

Fig. 6. Criteria of Japanese abnormal toxicity test.

at least twice. If, after two re-tests, the results are still significantly different, the vaccine is considered to have failed.

4. Discussion

ATT is performed as a safety test, in accordance with the WHO guidelines [3]. These tests ensure that the minimum requirements for vaccine safety and consistency between vaccine batches are met in Japan [4] and in other countries [5]. In Japan, tests performed by the National Regulatory Authority are important for ensuring the minimum safety requirements for vaccines. In this study, we improved the current ATT by using combined statistical and histopathological analyses and by comparing the results with RPs based on previously-passed vaccines. Since introducing these new methods to ATT, the number of re-tests has decreased and the number of animals used in ATT for DPT has been reduced from 3 to 2. Using statistical and histopathological analyses, the accuracy of the test has been improved. These test methods will enhance vaccine safety and quality control. Our method can be easily applied and is useful for vaccine manufacture by constructing a vaccine specific reference population based on the currently passed 50 lots of vaccines. Together with our data, these methods will help to understand internal quality control and future validation study for manufactures.

In the EU, in order to conform to the '3R' principle [13], animal safety tests for vaccines, sera and immunoglobulins were abolished after the introduction of Good Manufacturing Practice (GMP) and Good Laboratory Practice (GLP) principles. In the US, however, the general safety test is still required by the FDA for vaccines for human use. Whether or not ATT is relevant for determining the safety of vaccines is an ongoing discussion [14]. In the US, whole blood, red blood cells, cryoprecipitated antihemophilic factor (AHF), platelets, plasma, and cellular therapy are not required to pass ATT and

are described in US the Code of Federal Regulations (CFR) (21 CFR 610.118) [15]. Recently, the FDA amended the 21 CFR 610.118(g), such that manufacturers can now submit a request for exemption from ATT requirements to the director of the Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), if they believe that their product is not appropriate for ATT, or if they can demonstrate alternative methods to ensure the safety of their products [5].

In Japan, ATT are aimed at ensuring the safety and consistency of vaccine batches. It has been suggested that adsorbed toxoid [16] and DPT [17] cause specific histopathological effects in treated animals. We proposed the aforementioned modified protocol of ATT, whose result was not affected by using the clean animal in place of SPF animals. ATT with additional statistical and histopathological analyses should therefore be the first choice for determining vaccine safety and quality.

The use of ATT for blood products was abolished in Japan in 2005, more than 10 years after the introduction of GMP regulations covering these products. This abolition resulted in an 80% reduction in animal use for ATT in Japan (data not shown). This refinement [18] in the use ATT is consistent with the spirit and concept of the '3R' principle [13].

It has been suggested that ATT cannot detect target substances causing adverse events and body weight changes. Although the mechanism causing body weight change is still unclear, Hamaguchi et al. reported that the reactogenicity and toxicity of pertussis vaccine in the rat was strongly correlated with global gene expression patterns in the liver, and they identified biomarkers relating to the pertussis vaccine-related toxicity [19]. Mizukami et al. also reported that global gene expression patterns were strongly correlated with ATT and the other current regulatory test, the leukopenic toxicity test, performed in Japan [20]. It has been suggested that reductions in body weight were due to nutritional changes caused by

changes in water consumption by animals after vaccination [21]. The two gene profiles established following pertussis vaccine and influenza vaccine treatment were different, suggesting that body weight reduction occurred as a result of changes in the expression of different genes in animals treated with different vaccines. Furthering improvements in ATT is one of the most important roles for the NRA in Japan.

In this study, we have reported on an improved method for ATT, including statistical and histopathological analyses. It based on the observation that there is body weight change characteristic to each vaccine, and such standardized changes can be used as references for evaluating test vaccines. Our improved method can both evaluate the degree of vaccine toxicity itself and lot-to-lot difference in vaccine. These improvements will help to ensure the safety and quality of vaccines.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the contribution of the association of biological manufacturers of Japan in Tokyo. The authors are grateful to Dr Haruo Watanabe for some useful discussions and Hiroshi Yoshikura for his critical reading of our manuscript. This work was partly supported by Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices from the Ministry of Health Labour and Welfare, Japan.

References

- [1] Plotkin SL, Plotkin SL. A short history of vaccination. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, editors. *Vaccines*. 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2008. p. 1–16.
- [2] Baylor NW, Midthun K. Regulation and testing of vaccines. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, editors. *Vaccines*. 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2008. p. 1611–27.
- [3] WHO Expert Committee on Biological Standardization. 30th Report. General Considerations for combined vaccine. WHO Tech Rep Ser 1979; 638:100.
- [4] Minimum requirements for biological products, Japan, National Institute of Infectious Diseases, http://www.nih.go.jp/niid/MRBP/seibutsuki_english.pdf.
- [5] Code of Federal Regulations. Title 21, Vol. 7, CITE: 21 CFR 610.11, <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=610.11>.
- [6] Castle P. Alternatives to animal testing: achievements and recent developments in the European Pharmacopoeia. *Dev Biol Stand* 1996;86:21–9.
- [7] Kurokawa M, Murata R. On the toxicity of the "toxoid" preparation responsible for the Kyoto catastrophe in 1948. *Jpn J Med Sci Biol* 1961; 14:249–56.
- [8] Kurokawa M, Ishida S, Kuratsuka K. On the biological assay of toxicity of pertussis vaccine using mice. I. Selection of response metameter and reproducibility of relative toxicity. *Jpn J Med Sci Biol* 1962;15:67–84.
- [9] van Zutphen LF. Toxicity testing and genetic quality control. *J Exp Anim Sci* 1993;35:202–9.
- [10] Festing MF. A case for using inbred strains of laboratory animals in evaluating the safety of drugs. *Food Cosmet Toxicol* 1975;13:369–75.
- [11] Cuba-Caparó A, Myers DM, Germino NI. Focal hepatic necrosis in clinically normal guinea pigs: bacteriological and pathological studies. *J Comp Pathol* 1977;87:441–50.
- [12] Fleisher MS, Loeb L. The experimental production of necrosis of the liver in the guinea pig. *J Exp Med* 1914;20:169–79.
- [13] Cussler K. A 4R concept for the safety testing of immunobiologicals. *Dev Biol Stand* 1999;101:121–6.
- [14] Advisory Group on Alternatives to Animal Testing in Immunobiologicals. The target animal safety test—is it still relevant? *Biologicals* 2002;30:277–87.
- [15] Revisions to the general safety test requirements for biological products—FDA. Direct final rule: confirmation in part and withdrawal in part. *Fed Regist* 1998;63:41718.
- [16] Goto N, Kato H, Maeyama J, Eto K, Yoshihara S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine* 1993;11:914–8.
- [17] Goto N, Kato H. Accumulation of ascites and increase in skin vascular permeability observed by injection of adsorbed diphtheria-purified pertussis–tetanus combined vaccine in guinea pigs. *Microbiol Immunol* 1991;35:1143–8.
- [18] Chino F. The views and policy of the Japanese control authorities on the three Rs. *Dev Biol Stand* 1996;86:53–62.
- [19] Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, et al. Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control. *Vaccine* 2007;25:3355–64.
- [20] Mizukami T, Imai JI, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, et al. Application of DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine* 2008;26: 2270–83.
- [21] Dubos R, Costello R, Schaedler RW. The influence of endotoxin administration on the nutritional requirements of mice. *J Exp Med* 1965; 122:1003–15.

Original Article

Induction of Indistinguishable Gene Expression Patterns in Rats by Vero Cell-Derived and Mouse Brain-Derived Japanese Encephalitis Vaccines

Haruka Momose[†], Jun-ichi Imai[†], Isao Hamaguchi[†], Mika Kawamura^{1,2}, Takuo Mizukami, Seishiro Naito, Atsuko Masumi, Jun-ichi Maeyama, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Nobuo Nomura³, Shinya Watanabe¹, and Kazunari Yamaguchi*

Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011; ¹Department of Clinical Informatics, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 133-8519; ²Medicrome, Inc., Tokyo 151-0051; and ³Biological Information Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo 135-0064, Japan

(Received July 8, 2009. Accepted November 12, 2009)

SUMMARY: Transcriptomics is an objective index that reflects the overall condition of cells or tissues, and transcriptome technology, such as DNA microarray analysis, is now being introduced for the quality control of medical products. In this study, we applied DNA microarray analysis to evaluate the character of Japanese encephalitis (JE) vaccines. When administered into rat peritoneum, Vero cell-derived and mouse brain-derived JE vaccines induced similar gene expression patterns in liver and brain. Body weights and blood biochemical findings were also similar after administration of the two vaccines. Our results suggest that the two JE vaccines are likely to have equivalent characteristics with regard to reactivity in rats.

INTRODUCTION

Japanese encephalitis (JE) is a seasonal and sporadic viral encephalitis in East Asia, caused by infection with the JE virus. The JE virus exists in a zoonotic cycle between mosquitoes and swine and/or water birds. Infectious mosquitoes transmit JE to humans, a dead-end host (1). The great majority of infections are not apparent; the incidence of JE is considered to be 1 case per 250 to 500 infections (2). Even if the disease becomes manifest, recovery from mild illness occurs in most cases. Severe infection can cause febrile headache syndrome, aseptic meningitis, or encephalitis after an incubation period of about 6 to 16 days (1). Once JE has developed, the fatality rate is relatively high, from 5 to 40%, depending on the outbreak. Permanent neurological or psychiatric sequelae are left in 45–70% of survivors (1–3). No specific treatments for JE are available; therefore, preventing virus infection with vaccination is the most effective form of defense.

The approved and widely used JE vaccine is manufactured from inactivated JE virus that has been propagated in mouse brain. This mouse brain-derived (MBD) vaccine is currently manufactured and used in Japan, Korea, Taiwan, Thailand, Vietnam, and India, and is licensed in the United States, Canada, Israel, Australia, and several other Asian countries. Vaccination has succeeded in the near elimination of JE in several countries.

The MBD JE vaccine is a very pure form; impurities are removed during the manufacturing process, especially brain-

derived matter (3). Thus the vaccine has been considered safe. However, adverse reactions, such as local reactions and mild systemic events, may occur in 10–30% of vaccinated subjects (3). Acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) coinciding with the administration of MBD vaccines has been reported at frequencies of 1 to 2 out of 100,000 doses (2,3). In the wake of a severe case of ADEM, the recommendation for a program of routine childhood immunization against JE was suspended in Japan in 2005 (2,4). It is of great concern that non-immunized children are not given the JE vaccine in JE-infected areas of Japan.

