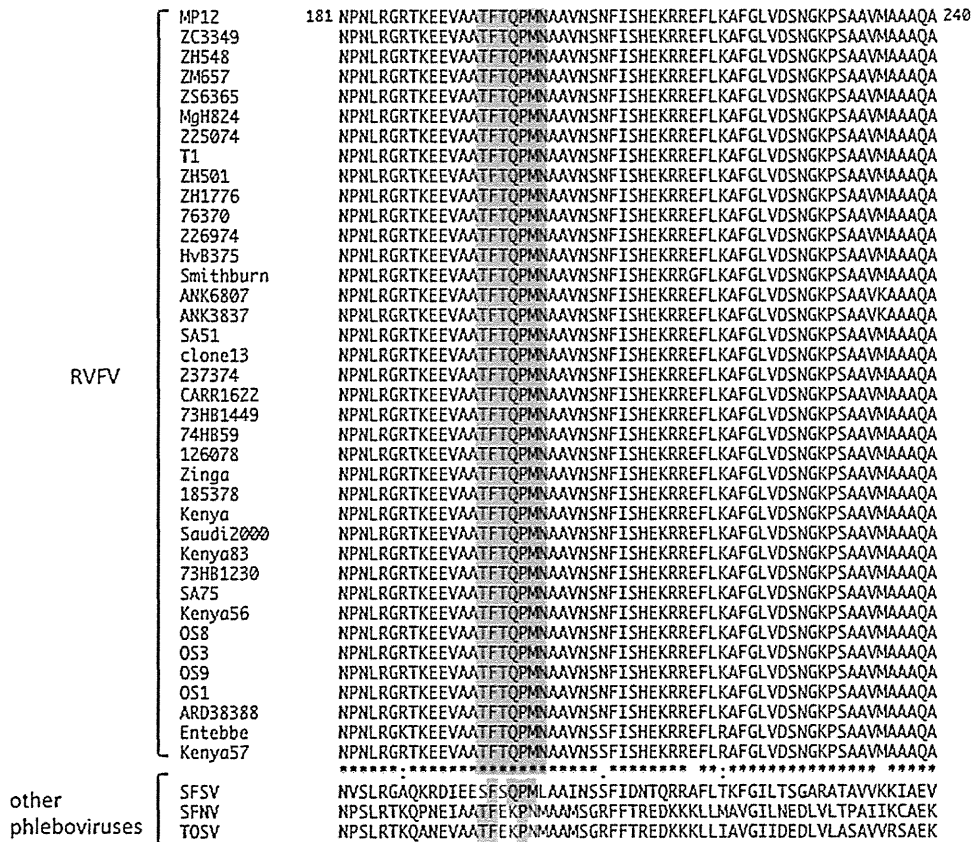


**Fig. 3.** Schematic representation of GST-tagged truncated RVFV rNP, and the reactivity of MAb D5-59, C10-54, and G2-36 and anti-GST antibody to the full-length and truncated rNPs. Anti-GST antibody was used to confirm the expression of the GST-tagged rNP in *E. coli*. MAb C10-54 reacted only to full-length rNP, and G2-36 and D5-59 reacted to the C-terminal one-third region, whereas anti-GST reacted to all the rNP proteins. Intensities of faint bands observed for NP1-89 and NP1-190 by MAb D5-59 were more than 4-fold weaker than those of NP177-245, NP76-245 and full-length NP1-245 (data not shown), thus we considered that both NP1-89 and NP1-190 were negative for binding to MAb D5-59. (B) The epitope recognized by G2-36 and D5-59 was analyzed in more detail with various rNPs subdivided from the C-terminal one-third region. The numbers shown for each schematic rNP indicate the amino acid positions of the RVFV NP in each truncated NP. The epitope region ranging from amino acid residues 195–201 is shown in the box.

perform substantially better than linear epitope-specific antibodies. It is suggested that MAb C10-54 could be suitable for detecting a small amount of NP antigens, although a more detailed study is needed to determine whether this MAb is cross-reactive to all RVFV isolates. It is noteworthy that the amino acid sequence of the region including the epitope recognized by MAb D5-59 and G2-36 was conserved among all the RVFV isolates so far deposited in the GenBank database, and that there was a significant diversity in the amino acid sequences between RVFV and other Phleboviruses.

Thus, the Ag-capture ELISA using these MAb is thought to be specific for the detection of RVFV among Phleboviruses. Thus, these MAb may be specifically useful for detecting RVFV and for the further development of highly specific dipstick/lateral flow devices that provide sensitive, easy handling, and less time consuming assay for diagnosis of RVF.

In conclusion, an RVFV NP-detection ELISA using novel MAb was developed, and the epitopes of these MAb on RVFV NP were identified. Although further validation of this ELISA system is



**Fig. 4.** Amino acid sequence alignment of NPs of RVFV isolates and other Phleboviruses. The minimum region recognized by MAbs G2-36 and D5-59 is shown as a gray box. The alignment includes only a limited number of RVFV isolates (38 strains). However, we confirmed that the amino acid sequence of <sub>195</sub>TFTQPMN<sub>201</sub> was completely conserved among all RVFV isolates (98 strains) available on the GenBank database (data not shown). The amino acid sequences of the corresponding regions of the NP of other Phleboviruses were not identical.

required with a large number of clinical specimens, it may offer an effective tool for diagnosis of RVFV infection in humans and animals.

**Acknowledgements**

We thank Ms. M. Ogata for her technical and clerical assistance. This work was financially supported by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (H19-Shinkou-Ippan-012, H19-Shinkou-Ippan-003, and H22-Shinkou-Ippan-006).

**References**

Al-Hazmi, M., Ayoola, E.A., Abdurahman, M., Banzal, S., Ashraf, J., El-Bushra, A., Hazmi, A., Abdullah, M., Abbo, H., Elamin, A., Al-Sammani el, T., Gadour, M., Menon, C., Hamza, M., Rahim, I., Hafez, M., Jambavalikar, M., Arishi, H., Aqeel, A., 2003. Epidemic Rift Valley fever in Saudi Arabia: a clinical study of severe illness in humans. *Clin. Infect. Dis.* 36, 245–252.

Alrajhi, A.A., Al-Semari, A., Al-Watban, J., 2004. Rift Valley fever encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 554–555.

Billecocq, A., Vialat, P., Bouloy, M., 1996. Persistent infection of mammalian cells by Rift Valley fever virus. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt. 12), 3053–3062.

Bird, B.H., Bawiec, D.A., Ksiazek, T.G., Shoemaker, T.R., Nichol, S.T., 2007a. Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3506–3513.

Bird, B.H., Khristova, M.L., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., 2007b. Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J. Virol.* 81, 2805–2816.

Bird, B.H., Githinji, J.W., Macharia, J.M., Kasiiti, J.L., Muriithi, R.M., Gacheru, S.G., Musaa, J.O., Townner, J.S., Reeder, S.A., Oliver, J.B., Stevens, T.L., Erickson, B.R., Morgan, L.T., Khristova, M.L., Hartman, A.L., Comer, J.A., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., 2008. Multiple virus lineages sharing recent common ancestry were

associated with a Large Rift Valley fever outbreak among livestock in Kenya during 2006–2007. *J. Virol.* 82, 11152–11166.

Fafetine, J.M., Tijhaar, E., Paweska, J.T., Neves, L.C., Hendriks, J., Swanepoel, R., Coetzer, J.A., Egberink, H.F., Rutten, V.P., 2007. Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of a N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants. *Vet. Microbiol.* 121, 29–38.

Gerdes, G.H., 2004. Rift Valley fever. *Rev. Sci. Tech.* 23, 613–623.

Jansen van Vuren, P., Paweska, J.T., 2009. Laboratory safe detection of nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus in human and animal specimens by a sandwich ELISA. *J. Virol. Methods* 157, 15–24.

Jansen van Vuren, P., Potgieter, A.C., Paweska, J.T., van Dijk, A.A., 2007. Preparation and evaluation of a recombinant Rift Valley fever virus N protein for the detection of IgG and IgM antibodies in humans and animals by indirect ELISA. *J. Virol. Methods* 140, 106–114.

Ji, Y., Guo, W., Zhao, L., Li, H., Lu, G., Wang, Z., Wang, G., Liu, C., Xiang, W., 2011. Development of an antigen-capture ELISA for the detection of equine influenza virus nucleoprotein. *J. Virol. Methods* 175, 120–124.

Kitts, P.A., Possee, R.D., 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* 14, 810–817.

Madani, T.A., Al-Mazrou, Y.Y., Al-Jeffri, M.H., Mishkhas, A.A., Al-Rabeah, A.M., Turkistani, A.M., Al-Sayed, M.O., Abodahish, A.A., Khan, A.S., Ksiazek, T.G., Shobokshi, O., 2003. Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin. Infect. Dis.* 37, 1084–1092.

Martin-Folgar, R., Lorenzo, G., Boshra, H., Iglesias, J., Mateos, F., Borrego, B., Brun, A., 2010. Development and characterization of monoclonal antibodies against Rift Valley fever virus nucleocapsid protein generated by DNA immunization. *MAbs* 2, 275–284.

MMWR, 2007. Rift Valley fever outbreak—Kenya, November 2006–January 2007. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 56, 73–76.

