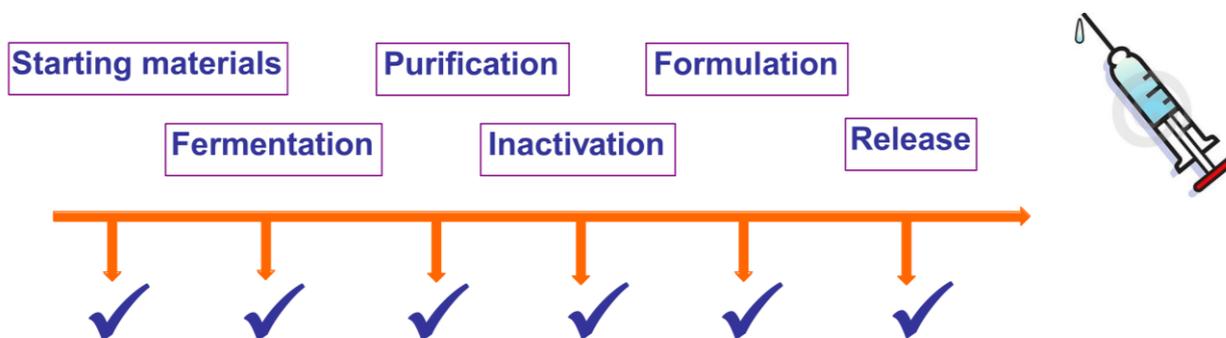
近年來，各國紛紛成立替代方案研究中心並積極推動替代試驗，以落實實驗動物 3R (取代、減量及精緻化)精神，因而科學家開始著手開發疫苗效價替代試驗。為什麼優先選定效價替代試驗，由於科學家對於各類疫苗產生抗體的機制越來越清楚，包括抗原種類、抗原決定位及特殊結構等，且因效價活體試驗，實驗動物使用數量較多，並且在試驗過程中，多數會使小鼠遭受極大的不適及痛苦，因而促使歐美共同攜手合作開發相關替代試驗。

然而替代試驗是否可取代活體效價試驗，依據美國聯邦法規標題 21 之 600.3 定義(21 CFR 600.3(s))，效價(potency)一詞係指產品的特定能力或能力，如以適當的實驗室測試結果或經適當臨床試驗之數據。以狂犬病而言，早期試驗是建構在動物避免疾病發生的保護力與人類免疫反應之關聯性，然而 NIH potency test 僅觀察狂犬病病毒接種後小鼠的存活率，因此 NIH potency test 測量的是保護力，無涉及人類免疫系統之反應。如果我們對於疫苗的組成分、抗原結構及產生中和抗體之抗原決定位已有清楚的了解，則抗原量應可與疫苗效價具一定程度的關聯性。

回顧狂犬病疫苗效價替代試驗之發展，在 1970 年代，以單向免疫擴散法 (single radial diffusion, SRD)，在瓊脂中對狂犬病病毒抗原作相對的定量，1980 年代以抗體結合試驗(antibody binding test)測量動物或組織培養中病毒感染抑制性，另也同步發展以酵素免疫分析法(ELISA)方式測量病毒抗原，包括直接、間接及競爭型等結合試驗等。直到 2012 年，由動物替代試驗歐盟夥伴組織(European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing, EPAA)在法國舉辦「定義替代效價試驗研討會(Workshop on define alternate potency assay)」，並由 EPAA 及動物替代試驗歐盟參考實驗室(European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, ECVAM)贊助下，成立國際工作小組(international working group)，並決議以病毒醣蛋白(glycoprotein)做為 NIH potency test 的替代試驗。國際工作小組成員由政府、企業或機構之人類狂犬病疫苗專家所組成。2012 年 EPAA 會議決議以三明治、直接 ELISA 方式(sandwich, direct ELISA method)做為替代試驗之方法，並挑選最適合的 ELISA 試劑做為未來國際合作之參考方法，另將內部參考物質(internal reference)校正為 IU，如第 6 代 WHO 標準品包含 ELISA 效價(3 IU/瓶)。國際工作小組在 2015 年第二次會議中決議以 Sanofi Pasteur 方法做為後續國際合作之方法，原因為 Sanofi Pasteur ELISA 單株抗體可清楚辨別抗原結構上之變化，並可分辨 potent 及 sub-potent 疫苗批次間之差異。

(二)效價替代試驗可行性評估-恐懼因素(Substitutions for in vivo methods and potency test acceptability: The Fear Factor)