To replace the current MBD vaccine, Vero cell-derived (VCD) vaccines have been developed (5–10). The cessation of using mouse brain for virus propagation is expected to reduce the incidence of severe adverse reactions, including ADEM, because myelin basic protein, which is abundant in the central nervous system, is a possible substrate that provokes ADEM (11). Further, a cell culture-based technique is advantageous for large-scale production of JE vaccine. The demand for JE vaccine is growing, because the distribution of the JE virus has expanded throughout Asia and towards the northern edge of Australia over the last decade (12,13), and these newly JE virus-infected countries will require JE vaccine.

Apart from these concerns about the JE vaccine, moving towards cell culture-based vaccines is a global trend in the field of virus vaccine development (14). Primary hamster kidney cells were the first cells to be accepted for the production of JE vaccine, and continue to be used in China and some other countries (3,15). Recently, vaccine production using primary cell culture systems has been replaced by production using continuous cell lines (CCLs), including the Vero cell line (14). The Vero cell line is the most widely accepted CCL by regulatory authorities and has been used for over 30 years for the production of polio and rabies virus vaccines (16,17). In addition, VCD vaccines for rotavirus, smallpox

*Corresponding author: Mailing address: Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771, Fax: +81-42-565-3315, E-mail: kyama@nih.go.jp

[†]These authors contributed equally to the paper.

virus, and influenza virus have been developed (14,18). In the case of JE vaccines, one of the developed VCD vaccines has received recent approval in the United States and Europe. Another was licensed in Japan in February 2009.

A newly licensed VCD JE vaccine must be at least equivalent to the current high-quality MBD vaccine in effectiveness. In this study, we applied conventional animal tests to demonstrate the equivalence of the MBD JE vaccine and the VCD JE vaccine. Further, based on our previous studies demonstrating that DNA microarray analysis was able to assay the features of a vaccine with high sensitivity, comprehensive gene expression analysis was performed to characterize the physiological reactivity of both JE vaccines.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Eight-week-old male Wistar rats, weighing 160–200 g, were obtained from SLC (Tokyo, Japan). Animals were housed in rooms maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$, with $50 \pm 10\%$ relative humidity and 12-h light/dark cycles, for at least 1 week prior to the test challenge. All procedures used in this study complied with institutional policies of the Animal Care and Use Committee of the National Institute of Infectious Diseases.

Vaccines: The approved JE vaccine (MBD) is an inactivated, highly purified JE virus (Beijin-1 strain), propagated in mouse brain. The improved inactivated vaccine (VCD) is manufactured from the same strain in Vero cells. Both vaccines were generous gifts from Biken, The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University, Japan. We administered 5 ml of MBD or VCD into rat peritoneum. Physiological saline (SA) was used as a control.

Weight check: The rat decreasing body weight test was performed according to the Minimum Requirements for Biological Products in Japan (19). After we injected 5 ml of samples into the peritoneum, animals were weighed daily. Five rats in each group were used.

Hematological test: Rats were treated with SA, MBD, or VCD, and blood samples were collected on days 1, 2, 3, and 4 after administration. Blood was immediately mixed with EDTA, and the number of erythrocytes, hematocrit level, hemoglobin value, number of leukocytes, and number of platelets (PLT) were determined using an automatic hemacytometer, the Celltac MEK-5254 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan). Five rats in each group were used.

Serum test: Blood samples for the serum test were collected separately from the same rats used for the hematological test. After centrifugation at 3,000 rpm for 15 min, 10-fold diluted supernatants were used for subsequent tests. We measured the activity of glutamate oxaloacetate transaminase/aspartate aminotransferase (GOT/AST), glutamate pyruvate transaminase/alanine aminotransferase (GPT/ALT), alkaline phosphatase (ALP), amylase (AMYL), and creatine phosphokinase (CPK), and the quantity of blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), total cholesterol (TCHO), triglyceride (TG), glucose (GLU), and C-reactive protein (CRP) using a DRICHEM-3030 according to the manufacturer's instructions (Fujifilm, Japan). Five rats in each group were used.

RNA preparation: Rats were sacrificed to obtain the whole brain and the lateral left lobe of the liver. Tissues were immediately frozen in liquid nitrogen for storage. Thawed tissue was homogenized and mixed with Isogen reagent (NIPPON GENE, Tokyo, Japan). Total RNA was prepared from the lysate in accordance with the manufacturer's instructions.

Poly(A)⁺ RNA was prepared from total RNA with a Poly(A) Purist Kit (Ambion, Austin, Tex., USA) according to the manufacturer's instructions.

Microarray preparation and expression profile acquisition: For microarray analysis, rats were treated with SA, MBD, or VCD (3 rats per treatment), and 2 tissue samples from each animal, brain and liver, were analyzed on days 1–4 post-treatment. A set of synthetic polynucleotides (80-mers) representing 11,468 rat transcripts and including most of the RefSeq genes deposited in the NCBI database (MicroDiagnostic, Tokyo, Japan) was arrayed on aminosilane-coated glass slides (Type I; Matsunami, Kishiwada, Japan) with a custom-made arrayer (20,21). Poly(A)⁺ RNA (1.5 μg) of each sample was labeled using SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) with Cyanine 5-dUTP. A common reference RNA (MicroDiagnostic) was labeled with Cyanine 3-dUTP (PerkinElmer, Boston, Mass., USA). Labeling, hybridization, and washes of microarrays were performed with a Labeling & Hybridization Kit (MicroDiagnostic) according to the manufacturer's instructions. The common reference RNA was purchased as a single batch and was labeled with Cyanine-3 for a single microarray side by side with each sample labeled with Cyanine-5. Hybridization signals were measured using a GenePix 4000A scanner (Axon Instruments, Union City, Calif., USA) and then processed into primary expression ratios ([Cyanine 5-intensity obtained from each sample]/[Cyanine 3-intensity obtained from common reference RNA]), which are indicated as 'median of ratios' in GenePix Pro 3.0 software [Axon Instruments]). The GenePix Pro 3.0 software performed normalization for the median of ratios (primary expression ratios) by multiplying normalization factors calculated for each feature on a microarray.

Data analysis: Data processing and hierarchical cluster analysis were performed using Excel (Microsoft, Redmond, Wash., USA) and an MDI gene expression analysis software package (MicroDiagnostic). The primary expression ratios were converted into \log_2 values (\log_2 Cyanine-5 intensity/Cyanine-3 intensity) (designated log ratios) and compiled into a matrix (designated primary data matrix). To predict the most obvious differences obtained from cluster analysis of the primary data matrix, we extracted genes with \log_2 ratios over 1 or under -1 in at least 1 sample from the primary data matrix and subjected them to two-dimensional hierarchical cluster analysis for samples and genes.

To identify genes demonstrating significant changes in expression, we extracted genes by *t* test between SA- and MBD-, SA- and VCD-, or MBD- and VCD-treated samples ($P < 0.01$).

RESULTS

Vaccine-treated animals showed no weight loss: Vaccines for public use are all made according to Good Manufacturing Practice (GMP), and many tests must be done before releasing vaccines to assure their quality. Conventional animal tests including the decreasing body weight test are applied for the quality control of vaccines (19). To explore the effects of the JE vaccines in a conventional method, we first applied the decreasing body weight test to the MBD and VCD JE vaccines, as described in Minimum Requirements for Biological Products in Japan (19). For this test, 5 ml of the vaccine was injected into the rat peritoneum, and the weight of the treated rats was measured daily for 4 days. As shown in Fig. 1, VCD-treated rats (filled circles) did not show

any weight loss, and gained weight in a similar manner to that of the SA- and MBD-treated groups (open and gray squares, respectively). Further, no abnormalities were observed in the condition or behavior of the rats during the testing period. Severe toxicity of MBD and VCD was not detected from this test.

Hematological tests revealed no significant changes in vaccinated rats: To investigate the influence of JE vaccines on hematological parameters, we treated rats with SA, MBD, or VCD (5 rats per treatment) and collected blood samples on days 1, 2, 3, and 4 after administration. We counted erythrocytes, leukocytes, and PLT and measured hematocrit levels and hemoglobin values. At any time point, all characteristics examined were within normal ranges and showed no significant differences among SA-, MBD-, and VCD-treated groups (Fig. 2). These results indicated that neither MBD nor VCD exhibited hematotoxicity to the treated rats.

Normal levels were observed in serum tests in vaccine-treated rats: To evaluate the reactivity of JE vaccines on

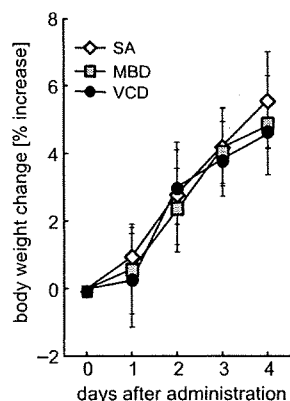


Fig. 1. Body weight analysis of the JE vaccine treated animals. The effects of mouse brain-derived (MBD) JE vaccine, Vero cell-derived (VCD) JE vaccine, and saline (SA) treatment were measured using decreasing body weight toxicity tests. All rats were weighed at days 0, 1, 2, 3, and 4. Changes in rat body weight were assessed as the percentage increase or decrease, and are indicated by the mean change \pm S.D.

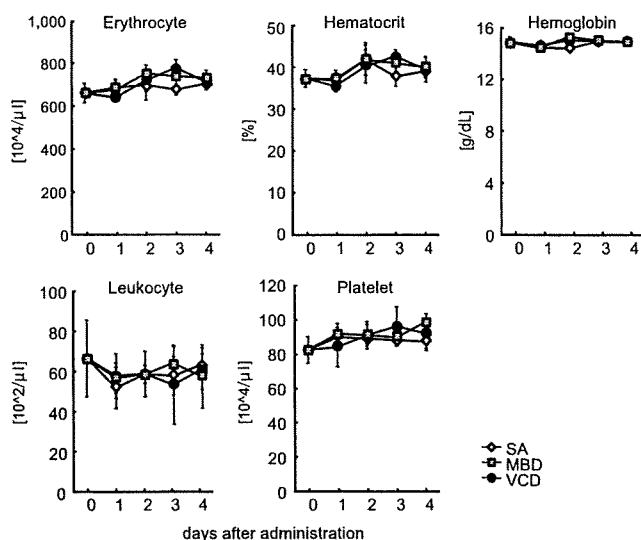


Fig. 2. Hematological tests for vaccinated rats. Blood obtained from individual rats was subjected to hematological tests. The tests were performed for 4 consecutive days after SA (open square), MBD (gray square), and VCD (filled circle) administration. Values are expressed as mean \pm S.D.

biological functions, we performed serum tests on vaccine-administered rats. On days 1, 2, 3, and 4 after administration of SA, MBD, or VCD, we collected blood from the same rats used for hematological tests, and isolated serum. Each serum sample was tested for liver function, renal function, muscle dysfunction, and metabolic abnormalities. No significant increase was observed in GOT/AST, GPT/ALT, ALP, or AMYL in any samples tested, indicating that no liver damage had occurred (Fig. 3 top panels). CRP values were all below detection limits (data not shown). Tests of renal (BUN and CRE) and muscle (CPK) function and of metabolism (TCHO, TG, and GLU) showed no differences among the vaccine-treated groups (Fig. 3 middle and bottom panels). These results suggested that SA, MBD, and VCD had similar biological reactivity in rats.