Nakauchi, M., Fukushi, S., Saijo, M., Mizutani, T., Ure, A.E., Romanowski, V., Kurane, I., Morikawa, S., 2009. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1132–1138.

Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Prehaud, C., Kurane, I., Morikawa, S., 2002. Recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1587–1591.

- Saijo, M., Tang, Q., Shimay, B., Han, L., Zhang, Y., Asiguma, M., Tianshu, D., Maeda, A., Kurane, I., Morikawa, S., 2005. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J. Med. Virol.* 77, 83–88.
- Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Fukushi, S., Mizutani, T., Philippe, M., Georges, A.J., Kurane, I., Morikawa, S., 2006. Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant nucleoprotein: detection of authentic Marburgvirus. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59, 323–325.
- Saijo, M., Georges-Courbot, M.C., Marianneau, P., Romanowski, V., Fukushi, S., Mizutani, T., Georges, A.J., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S., 2007. Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1182–1189.
- Saluzzo, J.F., Anderson Jr., G.W., Hodgson, L.A., Digoutte, J.P., Smith, J.F., 1989. Antigenic and biological properties of Rift Valley fever virus isolated during the 1987 Mauritanian epidemic. *Res. Virol.* 140, 155–164.
- Shimshony, A., 1999. Disease prevention and preparedness in cases of animal health emergencies in the Middle East. *Rev. Sci. Tech.* 18, 66–75.
- Shimshony, A., Barzilai, R., 1983. Rift Valley fever. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 27, 347–425.
- Shoemaker, T., Boulianne, C., Vincent, M.J., Pezzanite, L., Al-Qahtani, M.M., Al-Mazrou, Y., Khan, A.S., Rollin, P.E., Swanepoel, R., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., 2002. Genetic analysis of viruses associated with emergence of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen, 2000–01. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1415–1420.
- Sissoko, D., Giry, C., Gabrie, P., Tarantola, A., Pettinelli, F., Collet, L., D'Ortenzio, E., Renault, P., Pierre, V., 2009. Rift Valley fever, Mayotte, 2007–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 568–570.
- Velumani, S., Du, Q., Fenner, B.J., Prabakaran, M., Wee, L.C., Nuo, L.Y., Kwang, J., 2008. Development of an antigen-capture ELISA for detection of H7 subtype avian influenza from experimentally infected chickens. *J. Virol. Methods* 147, 219–225.
- Zhou, Y.H., Chen, Z., Purcell, R.H., Emerson, S.U., 2007. Positive reactions on Western blots do not necessarily indicate the epitopes on antigens are continuous. *Immunol. Cell Biol.* 85, 73–78.

## Genotype Distribution of Human Papillomaviruses in Japanese Women with Abnormal Cervical Cytology

Kazunari Kondo<sup>1</sup>, Asami Uenoyama<sup>1</sup>, Ryo Kitagawa<sup>1</sup>, Hajime Tsunoda<sup>1</sup>, Rika Kusumoto-Matsuo<sup>2</sup>, Seiichiro Mori<sup>2</sup>, Yoshiyuki Ishii<sup>2</sup>, Takamasa Takeuchi<sup>2</sup>, Tadahito Kanda<sup>3</sup> and Iwao Kukimoto<sup>\*,2</sup>

<sup>1</sup>NTT Medical Center Tokyo, 5-9-22 Higashi-gotanda, Shinagawa-ku, Tokyo 141-8625, Japan

<sup>2</sup>WHO HPV LabNet Regional Reference Laboratory, WHO Western Pacific Region, Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-murayama, Tokyo 208-0011, Japan

<sup>3</sup>Center of Research Network for Infectious Diseases, Riken, 1-101 Kanda-jinbocho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0051, Japan

**Abstract:** We report the prevalence and genotype distribution of human papillomaviruses (HPVs) among Japanese women with abnormal cervical cytology using the PGMY-CHUV assay, one of PGMY-PCR-based lineblot assays that was validated and shown to be suitable for the detection of multiple HPV types in a specimen with minimum bias. Total DNA was extracted from cervical exfoliated cells collected from 326 outpatients with abnormal Pap smears. Overall, 307 specimens (94%) were HPV-positive, 30% of which contained multiple genotypes. The prevalence of HPV DNA was 83% (49/59 samples) in atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US); 91% (20/22 samples) in atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H); 97% (130/134 samples) in low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL); and 99% (85/86 samples) in high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). Three most frequent HPV types detected in HSIL were HPV16 (36%), HPV52 (24%), and HPV58 (14%). Our results suggest that multiple HPV infections are more prevalent in Japanese women than previously reported, and confirm that HPV52 and 58 are more dominant in their cervical precancerous lesions when compared to those reported in Western countries.

**Keywords:** Human papillomavirus, HPV genotyping, cervical cancer, Pap smear, abnormal cytology, HPV vaccine.

### INTRODUCTION

Human papillomaviruses (HPVs) are the causative agents of cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia, and other anogenital cancers [1]. Among more than 100 HPV types so far identified, nearly 40 types infecting the anogenital mucosa are classified as either low- or high-risk types on the basis of their oncogenic potential [2]. A previous large-scale epidemiological study identified 15 HPV types, HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82, which are closely linked to the development of cervical cancer [3], with approximately 70% of cervical cancer cases worldwide attributed to HPV16 and 18 [4].

Two prophylactic HPV vaccines, one quadrivalent vaccine directed against HPV6, 11, 16, and 18 [Gardasil® (Merck and Co., Whitehouse Station, NJ, USA)], and one bivalent vaccine against HPV16 and 18 [Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium)], are now being introduced worldwide. Both vaccines exhibit a high efficacy for preventing cervical precancerous lesions caused by vaccine-targeted HPV types in clinical trials for

HPV-uninfected women [5,6]. In Japan, the bivalent vaccine was first approved for use in 2009, followed by the quadrivalent vaccine in 2011, both being introduced with the expectation of reducing cervical cancer cases. However, previous epidemiological studies performed in Japanese women have shown variation in the proportion of HPV16 and 18 in cervical cancer, ranging from 50 to 70% [7-9], which makes it difficult to predict the real impact of the HPV vaccination on cervical cancer prevention in the Japanese population.

Because currently available HPV vaccines are thought to be effective only for the vaccine-targeted types, precise determination of the HPV genotype distribution in cervical cancer and its precancerous lesions is needed for assessment of the vaccine efficacy and planning of future vaccination strategies. In 2006, the World Health Organization (WHO) established the HPV laboratory network (LabNet) with the aim of harmonizing and standardizing laboratory testing procedures to promote consistent laboratory evaluation of HPV-related disease burden and monitoring of the performance of HPV vaccines. Through a series of collaborative studies for standardizing HPV genotyping assays, the LabNet has recently described a PGMY-lineblot assay (PGMY-CHUV [10]) as a reliable, low-cost HPV genotyping method [11,12]. The PGMY-CHUV assay consists of PCR with biotinylated generic PGMY09/11

\*Address correspondence to this author at the Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-murayama, Tokyo 208-0011, Japan; Tel: +81 42 561 0771; Fax: +81 42 567 5632; E-mail: [ikuki@nih.go.jp](mailto:ikuki@nih.go.jp)

primers to amplify the HPV L1 region and subsequent reverse-blotting hybridization with type-specific DNA probes, and is suitable to detect multiple HPV types in a specimen with minimum bias [10,13]. Most studies on the HPV genotype distribution in Japanese women, however, have relied on PCR of HPV DNA using a limited pair of L1 consensus primers, such as LC1/LC2 [7,14-20], which is less sensitive to detect multiple-genotypes infection compared to other PCR assays using type-specific primers, which might have resulted in less confident data on HPV prevalence in Japanese women.

In this study we examined the prevalence and distribution of HPV genotypes among Japanese women with abnormal Pap smears by using the PGMY-CHUV assay. The data indicate that multiple HPV infections are more prevalent in Japanese women than previously reported, and confirm that HPV52 and 58 are more dominant in cervical precancerous lesions of Japanese women than in those of Western countries' women.

## MATERIALS AND METHODOLOGY

### Study Population and Specimen Collection

From November 2009 to May 2011, we enrolled 1088 women who visited NTT Medical Center Tokyo, a regional medical center in Tokyo, as outpatients having some sort of symptoms or referred by primary care physicians for further examination. The women were subjected to the Papanicolaou (Pap) smear test, leading to diagnoses of 762 (70%) negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM) and 326 (30%) abnormal cytology cases, based on the criteria of the Bethesda System 2001 (Fig. 1). Together with sampling Pap smears, cervical exfoliated cells were collected in Thinprep® collection media by using a Cervex-brush® combi for HPV genotyping. The women with abnormal cytology were further examined by colposcopy, and tissue specimens obtained by punch biopsy were histologically diagnosed. Among 86 HSIL cases, 53 cases were treated by cervical conization, and excised tissues were finally histologically

diagnosed as 1 CIN1, 9 CIN2, and 42 CIN3 cases (Fig. 1). All ICC cases diagnosed by the Pap test were finally histologically confirmed by tissue biopsy. The study protocol was approved by the Ethics Committee at NTT Medical Center Tokyo, and written informed consent for study participation was obtained from each patient.

