

平成 21 年 12 月 2 日

E C B S 報 告

血液・安全性研究部長 浜口 功
検定検査品質保証室 落合 雅樹

WHO Expert Committee on Biological Standardization (WHO 生物学的製剤の標準化に関する専門家会議)に参加し、生物学的製剤の国際基準 (WHO Recommendation, Guideline) 及び WHO 国際標準品・参照品の制定に関する議論を通して、国家検定手法の国際協調の視点から最新の国際動向に関する情報を収集した。本会議で得られた国際的な動向は、今後わが国の国家検定制度を含めた品質管理システムを考えていく上で有益な情報と考えられた。以下に、本会議で議論された主な内容についてまとめた。

弱毒生インフルエンザワクチンの Recommendation 案が提案された。とくに SPF 鶏卵による製造ができない場合について、その場合の外来性ウイルス等を否定するための試験、そして製造施設を共用する際の切り替えなどが主な議論の対象となった。

昨年の ECBS の議論で再検討されることになったバイオシミラー(バイオ後続医薬品)の評価ガイドライン案がドラフティンググループにより改訂され再提案された。改訂案に対するパブリックコメントの中に、組換えワクチンも対象に入れるといった意見があったが、ワクチン(組換えワクチンを含む)及び血漿分画製剤(組換え製剤を含む)は、本ガイドラインの対象としないことが確認された。会議の中でガイドライン案に対して、用語解説に修正が加えられた。また、主に臨床評価における同等性試験/非劣性試験について議論された。

規制当局によるワクチンのロットリリースに対するガイドライン案が提案された。Independent Testing の実施に関して長時間の議論がされ、いくつかの追加案が提案されたが、会期中に参加者の合意にいたる案を作成することはできなかった。また、ガイドライン案では、ワクチン輸入国は製造国の Release Certificate の受け入れることや試験成績を参考にすることで、Independent Testing を省略できるとの記載があるが、現実的には欧州内では相互承認により欧州輸出向け製品の Release Certificate の発行・受入体制が整えられているが、一般に輸入国に対して製造国の Release Certificate が送付されているわけではないこと、また製造国(Release Certificate 発行国)とはどの国を意味するのかなど問題点が指摘された。ガイドライン案では、そうした背景を考慮してワクチンのロットリリースは、自国向け、輸出向けによらず同じ規制により実施すべきであることが記載されている。また、各国の規制当局は自国で使用するワクチンの品質を保証する責任があることか

ら、プロトコールレビュー及び Independent Testing の実施について、最終的な判断は各国の規制当局にあるべきとの主張がされた。その他の部分については、数カ所の軽微な修正が加えられた。

肺炎球菌結合型ワクチンの Recommendation 案が提案された。会議では主に臨床評価で得られた各血清型に対する IgG 抗体量の基準値について主に議論された。参加者からの指摘により部分的な修正はあったが、Recommendation 案は概ね合意された。

不活化ポリオワクチン(IPV) 3rd WHO 国際標準品の国際共同研究の成績(D 抗原 ELISA) が報告された。現在の 2nd WHO 国際標準品の力価が低下していることが明らかとなり、欧州局方標準品(BRP1) に対して標準化が実施された。しかしながら2つの候補品のいずれに対しても施設間で結果に大きな食い違いが認められたことから、さらなる研究の必要性が認められた。当面は欧州局方標準品(BRP1) を暫定的な WHO 国際標準品とすることになった。現在、日本で開発が進められている弱毒 Sabin 株由来 IPV も研究に含まれていたが、Sabin-IPV では強毒株由来-IPV との用量反応との間に平行性が認められず、Sabin-IPV の評価には用いることができないとの結論であった。

Sabin 株由来弱毒生ポリオワクチン(1型)の MAPREC assay に用いる 1st WHO 国際標準品および3種の 1st WHO 国際参照品の国際共同研究結果が報告され承認された。本 assay では、Sabin ワクチン(1型)の 480、525 番目の塩基置換(変異)の蓄積を観察している。

ヒトパピローマウイルス(HPV) -16型ヒト抗血清(05/134)は、2007年の ECBS で 1st WHO 国際標準品として制定することが提案された。しかし、含湿度試験結果にバラツキがあり安定性が疑われたため、当面 WHO 国際参照品として位置づけられることになった。その後の安定性評価成績が得られ、WHO 国際標準品として制定することがあらためて提案された。実保存温度によるリアルタイムモニタリング評価成績と加速試験の評価成績(追加資料)が示され 1st WHO 国際標準品として承認された。

HPV-6型及び11型 DNA の作成計画について提案され承認された。

A 型インフルエンザワクチン H5N1 株クレードル 2 及び Pdm-H1N1 株に対するヒト抗血清の WHO 国際標準品の必要性について紹介された。

百日咳菌凝集素(Fimbriae 2 及び Fimbriae 3) に対するモノクローナル抗体の国際共同研究の成績が報告され 1st WHO 国際標準品として承認された。評価成績として、品質(主に安定性に関わる指標)、安定性、特異性について報告された。