長久以來，各國均使用 NIH Potency assay 作為狂犬病疫苗效價之判定依據，如何在疫苗品質、安全及有效性與疫苗取得性之間取得平衡，需藉由衛生主關機關及疫苗製造廠的創新研究，及以科學為基礎之判斷、生產、測試試驗與管理標準，並取得各國衛生主管機關在生物藥品管理規範之國際協和。加拿大衛生部生物藥品評估中心(Center for biologics Evaluation, Health Canada)主任 Dean Smith 博士指出許多非活疫苗(non-live vaccines)的品質管控，可藉由疫苗製程、批次放行及穩定性試驗中進行嚴格控管，反而不需要使用動物試驗，如人類乳突狀病毒疫苗(Human Papilloma Virus (HPV) vaccines)為重組的病毒樣顆粒(recombinant viral-like particles)與疫苗佐劑(adjuvant)所組成，這類疫苗可以物理、化學方法及 ELISA 進行品質評估；另外腦膜炎雙球菌肺炎鏈球菌結合疫苗(Meningococcal and Pneumococcal Bacterial Conjugate Vaccines)為多醣體與載體蛋白結合而成，可藉由物理及化學方法進行品質管控。Dean Smith 博士亦提出疫苗生產過程(圖三)，包括疫苗設計、開發、流程控管及現行藥品優良製造規範(cGMP)，從生產到批次放行之間，至少經過 300 次以上不同品質項目之檢驗，應可確保疫苗品質之一致性。



圖三:疫苗生產流程示意圖

2012 年，歐洲藥典 5.2.14 章節草創之初，以替代方法取代動物試驗做為疫苗品質之管控(Substitution of in vivo method(s) by in vitro method(s) for the quality control of vaccines)，仍存在許多左右為難、進退維谷的局面(catch 22)，包括(1)狂犬病疫苗效價試驗 NIH potency test:儘管替代方法研發迄今已 35 年，包括 SRID、細胞中和試驗及以醣蛋白 ELISA (GP ELISA)偵測穩定性等，但至今仍未付諸於行；(2)一般安全性試驗(General Safety Test, GST for vaccines):在 1900 年，一般安全性試驗是用於檢測 phenol 及破傷風毒素(tetanus toxin)，後來演變為疫苗的一般安全性試驗；在德國生物藥品主管機關(Paul-Ehrlich-Institute, PEI) 20 年的努力下，終於刪除獸醫用疫苗之一般安全性試驗並減少歐洲藥典人類疫苗一般安全性試驗，但在歐盟、北美及 WHO/ national vaccine guidance worldwide，於申請人類疫苗藥物許可證時，仍舊要求須執行一般安全性試驗；(3)百日咳疫苗組織胺敏感性試驗(Pertussis vaccine HIST):儘管已努力 20 年，但在歐洲藥典、WHO 或各國指引，極少數真正施行 HIST 替代試驗；(4)類毒素不可逆試驗(Toxoid irreversibility testing): 儘管類毒素穩定性試驗可支持具藥物許可證疫苗類毒素之穩定度，但仍舊被要求須執行活體動物不可逆試驗；(5)兔子熱原試驗(Rabbit Pyrogenicity): 多數衛生主管機關仍傾向使用兔子熱原試驗勝於單核球活化試驗法(monocyte activation test)；(6)白喉、百日合、破傷風疫苗效價及安全性試驗(DPT potency and safety tests): 由於傳統路徑導致缺乏替代試驗之發展。

由於推動替代試驗之過程屢遭挫敗，因而促使 EDQM Group15 深入了解替代試驗之限制並破解動物試驗使用迷思。包括: (1)以狂犬病疫苗效價試驗為例，

由於 NIH potency assay 動物試驗結果變異性大，導致多中心參與之國際合作研究計畫失敗，而須以一對一與較一致性之替代試驗結果相互比較；(2)雖然動物試驗可用於測量複雜性功能反應的結果(complex functional responses)，但動物試驗仍無法作為標的族群(target population) 之有效性預測，動物試驗僅是具高度變異性之生物方法。然而以替代試驗做為品質管理的策略，可使用一個或更多的新方法去評估相同的品質，以一對一評估動物試驗及替代試驗可能不具科學之正當性，因此，替代試驗必須能提供疫苗重要、關鍵性品管的信心。

2017 年 EPAA 研討會強調以現代化科學作為生物製劑的品質監控，並以朝向實驗動物 3R(取代、減量及精緻化)全球化協和邁進，EPAA 指出，美國食品藥物管理局(FDA) 在 2015 年 6 月取消生物藥品進行一般安全性試驗(GST)的要求(21 CFR 610.11)。另疫苗製造廠表示由於白喉、百日咳、破傷風疫苗(DPT vaccines) 須執行多次動物效價及安全性試驗，除造成資源耗損外，另因冗長的動物實驗使得疫苗批次放行的時間延長，造成疫苗供應短缺。歐盟官方藥物品質管制實驗室(The National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)同步以替代試驗(ELISA)及動物效價試驗(in vivo potency assays)評估白喉和破傷風產品之品質，結果顯示替代試驗之靈敏度及穩定度皆優於動物試驗結果。