Microarray analysis of tissues from vaccine-treated rats: Although the animal tests described above have long been accepted for the quality control of biological reagents (22–24), the progress of molecular biotechnology presents the possibility to improve or renew the traditional tests. Among recent technologies, the high-throughput ‘omics’-based technologies have led the way to clarify immune responses to pathogens and responses of metabolic pathways, as well as to develop new vaccine candidates (25–27). Now, several efforts have been made to analyze the side effects of pharmaceuticals using one of the ‘omics’ technologies, transcriptomics (28,29). In this context, we performed DNA microarray analysis of the vaccinated rat tissues, liver and brain, and tried to determine the effects of MBD and VCD by analyzing gene expression patterns. The liver is thought to be one of the most appropriate organs to analyze biological alterations due to vaccination, because it is the major organ of metabolism. The brain was taken as another target tissue because a neurological effect can be one of the side effects of JE vaccination.

For the analysis, SA-, MBD-, and VCD-treated rats (3 rats per group) were sacrificed to obtain the liver and brain on days 1, 2, 3, and 4 post-administration. Thirty-six samples from each tissue type were obtained. Poly(A)⁺ RNA purified from the samples and a rat common reference RNA were labeled with Cyanine-5 and Cyanine-3, respectively, and hybridized to microarrays representing 11,468 transcripts. Hybridization signals were processed into expression ratios as log₂ values (designated log ratios) and compiled into a matrix designated as the primary data matrix (see Materials and Methods).

To predict the most obvious differences obtained from the cluster analysis, we extracted genes with log ratios over 1 or under -1 in at least 1 sample in each group. Eventually, 2,386 genes for liver and 4,075 genes for brain were extracted and subjected to two-dimensional hierarchical cluster analysis for samples and genes (Fig. 4A). With hierarchical cluster analysis, genes were grouped according to expression patterns; thus samples having a similar gene expression pattern were clustered together, and samples having a distinct gene expression pattern formed a separate cluster (Fig. 4A) (30–32). If all test samples showed similar gene expression patterns, no clear clusters were formed. Thus, whether distinct clusters were formed was the criterion for the assessment of whether treatment with the 2 vaccines induced different gene expression patterns. Each column represents a sample. Each row represents a gene, and gene expression values are typically illustrated by a colored rectangle, red for up-regulation, blue for down-regulation, and yellow for no change. As shown, no

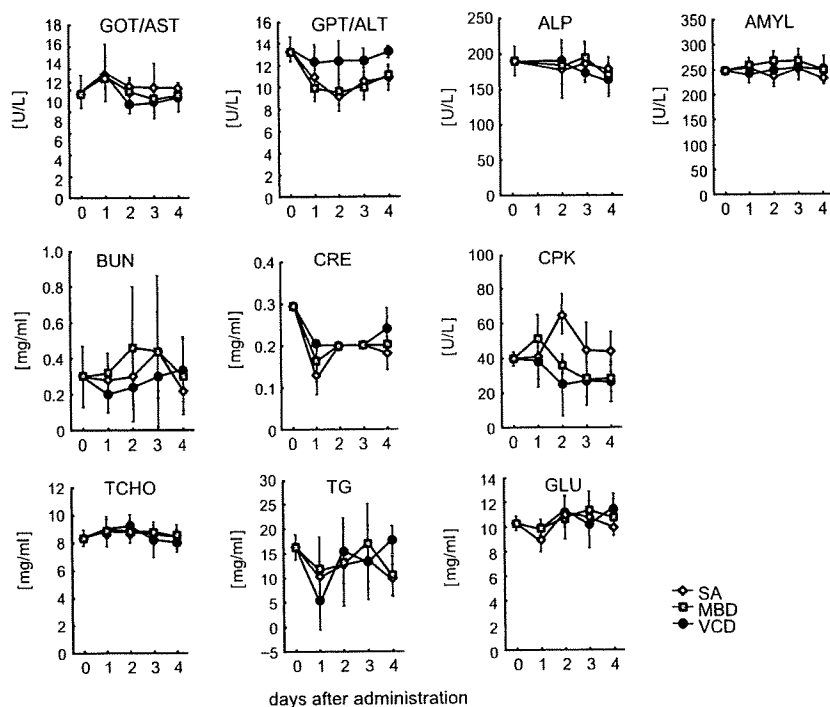


Fig. 3. Serum tests for vaccinated rats. Serum was separated from blood obtained from individual rats, and subjected to serum tests. The tests were performed for 4 consecutive days after SA (open square), MBD (gray square), and VCD (filled circle) administration. Values are expressed as mean \pm S.D.

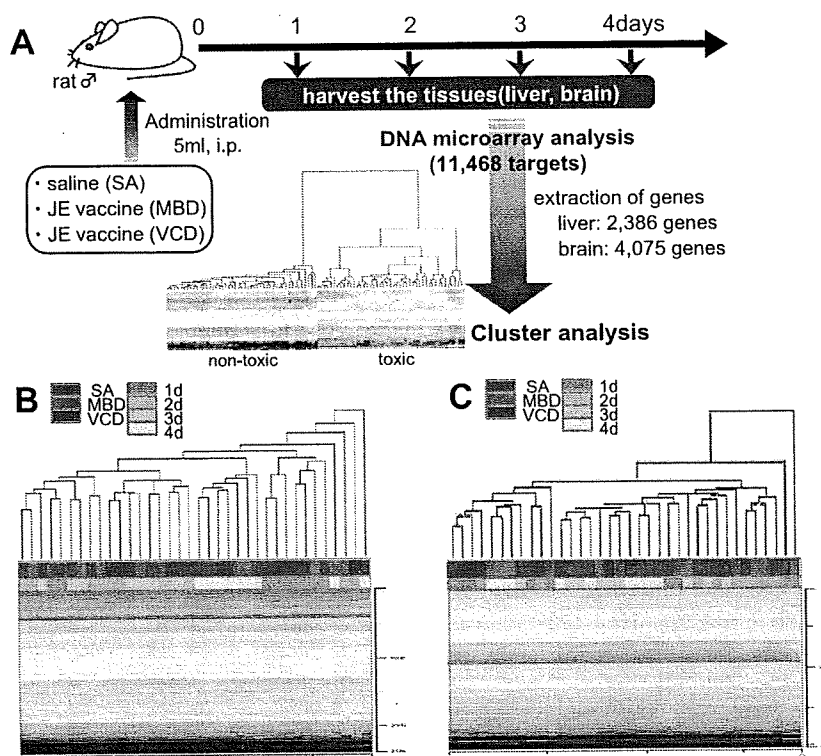


Fig. 4. Gene expression profiling and cluster analysis of vaccine-treated rat tissues. The procedure for gene expression analysis is outlined in A. For the cluster analysis, 2,386 genes for liver (B) and 4,075 genes for brain (C) were extracted from 11,468 targets and assembled in the order obtained from the results of the two-dimensional hierarchical cluster analysis. The results were drawn as a dendrogram based on the similarities of gene expression patterns of each sample. The y-axis of the dendrogram shown in (B) and (C) depicts the Euclid square distance as the dissimilarity coefficient, indicating the relationship between the samples. Red and blue indicate increases and decreases in the expression ratio, respectively.

clear clusters, corresponding to distinguishable gene expression patterns, were apparent, either in liver (Fig. 4B) or in brain (Fig. 4C). Gene expression patterns were very similar

in all vaccine-treated samples.

Further, we tried to identify specific genes whose expression levels were changed following JE vaccine treatment.

However, no genes could be selected from the comparison between MBD- and VCD-treated groups. MBD and VCD treatment could not be distinguished by gene expression analyses, indicating equivalent characteristics of MBD and VCD.

DISCUSSION

Comprehensive gene expression analysis is now an established approach to analyzing the effects of any manipulation on the whole transcriptome of living organisms. The genomic data associated with drug responses are expected to aid in the analysis of inter-individual variability and the tailoring of the administration of drugs to individuals to achieve maximal efficacy and minimum risk. The US Food and Drug Administration (FDA) now encourages voluntary genomic data submissions to the agency as part of new drug applications and biologics licensing applications (33). In this context, we have been trying to introduce DNA microarray analysis to the conventional quality control tests of the pertussis and influenza vaccines. The results of DNA microarray analysis correlated well with the results of conventional animal tests, and toxicity-related biomarkers were successfully extracted from the analysis (30–32). In the present study, we further applied this DNA microarray technology to analyze the biological reactivity of the JE vaccines (MBD and VCD). In liver and brain, the overall gene expression patterns were similar between MBD- and VCD-treated rats (Fig. 4), which was in accordance with the results obtained from the decreasing body weight test (Fig. 1) or the blood and serum tests (Figs. 2 and 3).

ADEM, an adverse reaction associated with JE vaccination, is thought to be a monophasic autoimmune disorder of the central nervous system, typically following a febrile infection or a vaccination (34). The precise mechanisms of ADEM have not been fully elucidated; however, recent studies suggested the involvement of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and chemokines (35–37). Further, several genes associated with inflammation or immune responses, including *Irf7*, were up-regulated in JE virus-infected mouse brains (38,39). Therefore, inflammation above certain levels may be associated with adverse reactions to vaccines, that is, inflammation-related genes could be markers to detect contaminating toxicity that can cause adverse reactions. However, we found no significant changes in the expression levels of inflammatory genes between MBD- and VCD-treated rat tissues. We showed by using animal tests and comprehensive gene expression analysis that the two Japanese encephalitis vaccines, the existing MBD and the improved VCD vaccines, seemed to possess identical biological reactivity in rats.