BCG ワクチンの亜型3種(デンマーク株、東京株、モスクワ株)の国際共同研究の成績が報告された。共同研究では、コロニー形成単位、ATP assay (modified) による定量及び multiplex PCR (一部参加施設) が実施され、その評価成績が報告された。デンマーク株及び東京株は WHO 国際参照品として承認されたが、モスクワ株は含湿度の成績が示されなかったことから、含湿度の成績を待つことになった。

沈降ジフテリアトキソイドの国際共同研究(WHO/EDQM) 成績が報告され 4th WHO 国

際標準品（モルモット攻撃法）として承認された。共同研究では、モルモット攻撃法に加え、マウス（Vero cell法）、モルモット（Vero cell法、ELISA法）が試験可能な施設では実施された。マウス、モルモットを用いたいずれの Vero cell 法においてもモルモット攻撃法と同等の成績が得られ、これらの試験法のバリデーションにも用いることが可能であると考えられた。モルモット ELISA 法では、攻撃法との間に有意な差が認められ、本標準品の使用は適さないと判断された。

今後の WHO 国際標準品、参照品の作成計画が提案され、マイコプラズマ DNA を除き承認された。マイコプラズマ DNA の標準品作成については、広範囲の専門家の意見を聞く必要があると判断されたため、本会議では承認されなかった。

厚生労働科学研究費補助金
(厚生労働省医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書

新型インフルエンザワクチンに対する日米欧国家検定の比較

研究分担者：佐々木次雄（医薬品医療機器総合機構、品質管理部）

研究協力者：櫻井 信豪（医薬品医療機器総合機構、品質管理部）

研究要旨：新型インフルエンザワクチン（H1N1）に対する国家検定制度を日米欧で比較した。収集情報より、日本と欧米の違いを要約すると、①日本とドイツは検定料金を支払い、試験項目も明らかにしているが、米国、カナダでは無料であるためか、試験項目は明らかにされていない、②日本では検定用製品の抜き取りは薬事監視員が行うが、欧米では製造所が行い、製造後直ちに製品を検定機関に送付することが可能である、③出荷承認書（日本の検定結果の通知）は、日本では郵送であるが、欧米ではF a x又はE-メールで行っている、③日本では検定合格品に検定証紙を貼付しなければならないが、欧米では貼付しない。日本は戦後GHQ指導の下に導入された検定制度を現在も忠実に守っている。ある意味では非常に保守的な制度であり、今後、検定品の抜き取りや検定合格証紙の貼付等については、海外の現状を考慮しつつ見直し検討も必要と思われる。

A. 研究目的

長い間、日本の検定制度に身を置いてきた者にとって、2004年にWHO調査団から指摘されたサマリーロットプロトコル（SLP）の導入は、ある意味で「黒船来襲」に近いものがあった。SLP評価はグローバル基準であることは理解しつつも、その導入に当たっては百花繚乱の議論があった。議論の中で、現在の検定試験の中には必ずしも国で行う必要性の無い試験も含まれているが、一旦検定項目から外す

と再度検定に組み入れることが難しく、躊躇している節も伺えた。問題は、試験項目毎に検定料金が定まっており、検定機関である国立感染症研究所にも厚労省にも試験項目を選定する余地が無いことである。そこで、昨年来国民の関心を集めた新型インフルエンザワクチン（H1N1）の品質を各国の規制当局がどのように保証しているかを、ドイツ、カナダ、米国及び日本で比較した。

B. 研究方法

国立感染症研究所における検定制度については2年前まで勤務していたこともあり、概ね理解してはいるが、詳細については確認した。ドイツのA社、カナダのB社、B社の米国委託製造所C社からは調査目的を説明し、了解の下、資料を入手した。

C. 研究結果

【EUにおける検定制度】EUにおけるヒト用生物製剤（ワクチン、血液及び分画製剤）の国家検定は、加盟国共通基準である Official Control Authority Batch Release (OCABR) によって行われる。OCABR の下に共通のガイドラインや試験手引き書があり、各国はそれらを母国語に翻訳したものを使用している。検定は各国の OMCL (Official Medicine Control Laboratories: 医薬品や食品の試験検査を行う公的な試験検査機関) で行う。欧州委員会の1部局である欧州医薬品品質管理理事会 (EDQM: European Directorate for the Quality of Medicines) は、各国の OMCL で行った試験成績を加盟国が相互承認するために、2003年から各 OMCL に相互承認規格である ISO/IEC 17025 を取得させることに努めてきた。EU加盟国は現在27国であるが、OMCL は80以上登録されている。ワクチンは全ロットが国家検定対象になっており、A社で製造したワクチンは、ドイツの OMCL であるポールエールリッヒ研究所 (PEI: Paul-Ehrlich-Institute) で

国家検定を受ける。A社の説明によると、PEI には約750名の職員がおり(内250名が学位修得者)、生物学的製剤の承認に係わる規制業務と国家検定機関の両機能を有しているとのこと。そのため、H1N1ワクチンの場合、開発段階から実製造、臨床治験、市販承認に至るまで連日のようにPEIから助言をいただいていたとの説明であった。

