

temperature. The reaction mixture was then washed three times with 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4), twice with 3 M NaCl, and once with 10 mM HCl. Finally, the PEI-conjugated magnetic beads were suspended with saline to a final solution of 50 mg/ml.

2.4. Virus concentration using PEI-magnetic beads

The essential adsorption procedure for each virus was as follows: 1 and 10 ml of each virus suspension were incubated with 100 μ l PEI-magnetic beads for 10 min at room temperature. After the complexes of virus and magnetic beads were trapped by a magnetic field, the medium was aspirated. The trapped virus and bead complexes were re-suspended in an aliquot of medium adjusted to 100 μ l, and then the extraction of virus RNA or DNA was carried out using either 100 μ l of virus–bead complex or the virus suspension and an SMI-TEST EX-R&D Kit (Genome Science Laboratories, Fukushima, Japan). The extracted RNA and DNA were dissolved in 20 μ l of TE buffer (10 mM Tris–HCl, pH 7.4/0.1 mM EDTA).

2.5. Determination of virus infectivity

Virus infectivity was quantified by estimating the tissue culture infectious dose (TCID₅₀) using standard cell culture conditions. HSV-1, Sindbis virus, VSV, and poliovirus were introduced into Vero cells; SV-40 virus was introduced into CV-1 cells; and PPV was introduced into ESK cells (Barrera and Letchworth, 1996; Fernandez-Munoz et al., 1979; Ferrari and GL, 1987; Hudson et al., 1997; Johnson and Sarnow, 1991; Mannini-Palenzona et al., 1998). Virus suspensions and PEI-magnetic bead-treated suspensions were subjected to measurements of infectious activity (TCID₅₀ assay). Cells were maintained as stock cultures in α -MEM containing 10% fetal calf serum (FCS), and were re-plated 2 days before infection in 96-well microplates for the TCID₅₀ assay (LaBarre and Lowy, 2001). Each virus suspension was serially diluted by a factor of 1/3. Cell cultures were then infected by incubation with 20 μ l of diluted virus suspension for 1 h. The medium used for dilution and infection was Hank's balanced solution supplemented with 20 mM HEPES buffer (pH 7.4). Post-infection TCID₅₀ cultures were washed and were then nourished with α -MEM containing 10% FCS. After 48 or 72 h of incubation post-infection, an MTT assay was carried out after the degeneration of the virus-infected cells became evident (Watanabe et al., 1994). The MTT method utilizes 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), which is converted to a water-insoluble blue crystal (formazan) in viable cells through mitochondrial dehydrogenase activity (Mosmann, 1983). Dead cells are unable to reduce MTT to formazan; thus, the amount of formazan present is an indication of the number of viable cells. The optical density of formazan was determined using a computer-controlled microplate reader.

2.6. Viral genome amplification

The PCR for DNA viruses (HSV-1, SV-40, and PPV) was carried out in a 50 μ l reaction mixture containing 25 μ l of the reagent from the PCR-Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems Co.), 13 μ l of DNase-free distilled water, 0.5 μ M of each primer set, and 10 μ l of the extracted sample. PCR was carried out using a GeneAmpPCR System 9700 (Applied Biosystems Co.). Thirty-five cycles at 95 °C for 30 s (5 min during cycle 1), annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C were performed. After the final cycle, the tubes were incubated for an additional 5 min at 72 °C and then were cooled down to 5 °C.

The reverse-transcription PCR (RT-PCR) for RNA viruses (Sindbis virus, VSV, and poliovirus) was carried out in a 50 μ l reaction mixture containing 25 μ l of the reagent from the RT-PCR-Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems Co.), 13 μ l of DNase/RNase-free distilled water, 0.5 μ M of each primer set, and 10 μ l of the extracted sample. The RNA virus genome was reverse-transcribed into cDNA (45 min at 50 °C), and the target fragments were amplified by PCR, with 35 cycles at 95 °C for 30 s (5 min during cycle 1), annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C.

After amplification, electrophoretic separation of the PCR products (10 μ l) was performed on 2% agarose gels in 1 \times Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.4); samples were then stained with ethidium bromide and visualized by UV illumination. In some experiments, the gels were stained with *Vistra Green*TM (Amesham Life Science Co.) according to the manufacturer's protocol, and the fluorescent bands were detected with FluorImager 595 (Molecular Dynamics Inc.) by 488 nm laser scanning and a 530DF30 filter.

2.7. Real-time PCR using ABI PRISM 7700

Real-time PCR for HSV-1 was carried out in a 50 μ l reaction mixture containing 25 μ l of TaqMan Gold Master Mix (Applied Biosystems Co.) or, for SV-40 virus and the Sindbis virus, in a 50 μ l reaction mixture containing 25 μ l of Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Co.). Thirteen microliters of DNase/RNase-free distilled water, 0.5 μ M of each primer set with or without a fluorescence probe, and 10 μ l of extracted sample were used for real-time PCR. The reaction mixture for RT-PCR was prepared in a single tube as follows: at first, the RNA virus genome was reverse-transcribed into cDNA (50 min at 42 °C), and the reaction was terminated 15 min at 95 °C. To reaction mixture, 25 μ l of Syber Green RT-PCR Master Mix, 13 μ l of DNase/RNase-free distilled water, and 0.5 μ M of each primer set were added. The real-time PCR was monitored on an ABI PRISM 7700 Sequence-Detection System (Applied Biosystems Co.). The standard curves were defined from standards with known concentrations, and the concentration of each virus DNA/RNA in the sample was determined from these curves.