To address concern about the reliability of the genomic data obtained from DNA microarray analysis, the FDA recently launched the MicroArray Quality Control (MAQC) project in anticipation of the regulatory submission of pharmacoinformatic and toxicoinformatic data in applications or supplements (33). The results of the MAQC project, showing interplatform reproducibility, were reported in 2006 (40–45). Subsequently, the follow-up MAQC-II project is progressing towards the development and the validation of genomic data in clinical applications. Similarly, in Japan, the Japan MicroArray Consortium (JMAC) for the standardization and the international harmonization of microarray platforms is ongoing and is coordinated with the FDA and the

European Medical Agency (EMA) (46). The efforts to achieve array platforms for the practical application of genomic data are being accelerated on a worldwide scale.

Although our experiments were limited with regard to the number of animals and vaccines examined, our DNA microarray technology was previously shown to be reproducible (30,32). The genomic data obtained in this study is, we believe, reliable. Recently, the VCD JE vaccine was licensed in Japan. It is desirable to accumulate gene expression profiles, especially data documenting the dynamics of inflammatory cytokines, in addition to generating animal testing data to enable a more reliable evaluation of the new JE vaccine.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Keiko Furuhashi and Momoka Tsuruhara for technical support.

This work was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. The authors have no conflicting financial interests.

REFERENCES

- Gubler, D.J., Kuno, G. and Markoff, L. (2007): Flaviviruses. p. 1185–1190. In D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, et al. (ed.), *Fields Virology*. 5th ed. vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- World Health Organization (2006): Japanese encephalitis vaccines. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 81, 331–340.
- Halstead, S.B. and Jacobson, J. (2008): Japanese encephalitis vaccines. p. 311–352. In S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, and P.A. Offit (ed.), *Vaccines*. 5th ed. Elsevier, New York.
- Global Advisory Committee on Vaccine Safety, World Health Organization: Japanese encephalitis (JE) vaccines. Mouse brain-derived Japanese encephalitis (JE) vaccine. Online at <http://www.who.int/vaccine_safety/topics/japanese_encephalitis/mouse_brain_derived/en/>.
- Hombach, J., Barrett, A.D., Cardoso, M.J., et al. (2005): Review on flavivirus vaccine development. Proceedings of a meeting jointly organised by the World Health Organization and the Thai Ministry of Public Health, 26–27 April 2004, Bangkok, Thailand. *Vaccine*, 23, 2689–2695.
- Monath, T.P., Guirakhoo, F., Nichols, R., et al. (2003): Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. *J. Infect. Dis.*, 188, 1213–1230.
- Kuzuhara, S., Nakamura, H., Hayashida, K., et al. (2003): Non-clinical and phase I clinical trials of a Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine*, 21, 4519–4526.
- Abe, M., Shiosaki, K., Hammar, L., et al. (2006): Immunological equivalence between mouse brain-derived and Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccines. *Virus Res.*, 121, 152–160.
- Lyons, A., Kanasa-Thanan, N., Kuschner, R.A., et al. (2007): A Phase 2 study of a purified, inactivated virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine*, 25, 3445–3453.
- Tauber, E., Kollaritsch, H., Korinek, M., et al. (2007): Safety and immunogenicity of a Vero-cell-derived, inactivated Japanese encephalitis vaccine: a non-inferiority, phase III, randomised controlled trial. *Lancet*, 370, 1847–1853.
- Pohl-Koppe, A., Burchett, S.K., Thiele, E.A., et al. (1998): Myelin basic protein reactive Th2 T cells are found in acute disseminated encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 91, 19–27.
- Williams, D.T., Wang, L.F., Daniels, P.W., et al. (2000): Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. *J. Gen. Virol.*, 81, 2471–2480.
- Ritchie, S.A. and Rochester, W. (2001): Wind-blown mosquitoes and introduction of Japanese encephalitis into Australia. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 900–903.
- Barrett, P.N., Mundt, W., Kistner, O., et al. (2009): Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 8, 607–618.
- Petricciani, J. and Sheets, R. (2008): An overview of animal cell substrates for biological products. *Biologicals*, 36, 359–362.
- Montagnon, B., Vincent-Falquet, J.C. and Fanget, B. (1983): Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. Promising results. *Dev. Biol. Stand.*, 55, 37–42.

17. Montagnon, B.J. (1989): Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. *Dev. Biol. Stand.*, 70, 27–47.
18. Monath, T.P., Caldwell, J.R., Mundt, W., et al. (2004): ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain)—a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int. J. Infect. Dis.*, 8 Suppl 2, S31–44.
19. National Institute of Infectious Diseases, Japan (2006): Minimum Requirements for Biological Products. Online at <http://www.nih.go.jp/niid/MRBP/seibutsuki_english.pdf>.
20. Ito, E., Honma, R., Imai, J., et al. (2003): A tetraspanin-family protein, T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated antigen 1, is induced by the Ewing's sarcoma-Wilms' tumor 1 fusion protein of desmoplastic small round-cell tumor. *Am. J. Pathol.*, 163, 2165–2172.
21. Kobayashi, S., Ito, E., Honma, R., et al. (2004): Dynamic regulation of gene expression by the Flt-1 kinase and Matrigel in endothelial tubulogenesis. *Genomics*, 84, 185–192.
22. Kurokawa, M. (1984): Toxicity and toxicity testing of pertussis vaccine. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 37, 41–81.
23. Horiuchi, Y., Takahashi, M., Konda, T., et al. (2001): Quality control of diphtheria tetanus acellular pertussis combined (DTaP) vaccines in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54, 167–180.
24. Mizukami, T., Masumi, A., Momose, H., et al. (2009): 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.
25. Grifantini, R., Bartolini, E., Muzzi, A., et al. (2002): Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat. Biotechnol.*, 20, 914–921.
26. Yang, H.L., Zhu, Y.Z., Qin, J.H., et al. (2006): In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. *BMC Genomics*, 7, 293.
27. Shin, J., Wood, D., Robertson, J., et al. (2007): WHO informal consultation on the application of molecular methods to assure the quality, safety and efficacy of vaccines, Geneva, Switzerland, 7–8 April 2005. *Biologicals*, 35, 63–71.
28. Hamadeh, H.K., Bushel, P.R., Jayadev, S., et al. (2002): Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicol. Sci.*, 67, 219–231.
29. Ejiri, N., Katayama, K., Kiyosawa, N., et al. (2005): Microarray analysis on Phase II drug metabolizing enzymes expression in pregnant rats after treatment with pregnenolone-16alpha-carbonitrile or phenobarbital. *Exp. Mol. Pathol.*, 79, 272–277.
30. Hamaguchi, I., Imai, J., Momose, H., et al. (2007): Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control. *Vaccine*, 25, 3355–3364.
31. Mizukami, T., Imai, J., Hamaguchi, I., et al. (2008): Application of DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine*, 26, 2270–2283.
32. Hamaguchi, I., Imai, J., Momose, H., et al. (2008): Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine*, 26, 4686–4696.
33. Frueh, F.W. (2006): Impact of microarray data quality on genomic data submissions to the FDA. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1105–1107.
34. Menge, T., Hemmer, B., Nessler, S., et al. (2005): Acute disseminated encephalomyelitis: an update. *Arch. Neurol.*, 62, 1673–1680.
35. Ichiyama, T., Shoji, H., Kato, M., et al. (2002): Cerebrospinal fluid levels of cytokines and soluble tumour necrosis factor receptor in acute disseminated encephalomyelitis. *Eur. J. Pediatr.*, 161, 133–137.
36. Kadhim, H., De Prez, C., Gazagnes, M.D., et al. (2003): In situ cytokine immune responses in acute disseminated encephalomyelitis: insights into pathophysiologic mechanisms. *Hum. Pathol.*, 34, 293–297.
37. Franciotta, D., Zardini, E., Ravaglia, S., et al. (2006): Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid and serum of adult patients with acute disseminated encephalomyelitis. *J. Neurol. Sci.*, 247, 202–207.
38. Saha, S., Sugumar, P., Bhandari, P., et al. (2006): Identification of Japanese encephalitis virus-inducible genes in mouse brain and characterization of GARG39/IFIT2 as a microtubule-associated protein. *J. Gen. Virol.*, 87, 3285–3289.
39. Saxena, V., Mathur, A., Krishnani, N., et al. (2008): An insufficient anti-inflammatory cytokine response in mouse brain is associated with increased tissue pathology and viral load during Japanese encephalitis virus infection. *Arch. Virol.*, 153, 283–292.
40. Canales, R.D., Luo, Y., Willey, J.C., et al. (2006): Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1115–1122.
41. Shippy, R., Fulmer-Smentek, S., Jensen, R.V., et al. (2006): Using RNA sample titrations to assess microarray platform performance and normalization techniques. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1123–1131.
42. Tong, W., Lucas, A.B., Shippy, R., et al. (2006): Evaluation of external RNA controls for the assessment of microarray performance. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1132–1139.
43. Patterson, T.A., Lobenhofer, E.K., Fulmer-Smentek, S.B., et al. (2006): Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1140–1150.
44. Shi, L., Reid, L.H., Jones, W.D., et al. (2006): The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1151–1161.
45. Guo, L., Lobenhofer, E.K., Wang, C., et al. (2006): Rat toxicogenomic study reveals analytical consistency across microarray platforms. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1162–1169.
46. Imagawa, K., Ito, T. and Azuma, J. (2008): The present status and future perspectives on pharmacogenomics and toxicogenomics. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 39, 61–67 (in Japanese).