### HPV DNA Detection and Genotyping

Total DNA was extracted from a 200- $\mu$ L aliquot of the suspended cell samples by using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), resulting in the final elution volume of 100  $\mu$ L Tris-EDTA buffer. Cross-contamination between samples during DNA extraction was evaluated by simultaneous extraction from only a collection medium. A 3- $\mu$ L aliquot of the purified DNA was then used for PCR amplification with AmpliTaq Gold® polymerase (GE Healthcare Bio-Sciences), biotinylated PGMY09/11 primers, to amplify the L1 DNA of >40 HPV genotypes, and biotinylated HLA primers, to amplify cellular HLA DNA. Positive control (0.1 pg/mL of HPV16 DNA as a plasmid) and negative control (dH<sub>2</sub>O) were included in every 50 PCR reactions to verify the sensitivity of PCR and monitor contamination of HPV DNA in reagents. The PCR products were run on 1.5% agarose gels to assign the positivity of HPV DNA amplification and to confirm the integrity of the extracted DNA as amplification of HLA DNA. Reverse blotting hybridization was done as described in the Human Papillomavirus Laboratory Manual published by the WHO [11]. Briefly, 15- $\mu$ L denatured PCR products were allowed to hybridize with oligonucleotide probes specific for 31 HPV types (HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 83, and 84) immobilized on a Biotodyne C membrane (Pall corporation) using a Miniblotter MN45 (Immunetics, Cambridge, MA, USA). The hybridized DNA was detected using streptavidin-HRP (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA) and ECL detection reagent (GE Healthcare Bio-Sciences). After reading positive signals, PCR-positive but hybridization-negative samples were

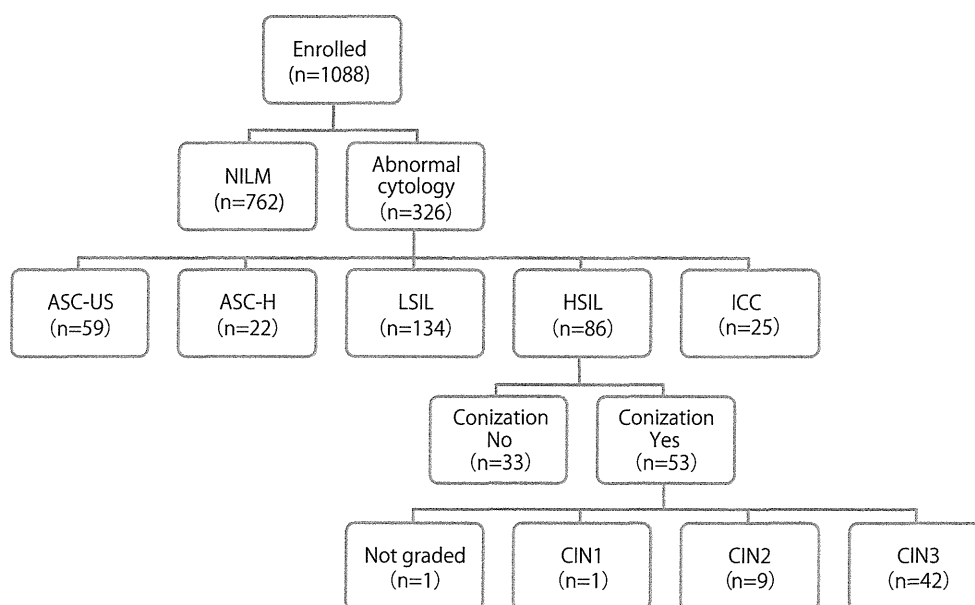


Fig. (1). Overview of study population. n indicates numbers of patients.

further subjected to direct sequencing of the PGMY PCR products with the PGMY11 primer. Our typing capability using the PGMY-CHUV assay was approved as proficient in the HPV DNA proficiency panel studies conducted annually by the WHO HPV LabNet [12].

### Statistical Analysis

To test differences between population proportions, Pearson's chi-squared test with Yates' continuity correction was performed using R version 2.11.1. Two-sided *P* values were calculated and considered to be significant at less than 0.05. Confidence intervals (CI) at 95% level for population proportions were calculated using R based on the assumption of the *F* distribution.

### RESULTS

The overall prevalence of HPV DNA among 326 women with abnormal Pap smears (age 17 to 84, mean age  $\pm$  standard deviation:  $38.9 \pm 10$  years) was 94.2% (307/326) (Table 1). The study subjects were stratified based on their cytological status. The mean age  $\pm$  standard deviation in each status was as follows: atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US),  $38.3 \pm 9.4$  years; atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H),  $38.8 \pm 9.8$  years; low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL),  $37.4 \pm 10$  years; high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL),  $38.3 \pm 8.9$  years; and invasive cervical cancer (ICC),  $52.0 \pm 14$  years. The detection rate of HPV DNA in each cytological group was as follows: ASC-US, 83.1% (49/59); ASC-H, 90.9% (20/22); LSIL, 97.0% (130/134); HSIL, 98.8% (85/86); and ICC, 92.0% (23/25). Meanwhile, among 762 NILM cases, the prevalence of HPV DNA in 173 pregnant women without cervical abnormalities (mean age  $\pm$  standard deviation:  $31.8 \pm 4.8$  years) was 24.3% (42/173) (data not shown).

Overall, among the 307 HPV-positive women with cervical abnormalities, HPV16 (21.2%), HPV52 (20.2%), and HPV58 (14.7%) were predominantly detected, which was followed by HPV56 (8.3%), HPV51 (7.4%), and HPV31 (7.4%) (Table 2). The genotype distribution varied with the status of lesion abnormalities: in ASC-US, HPV52 (20.3%), HPV16 (15.3%), HPV58 (13.6%), and HPV53 (10.2%); in ASC-H, HPV52 (40.9%), HPV16 (22.7%), HPV58 (18.2%) and HPV31 and HPV51 (13.6%); in LSIL, HPV58 (17.2%), HPV52 (16.4%), HPV56 (14.9%), HPV16 (10.4%), and HPV66 (9.7%); in HSIL, HPV16 (36.0%), HPV52 (24.4%), HPV58 (14.0%), HPV31 (11.6%), and HPV18 and HPV51 (9.3%). Comparison of the detection rate of high-risk types

between LSIL and HSIL showed that HPV16 and 31 were significantly more prevalent in HSIL ( $p = 0.00001$  for HPV16, and 0.046 for HPV31), while the reverse was observed for HPV56 and 66 ( $p = 0.013$  for HPV56, and 0.025 for HPV66) (Fig. 2a). Sequencing of PCR-positive and hybridization-negative samples (X in Table 2) identified HPV types not included in the probes on the typing membrane: HPV61, 62, 67, 71, 74, 86, 87, and 90, all of which belong to the low-risk genotype.

Multiple HPV genotypes were detected in 29.6% of total HPV-positive subjects (91/307) (Table 3). The detection rate of multiple HPV genotypes in each cytological group was as follows: ASC-US, 24.5% (12/49); ASC-H, 40.0% (8/20); LSIL, 32.3% (42/130); HSIL, 31.8% (27/85); and ICC, 8.7% (2/23). Among the 91 subjects of multiple infections of any HPVs, the detection rate of multiple high-risk types was 84.6% (77/91): ASC-US, 66.7% (8/12); ASC-H, 100% (8/8); LSIL, 83.3% (35/42); HSIL, 88.9% (24/27); and ICC, 100% (2/2). The 2 cases of multiple infections in ICC were co-infections of HPV16 and 53, and of HPV31 and 53. Overall, the most frequent combination of multiple infections was co-infection of HPV16 and 52 (9.9%), followed by co-infection of HPV52 and 58 (9.9%). As shown in Fig. (3), the proportion of HPV16 and/or 18 infections without other high-risk HPVs was significantly higher in HSIL than in LSIL ( $p = 0.0002$ ), and was further higher in ICC than in HSIL ( $p = 0.045$ ). Conversely, the proportion of high-risk HPV infections other than HPV16/18 was significantly lower in HSIL than in LSIL ( $p = 0.026$ ), and was slightly lower in ICC compared to HSIL (but not statistically significant). The proportion of multiple infections of HPV16 and/or 18 with other high-risk HPVs was highest in HSIL (15.1%), but was lowest in ICC (4.0%). Among the 307 HPV-positive women, high- and low-risk genotypes were detected in 281 (91.5%) and 46 (15.0%) women, respectively, and 26 (8.5%) women were infected with both types.

In the 86 subjects of HSIL, 42 women (mean age  $\pm$  standard deviation:  $38.6 \pm 6.1$  years) were histologically diagnosed as CIN3 by cervical cone biopsy (see Fig. 1). The detection rate of high-risk HPV DNA in the CIN3 cases was 100%, 33.3% of which corresponded to multiple infections (14/42). Three most frequent genotypes in the CIN3 cases were HPV16 (45.2%), HPV58 (19.0%), and HPV52 (14.3%) (Fig. 2b). Among the 25 cases of ICC, 20 cases were histologically diagnosed as squamous cell carcinoma (SCC), whereas the remaining 5 cases were determined as adenocarcinoma. In SCC, HPV16 and 18 were detected in 40.0% and 10.0%, respectively (Fig. 2b). In the 5 cases of

**Table 1. Prevalence of HPV DNA in Japanese Women with Abnormal Cervical Cytology**

	Total	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	ICC
N*	326	59	22	134	86	25
HPV (+)*	307	49	20	130	85	23
%**	94.2	83.1	90.9	97.0	98.8	92.0
Age***	$38.9 \pm 10$	$38.3 \pm 9.4$	$38.8 \pm 9.8$	$37.4 \pm 10$	$38.3 \pm 8.9$	$52.0 \pm 14$

\*. Numbers of patients.