【ドイツにおける国家検定】検定は、EU共通指令 (Directive 2001/83/EC) 第114条に基づいて行われる。検定品は日本では薬事監視員が抜き取り、検定成績が出るまでは封印保管されるが、EUでは製造後直ちに製造者が決められた本数を抜き取り、OMCL に送る。製剤品目毎に検定料金が決まっており、新型インフルエンザワクチン (H1N1) の場合、2660 Euro (345,000円) である。同じ単原液から複数の最終バルクを製造する場合には、最初のバッチが2660 Euro でサブバッチは主バッチ料金の1/4 (665 Euro) になる。試験項目は力価試験とエンドトキシン試験のみである。一方、日本では試験項目数も多く、検定料金は力価試験を一元放射免疫拡散試験 (SRD) で行うか、卵中和試験で行うかによって異なるが、料金はEUの2倍である。検定申請は当該ロット製品のサマリーロットプロトコル (SLP) 提出時に行う。出荷承認書はPEIよりFaxで送られてくる(資料1)。PEIでの検定に合格したロット製品をEU圏の他国に出荷する際には、合格証明書とSLP

を当該国の規制当局に提出する。提出後、7日以内に何も言っておかなければ当該国で販売できるシステムになっているとのこと。日本と違い、検定合格品を出荷する際に“検定合格証紙”を貼付しないが、検定に合格しない製品が市場に出回るようなことは無いとのことだった。

【標準品】試験実施に当たって必要な標準品は、通常、英国の OMCL である NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) から供給を受ける。新型インフルエンザワクチン (H1N1) の力価試験 (SRD) に用いる標準品 (抗原及び抗血清) は南半球向け製品については TGA (Therapeutic Goods Administration、オーストラリア) 提供のもの、北半球向け製品については NIBSC 提供のものを使っていた。TGA の標準品を使用した理由は、TGA の標準品作製が早かったためとの説明であった。抗原は TGA と NIBSC では同じ株を使用していた。EU は、EU 以外の国 (オーストラリア、ニュージーランド、カナダ、スイス) と相互承認 (MRA: Mutual Recognition Agreement) を締結しており、TGA から標準品を提供していただくのはそう難しくは無いとのことだった。EU は現在 MRA 締結の拡大を図っている。MRA 締結の目的は、①査察結果の情報をパートナー間で共有する、②企業のうける査察回数を減らす、③輸入の際の査察、規格試験の省略にある。今後、日本

も EU との MRA 完全締結に向けて努力が必要であろう。

【ドイツにおける GMP 査察】ドイツにおいては GMP の査察は国レベルでは行わず、16 ある各州が担当している。このため 16 州間の調整およびドイツの EMEA 代表として ZLG が存在する。ZLG はドイツ国内 16 州の GMP 査察の機関 (約 120 名の査察官) の調整や査察結果の国外への連絡 (日本へはドイツ連邦政府が行う) 等を行う。ZLG の医薬品部門は 4 名で査察自体は行わない。年 1 回 1 週間にわたる合同査察官会議は行うが、教育は各州が責任を持つシステムになっている。ただし、幾つかの州がグループを作り模擬査察などの教育を行うようである。A 社への査察は、通常、州の査察官 1 名と専門家として EPI から 1 名が参加していた。

【カナダ及び米国における検定制度】カナダの検定はヘルスカナダの付属組織である BGTD (Biologics and Genetic Therapies Directorate) で、保健大臣 (Minister of Health) が発行した Guidance for Sponsors: Lot Release Program for Schedule D (Biologic) Drugs に基づいて行われる。本ガイダンスによると、ワクチンの出荷基準は 4 グループに分かれており、承認前はグループ 1 A (臨床治験用) とグループ 1 B (新薬申請用、均質性確認)、承認後はグループ 2~4 に分かれており、ワクチンはグループ 2 に該当する。ワクチンは全ロットが国家

検定対象になっている。日本やEUとは違い、検定料金は無料である。その代わり、検定申請者は何の試験が行われるかについては知らない。検定必要本数は決められており、製造者が抜き取ってBGTDに送付する。BGTDによる評価のために、検体の他に試験プロトコル及び／又は試験成績書を提出しなければならない。BGTDによる検定期間は、全ての要求された情報及び検体を受理してから6週間以内である。ただし、市場に流通している製品に不足が発生する危険性のある場合やその他正当な理由がある場合には、早く判定することも可能になっている。

AREPANRIX™ H1N1 (Lot : A80CAxxxA) の検定申請日は2009年12月9日 (資料2)、検定合格通知 (RELEASE LETTER) の発行日は2009年12月10日 (資料3) と申請翌日には合格通知がFaxで送られてきていた。EU同様、検定合格証紙の貼付はない。米国における検定制度も基本的にはカナダと同様であり、検定機関はFDA (CBER) である。

D. 考察

日本と欧米におけるワクチンの検定制度を比較すると、以下の点が大きく異なる。①検定品は製造者が抜き取り、製造後直ちに検定機関に送付できる、②検定品提出とは別に製造及び試験成績の要約版 (SLP) を提出しなければならない、③通常、検定申請時 (SLP提出時) には先に送付した検体に対する試験は完了しており、SLP評価後直ちに“出荷承認書 (Release Letter)