国際調和を踏まえた無菌試験法の改正**

佐々木 次 雄*

筆者は1995年以来、日局無菌試験法の国際調和作業を担当してきました。2002年に「無菌試験法」はPDG (Pharmacopoeial Discussion Group, 薬局方検討会議)において調和調印されましたが、三極規制当局 (ICH) から見た場合、調和はされていないということで、再度調和作業を行いました。3薬局方で完全調和されたのは2008年10月ですから、実に12年もかかったこととなります。何故、そのように長期間を要したのかを理解するために、初めに日米欧薬局方の位置づけや取扱い品目の違い、国際調和についての考えの違い等について説明します。

1. 日米欧薬局方と国際調和

1.1 各国・地域の規制当局と薬局方との関係 (Table 1)

日本薬局方 (JP) は、薬事法に基づいて厚生労働大臣が告示するもので、規制当局と一体になっています。欧州薬局方 (EP) は、EU加盟国初め多くの国で使用されています多国籍局方です。フランスのストラスブールにあるEDQMが局方を担当しています。米国薬局方 (USP) は企業体で、規制当局FDAからは独立した機関です。FDAはUSPを参考にはしますが、必ずしも遵守する必要はありません。

1.2 USP, EP 及び JP の無菌試験対象物 (Table 2)

無菌試験は無菌製品に適用されますが、同じ無菌製品でもUSPはヒト用医薬品の他に医療機器をも対象としています。EPは動物用医薬品と生物学的製剤も対象としています。日局は、動物医薬品や医

療機器は対象外です。このように無菌試験対象製品が3局で異なっていることも調和作業を進める上で大きな障壁となりました。

無菌試験法の調和作業が始まった頃に、USPの微生物試験法委員会からEPに送られた手紙をTable 3に示します。「USPの多くのモノグラフに影響を及ぼす微生物試験法を国際調和という観点から修正を加えることには注意が必要である。微生物関連試験法の一部の変更でも米国内製薬企業並びに米国に医薬品を輸出している国外の製薬企業に直接影響を及ぼすことになる。これは、一般試験法を変更できないといっているわけではないが、変更するには注意が必要である。」と、一見脅し的な手紙になっています。このような環境下で無菌試験法の調和作業が開始されたことをご理解下さい。

1.3 ICH/Q6A ガイドライン関連試験法の現状

無菌試験法をはじめ幾つかの試験法の調和作業が始まった背景には、ICH/Q6A ガイドライン「新医薬品の規格及び試験方法の設定」の存在があります。本ガイドラインを遂行する上で局方試験法の幾つかを調和させておく必要がありました。Table 4に掲げた11の試験法以外に当初は保存効力試験法も調和対象になっていましたが、保存効力試験法の位置づけが3局で異なることから、途中で調和対象から外されました。調和対象生物関連試験法として、微生物限度試験法、無菌試験法、エンドトキシン試験法があり、エンドトキシン試験法の調和は日局が担当しています。無菌試験法は、2007年10月にPDGで調和調印され、これからQ4Bでの評価が始まります。

* 独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部 東京都千代田区霞が関3-3-2 (〒100-0013)

** 当協会主催の第2回日本薬局方に関する説明会 (平成20年8月21日:東京, 8月28日:大阪)における講演による。

Table 1 各国・地域の規制当局と薬局方との関係

	薬局方	審査・規制当局
日本	JP 1886年（明治19年）初版発行 薬事法第41条に基づく厚生労働大臣告示	厚生労働省 総合機構
欧州	EP 1964年創設、仏ストラスブール 欧州評議会内の医薬品品質局（EDQM）	欧州委員会 EMA
米国	USP 1820年創立、米メリーランド州 NPO、FDAから独立した組織 FDC Actの中で基準として位置づけられている。	FDA

Table 2 USP, EP及びJPの無菌試験対象物

	試験対象製品			
	ヒト用 医薬品	動物用 医薬品	生物学的 製剤	医療機器
USP	○			○
EP	○	○	○	
JP	○			

Table 3 A Letter from the USP to the EP

Since the USP Microbiology Subcommittee is updating the microbiology chapter, it is a good time to look at them from a harmonization prospective. However, it is necessary to be cautious in attempting to harmonize General Chapters, especially Microbiological Chapters that affect a large number of monographs and existing marketed pharmaceutical products.

Changes brought about in an attempt to harmonize in any one of these chapters will have direct legal, regulatory, and compliance ramifications for the pharmaceutical manufactures in the U.S. and for overseas manufactures importing products in the U.S. This is not say that General Chapters cannot be modified, but it has to be done with caution.

1.4 PDGにおける国際調和（Table 5）

薬局方の国際調和は、日米欧3薬局方から成り立つPDGで行われています。PDGは1989年に発足し、現在までに36の添加剤モノグラフと25の試験法について調和を終了しています。

1.5 PDG Process

Table 6にPDGの調和作業プロセスを示します。Stage 1で決まった調和案件を種々の調和作業段階をとり、Stage 5Bで調和調印します。その調和内容

Table 4 ICH/Q6Aガイドライン関連試験法の現状

Topics	Current Status
注射剤の採取容量試験法	Q4B (Step 4)
強熱残分試験法	Q4B (Step 4)
注射剤の不溶性微粒子試験法	Q4B (Step 4)
崩壊試験法	Q4B (Step 2)
製剤均一性試験法	Q4B (Step 1)
微生物限度試験法	Q4B (Step 2)
非無菌医薬品の微生物学的品質特性	Q4B (Step 2)
溶出試験法	Q4B (Step 1)
無菌試験法	PDG Stage 6 (Oct. 2007)
エンドトキシン試験法	PDG Stage 5A
色調試験法	PDG Stage 3

Table 5 PDG (Pharmacopoeial Discussion Group)における国際調和

- 日本薬局方(JP)、欧州薬局方(EP)及び米国薬局方(USP)により、1989年に発足。
- 通常、1年に2回、ICH EWGと同時期に開催。
- 2001年5月からWHOがオブザーバーとして参加。
- 現在まで、36の添加剤モノグラフと25の試験法について調和を終了。
- 1997年からは、ICH Q6A（新医薬品の規格及び試験方法の設定について）で取り上げられた11の試験法について、重点的に調和作業に取り組んでいる。

を各局が採用しますとStage 6となり、各局で採用した内容をICH Q4Bで評価します。三極で調和がとれて規制当局として相互受入可能と判断されますとStage 7となります。

Table 6 PDG Process

Stage 1	Identification
Stage 2	Investigation
Stage 3	Proposal for Expert Committee Review
Stage 4	Official Inquiry
Stage 5A	Provisional Consensus
Stage 5B	Sign-off
-sign-off ends PDG process-	
Stage 6	Regional Adoption & Implementation
Q4B Evaluation	
Stage 7	Inter-Regional Acceptance

Table 7 PDGによる局方調和の問題

PDGで“調和された”試験法であるにも関わらず、3極規制当局により受け入れられない。

<背景・理由>

- ・非調和事項があるため、各局方で差違がある。(PDGでの調和の限界)
- ・調和された試験法であることが各局方上に明記されていない。
- ・各局方の位置づけ、取扱いが3極で異なる。



企業側から、調和された局方試験法等について規制当局側の受け入れを促進するよう要望

1.6 PDGによる局方調和の問題 (Table 7)

PDGで調和された試験法であるにも関わらず、三極規制当局には受け入れられない場合があります。前述しましたように各薬局方で取扱い対象品目や局方の位置づけが違いますと、細部にわたっての完全調和が難しい場合があります。そうしますと、非調和部分が発生します。この非調和部分が規制当局にとって相互受入のできないクリティカルなものかどうか問題となります。

1.7 Q4Bとは (Table 8)

Q4Bでは、国際調和された局方試験法等を三極の規制当局が受け入れることができるかどうかをQ4Bガイドラインに基づいて評価するようになっています。

2. 国際調和を踏まえた無菌試験法の改正

2.1 無菌試験法の国際調和作業 (Table 9)

無菌試験法は1995年に始まり、7年の年月を費やして2002年にPDGで調和調印されました。調和作

Table 8 Q4Bとは

Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial Texts for Use in the ICH Regions

- ・国際調和された局方試験法等を3極の規制当局が受け入れることを促進することが目的
- ・Q4Bでは国際調和された局方試験法等を3極の規制当局が受け入れることができるか評価し、その結果を勧告

Q4B ガイドライン：評価の手順を規定

Q4B Annex：評価した各試験法について、Q4B評価結果や施行上の留意事項等をまとめたもの

Table 9 無菌試験法の調和作業

Jun 1995: Stage 4 draft (1st draft from EP)
 Feb 1996: Barcelona Congress
 Mar 1996: Stage 5A draft
 Sep 1996: Stage 5B draft
 Dec 1996: Stage 5B (Version 2) draft
 Jun 1997: Stage 5B (Final draft)
 Oct 1998: Stage 5B (New Version)
 Mar 2000: Stage 5B (Public inquiry for sign-off)
 Sep 2002: Sign-off
 Nov 2003: Q4B was established
 Jun 2004: 1st Q4B meeting
 May 2005: 3rd Q4B meeting

Q4B Evaluation “No Interchangeability”
 Eleven residual differences



Sep 2006: (Rev.1) Stage 4 draft
 Jan 2007: (Rev.1) Stage 5A draft
 May 2007: (Rev.1) Stage 5A2 draft
 Sep 2007: (Rev.1) Stage 5B draft
 Oct 2007: (Rev.1) Sign-off

業が始まった頃には、調和は完全統一 “Unification”ではなく、飽くまでも相互受入可能なレベルに調和 “Harmonization” されていればよいとのことで作業を開始しました。そのため、結果的に11項目の非調和部分を残しての調印でしたが、当時のPDGとしては問題ないとの判断でした。

PDGで無菌試験法の調和調印された翌年にICH Q4Bが充足し、国際調和された無菌試験法を評価した結果、三極の規制当局が相互に受け入れることは不可能と評価され、完全調和を目指して再度調和作業を行うようにとの勧告が出されました。そこで、再度調和作業を開始し2007年にPDGとして調和作業が終わり、これから再度、Q4Bでの評価が始ま

ります。現時点では、調和とは Unification > Harmonization の色合いが強くております。

2.2 局方無菌試験法の歴史

無菌試験法が局方に初めて導入されたのは 1932 年英国薬局方 (BP) でした。USP には 1936 年に、日局には 1951 年に導入されました。日局への導入 1 年前の 1950 年 1 月 25 日 (厚生省告示第 20 号) には、生物学的製剤基準に導入されました。

2.3 日局「無菌試験法」の歴史 (Table 10)

無菌試験法が導入された 1951 年の無菌試験対象物は、注射用蒸留水と滅菌蒸留水の 2 品目のみでした¹⁾。1961 年の改正²⁾で無菌試験法の基本ができ、細菌と真菌試験法に分けて記載され、細菌検出には液状チオグリコール酸培地、真菌検出にはブドウ糖・ペプトン培地が指定されました。また液状チオグリコール酸培地の性能試験菌株として破傷風菌と溶血性連鎖球菌が指定されました。1971 年改正³⁾では、無菌試験の実施環境が規定され、無菌試験は無菌箱又は無菌試験室で行うことになりました。“無菌箱”とはクリーンベンチのことを指しておりました。