歐洲藥典 5.2.14 章節中定義所有品管試驗應可區分商品化批次放行之疫苗與臨床研究使用之安全、有效疫苗間之差異，如獸醫疫苗之標的族群；然而動物試驗原本就存在著固有的差異性，與替代試驗相比較，動物試驗較不適用於評估疫苗產品的一致性 & 製程改變等，因此以適當的替代試驗可提高安全、有

效之疫苗批次放行的預測性。因此 EDQM Group 15 強調以科學證據為基礎的討論，將有助於替代試驗的發展。

(三) 狂犬病疫苗效價替代試驗之助力及阻力 (Drivers and Barriers to Replacing the NIH Test for Rabies Vaccine Potency Testing)

來自荷蘭的 Marie-Jeanne Schiffelers 博士表示，依據利益關係人(stakeholder group)之調查結果，替代試驗研發工作對於衛生主管機關與疫苗製造廠而言，其阻力及助力皆有不同(表一及表二)。以衛生主管機關而言，替代試驗之研發工作所遭遇到的問題依序為害怕放行次效價(sub-potent)之狂犬病疫苗、NIH potency test 仍被認為效價判定之標準、技術上的限制及仍對 3R 替代試驗保留科學存疑態度及法規單位必須知道替代試驗與 NIH potency test 之關連性等，另主要之助力分別為與推動 3R 試驗之國際潮流接軌、動物福祉日漸重視、早期導入統計學及 NIH potency test 變異性大。

Main barriers	% of survey agreement	Main drivers	% of survey agreement
Fear for release sub potent rabies vaccine	75%	Taking regulatory needs onboard when developing 3R model	81%
NIH test still considered to be gold standard	74%	Animal welfare concern	73%
Technical limitations and remaining scientific questions of 3R models	69%	Early involvement statistician	69%
Regulators require correlation 3R model with NIH test	61%	Variability NIH test	57%

表一：衛生主管機關面臨替代試驗研發工作之阻力及助力

另疫苗製造廠開發替代試驗面臨到最大的阻力分別為缺乏國際調和、衛生主管機關間可接受之標準及定義不同、不清楚可接受的標準及產品專一性確效試驗；另主要助力分別為開發替代試驗具經濟效益，可縮短產品放行時間、NIH potency test 變異性大、結合 3R 模式是很有希望及動物福祉問題等。

Main barriers	% of survey agreement	Main drivers	% of survey agreement
Lack of harmonization	64%	Economic advantages by shortening time of release	82%
No shared definitions between regulators on acceptance criteria	62%	Variability NIH test	78%
Unclear acceptance criteria	58%	Combination of 3R models is promising	58%
Product specific validation needed	52%	Animal welfare concern	52%

表二：疫苗製造廠開發替代試驗時所遭遇之阻力及助力

(四)回顧動物替代試驗歐盟夥伴組織在狂犬病疫苗替代試驗及試劑取得性之努力(Overview of European Partnership for Alternatives to Animal Testing (EPAA) Efforts on Replacement of Animal Testing for Rabies Vaccines and Reagent Availability)

歐洲藥典 0216 專章以細胞培養產製之人類狂犬病疫苗(Rabies Vaccine for Human Use Prepared in Cell Cultures)及世界衛生組織技術報告系列 941(WHO TRS 941)指出，人類狂犬病疫苗可以 NIH potency test 來評估疫苗產品的效價，且每批次最後產品(final lot)必須進行效價試驗。然而如同先前所述，NIH potency test 會造成動物極大的痛苦與不適，且結果變異性大(25-400%)，另需在 BSL3 實驗室操作活的狂犬病病毒等。反觀替代試驗 ELISA 方法，依據歐盟藥典及 3R 策略中之取代(replacement)，有些疫苗製造廠及官方批次放行實驗室(Official Control laboratories)已混合採用 ELISA 方法以作為監控產品製造之一致性。

來自動物替代試驗歐盟夥伴組織(EPAA)的 Jean-Michel Chapsal 博士表示，EPAA 的宗旨將透過更佳且可預測性之科學方法來達到衛生主管機關對於動物替代試驗的要求，EPAA 的使命將促進國際合作交流以推動替代試驗的開發及接受，與成員間分享 3R 觀念並促進利益關係人(stakeholders)的對話以凝聚動物福祉(animal welfare)共識。