\*\*., Percentages of HPV-positive patients relative to the total number of patients in each cytological group.

\*\*\*., Mean age  $\pm$  standard deviation.

Table 2. HPV Type Prevalence in Japanese Women with Abnormal Cervical Cytology

HPV Types	Total (N = 326)		ASC-US (N = 59)		ASC-H (N = 22)		LSIL (N = 134)		HSIL (N = 86)		ICC (N = 25)	
	n*	%**	n*	%**	n*	%**	n*	%**	n*	%**	n*	%**
<b>High-Risk</b>												
16	69	21.2	9	15.3	5	22.7	14	10.4	31	36.0	10	40.0
18	23	7.1	1	1.7	1	4.5	9	6.7	8	9.3	4	16.0
26	1	0.3	0	0	0	0	0	0	1	1.2	0	0
31	24	7.4	3	5.1	3	13.6	5	3.7	10	11.6	3	12.0
33	6	1.8	0	0	0	0	2	1.5	3	3.5	1	4.0
35	6	1.8	0	0	0	0	3	2.2	3	3.5	0	0
39	16	4.9	3	5.1	0	0	11	8.2	1	1.2	1	4.0
45	1	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4.0
51	24	7.4	2	3.4	3	13.6	11	8.2	8	9.3	0	0
52	66	20.2	12	20.3	9	40.9	22	16.4	21	24.4	2	8.0
53	23	7.1	6	10.2	1	4.5	12	9.0	2	2.3	2	8.0
56	27	8.3	3	5.1	1	4.5	20	14.9	3	3.5	0	0
58	48	14.7	8	13.6	4	18.2	23	17.2	12	14.0	1	4.0
59	10	3.1	3	5.1	1	4.5	4	3.0	2	2.3	0	0
66	15	4.6	1	1.7	0	0	13	9.7	1	1.2	0	0
68	5	1.5	1	1.7	0	0	2	1.5	2	2.3	0	0
73	1	0.3	1	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0
82	6	1.8	1	1.7	0	0	1	0.7	4	4.7	0	0
Any***	281	86.2	44	74.6	20	90.9	111	82.8	83	96.5	23	92.0
<b>Low-Risk</b>												
6	8	2.5	1	1.7	0	0	4	3.0	3	3.5	0	0
11	1	0.3	1	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0
34	1	0.3	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	9	2.8	3	5.1	0	0	5	3.7	1	1.2	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	6	1.8	1	1.7	0	0	5	3.7	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	1	0.3	0	0	0	0	1	0.7	0	0	0	0
70	6	1.8	2	3.4	0	0	3	2.2	1	1.2	0	0
83	2	0.6	0	0	0	0	2	1.5	0	0	0	0
84	2	0.6	0	0	0	0	1	0.7	1	1.2	0	0
X	13	4.0	1	1.0	0	0	10	7.5	2	2.3	0	0
Any***	46	14.1	7	11.9	0	0	31	23.1	8	9.3	0	0
Overall	307	94.2	49	83.1	20	90.9	130	97.0	85	98.8	23	92.0

HPV genotypes are grouped based on the risk classification of Munoz *et al.* [3]. Type-specific prevalence includes HPVs in single or multiple infections.

\*. Numbers of patients detected with each HPV.

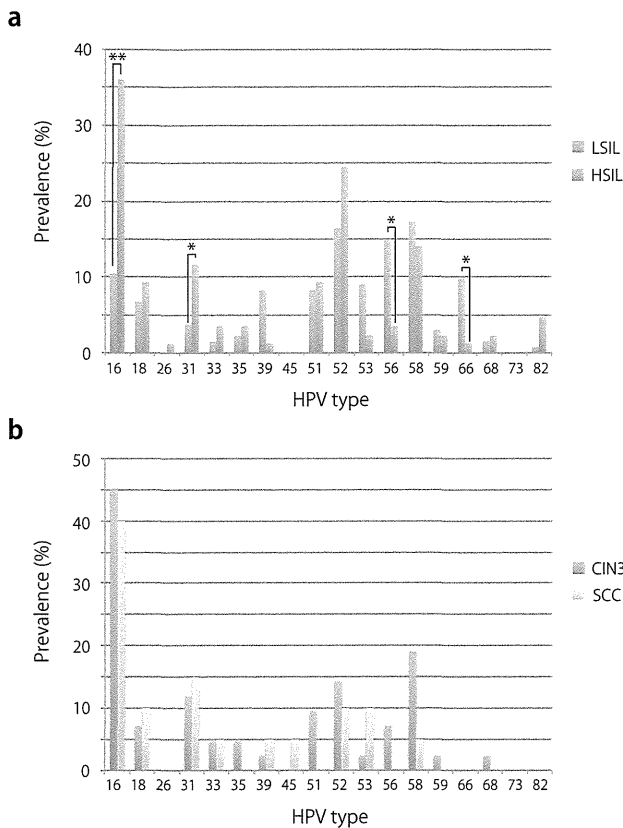
\*\*.. Percentages relative to the total number of patients (N) in each cytological group.

\*\*\*. Numbers of patients with any high- or low-risk HPVs and percentages relative to the total number of patients (N) in each cytological group.

adenocarcinoma, HPV16 was singly detected in 2 cases, and HPV18 was singly detected in 2 cases, whereas no HPV DNA was detected in one case.

## DISCUSSION

This study provides the first data on the prevalence of HPV DNA and the distribution of HPV genotypes among



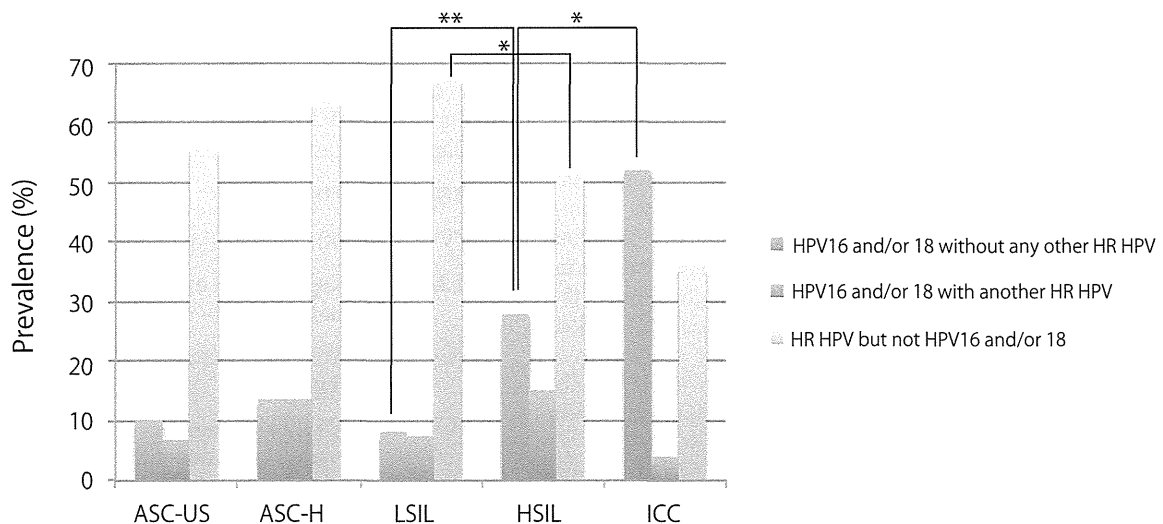
**Fig. (2).** Comparison of high-risk HPV type distribution in Japanese women with LSIL and HSIL (a), with CIN3 and SCC (b). \* and \*\* indicate  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ , respectively,

Japanese women with abnormal cervical smears using a highly sensitive genotyping assay that was recently validated by the HPV LabNet. The detection rates of HPV DNA were 97.0% (95% CI = 93.7% to 100%) in LSIL and 98.8% (95% CI = 92.5% to 99.2%) in HSIL, which are higher than those reported in a previous meta-analysis of studies in Japan: 79.4% in LSIL and 89.0% in HSIL [21]. With regard to multiple infections, the overall detection rate was 29.6%

(95% CI = 24.6% to 35.1%) in women with cervical abnormalities, which is also higher than a previous report: 11.3 to 18.5% in Japanese CIN patients [15]. The increased detection rate of multiple infections likely reflects a higher sensitivity of the PGMY-CHUV assay to detect multiple infections without inter-type PCR competition compared to other genotyping methods used in previous studies in Japan, such as the L1C1/L1C2 primer system [13], and/or higher performance of AmpliTaq Gold<sup>®</sup> polymerase to amplify multiple HPV DNAs with the PGMY primers compared to other PCR enzymes [22].

The positivity of HPV DNA in ASC-US (83.1%, 95% CI = 71.0% to 91.2%) in this study seem to be higher than those reported in studies for cervical low-grade lesions in the US (61%) [23] and in Sweden (63%) [24]. This difference is likely due to the characteristics of our study population, which was not selected from primary screening programs but enrolled from outpatients mostly referred by primary care physicians due to abnormal cytology results. Furthermore, strict assignment of ASC-US cases in this study population, which is presumed to be relatively more HPV-positive than normal population, might have led to the high positivity of HPV DNA in ASC-US.