1976 年改正⁴⁾では液状チオグリコール酸培地Ⅱが導入され、1981 年改正⁵⁾では 100 mL 以上製品の無

菌試験に MF 法が適用されるようになりました。1994 年の全面改正⁶⁾から筆者が担当になり、1994 年の改正では可能な限り USP に合わせました。真菌検出用ブドウ糖・ペプトン培地を SCD 培地に変更し、MF 法の培養期間の 1 週間を 2 週間に変更し、培地性能試験菌株や判定基準も明記しました。その後、1999 年⁷⁾と 2004 年⁸⁾にも改正をしました。2009 年 3 月には第十五改正日本薬局方第二追補に国際調和されました無菌試験法が出ます。

2.4 無菌試験法の国際調和作業開始

調和作業開始当時、国内にありました三つの無菌試験法の調和も考慮に入れました。三つの無菌試験法とは、日本薬局方、生物学的製剤基準及び日本抗生物質医薬品基準に収載されていた無菌試験法です。調和作業が進む内に、日本抗生物質医薬品基準は日局に組み込まれましたので、生物学的製剤基準の無菌試験法を日局無菌試験法準拠にするために、国際調和作業段階でも若干の工夫が必要でした。

2.5 無菌試験とは

無菌試験とは、規定された検体又は試料の量について、規定された培地を用いて、規定された方法に従って試験したとき、検体又は試料に由来すると判断される微生物が検出されるかどうかを調べる試験です。

Table 11 に無菌試験結果に影響を及ぼす可能性のある要因を示します。無菌試験法では、これらの要因を一定に定めています。したがって、要因を変えれば検出できる汚染微生物もあるかも知れません。飽くまでも一定のルールでの無菌性を調べる試験です。

Table 12 に汚染菌検出率を示します。汚染率 1.0

Table 10 日局「無菌試験法」の歴史

1951 (6): 適用製品は、注射用蒸留水及び滅菌蒸留水
1961 (7): 細菌と真菌試験に分けて記載、細菌試験には液状チオグリコール酸培地、真菌試験にはブドウ糖・ペプトン培地を使用、接種量及び培地量も記載、液状チオグリコール酸培地の培地性能菌株として、破傷風菌と溶血性連鎖球菌を指定
1971 (8): 無菌試験実施環境として、無菌箱又は無菌試験室内を提示
1976 (9): 液状チオグリコール酸培地Ⅱを導入、破傷風菌と溶血性連鎖球菌を培地性能試験用菌株から除外
1981 (10): MF 法を導入 (表示量又は調製量 100mL 以上のものに適用)、試験実施者の要件を提示
1994 (12): 全面改正、GP 培地を SCD 培地に変更、培養期間を MF 法、直説法ともに 14 日間以上に変更、培地性能試験用菌株を USP に合わせた。微生物発育阻止活性物質の試験及び除去方法を導入、判定方法を明記
1999 年、2004 年、2009 年

Table 11 無菌試験結果に及ぼす要因

$F_0 = F_1 \times F_2 \times F_3 \times F_4 \times F_5 \times F_6 \times F_7$
F ₀ : 無菌試験結果
F ₁ : 被験ロットからのサンプリング方法とサンプリング個数
F ₂ : サンプリングした各容器から培地への接種量
F ₃ : 接種方法 (MF 法、直接法)
F ₄ : 培地の種類
F ₅ : 培養温度
F ₆ : 培養期間
F ₇ : 他

Table 12 汚染菌検出率

$P = 1 - (1 - X)^N$	
P：汚染検体検出確率	
X：母集団（ロット）の汚染率	
N：抜き取り個数（20 容器）	
ロットの汚染率 (%)	汚染検体検出率 (%)
10	87.84
1.0	18.20
0.1	1.98

%の母集団（ロット）から無作為に 20 容器を取り出して、無菌試験を実施したとしても、汚染検体に遭遇する確率は 18%にしか過ぎません。しかも全量を接種し、1 個でも微生物が存在すると検出できるという条件での計算です。別のいい方をすると、1.0%の高い汚染率にもかかわらず、80%以上は無菌試験で検出できないということです。無菌試験による汚染菌検出は非常に感度の悪いもので、現在のように高度な無菌性が保証されている医薬品製造においては、セレモニータ的な意味合いしか持たない試験ともいえます。

2.6 11 の非調和事項をどのように解決したのか

非調和事項の中には「何でそんな些細なことで調和できなかったの?」と思われるものもあるかも知れません。筆者もそうのように思っていました。背景には局方間の意地の絡み合いみたいなものがあったようにも思えます。非調和事項が最終的にどのように解決されたのかについて示します。

2.6.1 #1：変法培地の使用 (Table 13)

無菌試験用培地として、液状チオグリコール酸培地と SCD 培地の他に、培地性能試験とバリデーション試験に適合するならば他の培地も使用可能との

Table 13 #1: (Alternative media)

The following culture media have been found to be suitable for the test for sterility. Fluid thioglycollate medium is primarily intended for the culture of anaerobic bacteria; however, it will also detect aerobic bacteria. Soya-bean casein digest medium is suitable for the culture of both fungi and aerobic bacteria.

Other media may be used provided that they pass the growth promotion and the validation tests.[1]

[1] JP and USP will not include this sentence.

EP 提案に対して、日局と USP は、レフェリーテストとして適用されている無菌試験法を複雑にするものであるとの理由により、他の培地の使用に反対しました。2007 年調和合意では、日局と USP の主張通り、他の培地は使用しないことになりました。

2.6.2 #2：液状チオグリコール酸培地成分であるカンテンの含湿度 (Table 14)

液状チオグリコール酸培地には嫌気度を維持するために、カンテンが 0.75 g/L 濃度に加えられています。このカンテンの含湿度が 15%以下とされていましたが、日局は培地成分からカンテンを取り出してその含湿度を測定することはできないので、15%規格値を取り除くよう求めました。最終的には取り除かれましたが、これはカンテンの規格であり、必ずしも求めるような事項では無かったのかも知れません。

2.6.3 #3, 4：培地の有効期間 (Table 15)

EP から培地はバリデートされた期間有効であるとの提案がありましたが、単に指定菌株を使って培地性能を調べますと、密封容器に入った培地の場合、かなりの長期間、例えば調製後 3 年とか 5 年間有効かも知れません。それも問題ですので、密封容器に入った培地の場合、3 箇月ごとに行う培地性能試験が適合の場合、最長 1 年間は有効、非密封容器に入った培地は 2 週間ごとに行う培地性能試験が適合の場合は 1 箇月間有効としておりましたが、2007 年の調和合意ではバリデートされた期間有効となりました。

Table 14 #2: (Moisture content agar)

<i>Fluid thioglycollate medium</i>	
l-Cystine	0.5 g
Agar, granulated (moisture content not in excess of 15 per cent)[1]	0.75 g
Sodium chloride	2.5 g
Glucose monohydrate/anhydrous	5.5/5.0 g
Yeast extract (water-soluble)	5.0 g
Pancreatic digest of casein	15.0 g
Sodium thioglycollate or	0.5 g
Thioglycollic acid	0.3 ml
Resazurin sodium solution (1 g/l of resazurin sodium), freshly prepared	1.0 ml
Water R	1,000 ml
pH after sterilisation 7.1 ± 0.2	

[1] JP will not specify the moisture content of the agar, granulated.

Table 15 #3: (Shelf-life of media)

Do not use the medium for a longer storage period than has been validated.[1]

If prepared media are stored in unsealed containers, they can be used for one month, provided that they are tested for growth promotion within two weeks of the time of use and that color indicator requirements are met. If stored in tight containers, the media can be used for one year, provided that they are tested for growth promotion within 3 months of the time of use and that the color indicator requirements are met.[2]

[1] JP and USP will not include this sentence.

[2] EP will not include these two sentences.

2.6.4 #5：水銀防腐剤を含む医薬品に対する培地 (Table 16)

ワクチンには、防腐剤として水銀防腐剤であるチメロサルを含むものがあります。中でもアジュバントを含んでいる製剤はMF法が使えないものもあります。前述したように国内にある三つの無菌試験法を日局に統一するためにも、MF法を使えないチメロサル添加ワクチンにはSCD培地の代わりに液状チオグリコール酸培地を用いて培養温度をSCD培地と同じにすることを主張してきました。米国ではワクチンに対する無菌試験は連邦法規集(CFR)に規定されており、チメロサル添加ワクチンにはSCD培地の代わりに液状チオグリコール酸培地が使用されています。2007年調和合意では日局の要求が通り、水銀防腐剤添加製剤には真菌検出試験にも液状チオグリコール酸培地を用いることになりました。

2.6.5 液状チオグリコール酸培地の歴史

液状チオグリコール酸培地は、1940年にBrewerが開発した培地が基になっています (Table 17)。

Table 16 #5: (Products containing Hg preservatives)

Fluid thioglycollate medium is to be incubated at 30-35°C. For products containing a mercurial preservative that cannot be tested by the membrane-filtration method, fluid thioglycollate medium incubated at 20-25°C may be used instead of soya-bean casein digest medium.[1]

[1] EP and USP will not include this sentence.

Table 17 Brewerの培地 (1940年)

• Pork infusion solid	1%
• Peptone (thio)	1%
• Sodium chloride	0.5%
• Sodium thioglycollate	0.1%
• Agar	0.05%
• Water	

チオグリコール酸ナトリウムは当時開発されていたすべての生物製剤(抗毒素製剤が主)に防腐剤として含まれていたチメロサルを中和する能力があり、かつ通常の培養において嫌気性菌の発育も可能ということで普及したものです。その後、米国NIHのPittmanが現在の組成に変え、それが1947年にUSP VIIIに採用され、以後、無菌試験培地として世界中の基準に採用されるようになりました。

2.6.6 #6：培地性能試験の実施頻度 (Table 18)

USPと日局は当初、市販の粉末培地については購入時に培地性能試験を行い、その後は調製方法に問題がなければ調製ロットごとに培地性能試験を行う必要はなく、スキップテストの考えを導入しても良いのではと主張してきましたが、2007年調和合意では培地の種類によらずすべて調製ロット又は購入ロットごとに培地性能試験を実施することになりました。

2.6.7 #7：MF法における洗浄回数 (Table 19)

抗菌活性のある試料をろ過した場合、MFに吸着した抗菌活性物質を洗浄操作によって除去する必要があります。その際の洗浄液量と洗浄回数は、200 mLで5回までの洗浄条件でしたが、日局はフィルター1枚当たり100 mLを主張し、最終的には日局の主張が受け入れられました。

2.6.8 #8：混濁培地からの移植量 (Table 20)

接種した試料によっては培地が混濁し、汚染菌の

Table 18 #6: (Growth promotion test frequency)

Test each batch of ready-prepared medium and each batch of medium prepared either from dehydrated medium[1] or from ingredients. Suitable strains of micro-organisms are indicated in Table 2.6.1.-1.