がFax (ドイツ、カナダ) 又はe-mail (米国) で申請者に送られてくる、④検定合格ロット製品に対しては”検定合格証紙“のようなものは貼付しないで出荷している。日本とEUは検定料金を支払うこともあり、検定機関における試験項目が予め規定されている。EUでの検定試験は、H1N1ワクチンのみならず他のワクチンも力価試験中心であるが、日本では安全性や均質性に関する試験項目が多い。H1N1ワクチンのSLPも入手したが、その内容は簡潔であり、日本でも同程度のSLP導入なら難なく可能と思われる。

E. 結論

戦後、GHQの指導のもと導入された現行検定制度は、指導者である米国とも大きくかけ離れたものとなっている。申請者が検定料金を支払う制度はEUと同じであるので、これは原則堅持するとしても試験項目数は力価試験を中心にして、安全性試験や均質性試験は一定期間 (又は一定ロット数) 行ったら検定項目から削除するのが望ましい。欧米のように、検定品を製造者が抜き取り、SLP提出前に検定機関に送付することが可能なら製造者にとってもメリットは大きい。薬事監視員が抜き取らなければならない科学的根拠は特に見いだせない。また、検定合格品への“検定合格証紙”貼付は、製造現場においては大変な作業である。ワクチンの流通上、“検定合格証紙”が無ければ支障を来すようなも

のではない。これらについては今後、検討する必要がある。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. Horino A., Kenri T., Sasaki Y., Okamura N., and Sasaki T. Identification of a site-specific tyrosine recombinase that mediates promoter inversion of phase-variable *mpl* lipoprotein genes in *Mycoplasma penetrans*.

Microbiology 155: 1241-1249, 2009.

2. 神谷茂、蔵田訓、佐々木次雄、柳田修、跡見裕：Helicobacter pylori とマイコプラズマの重複感染、Helicobacter Research 14: 33-38, 2010.
3. 佐々木次雄：国際調和を踏まえた無菌試験法の改正、医薬品研究 40: 432-441, 2009.

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1 日米欧におけるインフルエンザワクチン（H1N1）の国家検定制度

	日本	ドイツ	カナダ	米国
法的根拠	薬事法第43条	Directive 2001/83/EC		
国家検定機関	NIID	PEI	BGTD	FDA (CBER)
検定品提出時	自家試験終了後（併行検定可）	製品製造後	製品製造後	製品製造後
検定品採取者	地方薬事監視員	製造者	製造者	製造者
送付本数	0.5mL x 142本 1mL x 72本 5mL x 11本 10mL x 9本		8本（16本）	（20mL、5本）
検定料金	635,500円（SRD） 808,200円（卵中和）	2660ユーロ	無料	無料
SLP	検定品提出時	自家試験終了後	自家試験終了後	自家試験終了後
試験項目	分画試験、エーテル否定試験、たん白質含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、異常毒性否定試験、マウス白血球数減少試験、力価試験	力価、エム・トキソ	不明	不明
検定合格証明書	郵送		Faxで受理	e-mailで受理
証明書受理時期			通常、1日	（20日以内）
検定証紙	貼付	なし	なし	なし

外国における（ ）内は季節性インフルエンザワクチン

NIID (National Institute of Infectious Diseases、国立感染症研究所)

PEI (Paul-Ehrlich Institute)

BGTD (Biological and Genetic Therapies Directorate)

SLP (Summary Lot Protocol、製造バッチ記録)

表 2. 国内外で製造した新型インフルエンザワクチンの国家検定内訳

送付本数	<p>A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : 内容量が 0.5mL であるとき : 142 本、内容量が 1mL であるとき : 72 本、内容量が 5mL であるとき : 11 本、内容量が 10mL であるとき : 9 本</p> <p>沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) : 中間段階 : 原液を最終バルクと同濃度に希釈したものにつき、1 容器 2mL 入りのもの 2 本、1 容器 5mL 入りのもの 2 本及び 1 容器 20mL 入りのもの 1 本、最終段階 : 内容量が 1mL であるとき : 28 本、内容量が 10mL であるとき : 8 本</p> <p>乳濁 A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : 専用混和液が同一の製造番号のもので構成されるとき : 抗原製剤 13 本及び専用混和液 9 本、専用混和液が 2 種類の製造番号のもので構成さえるとき : 抗原製剤 16 本及び専用混和液を製造番号ごとに 9 本、計 18 本</p> <p>乳濁細胞培養 A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : 内容量が 6mL であるとき 13 本</p>
検定料金	<p>A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : 一元放射免疫拡散試験法を用いるとき : 635,500 円、卵中和試験法を用いるとき : 808,200 円</p> <p>沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) : 中間段階 : 一元放射免疫拡散試験法を用いるとき : 551,900 円、HA 含量試験法を用いるとき : 444,400 円、最終段階 : 159,500 円</p> <p>乳濁 A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : 専用混和液が同一の製造番号のもので構成されるとき : 462,200 円、専用混和液が 2 種類の製造番号のもので構成さえるとき : 606,800 円</p> <p>乳濁細胞培養 A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : 410,000 円</p>
試験項目	<p>A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : 分画試験、エーテル否定試験、たん白質含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、異常毒性否定試験、マウス白血球数減少試験、力価試験</p> <p>沈降インフルエンザワクチン (H5N1 株) : 中間段階 : 力価試験、発熱試験、エンドトキシン試験、最終段階 : アルミニウム含量試験、たん白質含量試験、異常毒性否定試験</p> <p>乳濁 A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : α トコフェロール及びスクワレン含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、異常毒性否定試験、力価試験</p> <p>乳濁細胞培養 A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) : スクワレン含量試験、異常毒性否定試験、力価試験</p>