The previous meta-analysis of the HPV type prevalence in Japan showed that three most frequent genotypes in HSIL were HPV16 (34.3%), HPV52 (15.0%), and HPV58 (6.7%) [21]. In this study, the order of top three frequent HPV types in HSIL was the same with that reported in the meta-analysis, but more HPV52 (24.4%, 95% CI = 15.8% to 34.9%) and HPV58 (14.0%, 95% CI = 7.4% to 23.1%) were detected in this study. Given that the PGMY-CHUV assay exhibits a higher sensitivity and specificity for detection of HPV52 and 58 in multiple infection specimens [13], the previous surveys may have underestimated the prevalence of these genotypes. This may be also true of the HPV type distribution in LSIL cases. The meta-analysis revealed that five most frequent HPV types in LSIL were HPV16 (13.8%), HPV52 (11.1%), HPV51 (9.8%), HPV56 (9.0%), and HPV58 (5.8%) [21], but reported lower distribution rates for HPV52, 56, and 58, compared to those detected in this study: HPV52 (16.4%, 95% CI = 10.6% to 23.8%), HPV56 (14.9%,



**Fig. (3).** Prevalence of HPV16 and/or 18 and other high-risk HPVs (alone or in mixed infections with HPV16 and/or 18). The percentages of cases are presented by each cervical abnormality grade. \* and \*\* indicate  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ , respectively,



**Table 3. Multiple Infections (MI) of HPV in Japanese Women with Abnormal Cervical Cytology**

	Total		ASC-US		ASC-H		LSIL		HSIL		ICC	
HPV (+)*	307		49		20		130		85		23	
MI*	91		12		8		42		27		2	
%**	29.6		24.5		40.0		32.3		31.8		8.7	
	n*	%**	n*	%**	n*	%**	n*	%**	n*	%**	n*	%**
1 type	216	70.4	37	75.5	12	60.0	88	67.7	58	68.2	21	91.3
2 types	62	20.2	8	16.3	7	35.0	28	21.5	17	20.0	2	8.7
3 types	22	7.2	2	4.1	1	5.0	11	8.5	8	9.4	0	0
4 types	6	2.0	2	4.1	0	0	3	2.3	1	1.2	0	0
5 types	1	0.3	0	0	0	0	0	0	1	1.2	0	0
<b>MI of High-Risk HPVs</b>												
	n*	%***	n*	%***	n*	%***	n*	%***	n*	%***	n*	%***
	77	84.6	8	66.7	8	100	35	83.3	24	88.9	2	100

\* , Numbers of patients.

\*\* , Percentages relative to the total number of HPV-positive patients in each cytological group.

\*\*\* , Percentages relative to the total number of multiple-types infected patients in each cytological group.

95% CI = 9.4% to 22.1%), and HPV58 (17.2%, 95% CI = 11.2% to 24.6%).

In a meta-analysis using worldwide data on HPV type prevalence, a higher prevalence of HPV52 and 58 in HSIL and ICC was reported for East Asian countries, such as China, Taiwan, Japan, and Korea, compared to Europe, North America, and Africa [4,25], suggesting region-specific variation of HPV type prevalence in East Asia. Furthermore, a recent study by Takehara *et al.* [26] lends further support to the high prevalence of HPV52 and 58 in cervical intraepithelial lesions in Japanese women. Surprisingly, a recent clinical trial for the bivalent vaccine examining its cross-protective efficacy revealed negative vaccine efficacy for precancerous events associated with HPV52; vaccinated women developed slightly more HPV52-associated CIN2/3 lesions (excluding HPV16/18 co-infection) compared to the control women who received placebo [27]. Regarding an HPV genotyping method, it is worth noting that the InnoLiPA kit used in that trial was shown to be suboptimal for the detection of HPV52 in the global proficiency study of HPV genotyping [12], and thus may lead to underestimation of HPV52 in mixed infection samples, which indicates the necessity to confirm HPV52 prevalence by other typing methods or type-specific real-time PCR. Although the data are preliminary and will require further extensive evaluation, some potential for type-replacement, through which the protection of HPV16/18 infection by vaccines makes progression of HPV52-associated lesions more evident over time, warrants consideration, because high-risk HPVs not targeted by the vaccines tend to induce CIN3+ more slowly than HPV16/18 [28].

The HPV type distribution in CIN2/3 specimens of Japanese women was previously described in a study by Onuki *et al.* [15] as follows: three most frequent types were HPV16 (24.1%), HPV52 (17.5%), and HPV58 (10.7%). The

higher detection rate of HPV16 (45.2%, 95% CI = 29.8% to 61.3%) in CIN3 specimens in this study, as well as that reported in previous epidemiological studies [14,15,28], strongly indicates a higher risk of HPV16 infection for progression to high-grade intraepithelial neoplasia and/or invasive cervical cancer.

Although the number of cervical cancer samples in this study was relatively small (n = 25), the detection rates of HPV vaccine-targeted types were 40% for HPV16 and 16% for HPV18, totaling 56% for both types, which lies in the range of 50 to 70% reported for cervical cancer in previous studies in Japan [7-9]. Further continuous investigation of the HPV type distribution in cervical cancer and its precursor lesions, such as CIN2/3 and adenocarcinoma in situ, in a central laboratory using a standardized genotyping assay will be required to monitor the efficacy of the current HPV vaccines, as well as to formulate a strategy for the development of the next generation HPV vaccines to meet the demand for protection from high-risk HPV infection other than HPV16/18 in each region, such as HPV52 and 58 in Japan and East Asia.

#### ABBREVIATIONS

HPV	= Human papillomavirus
NILM	= Negative for intraepithelial lesion or malignancy
ASC-US	= Atypical squamous cells of undetermined significance
ASC-H	= Atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion
LSIL	= Low-grade squamous intraepithelial lesion
HSIL	= High-grade squamous intraepithelial lesion
ICC	= invasive cervical cancer

WHO = World Health Organization  
 CIN = Cervical intraepithelial neoplasia  
 SCC = Squamous cell carcinoma  
 CHUV = Centre Hospitalier Universitaire Vaudois

### CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the WHO HPV LabNet European Reference Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) in Lausanne, Switzerland, for technical support of introduction of the PGMV-CHUV assay into our laboratory.

### FUNDING

This work received financial support from the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan.

### REFERENCES

- [1] zur Hausen H, Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; (2): 342-50.
- [2] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
- [3] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
- [4] Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89: 101-5.
- [5] The FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* 2007; 356: 1915-27.
- [6] Paaonon J, Naud P, Salmeron J, *et al.* Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009; 374: 301-14.
- [7] Asato T, Maehama T, Nagai Y, *et al.* A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing-based genotyping. *J Infect Dis* 2004; 189: 1829-32.
- [8] Nakagawa S, Yoshikawa H, Onda T, *et al.* Type of human papillomavirus is related to clinical features of cervical carcinoma. *Cancer* 1996; (78): 1935-41.
- [9] Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; (10): 45-52.
- [10] Estrade C, Menoud PA, Nardelli-Haeffliger D, Sahli R. Validation of a low-cost human papillomavirus genotyping assay based on PGMV PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3474-81.
- [11] World Health Organization human papillomavirus laboratory manual, 1<sup>st</sup> ed. Available at: [http://www.who.int/immunization/documents/WHO\\_IVB\\_2009\\_1012/en/](http://www.who.int/immunization/documents/WHO_IVB_2009_1012/en/) (WNO/IVB/10.12) WHO, Geneva (Switzerland).
- [12] Eklund C, Zhou T, Dillner J. Global proficiency study of human papillomavirus genotyping. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4147-55.
- [13] Mori S, Nakao S, Kukimoto I, *et al.* Biased amplification of human papillomavirus DNA in specimens containing multiple human papillomavirus types by PCR with consensus primers. *Cancer Sci* 2011; 102: 1223-7.
- [14] Matsumoto K, Oki A, Furuta R, *et al.* Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *Int J Cancer* 2011; 128: 2898-910.
- [15] Onuki M, Matsumoto K, Satoh T, *et al.* Human papillomavirus infections among Japanese women: age-related prevalence and type-specific risk for cervical cancer. *Cancer Sci* 2009; 100: 1312-6.
- [16] Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Prevalence of HPV infection in cervical cytology-normal women in Okinawa, Japan, as determined by a polymerase chain reaction. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 69: 175-6.
- [17] Yoshikawa H, Nagata C, Noda K, *et al.* Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *Br J Cancer* 1999; 80: 621-4.
- [18] Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, *et al.* Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 524-31.
- [19] Yoshida T, Fukuda T, Sano T, *et al.* Usefulness of liquid-based cytology specimens for the immunocytochemical study of p16 expression and human papillomavirus testing: a comparative study using simultaneously sampled histology materials. *Cancer* 2004; 102: 100-8.
- [20] Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol* 2000; 79: 294-9.
- [21] Miura S, Matsumoto K, Oki A, *et al.* Do we need a different strategy for HPV screening and vaccination in East Asia? *Int J Cancer* 2006; 119: 2713-15.
- [22] Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE, *et al.* Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol* 2002; 68: 417-23.
- [23] Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1066-71.
- [24] Brismar-Wendel S, Froberg M, Hjerpe A, Andersson S, Johansson B. Age-specific prevalence of HPV genotypes in cervical cytology samples with equivocal or low-grade lesions. *Br J Cancer* 2009; 101: 511-7.
- [25] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, *et al.* Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121: 621-32.
- [26] Takehara K, Toda T, Nishimura T, *et al.* Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in uterine cervical squamous lesions from Japanese women. *Patholog Res Int* 2011; 2011: 246936.
- [27] Wheeler CM, Castellsague X, Garland SM, *et al.* Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 100-10.
- [28] Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 1478-88.