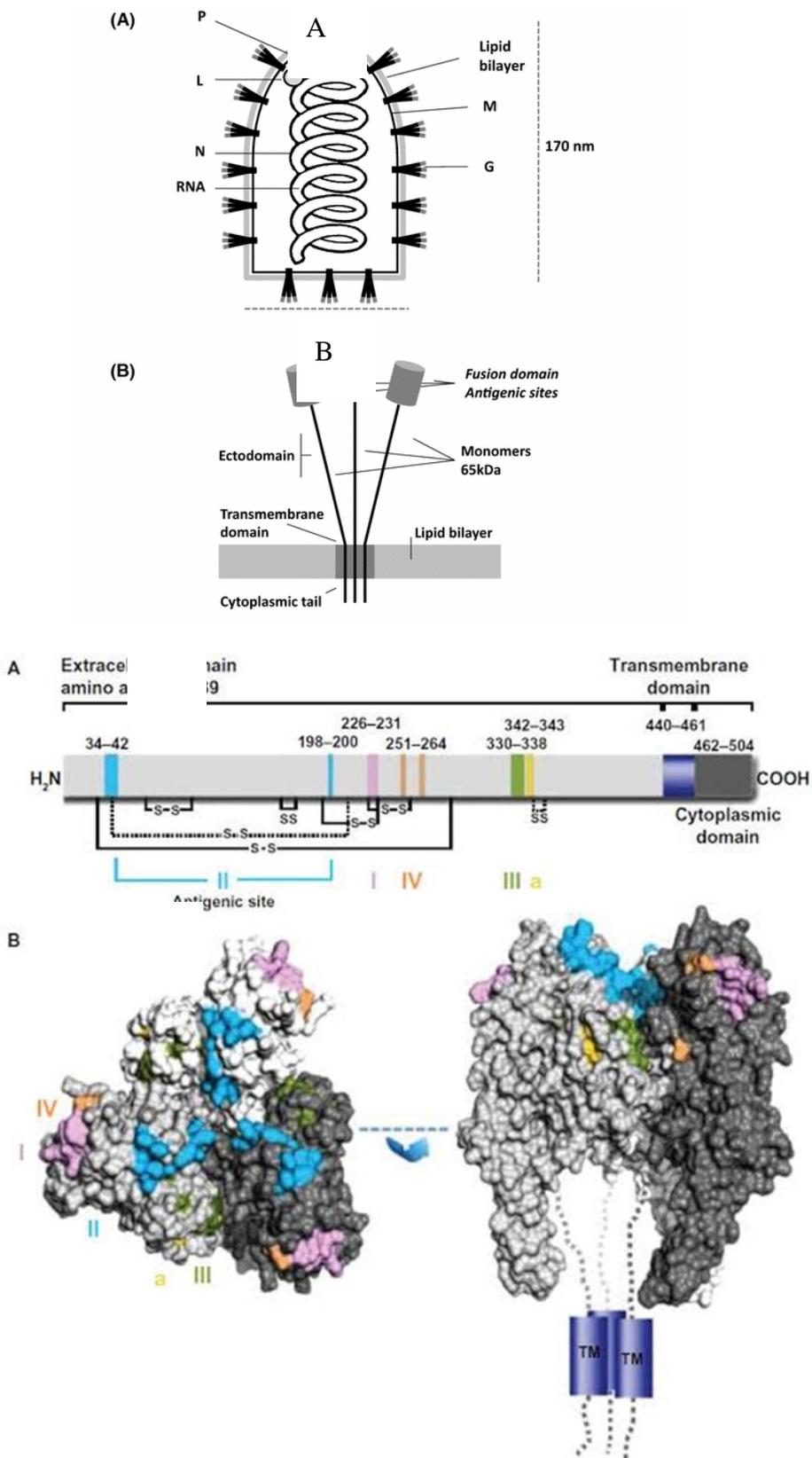
EPAA 目前推行替代試驗的計畫如下：

1. 急性毒試驗(Acute Toxicity)
2. 梭狀芽胞桿菌疫苗(Clostridial Vaccines)
3. 人類狂犬病疫苗(Human Rabies Vaccines)

4. 以最適策略評估皮膚敏感性試驗(Optimized strategies for assessing skin sensitization)
5. 生物藥品 3R 國際調和(International Harmonization of 3Rs in Biologics)
6. 農藥致癌性之預測(Prediction of Carcinogenic potential of agrochemicals)

另 EPAA 將優先開發人類及獸醫疫苗之替代試驗，人類疫苗以減量破傷風、白喉、非細胞性百日咳混合疫苗(DTaP)及狂犬病疫苗(Rabies vaccines)為主；獸醫疫苗則以狂犬病疫苗(Rabies vaccines)及 Clostridial vaccines 優先開發。