一部、表 1 内容を再掲

(資料1：ドイツにおける出荷承認)

Paul-Ehrlich-Institute
2009年11月20日
証明書番号 76xx/09

A社名
A社の住所

EC/EEA OFFICIAL CONTROL AUTHORITY BATCH RELEASE TESTING CERTIFICATE FOR IMMUNOLOGICAL PRODUCTS

指令 2001/83/EC(免疫学的医薬品)第 1 1 4 条に基づいて試験した結果、Official Control Authority Batch Release の要求手法に適合していた。

製 品	内 容
国際的非独占名/EP名/一般名	Pandemic H1N1 Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, cell-culture-derived, adjuvanted)
バッチ番号、本バッチに関連した他の 識別番号	0 0 8 0 x x A - Z
容器タイプ	シリンジ
本バッチの容器総数	1 9 9, x x x
有効開始日	2009年10月22日
容器当たりの接種数	1
有効期限日	2010年4月22日
出荷許可番号	PEI. H. 11428.01.1
製造所名及び住所	A社名 A社の住所
もし異なるなら販売権者名と住所	

本バッチは、品質マネジメントシステムに示された様式に沿い、文書化された試験手法を用いて試験した。

本試験は、以下の何れかに基づいている；

- 本製品に関連するガイダンスノート。関連するガイダンスノートが無い場合には、
- 製造所から提出されたプロトコル及び販売承認書示されている適切なラボ試験成績の評価

本バッチは、関連する欧州薬局方及び上記の販売承認書に示されている承認された規格に適合している。

Dr. E. Krelzschmar
ウイルス性ワクチン部門
Federal Agency for Sera and Vaccines
Paul-Ehrlich- Straße 51-59
D-63225 Langen
Postfach D-63207 Langen

(資料 2 : カナダにおける検定申請)

2009 年 12 月 9 日

B 社名

Cynthia Allen and Helen MacDonald-Piquard
Pandemic Influenza Division
Centre for Biologics Evaluation
Biologics and Genetics Therapies Directorate
100 Eglantine Driveway
2nd floor, Room 2110
A/L 0602A Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario
K1A 0K9

Arepanrix™ H1N1- A80CAxxxA のカナダ市場出荷について

Cynthia Allen 殿
Helen MacDonald-Piquard 殿

抗原ロット (AFLPAxxxAA) に対する出荷プロトコルのコピー、及び組み合わせロット (A80CAxxxA) に対する製造フローシート、並びにアジュバントロット (AA03AxxxAA) に対する関連文書をお送りします。

最終 AREPANRIX™ H1N1 ロット (A80CAxxxA) の構成は下記の通りです。

抗原ロット : AFLPAxxxAA
アジュバントロット : AA03AxxxAA
製造本数 : 17500 ドーズ

本剤の出荷に関連して何か疑問とかコメントがありましたら Mr. Richard Ippersiel (Tel : 450-978-xxxx) に遠慮無くご連絡下さい。
全てが貴方を満足させることを望んでいます。

Sonia Proulx
品質保証製品マネージャ
Fax : 1-418-577-xxxx

(資料3：カナダにおける出荷承認)

RELEASE LETTER

2009年12月10日、ヘルスカナダ

保証人／製造者	B社名 B社の住所
Fax	418-577-xxxx
宛先	Mme Amélie Lapierre、品質保証部責任者
受付番号	2009-B B-xxxx
製品名	Arepanrix H1N1
正式名	Q-PAN H1N1 (AS03 adjuvanted)
ロット番号	A80CAxxxA

上記ロットは“Biologics and Genetics Therapies Directorate”によってカナダ国内での販売が承認されたことを通告する。

Akine Rinfret, Ph.D.
ウイルス性ワクチン部門、責任者
Biologics and Genetics Therapies Directorate

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizitani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.	Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates.	Journal of General Virology	90	2266-2271	2009
Horino A., Kenri T., Sasaki Y., Okamura N., and Sasaki T.	Identification of a site-specific tyrosine recombinase that mediates promoter inversion of phase-variable mpl lipoprotein genes in <i>Mycoplasma penetrans</i> .	Microbiology	155	1241-1249	2009
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.	Biologicals	37	8-17	2009
Momose H, Imai J-I, Hamaguchi I, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Masumi A, Maeyama J-I, Takizawa K, Kuramitsu M, Nomura N, Watanabe S, Kazunari Yamaguchi K	Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines.	Jpn J Infect Dis,	63	25-30	2010
神谷茂、蔵田訓、佐々木次雄、柳田修、跡見裕	Helicobacter pyloriとマイコプラズマの重複感染	Helicobacter Research	14	33-38	2010
佐々木次雄	国際調和を踏まえた無菌試験法の改正	医薬品研究	40	432-441	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