Received: May 22, 2012

Revised: September 4, 2012

Accepted: September 14, 2012

© Kondo *et al.*; Licensee Bentham Open.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

## 特集

### ワクチン製造をめぐる 規制・製造技術の最新動向

2

# ワクチン・レギュレーションの新展開— 国家検定へのSLP審査制度の導入

New development in vaccine regulation –  
Adoption of summary protocol review on vaccine lot release

国立感染症研究所 検定検査品質保証室

内藤誠之郎

SEISHIRO NAITO

*Division of Quality Assurance, National Institute of Infectious Diseases*

## はじめに

昨年の薬事法施行規則の改正により、ワクチンの国家検定において、ロットごとに製品の製造および試験の記録等を要約した書類(製造・試験記録等要約書)を審査する制度が新たに導入されることになった。製造・試験記録等要約書は、英語ではSummary Lot Protocol (SLP) またはSummary Protocolと呼ばれる。本稿では、ワクチンに特異的なレギュレーションであるSLP審査制度について、その概要を紹介する。

## 1. 国家検定制度

医薬品の品質、有効性および安全性を守るため、開発、製造、販売、使用の各段階で、製造販売承認、GMP、製造販売後調査など、さまざまな規制や制度が設けられている。ワクチンは、医薬品としてこれらの規制や制度の対象となるのに加えて、さらに、国家検定という特別な制度の対象となっている(図1)。国家検定は、薬事法第43条に基づいて実施されている。

### 薬事法第43条(検定)

厚生労働大臣の指定する医薬品は、厚生労働大臣の指定する者の検定を受け、かつ、これに合格したものでなければ、販売し、授与し、又は販売若しくは授与の目的で貯蔵し、若しくは陳列してはならない。ただし、厚生労働省令で別段の定めをしたときは、この限りではない。

現在、厚生労働大臣が国家検定の対象として指定している医薬品は、ワクチン、血液製剤、診断用抗原、抗毒素血清などの一部の生物学的製剤に限られる。国家検定機関としては、国立感染症研究所が指定されている。ワクチン等の製造販売業者は、ロットごとに製造所の所在地の都道府県を通じて国立感染症研究所に国家検定を申請し、所定の数量の試験品を提出する。国立感染症研究所では、厚生労働大臣の定めた検定基準に従って試験を実施し、合否を判定する。製造販売業者は、国家検定に合格するまで、当該製品(ロット)を出荷することはできない。

以上が、国家検定制度の概略であるが、このような制度が導入されたのは、終戦後間もない昭和22年、国立感染症研究所の前身である予防衛生研究所が設立されたのと同時期であった。予防衛生研究所の年報第1号には、国家検定導入の様子が次のように記されている。「デブテリア血清及び破傷風血清に就いては大正3年以來その検定は伝染病研究所に於いて特に検定室を設けて行われて来た。…終戦以來…民間に数多くの製造所が設立されるに至って、治療血清のみならず、一般生物学的製剤の国家検定が緊急の問題となった。…製剤を検定するためには、製剤の基準を設けなければならない。…厚生省に於いては、斯界の權威を以って生物学的製剤基準委員会を設け、更に各個の製剤に就いて専門委員会を設けて基準の制定に当たっている。…国家検定の重要性は当研究所の設立を待ち得ず、極めて急を要するもの、即ちチフ

ワクチン・レギュレーションの新展開—  
国家検定へのSLP審査制度の導入

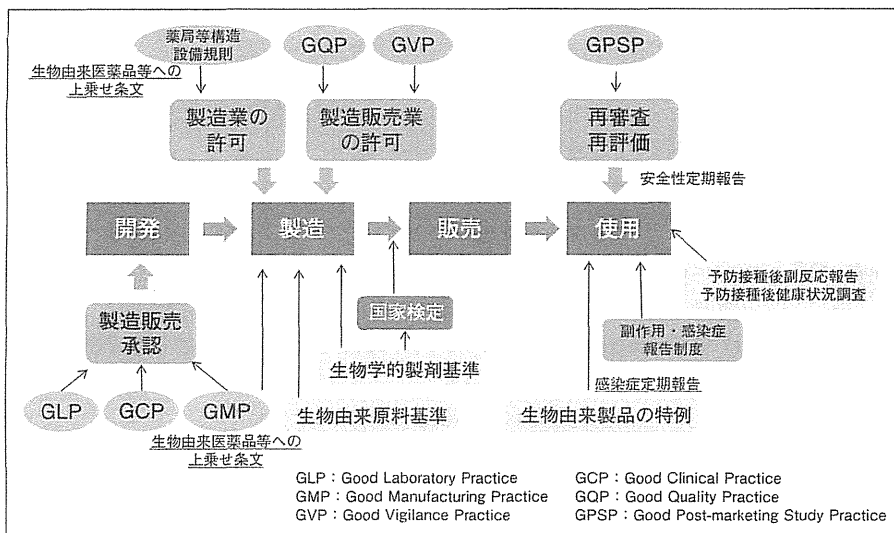


図1 ワクチンに対するさまざまな規制や制度

スパラチフスワクチン、発疹チフスワクチン等の検定は伝染病研究所に於いて始められた。…当研究所は伝染病研究所の一半に設立されたが、設立と共に…検定業務は、陣容施設共に当研究所に移管された」。当時の薬事法(旧薬事法)では、日本薬局方に収められている医薬品については製造承認が免除されており(原則としてすべての医薬品について製造承認が求められるようになったのは、昭和54年の薬事法一部改正からである)、GMPの考え方も誕生以前であった。したがって、品質不良ワクチンの流通を防止するうえで、国家検定の役割は大きかったと思われる。実際に当時の記録を調べてみると、国家検定制度の導入初期には、年間100件を超える不合格が出ていたようである。

現在では、国家検定の不合格件数は、年間ゼロ件~数件で推移している。数件とはいえ、コンスタントに不合格が出ており、国家検定は、現在でも必要な制度であると筆者は考えている。また、次項で述べるように、国家検定に相当する制度は多くの国がもっており、WHOもそのような制度をもつことを推奨している。したがって、国際調和の観点からも、国家検定制度を維持することは必要である。一方で、製造承認制度の導入、GMPの制定など、薬事制度をめぐる状況は、国家検定が導入された当時から大きく変わった。変貌する薬事制度に応じて国家検定制度を見直すことは重要であると考えられる。本稿で取り上げているSLP審査制度の導入は、見直しの第一歩となりうるのではないかと、筆者は考えている。

## 2. 国家検定(ロットリリース)制度の国際的な状況

製品を市場に出荷(ロットリリース)するかどうかを判断するのは、通常の製品であれば、製造販売業者である。国家検定は、その判断に国の規制当局が関与する制度であるといえる。このような意味で、国家検定に相当する制度は、国際的には、「規制当局による独立のロットリリース(Independent Lot Release by Regulatory Authority)」として認識されている。ワクチンに対してロットリリース制度を導入しているのは、わが国だけではなく、米国やEU諸国はもちろん、世界中の多くの国が採用している。WHOも、ワクチンに対するロットリリース制度を導入することを強く推奨している。ワクチンには、なぜ、ロットリリース制度が必要なのか、WHOでは以下のような理由をあげている。①ワクチンは健常者に接種される、②ワクチンの品質不良は、有効性および安全性ともにその影響が短期間では明らかにならず、問題が明確になった時点では、被害が甚大なものになる可能性が高い、③ワクチンの品質問題は、公衆のワクチン接種プログラムに対する受容に影響を与え、公衆衛生政策に悪影響を及ぼしかねない、④生物学的製剤であるワクチンは、化学的に本質が明らかな医薬品とは異なり、本来的に複雑でばらつきが大きく不安定である。また、ワクチンに適用される試験法も生物学的反応に依拠するもの(バイオアッセイ)が多く、同様な性質がある。

⑤ワクチンに対する試験の“ものさし”となる標準品もまた、ワクチンそのものと同様に、複雑でばらつきが大きく不安定である。特に、新規のワクチンの場合には、国際／国内標準品が未整備で、標準品の安定性に関するデータも限られる。

ワクチンに対するロットリリース制度は、多くの国が導入しているが、その内容は国により違いがある。ワクチンの流通がグローバル化するに従い、この点が問題となってきた。WHOは、2007年にオタワ(カナダ)で開催した「ワクチンロットリリースに関する専門家会議(WHO／ヘルス・カナダ)」<sup>1)</sup>において、この問題を取り上げた。そして2010年には、「規制当局による独立したワクチンのロットリリースに関するガイドライン」(以下、WHOガイドラインという)<sup>2)</sup>を制定し、ロットリリース制度の国際調和を推進している。

WHOガイドラインでは、ロットリリースに際して規制当局が実施することとして、①SLPの審査、②製造業者から独立した試験、をあげている。SLP審査が、ロットリリースに際して必ず実施しなければならない事項とされているのに対して、試験を実施することは必須とはされていない。