狂犬病病毒糖蛋白(G)結構如下(圖四)，包含 4 個 domains，分別為 single peptide (SP), ectodomain (ED), transmembrane 及 cytoplasmic domain (CD)。狂犬病病毒糖蛋白由 524 個胺基酸組成，分子量為 65kDa。具抗原性的狂犬病病毒糖蛋白是由 3 個 ectodomain、1 個 transmembrane 及 cytoplasmic 所組成，又稱為病毒「刺突」(spikes)。當病毒刺突與宿主細胞接受器(如 nicotinic acetylcholine receptors, neural cell adhesion molecule (NCAM)及 p75 neurotrophin receptor (p75NTR))結合後，會促使病毒套膜與細胞膜融合，進而感染細胞。目前已知 trimeric 糖蛋白具抗原性，會刺激人體免疫反應產生中和性抗體。



圖四:狂犬病病毒結構(A)及醣蛋白結構(B)

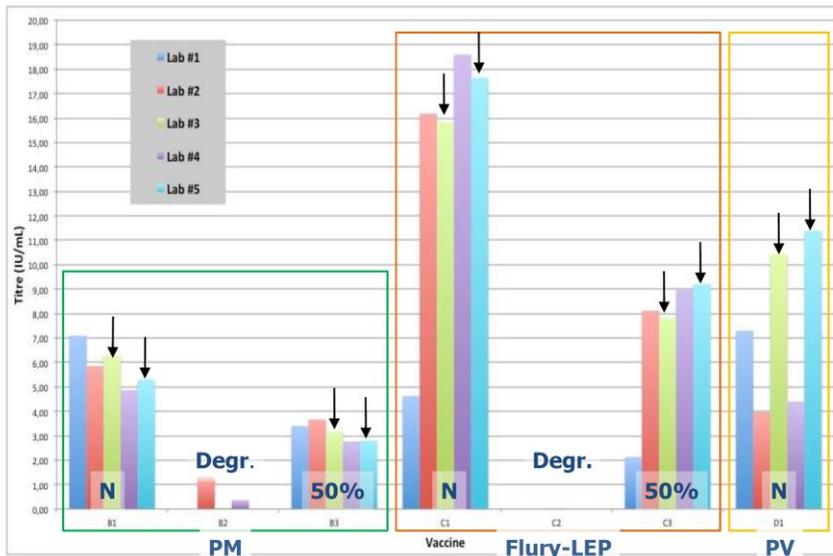
在先期試驗，EPAA 共邀請 5 家實驗室參與(2 家疫苗製造廠及 3 家國家管制實驗室)，同步評估 3 種不同的 ELISA 抗體組合之方法(圖五)。由三家疫苗製造商提供樣品，狂犬病病毒株包括 PM strain、Flury-LEP strain 及 PV strain，樣品樣態如下：未處理 Untreated (normal)、加熱處理 heat-treated(degraded)及混和未處理及加熱處理 mix of normal and degraded (50% spike normal)。

實驗結果顯示在 3 種狂犬病病毒株，以單株抗體 TJH 1112-1 及 D1-25 做為 coating 及 detection 抗體的組合，可清楚分辨未處理(normal)、熱處理後之降解疫苗(degraded)及 1:1 混合未處理及熱處理之疫苗差異性(圖六)。

	Source	Rabies strain	Assigned* glycoprotein content (IU/mL)	Assigned NIH potency value (IU/mL)
WHO 6 th IS (07/162)	NIBSC	Pitman-Moore	6.6 (reconstituted in 0.5 mL)	8 (reconstituted in 1 mL)
"Normal" (freeze-dried)	Manuf. A	Pitman-Moore	6.6	12.4
	Manuf. B	Flury LEP	13.6	2.7
	Manuf. C	PV	-	5 (reconstituted in 4 mL)
"Degraded" (freeze-dried)	Manuf. A	Pitman-Moore	<0.2	below detection level
	Manuf. B	Flury LEP	0.0	0.0
"50% spiked normal" (reconstituted)	Manuf. A	Pitman-Moore	2.8	3.0
	Manuf. B	Flury LEP	6.4	0.8