Short
Communication

Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates

Masayuki Saijo,¹ Yasushi Ami,² Yuriko Suzaki,² Noriyo Nagata,³ Naoko Iwata,³ Hideki Hasegawa,³ Itoe Iizuka,¹ Tomoyuki Shiota,¹ Kouji Sakai,² Momoko Ogata,¹ Shuetsu Fukushi,¹ Tetsuya Mizutani,¹ Tetsutaro Sata,³ Takeshi Kurata,³ Ichiro Kurane¹ and Shigeru Morikawa¹

Correspondence
Masayuki Saijo
msaijo@nih.go.jp

¹Special Pathogens Laboratory, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases (NIID), 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

²Laboratory of Animal Experimentation, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

³Laboratory of Infectious Disease Pathology, Department of Pathology, NIID, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan

Monkeypox virus is divided into Congo Basin and West African strains. The virulence and pathophysiology of two strains, Zr-599 (a Congo Basin monkeypox virus) and Liberia (a West African monkeypox virus), were evaluated in non-human primates. Four monkeys were infected by the subcutaneous (SC) and two by the intranasal (IN) inoculation routes for Zr-599 and Liberia at a dose of 10^6 p.f.u. One monkey in the Liberia/SC group was demonstrated to be co-infected with Gram-positive cocci and was excluded from analyses. Infections in three of the four Zr-599/SC monkeys and in one of the three Liberia/SC monkeys were fatal. Virus genome levels in blood in the Zr-599/SC monkeys were approximately 10 times higher than those in the Liberia/SC monkeys. Zr-599 affected respiratory, genito-urinary and gastrointestinal tract organs more severely than Liberia. Zr-599 was more virulent than Liberia and one of the factors might be the difference in organ tropism.

Received 8 January 2009
Accepted 26 May 2009

The species *Monkeypox virus* belongs to the genus *Orthopoxvirus*, family *Poxviridae*. Monkeypox viruses cause human monkeypox in humans inhabiting the rainforests of central and western Africa (Arita *et al.*, 1985; Damon, 2007; Heymann *et al.*, 1998). Wild rodents (*Funisciurus anerythrus* and *Helioscirus rufobrachium*) were implicated as the most probable reservoir (Khodakevich *et al.*, 1987). Human monkeypox is endemic to central and western Africa (Khodakevich *et al.*, 1988). An outbreak of human monkeypox was reported in the Democratic Republic of Congo (DRC) (Khodakevich *et al.*, 1988; Learned *et al.*, 2005; Mukinda *et al.*, 1997). Human monkeypox outbreaks outside Africa were first reported in the USA in 2003 (Di Giulio & Eckburg, 2004; Guarner *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2004). In that outbreak, patients acquired the virus from prairie dogs (*Cynomys* spp.) that became ill after contact with various exotic rodents shipped from Ghana, Africa (Reed *et al.*, 2004).

Two clades of monkeypox virus exist: West African and Congo Basin monkeypox virus (Likos *et al.*, 2005). Human

and monkey disease virulence differs between Congo Basin and West African strains, the former being more virulent in non-human primates (Chen *et al.*, 2005). The clinical manifestations of human monkeypox are reported to be similar to those of smallpox (Arita *et al.*, 1985; Breman *et al.*, 1977, 1980; Foster *et al.*, 1972; Janseghers *et al.*, 1984; Jezek & Khodakevich, 1987; Stagles *et al.*, 1985). This study describes the clinical manifestations and laboratory and pathological findings in cynomolgus monkeys infected with Congo Basin or West African monkeypox virus. The virulence of Congo Basin and West African monkeypox virus was compared. Furthermore, the pathophysiological mechanisms behind the difference in virulence between these two monkeypox viruses were elucidated.

Monkeypox virus strains Zr-599 (a representative Congo Basin strain) and Liberia (a representative West African strain) were used. Zr-599, isolated from a patient in the DRC, and Liberia, isolated from a patient with human monkeypox in Liberia, were assigned to the Congo Basin and the West African clades, respectively, according to A-type inclusion body gene sequence (Likos *et al.*, 2005). Virus solution for challenge experiments was prepared by disruption of Vero E6 cells infected with each monkeypox

Supplementary figures and tables are available with the online version of this paper.

virus strain in a sonicator (TITEC Ultra S Homogenizer UP-5) for 30 s at full power, followed by high-speed centrifugation (3500 r.p.m. for 5 min at 4 °C). The infectious dose of the virus was determined by plaque assay.

Twelve cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) were used (see Supplementary Table S1, available in JGV Online). They were classified into four groups: Zr-599/SC, Liberia/SC, Zr-599/IN and Liberia/IN. Monkeys #4651 and #4653 (Zr-599/SC) and #4595 and #4596 (Liberia/IN) were used in a previous study in which the efficacy of a smallpox vaccine, LC16m8, was evaluated (Saijo *et al.*, 2006). Other monkeys were also used as control subjects in the study for the evaluation of LC16m8 efficacy. A monkey in the Liberia/SC group (#4567) died on day 10 post-inoculation. This subject was demonstrated to be co-infected with Gram-positive cocci and was excluded from further analyses.

Complete blood-cell counts in peripheral blood collected in sodium heparinized tubes were measured. C-reactive protein (CRP) was measured as an indicator of inflammation level.