[1] JP and USP will state that, in appropriate cases, periodic testing of the different batches prepared from the same batch of dehydrated medium is acceptable.

Table 19 #7: (Washing volume)

If the product has antimicrobial properties, wash the membrane not less than three times by filtering through it each time the volume of the chosen sterile diluent used in the validation test. Do not exceed a washing cycle of 5 times 200 ml[1], even if during validation it has been demonstrated that such a cycle does not fully eliminate the antimicrobial activity.

[1] JP will specify "5 times 100 ml per filter".

Table 20 #8: (Transfer volume)

If the material being tested renders the medium turbid so that the presence or absence of microbial growth cannot be readily determined by visual examination, 14 days after the beginning of incubation transfer portions (each not less than 1 ml[1]) of the medium to fresh vessels of the same medium and then incubate the original and transfer vessels for not less than 4 days.

[1] JP will indicate "transfer suitable portions" and omit "(each not less than 1 ml)".

増殖とを区別ができないことがあります。そこで、混濁培地の一部を培養 14 日目に新鮮培地に移植して 4 日間以上培養しますが、移植量について EP と USP は 1 mL 以上を、日局は適量を主張しました。もし汚染菌の増殖があるなら、少量の移植でも十分ですが、最終的に EP/USP の考えを受け入れ、移植量は 1 mL 以上となりました。

2.6.9 #9: 試験の不適合 (Table 21)

日局の現行「無菌試験法」⁹⁾での判定は、「以上の試験の結果、菌の発育を認めないときは、無菌試験に適合とする。菌の発育が認められたときは、不適と判定する。ただし、試験に供した検体とは関係なく無菌試験自体に問題があったことが立証された場合には、再試験を行うことができる。再試験の結果、菌の発育が認められないときは、無菌試験に適合とする。菌の発育が認められたときは、不適と判定する。」となっています。無菌試験自体に問題があったことが立証されない限り、再試験は行えないことになっていますが、最終的に日局も EP/USP 提案に妥協し、以下ようになりました。

微生物の増殖が観察されない場合は、被検製品は無菌試験に適合する。微生物の増殖が観察された場合は、当該被検製品に無関係な原因により試験が無

Table 21 #9: (Invalidity of the test)

The test may be considered invalid only if one or more of the following conditions are fulfilled:

- a) the data of the microbiological monitoring of the sterility testing facility show a fault;
- b) a review of the testing procedure used during the test in question reveals a fault;
- c) microbial growth is found in the negative controls;
- d) after determination of the identity of the micro-organisms isolated from the test, the growth of this species or these species may be ascribed unequivocally to faults with respect to the material and/or the technique used in conducting the sterility test procedure.[1]

[1] JP will not include this sentence ("The test may be ... sterility test procedure.").

効であったことを明確に証明できなければ、被検製品は無菌試験に適合しない。以下の条件のうち一つ以上を満たした場合のみ当該試験は無効と考えられる。

- a) 無菌試験施設の微生物学的モニタリングデータが欠陥を示した場合；
- b) 無菌試験中に用いた試験方法を調査した結果、欠陥が示された場合；
- c) 陰性対照中に微生物の増殖が認められた場合；
- d) 当該無菌試験から分離された微生物の同定後、こ（れら）の菌種の増殖が無菌試験実施中に用いた材料及び/又は技術に関する欠陥に明白に帰せられる場合。

2.6.10 #10: ロット当たりの抜き取り個数 (Table 22)

日局と USP は「ロット当たりの抜き取り個数」表をテキストの中で示していますが、EP は参考情報としてガイダンスにしたいとのことでした。最終的には EP も日局、USP 同様、「ロット当たりの抜き取り個数」はテキストの中に示すことになりました。

2.6.11 #11: 表示容量 100 mL 以上の大容量製剤の抜き取り個数

日局と USP は 10 容器を、EP は 20 容器を主張しました。最終的には、EP が折れて大容量製剤の抜き取り個数は 10 容器になりました。

2.7 調和作業を通じて話題に上った事項

非調和 11 項目とは別にこれまでの長い調和作業

Table 22 試験に用いる最小試験容器数(表2.6.1.-3.)

ロット当たりの製造個数	他に規定されていない限り、それぞれの培地当たりの最小試験個数
注射剤	
100 個以下	10%又は4容器のうち多い方
101 個以上 500 個以下	10 容器
501 個以上	2%又は20 容器（大容量製剤には、10 容器）のうち少ない方
眼軟膏剤及び点眼剤等の非注射剤	
200 個以下	5%又は2容器のうち多い方
201 個以上	10 容器
単回使用製品の場合は、注射剤に準じた抜き取り個数とする	
腸線及び動物用の他の手術糸	
2%又は5容器のうち多い方、最大20容器	
固形バルク製品	
4 容器まで	各バルク容器
5 容器以上 50 容器以下	20%又は4容器のうち多い方
51 容器以上	2%又は10容器のうち多い方

中に合意されましたことを示します。

2.7.1 各培地当たりの最少試料採取量 (Table 23)

2002 年調和無菌試験法を踏まえて作成した現行の日局「無菌試験法」では、液剤の欄に「水溶性又はミリスチン酸イソプロピルで可溶性の他の医薬品」の記載があります。意味が通じませんので、削除を求め、2007 年調和テキストからは削除されました。

2.7.2 試験用菌株 (Table 24)

培地の性能試験や試験法の適格性評価に用いる試

験用菌株は、好気性菌、嫌気性菌及び真菌からなり、菌株名も指定されています。日本では ATCC 株に相当する NBRC 株を指定しています。菌種名が同じでも株名が違うと使用できません。

2.7.3 培地性能試験 (Table 25)

液状チオグリコール酸培地には、*Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* を、SCD 培地には *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* を使用するこ

Table 23 各培地当たりの最少試料採取量(表2.6.1.-2.)

容器の内容量	他に規定されていない限りそれぞれの培地に接種する最小量
液剤	
1 mL 未満	全量
1 mL 以上 40 mL 以下	半量、ただし 1 mL 以上
40 mL 超 100 mL 以下	20 mL
100 mL 超	10%, ただし 20 mL 以上
抗生物質 (液剤)	1 mL
水溶性又はミリスチン酸イソプロピルで可溶性の他の医薬品	全量、ただし 200 mg 以上
懸濁又は乳化して用いる非水溶性医薬品、クリーム又は軟膏剤	
200 mg 以上	
固形剤	
50 mg 未満	全量
50 mg 以上 300 mg 未満	半量、ただし 50 mg 以上
300 mg 以上 5 g 以下	150 mg
5 g 超	500 mg

Table 24 試験用菌株 (表2.6.1-1.)

好気性細菌	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NBRC13276, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NBRC 3134, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NBRC 13275, NCIMB 8626, CIP 82.118
嫌気性細菌	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, 又は ATCC 11437, NBRC 14293
真菌	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NBRC 1594, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus niger</i> *	ATCC 16404, NBRC 9455, IP 1431.83, IMI 149007

* 種名が *Aspergillus brasiliensis* に変更

Table 25 培地性能試験

液状チオグリコール酸培地：

Clostridium sporogenes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*
 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地
Aspergillus niger, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*.

細菌の場合は3日間、真菌の場合は5日間を超えないで培養する。

とになりました。細菌の場合は3日間、真菌の場合は5日間以内に十分な発育を示さなければなりません。

2.7.4 シードロットシステム

微生物はマスターシードロットから継代数が5代を超えないように保存管理する必要があります。

2.7.5 無菌試験法のバリデーション (Table 26)

試験法のバリデーションは「手法の適合性試験」と名称が変わりました。当初、各局で接種菌数、培養期間、MF法の洗浄回数が違っていました。最終的には接種菌数は約100個、培養期間は細菌が3日間、真菌が5日間、抗菌活性物質が吸着したMFの洗浄回数は100 mLで5回になりました。手法の

適合性試験を実施するのは、①新しい医薬品に無菌試験を行う場合、②試験の実施条件に変更があった場合であり、本試験は被験医薬品の無菌試験と同時に行うことができます。

2.7.6 微生物汚染に対する予防措置

1996年に提案された無菌試験法では (Table 27)、「無菌試験は、例えば、清浄環境下に設置されたクラスAの無菌層流キャビネットを用いて、製品の無菌操作法に要求されると同等の条件下で行われる」とありました。

しかし、2007年版 (Table 28) では「無菌試験は無菌条件下で行われる。このため、試験環境は無菌試験の実施に適したものでなければならない。汚染を避けるためにとられる予防措置は、本試験で検出されるべきいかなる微生物にも影響を与えてはならない。作業区域の適切なサンプリング及び適切な制御の実施によって、本試験を実施する作業環境を適切に監視する」となりました。GMP調査に出かけますと、グレードAのクリーンキャビネットを設置している環境がグレードBになっていないと指摘する査察官がいますが、クリーンキャビネットの設置清浄度云々よりは、検出感度の低い無菌試験で汚染菌が検出されますと、基本的にロットアウトに

Table 26 無菌試験法のバリデーション

	項目		
	接種菌数	培養期間	MF法洗浄回数
日局 (1999)	10~100 個	7 日間以内	100mL × 5 回
USP (2000)	100 個以下	7 日間以内	500mL × 5 回
EP (1996)	約 100 個	7 日間以内	
国際調和 (2007)	100 個以下	細菌 3 日間, 真菌 5 日間	100mL × 5 回

Table 27 微生物汚染に対する予防措置 (1996)

The test for sterility is carried out under conditions equivalent with those required for aseptic manufacture of the products designed to avoid accidental contamination of the product during test, using, for example, a class A sterile laminar air-flow cabinet located within a clean room environment.