* by each manufacturer using own method

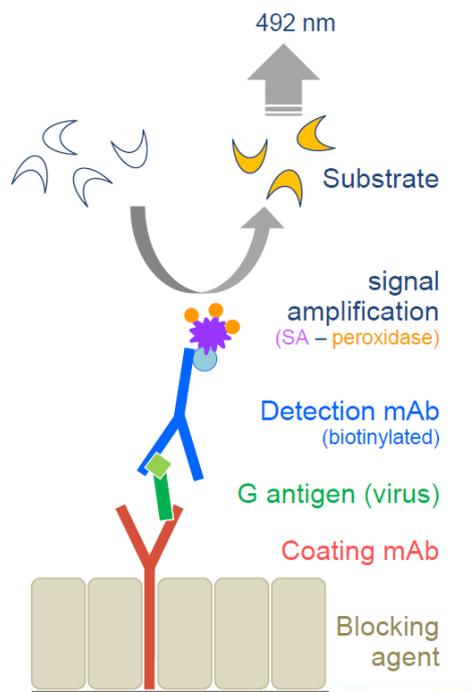
圖五：以 NIH potency test 及替代試驗評估狂犬病疫苗之效價結果



Lab	Coating Ab	Detection Ab
1	mAb (D1-25)	mAb (D1-25)
→ 3	mAb (TJU 1112-1)	mAb (D1-25)
→ 5		mAb (D1-25)
2	polyclonal	mAb (TW 17)
4		

圖六: 以 3 種 ELISA 抗體組合，評估狂犬病疫苗之品質

以下簡單介紹定量、直接三明治酵素免疫分析法(a quantitative direct sandwich ELISA method)(圖七)，本方法是將單株抗體 TJU 111-2 連接到一固定物上，先加疫苗檢體後，再加生物素連接的單株抗體(D1-25*biotinylated，)以抗生物素蛋白結合 peroxidase 酵素放大訊號，如此測得之酵素活性即代表抗原量之高低。

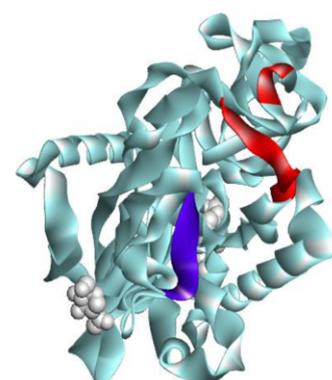


圖七: 定量、直接三明治酵素免疫分析法

以下介紹效價替代試驗 ELISA 方法中所選用的單株抗體(表三)，coating antibody TJU 1112-1 可辨認病毒醣蛋白結構中抗原位置 II (位於醣蛋白胺基酸 34-42 及 198-200 位置)，這兩個結構、不連續的抗原決定位間以雙硫鍵鍵結，可辨識所有基因型 1 之病毒株，包括 PV、CVS、PM 及 Flury LEP。

另 detection antibody D1-25 biotinylated 可辨識病毒醣蛋白抗原位置 III (醣蛋白胺基酸 330-338)，只可與 trimeric 醣蛋白結合，無法辨識 soluble form 的醣蛋白，D1-25 biotinylated antibody 可辨認基因型 1 和基因 6 之病毒株，包括 PV、CVS、PM、Flury LEP 及 EBL2。

Coating antibody	Detection antibody
TJU 1112-1 (Wistar Institute, USA)	D1-25 biotinylated (Pasteur Institute, FR)
Ig G1	IgG1
Antigenic site II (aa 34-42 & 198-200)	Antigenic site III (aa 330-338)
2 <u>conformational</u> and discontinuous epitopes linked by a S-S bridge	<u>conformational trimeric form</u> of the gp does NOT recognize the <u>soluble gp</u>
recognizes all genotype 1 strains (PV, CVS, PM, Flury LEP)	recognizes genotypes 1 & 6 strains (PV, CVS, PM, Flury LEP & EBL2)
neutralize strains used for the RFFIT on BHK21 cells (CVS-11, PM, Flury LEP)	



Other known antigenic sites
 site I : 226-231
 site IIIa : 342-343
 site IV : 251- 264

表三：狂犬病疫苗效價替代試驗中所使用之單株抗體特性介紹

Institute Pasteur 公司負責製造生物素結合及非生物素之單株抗體 D1-25，預計 2019 年可上市。單株抗體 TJU 1112-1 則由 Thomas Jefferson University 負責製造，預計 2018 年上市；這 2 支抗體非屬專利抗體。

在實驗過程中，以不同方式降解狂犬病病毒糖蛋白(G protein)，如 alkylation/reduction、加熱降解(heat degradation)及過量 beta-Propiolactone (BPL) 處理，單株抗體 D1-25 及 TJU 1112-1 組合皆可區分。BPL 廣泛使用於感染性物質的去活化，包括細菌、真菌及病毒等，一般常用於套膜病毒的去活化，許多研究顯示 BPL 處理後之病毒，會失去其感染力但不影響其抗原性。以下為狂犬病疫苗經不同濃度 BPL 處理後，以 ELISA 測得之結果(表四)。隨著 BPL 處理濃度增加，以 ELISA 方法獲得狂犬病疫苗之效價越低。

Sample	BIAcore (RU mAb used)		ELISA (IU/mL)
	D1-25	TJU 1112-1	
initial (no BPL treatment)	418	550	30.7
BPL 1/4000 (= ref. treatment)	372	513	31.4
BPL 1/2000	279	381	26.8
BPL 1/1000	312	419	19.7
BPL 1/500	81	89	6.2