Vaccinia virus-specific antibody levels were measured by ELISA using the entire suite of vaccinia virus proteins as antigens, as reported previously (Morikawa *et al.*, 2005; Saijo *et al.*, 2006). Although the IgG response in monkeys #4651 and #4653 from the Zr-599/SC group and #4595 and #4596 from the Liberia/IN group had already been determined as reported previously (Saijo *et al.*, 2006), the IgG response in all of the monkeys, including the four previously tested monkeys, was determined simultaneously. Virus genome levels were determined by a quantitative real-time PCR (qPCR) method as reported previously (Saijo *et al.*, 2006, 2008). Although the virus genome level in monkeys #4651 and #4653 from the Zr-599/SC group and #4595 and #4596 from the Liberia/IN group had already been determined in a previous study (Saijo *et al.*, 2006), the virus genome level in the peripheral total blood of all of the monkeys, including the four previously tested monkeys, was determined simultaneously. All challenge experiments were conducted in a highly contained laboratory in which a glovebox class III safety cabinet was installed. The monkeys were anaesthetized and inoculated intranasally (IN) with 0.5 ml virus solution containing 1×10^6 p.f.u. Zr-599 or Liberia by using an atomizer (Keytron Co.) to atomize the virus solution, or inoculated subcutaneously (SC) with 0.5 ml virus solution containing 1×10^6 p.f.u. Zr-599 or Liberia. After the challenge, blood was drawn every 2–4 days. Clinical manifestations, such as volume of food and water consumed, appearance of faeces, etc., were observed every day. The skin surface was observed carefully, and body (anal) temperature and mass were measured.

After sacrifice under anaesthesia, skin, lymphoreticular system structures (lymph nodes, spleen, thymus, pharynx and tonsils), gastrointestinal tract organs (including the liver and pancreas), genito-urinary tract organs (kidneys,

bladder, testes, ovaries and uterus), endocrine organs (adrenal glands and thyroid), respiratory tract organs (trachea and lungs), the heart as the cardiovascular organ, and central nervous system (CNS) organs (brain and spinal cord) were excised, fixed in 10% formalin in PBS and embedded in paraffin. They were then examined for micropathology and the presence of monkeypox virus antigens by immunohistochemical analyses as reported previously (Nagata *et al.*, 2001, 2002; Saijo *et al.*, 2006).

Infections in three of the four Zr-599/SC monkeys and one of the three Liberia/SC monkeys were fatal, whereas all Zr-599/IN and Liberia/IN monkeys survived (see Supplementary Table S1, available in JGV Online). In Zr-599/SC monkeys, body mass decreased sharply by 10–20% after challenge without any sign of recovery except for one subject that survived, whereas body mass in Liberia/SC monkeys decreased less sharply. There was a tendency for body temperature to rise for the first week after virus inoculation in all groups (see Supplementary Fig. S1, available in JGV Online).

Papulovesicular rashes appeared on days 7–9 after monkeypox virus inoculation. The general condition of the monkeypox virus-infected monkeys deteriorated and their activity decreased from day 6 to day 11 post-inoculation. The mean number of papulovesicular lesions in the Zr-599-infected monkeys ($n=369$) was higher than that in the Liberia-infected monkeys ($n=226$) (Supplementary Table S1). Skin and gross lesions in the internal organs in a Zr-599-infected subject (#4653) and a Liberia-infected subject (#4625) on day 18 post-inoculation are shown in Fig. 1. Both subjects were sacrificed because of severe symptoms on day 18 post-inoculation. The papulovesicular lesions demonstrated in both monkeys were morphologically similar. Lymph nodes and thymus in both subjects were affected. The most significant differences were that gross lesions with a granulomatous appearance were demonstrated in the gastrointestinal tract organs, such as stomach, small intestine and colon, in the Zr-599-infected monkey, but not in the Liberia-infected monkey (Fig. 1). The peritoneal membrane of the Zr-599-infected subject (#4653) became thickened and had granulomatous lesions, whereas that of the Liberia-infected subject (#4625) was intact. In Zr-599/IN monkeys, one (#4654) showed severe monkeypox-associated symptoms and the other (#4655) showed very mild symptoms. In the Liberia/IN monkeys, the symptoms were relatively mild and of short duration, with only a small number of papulovesicular lesions. The Zr-599-induced ulcerative lesions were still exudative on day 18, whereas the Liberia-induced lesions were dried and covered with scar tissues (Fig. 1). The Zr-599-induced ulcerative lesions seemed to be more severe than the Liberia-induced lesions.

There was a statistically significant difference in virus genome levels as determined by qPCR between Zr-599-infected and Liberia-infected monkeys (see Supplementary Table S2, available in JGV Online), the highest level assessed in combinations of SC and IN group monkeys