SLP審査をロットリリースの必須事項とすることは、

承認制度との関連を考えると理解できる。承認制度のもとでは、承認事項に合致しているか否かが、製造販売業者が出荷の可否を判断する際の基準となる。規制当局がロットリリースの判断をする際にも、同様に、承認事項への適合性を判断基準にすること、そのために製造販売業者から提出された当該ロットの製造と試験の記録、すなわちSLPを審査することは道理にかなっていると思われる。一方、試験については、ワクチン製造国の規制当局により試験が実施されているならば、ワクチン輸入国の規制当局が繰り返し試験をする必要はないというようなケースが考えられる。また、試験を実施するためにはそのための設備や人員等が必要になるが、すべての国がそのようなリソースを準備できるわけではない。不十分なリソースで実施された試験は、信頼性の乏しい結果をもたらし、ロットリリースの判断にかえって害をもたらしかねない。このようなこともありWHOガイドラインでは、規制当局による試験の実施は、ロットリリースの必須事項とはされていないようである。実際には、わが国のようなワクチン製造国においては、SLP審査に加えて、製造業者から独立して試験を実施して、その結果によりロットリリースの可否を判断している国が多い。

## ワクチン・レギュレーションの新展開— 国家検定へのSLP審査制度の導入

### 3. 国家検定へのSLP審査制度の導入

わが国の国家検定制度は、基本的に試験の結果のみにより可否を判定する制度であった。旧薬事法施行規則の下記の条文により、検定申請にあたっては、製造業者が行った自家試験の記録を添付することが義務づけられていたが、自家試験記録は試験を行ううえでの参考資料の位置づけであり、検定の可否に関わる審査対象とはされていない。

#### 【旧】薬事法施行規則第197条第2項

前項の申請書には、自家試験の記録を記載した書類を添えなければならない。

一方、前項で述べたように、規制当局がロットリリースの可否を判断するにあたっては、SLP審査をすることが必要不可欠な事項としてWHOガイドラインに盛り込まれ、実際に多くの国々でSLP審査制度が導入されている。このような状況を踏まえ、わが国においても国家検定にSLP審査制度を導入することになり、平成23年7月4日付で薬事法施行規則の改正と関連告示の改正および制定が公布された。実際にSLP審査制度を実施するためには、SLPを提出する製造販売業者側、SLPを審査する当局側ともに準備期間が必要であることから、改正省令等の施行日は、平成24年10月1日とされた。施行日までの期間は、準備の整ったところから、SLPに相当する書類を自家試験記録として提出して差し支えないこととされ、円滑な改正省令等の施行を行う観点からSLP審査の試行を行うことになった<sup>3)</sup>。改正省令により、検定対象医薬品は、検定申請にあたりSLPを添付しなければならない品目と自家試験記録を添付しなければならない品目に区分されることになった。

#### 【改正】薬事法施行規則第197条第2項

前項の申請書には、次の各号に掲げる医薬品の区分に応じ、当該各号に定める書類を添えなければならない。

- 一 生物学的製剤である医薬品のうち厚生労働大臣が指定するもの(以下「指定製剤」という。)申請に係る同一の製造番号又は製造記号の医薬品について作成した製品の製造及び試験の記録等を要約した書類(以下「製造・試験記録等要約書」という。)
- 二 指定製剤以外の医薬品 自家試験の記録を記載した書類

指定製剤としては、新たに制定された告示によりワクチン(専ら疾病の治療に使用されることが目的とされているものを除く)が指定された。

薬事法施行規則第197条第2項第1号の規定に基づき厚生労働大臣が指定する生物学的製剤である医薬品(平成23年厚生労働省告示第225号)

薬事法施行規則(昭和三十六年厚生省令第一号)第百九十七条第二項第一号の規定に基づき厚生労働大臣が指定する生物学的製剤である医薬品は、ワクチン(専ら疾病の治療に使用されることが目的とされているものを除く。)とする。

### 4. SLP審査制度の概要

以下、改正省令等の条文を引用しつつ、新たに国家検定に導入されたSLP審査制度の概要を説明する(図2)。

SLPは、あらかじめ定められた様式に従って作成することとされている。これは製造販売業者にとって都合のよい情報のみをSLPに記載する(都合の悪い情報を記載しない)ことがあっては、SLP審査を適正に行うことができないからであると考えられる。SLPの様式は、製造販売業者の申請に基づき、国立感染症研究所が作成することが規定されている。

#### 【改正】薬事法施行規則第197条の3(製造・試験記録等要約書の様式の作成及び変更)

製造・試験記録等要約書の様式は、製造販売業者(選任製造販売業者を含む。第百九十七条の七から第百九十七条の十までにおいて同じ。)の申請に基づき、品目ごとに、国立感染症研究所が作成し、又は変更するものとする。

新たに承認を受けたときは、製造販売業者は遅滞なく、国立感染症研究所にSLP様式作成を申請しなければならない。

#### 【改正】薬事法施行規則第197条の4(製造・試験記録等要約書の様式の作成の申請)

製造販売業者は、指定製剤に該当する品目について法第十四条第一項の承認を受けたときは、遅滞なく、国立感染症研究所に対し、製造・試験記録等要約書の様式の作成を申請しなければならない。(後略)

SLP様式を作成するためには承認書の情報が必要になる。SLP審査の目的は、承認書に適合して製造されたことをロットごとにチェックすることにあるからである。そこで、SLP様式作成の申請にあたっては、当該製品の承認書の写しを添付することになっている。また、SLP様式を作成するのは国立感染症研究所であるが、製品の製造工程および試験項目について熟知しているのは製造販売業者であることから、まず製造販売業者においてSLP様式の案を作成し、様式作成の申請時に提出することとされている。



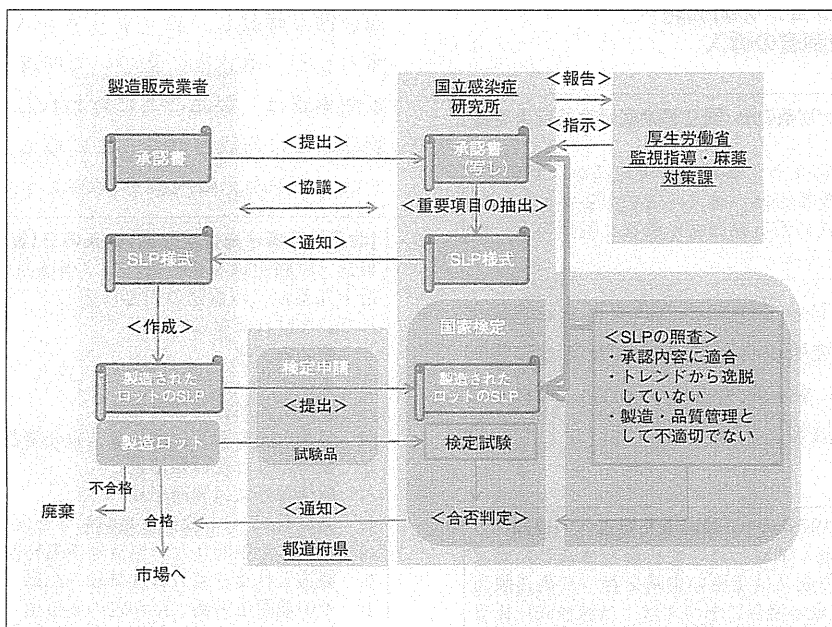


図2 国家検定とSLP審査制度

**【改正】薬事法施行規則第197条の4第2項**

前項の申請は、様式第九十五の二による申請書に次に掲げる資料を添えて提出することによつて行われなければならない。

- 一 当該品目に係る承認書の写し
- 二 当該品目に係る製造・試験記録等要約書の様式の案
- 三 その他製造・試験記録等要約書の様式の作成に必要な資料

製造販売業者によっては、承認を受けた後速やかに製造販売を行いたい場合もあると考えられる。そこで、承認前であってもSLP様式作成の申請を行えることになっている。その場合には、承認申請書の写しを添付して申請し、承認後に速やかに承認書の写しを提出する必要がある。SLP様式が確定するのは、承認後になる。

**【改正】薬事法施行規則第197条の4第3項**

指定製剤に該当する品目について法第十四条第一項の承認の申請を行つた製造販売業者は、同項の承認を受けた後速やかに製造販売を行う必要があることその他特別の事情がある場合には、第一項の規定にかかわらず、同条第一項の承認を受ける前においても、国立感染症研究所に対し、製造・試験記録等要約書の様式の作成を申請することができる。

承認事項の一部変更承認を受けた場合など、SLP様式を変更する必要がある場合がある。一部変更承認を受けた場合には、製造販売業者がSLP様式を変更する必要がないと判断した場合でも、必ず、「様式の変更又は変更の確認の申請」をしなければならないことになっている。「変更の確認」とは「変更する必要がないことの確認」の意であろう。一部変更の承認前であっても、承認後に速やかに製造販売を行いたい場合などに、あらかじめSLP様式の変更を申請できるのは、初回の承認申請時