表四：以 ELISA 偵測不同濃度 BPL 處理後之狂犬病疫苗效價

前期試驗結果顯示，狂犬病疫苗效價替代試驗 ELISA 方法中，所使用的單株抗體組合具專一性，僅可與糖蛋白 conformational trimeric form 結合，無法與 inactive soluble glycoprotein，可清楚分辨 potent 及 sub-potent 疫苗，並適用於目前商品化狂犬病疫苗所使用之病毒株。前期試驗的結果支持替代方法的可行性

及適用性，下一階段將規劃進行生物標準計畫(Biological Standardisation program (BSP))。

(五) 邁向全球性狂犬病疫苗效價替代試驗 (Moving towards a global replacement of the animal test for human rabies vaccines by an ELISA)

來自歐洲醫藥品品質審查委員會(EDQM)的 Eriko Terao 博士介紹生物標準化計畫 148(BSP148)計畫之緣由。由於 NIH potency test 存在許多爭議性議題，包括實驗過程中造成動物的不適與痛苦、非自然(腦內)攻毒途徑具科學爭議性、固有高變異性(25-400%)、需第三等級生物安全操作實驗室(BSL3)操作活的狂犬病病毒及花費高(包括 BSL3 設備之建置與維護、動物飼養費用及重複試驗等)。相對的效價替代試驗 ELISA 方法，符合歐洲藥典 3R 策略，且已有疫苗製造廠及歐洲官方藥品管制實驗室(OMCLs)混合使用，用於監測疫苗製造過程之一致性，然 NIH potency test 無法計算疫苗劑量。因此國際皆有共識，將 ELISA 方法用於不含佐劑之疫苗批次放行之可行性評估。

生物標準化計畫(biological standardization programme)於 1991 年創立，由歐盟理事會(European Union Commission)及歐洲醫藥品品質審查委員會(EDQM Council of Europe)共同資助，技術秘書處由 EDQM 理事會擔任。BSP 協調國際合作研究，以建立歐洲藥典工作標準品及試劑、提供實驗數據供歐洲藥典編修時之參考，尤其與 3R 方法有關、鼓勵國際生物藥品品質管制之調和化。

BSP 為獨立中立立場，其任務為提供管制實驗室、疫苗製造商、研究機構、歐盟或以外之區域、歐洲藥典及其他組織間之開放討論平台；BSP 接受成熟、

開放及不具專利之方法供外界使用；BSP 定期公布研究結果，並開放各界自歐洲藥典論壇生物科學筆記(Pharmeuropa Bio Sci Notes)登入查詢。目前 BSP 已進行 158 個計畫，其中 42 個計畫與方法改進有關，至少已有 25 個計畫與 3R 方法確效有關。其中與狂犬病疫苗 3R 計畫有關之研究分列如下，

獸醫狂犬病疫苗:

√ 單一劑量血清方法(Single-dose serology method) (BSP105, 2008-2011)

√ 多劑量血清方法(Multi-dose serology method) (BSP115, 2011-2018)-於

在 2015 年暫停施行，於 2018 年 1 月由 BSP 指導委員會議(BSP Steering Committee meeting)決議停止試驗。

人類狂犬病疫苗:

√ 替代方法(In Vitro method) (BSP148, 06/2016-)

BSP148 國際合作研究計畫為評估 EPAA 狂犬病國際工作小組所挑選的 Rabies G protein ELISA 方法之可行性及耐變性(Robustness)，並將研究結果提供歐洲藥典 group 15(人類疫苗)以作為編修藥典之參考，期望全世界可將標準化 ELISA 方法取代動物試驗，作為人類狂犬病疫苗品質之評估依據。BSP148 計畫主持人為法國 ANSM 的 Sylvie Morgeaux 博士及 EPAA 的 Jean-Michel Chapsal 博士所擔任，計畫協調者則由 EDQM/BSP Eriko Terao 博士擔任。

BSP148 將分為三階段執行，第一階段為準備期，第二階段為國際合作計畫研究，第三階段為報告期。在第一階段準備期，EDQM 已採購來自 3 家疫苗製造廠所生產之狂犬病疫苗，包含 aGV 及 PM 病毒株，並連繫 2 家單株抗體持

有機構進行量產，並將單株抗體商品化販售。目前 capture antibody 可由全球經銷商取得該產品，並經前測試(pre-test)及產品改進；detection antibody 目前仍生產製造中，預計 2019 年進行前測試及販售。目前 EDQM 正進行相關之實驗設計、建立操作流程及報告格式，並於 2018 年 7 月邀請全世界公眾實驗室(public laboratories)及疫苗製造商參與，包括歐盟、北美、非洲及亞洲等。