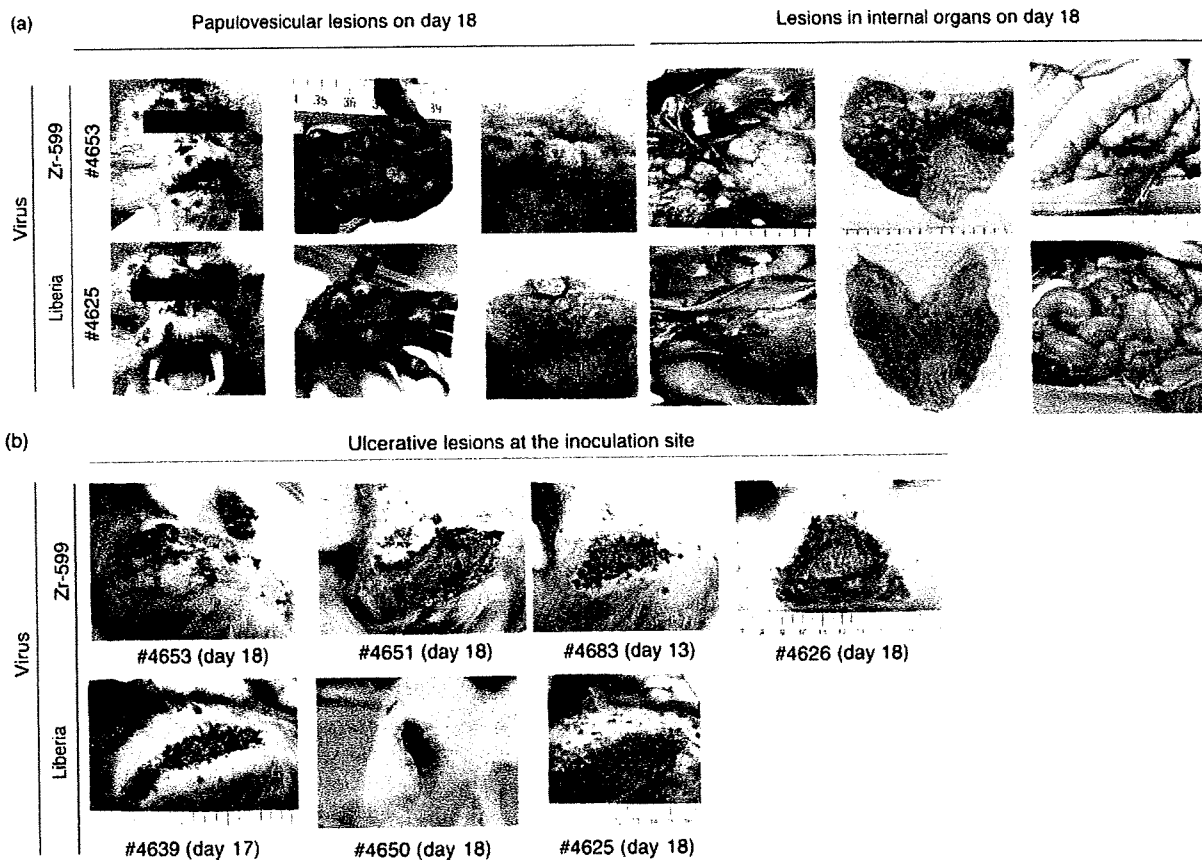


Fig. 1. (a) Monkeypox-associated lesions in skin and internal organs of fatal cases of Zr-599 (#4653) and Liberia (#4625) infection. (b) Ulcerative lesions at the monkeypox virus inoculation site in each subject.

(Student's *t*-test, $P=0.03$) and the mean virus genome level per day in the first 14 days in IN group monkeys (Student's *t*-test, $P=0.02$). All indices in Zr-599-infected monkeys were approximately 10 times higher than those in Liberia-infected monkeys.

There was a significant difference in the IgG response between the Zr-599-infected and Liberia-infected monkeys (Supplementary Fig. S1). In five of the six Zr-599-infected monkeys, an obvious IgG response was demonstrated even on day 10 post-inoculation, whereas the IgG ELISA was negative in all Liberia-infected monkeys except one on day 10. The IgG response was detected 2–3 days earlier in the Zr-599-infected monkeys than in the Liberia-infected monkeys.

The data on monkeypox virus antigen distribution indicated that Zr-599 infected the organs of the respiratory tract, gastrointestinal tract, lymphoid and reticuloendothelial systems, genito-urinary tract and skin, but not the CNS, and that Liberia mainly infected the lymphoid and reticuloendothelial systems and skin (Table 1). Micrographs of immunoperoxidase-stained tissue sections of Zr-599/SC monkeys are available in Supplementary Fig. S2 (in JGV Online).

To compare the severity of monkeypox-associated symptoms, a scoring system was developed and used in this study. The score is composed of two categories: items associated with clinical symptoms and those associated with laboratory findings. The following variables were recorded: decrease in body mass, duration of decreased activity with ill appearance, duration of decreased food consumption (<75%), body temperature (fever and lower temperature), diarrhoea with/without blood contamination, number of papulovesicular lesions except for the lesions associated with the challenge virus inoculation, outcome, virus genome level (maximum value during the course of observation and the final value when the observation finished), total peripheral blood-cell counts (increased and/or decreased numbers of white blood cells, decreased number of platelets, haemoglobin level) and CRP level. The points for each item are shown in Table 2. It is indicated that the higher the score, the more severe the monkeypox. The mean severity point of monkeypox caused by Zr-599, 25.2, was higher than that caused by Liberia, 17.0. When the same analysis was conducted based on points of the subjects that were infected with virus through the SC route, the mean point of the Zr-599/SC group, 30.0, was higher than that of the Liberia/SC group,