と同様である。承認事項の軽微変更を届け出る（届け出た）場合には、製造販売業者がSLP様式の変更が必要と判断した場合には、様式変更の申請を行う。

**【改正】薬事法施行規則第197条の5（製造・試験記録等要約書の様式の変更等の申請）**

製造販売業者は、前条の規定により製造・試験記録等要約書の様式が作成された場合において、次に掲げる場合に該当したときは、遅滞なく、国立感染症研究所に対し、当該製造・試験記録等要約書の様式の変更又は変更の確認の申請をしなければならない。

- 一 当該品目について法第十四条第九項の承認を受けた場合
- 二 当該品目について法第十四条第十項で定める軽微な変更が行われることにより製造・試験記録等要約書の様式の変更が必要となる場合
- 三 その他製造・試験記録等要約書の様式の変更が必要となる場合

SLP様式の作成または変更は、国立感染症研究所が行うこととされているが、製造販売業者が実際に記載できないような内容の様式が定められては差し支えがある。そこで、SLP様式を作成または変更する際には、必要に応じて、製造販売業者と協議することが規定されている。

**【改正】薬事法施行規則第197条の8（国立感染症研究所と製造販売業者との協議）**

国立感染症研究所は、製造・試験記録等要約書の様式の作成又は変更に当たっては、必要に応じ、第百九十七条の三の申請を行つた製造販売業者と協議するものとする。

SLP様式の変更は、製造販売業者からの申請がなくても、協議のうえ、国立感染症研究所側からも実施できることになっている。

## ワクチン・レギュレーションの新展開— 国家検定へのSLP審査制度の導入

### 【改正】薬事法施行規則第197条の9(国立感染症研究所による様式の変更)

国立感染症研究所は、第九十七条の三の規定にかかわらず、作成した製造・試験記録等要約書の様式の変更が必要となつたと認める場合は、当該様式に係る製造販売業者と協議の上、当該様式を変更することができる。

国立感染症研究所において作成または変更されたSLP様式は、国立感染症研究所から当該製造販売業者に通知される。SLP様式には、製造販売業者の利害に関わる情報を含むことから、当該製造販売業者以外に対しては機密に扱われる。

### 【改正】薬事法施行規則第197条の10(製造販売業者への通知)

国立感染症研究所は、製造・試験記録等要約書の様式を作成又は変更したときは、当該作成又は変更の申請を行つた製造販売業者(前条の規定による変更の場合にあつては、当該様式に係る申請を行つた製造販売業者)に通知するものとする。

以上のように、SLPについては、自家試験記録とは異なり、薬事法施行規則により詳細に規定されている。SLPと自家試験記録を比べた場合、前者には製造の記録も含まれ、記載を求める内容もより詳細であることなどの違いがあるが、最も大きな相違点は、SLPが国家検定の合否判定の審査対象とされることであろう。そのため、SLP様式について、薬事法施行規則により詳細に定められているわけである。SLPが国家検定の合否判定の審査対象であることは、検定基準を定めている告示が、以下のように改正されたことによる。

薬事法第43条第1項の規定に基づき検定を要するものとして厚生労働大臣の指定する医薬品等(昭和38年厚生省告示第279号)の一部を改正する件(平成23年厚生労働省告示第224号)

2の生物学的製剤の項人ハプトグロビンの目の次に次のように加える。

このほか、薬事法施行規則第九十七条第二項第一号に規定する指定製剤にあつては、当該申請のあつた製品に係る同号の製造・試験記録等要約書の記載内容が、次の全てを満たすものとする。

- (1) 規格及び管理基準等(当該規格及び管理基準等を変更しようとする場合に当該変更が薬事法施行規則第四十七条の軽微な変更の範囲に該当するものを除く。)に係る記載内容が、当該品目について薬事法第十四条又は第十九条の二の規定により承認された内容に適合していること。
- (2) (1)に定めるもののほか、当該製品の製造管理及び品質管理として不適切でないこと。

## 5. SLP様式の作成

SLP様式は、SLP審査の目的(ロットの承認事項への

適合性を確認し、ロットリリースの可否を判断する)に照らして、承認書に基づいて作成する必要がある。製造販売承認は、製品ごとに行われることから、SLP様式も製品ごとに作成されることになる。改正薬事法施行規則では、SLPの記載内容を次のように規定している。

### 【改正】薬事法施行規則第197条の2(製造・試験記録等要約書)

製造・試験記録等要約書には、当該品目に係る法第十四条又は第十九条の二の承認の内容に応じて、次に掲げる事項が記載されていなければならない。

- 一 製品の名称
- 二 承認番号
- 三 製造所の名称及び所在地
- 四 製造販売業者又は選任製造販売業者の名称及び所在地
- 五 製造年月日及び製造量
- 六 製造番号又は製造記号
- 七 原材料(シード及びセルバンクを含む。)に関する情報
- 八 使用した中間体及び原液等の名称及び構成
- 九 製造工程及び品質管理試験の記録
- 十 その他厚生労働大臣が定める事項

WHOガイドラインでは、SLPに記載された重要データを評価することにより、①ロットごとの品質の一貫性を確認すること、②有効成分の力価の信頼性を確保すること、③実施された試験の妥当性と正確性を評価すること、が必要とされており、重要データには、①主要な原材料のトレーサビリティ、②製造工程で使用される重要な有効成分、③製造の各段階(重要成分、中間体、最終バルク、最終製品など)で行われる試験の結果、が含まれるとされている。さらに具体的に、SLPに記載が求められる事項として、以下の項目をあげている。①製造業者名、②承認番号、③製造所の所在地、④製剤名称とロット番号、⑤ロットサイズ、⑥有効期限、⑦製造年月日、⑧製造工程のフローチャート、⑨製造株と細胞基材、⑩製造工程、⑪製剤処方、⑫品質管理試験の結果。

承認書は、①名称(一般的名称、販売名)、②成分及び分量又は本質、③製造方法、④用法及び用量、⑤効能又は効果、⑥貯蔵方法及び有効期間、⑦規格及び試験方法、⑧製造所の名称及び所在地、などの項目からなっている。これらの項目のうち「規格及び試験方法」欄に記載のある試験は、製品の品質を確保するうえで特に重要な試験(一般に「規格試験」と呼ばれている)と考えられることから、SLPの必須記載項目と考えるべきである(ただし、「規格及び試験方法」は、添加物や標準品などに対して設定されている場合があるが、これらについてはSLPの記載項目に含める必要性は低いと思われる)。製造工程を管理するために実施される試験(承認書により「工程内管理試験」「工程内試験」「工程管理」など、さまざま



な表記がされている)についても、製品の安全性や有効性に関わる試験や製造の一貫性を評価するうえで重要な試験などについては、SLPに記載する必要があると思われる。

「製造方法」欄は、承認書の中核をなす部分であり、記載量も多く、ここからSLPにどの項目を記載するかについては頭を悩ますところである。以下、「製造方法」欄の記載事項からSLPの記載項目を選択する際に留意するとよいと思われる事項を列挙してみる。以下はあくまでも筆者の私見であることにご留意いただきたい。

- ①「製造方法」欄には、原材料から製剤の包装・表示工程までの全工程が工程の順に記載されている。全体の流れ(トレーサビリティ)を把握できるように、項目を選択する。
- ②原材料としてシードロット(製造用株)およびセルバンク(細胞基材)が用いられている場合には、その管理番号、作製年月日、継代数等の基本的な情報は記載する必要がある。
- ③原材料として、生物由来原料(反芻動物由来原料、動物由来原料)<sup>4)</sup>が使われている場合には、動物種、原産国、使用部位、製造業者名、製造年月日、ロット番号等の情報を記載する必要がある。
- ④工程内管理試験のなかでも、重要工程および重要中間体に対して設定されているものは優先度が高い。
- ⑤品質に重大な影響を与えるプロセス・パラメータ(温度、pH、時間など)については、許容範囲が明示されている。幅記載のあるパラメータについては、その実現値を記載する必要がある。
- ⑥目標値/設定値で示されるプロセス・パラメータまたは標準的仕込量のうち、一部変更承認申請の対象とされている事項については、記載を考慮する。
- ⑦重要中間体の保存期限が設定されている場合は、実際の保存期間を記載する必要がある。
- ⑧製造量、収量、収率、良品率、細胞数倍化レベル、細胞濃度など、製造の一貫性を示す指標となる項目については、記載を考慮する。

以上、思いつくままに列挙してみたが、これらは、あくまでも原則的なものである。承認書の記載は製造販売業者ごとに統一されていない部分もあり、絶対的なルールを定めることは難しい。また、ウイルスワクチンと細菌ワクチン、生ワクチンと不活化ワクチン、シードの増殖に動物を用いるものと細胞を用いるものなど、ワクチンの本質および製法は多様である。製剤の特性を考慮し

てSLPに記載する項目を選択することが重要である。

## おわりに

平成24年10月1日より、ワクチンの国家検定におけるSLP審査制度が施行される。試験を中心に行われてきた国家検定制度にとって、導入以来の大きな改正である。SLP審査制度が適切に運用され、国民の安心・安全の向上に役立つことを念願する。

### ■参考文献

- 1) Meeting report : WHO/Health Canada consultation on vaccine lot release, 2007
- 2) WHO : Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory authorities, 2010
- 3) 薬事法施行規則の一部を改正する省令等の公布に伴う試行期間の設置について、平成23年薬食監麻発0708第4号
- 4) 生物由来原料基準、平成15年厚生労働省告示第210号