第二階段為國際合作計畫研究，參加者包括來自全世界的公眾實驗室及疫苗製造商，測試之疫苗檢體儘可能涵蓋不同種的狂犬病病毒株及 WHO 第 7 代狂犬病疫苗國際標準品 (WHO 7th IS for Rabies vaccines)。實驗設計如下: 3 次獨立試驗，每個檢體各進行 2 重複，測試方法包括由 EDQM 提供的 common ELISA SOP 及特定試劑(單株抗體)，若可以，也歡迎參加者使用自行建立之 ELISA 方法(in-house ELISA method)做比對；另 EDQM 會提供標準的報告格式並統計分析實驗數據。

第三階段報告期，評估替代試驗方法是否可作為一般常規批次放行之檢驗方法，另計算以 ELISA 替代試驗作為效價試驗時，疫苗產品應有的效價要求，如以 NIH potency test 作為狂犬病疫苗效價之判定時，該批次疫苗效價不得低於 2.5 IU/human dose。本研究計畫之目的將可用於編修歐洲藥典 0216 專章「以細胞培養產製之人類狂犬病疫苗(Rabies Vaccine for Human Use Prepared in Cell Cultures)」。

心得與建議

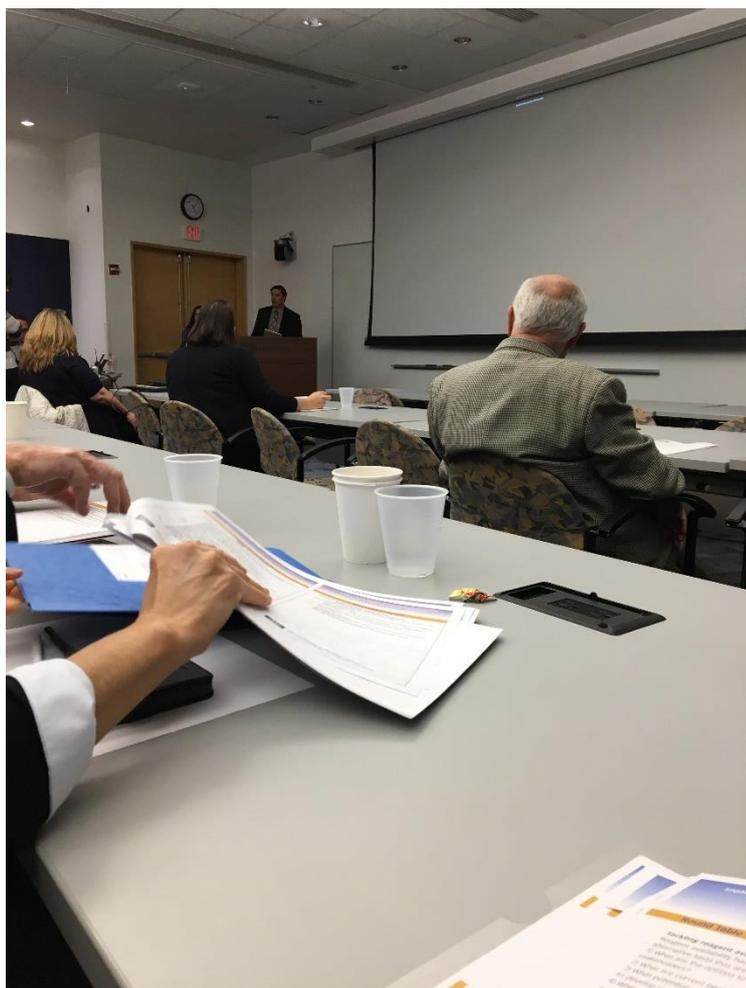
- (一) 本次研討會與加拿大衛生部生物藥品評估中心主任 Dean Smith 博士及歐洲醫藥品品質審查委員會 Eriko TERAO 博士建立友好、合作關係，其中 Dean Smith 博士在生物藥品(包括血液製劑、病毒性疫苗及細菌性疫苗)檢驗技術之開發上擁有豐富的經驗，建議未來可邀請這 2 位專家參與本署所舉辦之國際研討會，以提升我國生物藥品檢驗技術及增加國際交流合作。
- (二) 本次研討會獲邀參加 BSP148 國際合作計畫研究，可使我國生物藥品檢驗技術與國際接軌並增加台灣之能見度。另 IABS 每年皆會舉辦動物替代試驗相關研討會或座談會，建議本署可持續派員參加以獲取新知、以拓展國際人脈，並作為本署生物藥品檢驗技術開發之參考。

照片

馬里蘭州貝塞斯達(本次研討會地點)



本次研討會結束前所有與會者大合照



專題演講會場