Table 28 微生物汚染に対する予防措置 (2007)

無菌試験は無菌条件下で行われる。このため、試験環境は無菌試験の実施に適したものでなければならない。汚染を避けるためにとられる予防措置は、本試験で検出されるべきいかなる微生物にも影響を与えてはならない。作業区域の適切なサンプリング及び適切な制御の実施によって、本試験を実施する作業環境を適切に監視する。

しなければなりませんので、そのリスクを軽減するためにはどうしたら良いかという観点で、微生物汚染に対する予防措置を考えるべきと思います。

2.7.7 培地の滅菌 (Table 29)

1996 年版では、120℃で 20 分間滅菌となっていました。その後、バリデートされた条件下で滅菌するとなりました。

2.7.8 無菌試験とは (Table 30)

1996 年版には、最終滅菌製剤に対してはパラメトリックリリースも許容可能である旨の記載がありました。無菌試験は、無菌操作法で製される製品にのみ有効な試験であるといっています。最終滅菌医薬品に科学的に意味のない無菌試験を適用し続けるのは問題だと思います。日局製剤通則第 6 項でもパラメトリックリリースは許容しています。最終滅菌医薬品に無菌試験を適用しているメーカーは可能な限り、パラメトリックリリース適用の一部変更届けを出していただきたいと思います。

3. 最後に

調和作業が始まった頃は科学的な観点からの議論が多かったように思えますが、Q4B に指摘されました 11 項目の調和は科学的というよりは試験法の「統一」を目指すための作業でしかなかったように

Table 29 培地の滅菌

Sterilise by heating using a validated system in an autoclave at 120 °C for 20 min. Store at a temperature between 2 °C and 25 °C. If necessary regenerate the medium just before use by heating in a water-bath for 20 min and cooling quickly.

Table 30 無菌試験とは (1996)

In the case of products sterilised in their final sealed containers, physical proofs, biologically based and automatically documented, showing correct treatment throughout the batch during sterilisation are of greater assurance than the sterility test. Hence a validated parametric release of these products is acceptable.

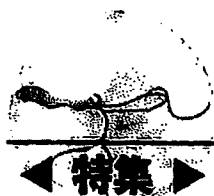
The sterility test is the only analytical method available for products prepared under aseptic conditions and furthermore it is, in all cases, the only analytical method available to the authorities who have to examine any product for sterility.

感じております。

無菌試験法の長い調和作業において、USP の Roger Dabbah 先生、EP の Peter Castle 先生とは家族ぐるみでお付き合いをさせていただきました。お二人との思い出は尽きないものがありますが、筆者と同年齢の Peter Castle 先生が今年 (2008 年) 他界されましたことは残念でなりません。

文 献

- 1) 厚生省：第六改正日本薬局方，1951.
- 2) 厚生省：第七改正日本薬局方，1961.
- 3) 厚生省：第八改正日本薬局方，1971.
- 4) 厚生省：第九改正日本薬局方，1976，p. 695.
- 5) 厚生省：第十改正日本薬局方，1981，p. 736.
- 6) 厚生省：第十二改正日本薬局方第二追補，1994，p. 14.
- 7) 厚生省：第十三改正日本薬局方第二追補，1999，p. 10.
- 8) 厚生労働省：第十四改正日本薬局方第二追補，2004，p. 6.
- 9) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方，2006，p. 88.



Helicobacter pylori と他の細菌・ウイルスの混合感染

Helicobacter pylori とマイコプラズマの 重複感染

神谷 茂* 蔵田 訓* 佐々木次雄** 柳田 修*** 跡見 裕***

慢性胃炎の胃粘膜組織からマイコプラズマ (*Mycoplasma*) が検出され、マイコプラズマ感染が *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染とともに胃粘膜の炎症を誘導している可能性が報告された。また、胃癌組織からブタ由来の *Mycoplasma hyorhinis* が高率に検出されたとの報告がなされている。喘息発作や動脈硬化症におけるマイコプラズマと *H. pylori* の感染が検討されたが、*H. pylori* 感染はこれらの疾患の病態に影響を与えているものとは考えられなかった。*H. pylori* と慢性気管支炎や結核との関連性が報告されているが、マイコプラズマ感染とのリンクについては不明である。*H. pylori* とマイコプラズマとの慢性重複感染が生体にどんな効果を与えているかについての検討が今後期待される。

KEY WORDS

Helicobacter pylori, マイコプラズマ, dual infection (重複感染)

はじめに

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) は細胞壁を欠くグラム陰性菌で、最小の細菌である。マイコプラズマのうち *Mycoplasma pneumoniae* はヒトの原発性異型肺炎 (マイコプラズマ肺炎) を引き起こす病原細菌である。海外の報告では、ヒト胃癌組織よりマイコプラズマが高率に検出されるほか、ヒト慢性胃炎組織からも各種のマイコプラズマが PCR 法により検出されている。胃内に棲息する *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) とマイコプラズマとの重複感染に関する報告ならびに自験例を紹介し、両者の感染効果を考察する。

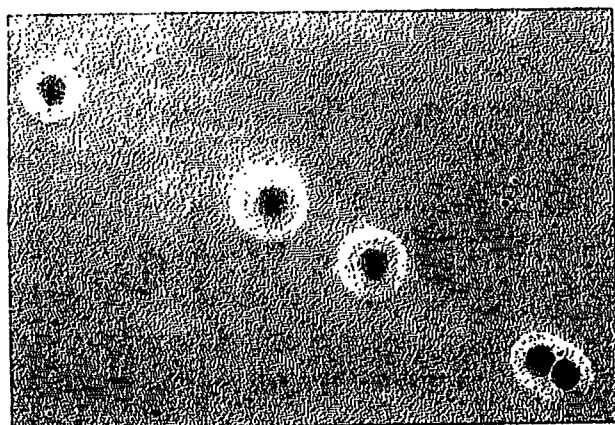
1. マイコプラズマの性状

マイコプラズマは直径 0.3~0.8 μm の球型または西洋梨型を示すグラム陰性菌で、細菌濾過器を通過し得る最小の細菌である。細胞壁を保有しないため多形性である。細胞表面は蛋白と脂質の3層膜により構成される。固形培地での発育は表層から内部へ中心部がくい込むように増殖する。マイコプラズマは桑の実状、目玉焼き状、乳首状などのコロニーを形成する (図1)。増殖にはステロールを要求する。ヒトのマイコプラズマである *Mycoplasma pneumoniae* のゲノムサイズは 816,394 bp であり、細胞寄生性を示さない病原体としては最小となる。

* KAMIYA Shigeru, KURATA Satoshi/杏林大学医学部感染症学

** SASAKI Tsuguo/国立感染症研究所細菌部

*** YANAGIDA Osamu, ATOMI Yutaka/杏林大学医学部外科学



図① *M. pneumoniae* のコロニー形態 (PPLO 培地)
「目玉焼き状」に観察される。

表① ヒト系マイコプラズマの性状

性 状	存在部位 (病原性)			
菌 名	ブドウ球菌分解	アルギニン分解	モルモット肺組織増殖性	ウレアーゼ活性
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	+	-
<i>M. orale</i>	-	+	-	-
<i>M. salivarium</i>	-	+	-	-
<i>M. buccale</i>	-	+	-	-
<i>M. faucium</i>	-	+	-	-
<i>M. lipophilum</i>	-	+	-	-
<i>M. hominis</i>	-	+	-	-
<i>M. fermentans</i>	+	+	-	-
<i>M. genitalium</i>	+	-	+	-
<i>M. primatum</i>	-	+	-	-
<i>U. urealyticum</i>	-	-	-	+

* : ヒトへの病原性はいまだ確定されていない。
(田口晴彦ら, 2007¹⁾ より引用)

M. pneumoniae のゲノムがコードする蛋白質は 677 ほどしかないと考えられている。

M. pneumoniae は、通常飛沫感染によりマイコプラズマ肺炎を引き起こす。市中肺炎の約 20% は本菌による。潜伏期は約 2~3 週間で発熱、咳嗽、喀痰などの症状が認められ、胸部 X 線で下肺野にスリガラス状陰影を検出することが多い。好発年齢は 5~19 歳で秋から冬にかけての流行がみられる。近年、5 歳以下の小児や高齢者における発症が増加している。肺炎のほかに気管支炎、皮

膚発疹症、鼓膜炎、関節炎、髄膜炎、脳炎などを併発することがある。ヒトから分離されるマイコプラズマとして *M. pneumoniae* のほかに *M. hominis* (咽頭炎・扁桃炎や流産・分娩後の発熱を起こす可能性あり)、*M. genitalium* (尿道炎の原因となる可能性あり)、*M. salivarium*、*M. orale*、*M. fermentans* やウレアーゼ活性をもつ *Ureaplasma urealyticum* (尿道炎の原因となる可能性あり) などがあげられる (表①)¹⁾。

2. 韓国人胃粘膜からのマイコプラズマの検出と *H. pylori* 感染との関連

Kwon ら²⁾ は 57 例の慢性胃炎患者の胃粘膜生検材料 (51 例、前庭部; 5 例、胃体部) を対象として、マイコプラズマ特異的 16S rDNA に対するプライマーを用いた PCR 法によりマイコプラズマの検出を試みた。マイコプラズマ DNA が増幅されたのは 57 例中 23 例 (41.1%) であった (22 例、前庭部材料; 1 例、胃体部材料) (表②)。増幅された DNA の塩基配列シーケンシング解析の結果、12 例は *M. faucium* (100% homology)、1 例は *M. salivarium* (100% homology)、2 例は *M. fermentans* (98.7% homology)、1 例は *M. orale* (88.0% homology)、1 例は *M. spermatophilum* (100% homology) と *M. salivarium* (100% homology) の混合、1 例は *M. fermentans* (98.7% homology) と *M. faucium* (100% homology) の混合であることが明らかにされた。残り 5 例では DNA シーケンシングがおこなわれなかった。

マイコプラズマ陽性検体と陰性検体とにおける炎症度 (リンパ球浸潤度)、炎症活性 (好中球浸潤度)、萎縮、化生および定着 *H. pylori* 量についての比較検討がなされた (表③)。マイコプラズマ陽性症例では陰性症例にくらべて有意に炎症活性が高値を示したが ($p < 0.005$)、炎症度、萎縮、化生、定着 *H. pylori* 量においてはマイコプラズマ検出の有無とは関連しなかった。

3. 中国人胃癌患者からのマイコプラズマの検出

Huang ら³⁾ は胃癌組織におけるマイコプラズマ感染についての検索をおこなった。彼らが作製した *M. hyorhinis* に対するモノクローナル抗体 PD4 を用いて、組織染色法により胃癌症例 90 例のマイコプラズマ感染率