Table 3
Reduction of infectivity among viruses treated with PEI-magnetic beads

		TCID ₅₀ in virus suspension
SV-40 virus	Applied sample	$6.3 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^{6a}$
	Upper layer treated with PEI-beads	$1.0 \times 10^3 \pm 2.0 \times 10^2$
HSV-1	Applied sample	$6.3 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^6$
	Upper layer treated with PEI-beads	$3.2 \times 10^2 \pm 3.2 \times 10^1$
Sindbis virus	Applied sample	$3.2 \times 10^6 \pm 6.3 \times 10^4$
	Upper layer treated with PEI-beads	$2.0 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^1$
VSV	Applied sample	$4.0 \times 10^8 \pm 4.0 \times 10^6$
	Upper layer treated with PEI-beads	$3.2 \times 10^2 \pm 6.3 \times 10^1$
PPV	Applied sample	$6.3 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^5$
	Upper layer treated with PEI-beads	$4.0 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$
Poliovirus	Applied sample	$1.0 \times 10^7 \pm 5.0 \times 10^5$
	Upper layer treated with PEI-beads	$1.0 \times 10^7 \pm 1.0 \times 10^6$

^a Mean \pm S.D. ($n = 4$).

3. Results

In order to clarify the adsorption of model viruses with PEI-conjugated magnetic beads, the infectious activity of each virus in the PEI-magnetic bead-treated virus suspension and the untreated virus suspension was compared (Table 3). The infectious activity of SV-40 virus, Sindbis virus, HSV-1, and VSV in each suspension treated with PEI-magnetic beads decreased markedly compared with the infectious activity of the untreated samples. Infectious titers of SV-40, HSV-1, Sindbis virus, and VSV in the medium were decreased to 1/1000–1/10,000 by treatment with the PEI-beads. However, the infectious titers of PPV and poliovirus did not decrease.

The virus genome content in the PEI-magnetic bead-adsorbed fractions was examined by PCR and RT-PCR. Fig. 1 shows that treatment with PEI-magnetic beads concentrated the SV-40 virus and Sindbis virus genomes, in contrast to the results observed with the untreated fractions (Fig. 1). The same data were obtained for HSV-1 and VSV (data not shown). After the treatment of 1 ml virus suspension with PEI-beads, the viruses bound to PEI-beads were re-suspended and adjusted to a volume of 100 μ l in the medium. The maximum concentration of viruses bound to PEI-beads was 10-fold that of the original medium. Furthermore, after the treatment of the virus suspension with PEI-beads, the virus genome contents in the treated suspension markedly decreased, with the exception of the PPV and poliovirus genomes, the concentrations of which did not decrease (data not shown). These results suggest that the PEI-magnetic beads are able to adsorb SV-40 virus, Sindbis virus, HSV-1, and VSV, but that they are unable to

adsorb PPV and poliovirus. We therefore concluded that the concentration of viruses using PEI-magnetic beads is useful in enhancing the sensitivity of both PCR and RT-PCR when detecting certain virus genomes.

Next, to examine the adsorption efficiency of PEI-magnetic beads using several model viruses, the concentrations of these viruses were determined quantitatively by real-time PCR analysis. As shown in Fig. 2, HSV-1, Sindbis virus, and SV-40 virus in 1 ml of medium were concentrated to 100 μ l in the medium in a dose-dependent manner, when various amounts of PEI-magnetic beads were added. Therefore, in a subsequent study, we used 100 μ l of PEI-magnetic beads to concentrate viruses from 1 or 10 ml medium to 100 μ l.

We next attempted to clarify the effects of serum on virus concentration using PEI-magnetic beads. It was found that at concentrations of up to 10% in the medium, there was no marked interference exerted by serum on the virus concentration effected by the PEI-magnetic beads (Fig. 3). The following experiments were performed in the presence of 10% FCS, and the PEI-beads did facilitate concentration of low levels of virus (Fig. 4).

Next, 1 and 10 ml of various concentrations of HSV-1 and Sindbis virus suspension were concentrated to 100 μ l with PEI-magnetic beads. After the adsorption to the PEI-magnetic beads, the virus genome in the concentrated virus suspension was compared to that in the original solution by means of quantitative PCR. As shown in Fig. 4, HSV-1, Sindbis virus, SV-40 virus and VSV, which were diluted to various concentrations with the medium, were efficiently concentrated by the PEI-magnetic beads. The 10- and 100-fold concentration procedures used for HSV-1 and PEI-magnetic beads resulted in the expected concentrations, respectively, from the original solutions. The same results were obtained using SV-40 virus (Fig. 4). In contrast, in the case of Sindbis virus, the 100-fold concentration procedure using PEI-magnetic beads led to concentrations in excess of 1000-fold from the original virus suspension. Similar results were obtained with VSV (Fig. 4). These results suggest that in the case of RNA viruses, more than the theoretical value for the virus genome can be detected in concentrated solutions using PEI-magnetic beads. We confirmed the reproducibility of the observed virus concentration using the PEI-beads. It is of particular interest in this context that the PEI-bead method led to a decrease in the detection limit, due to the concentration of viruses such as HSV-1, Sindbis virus, SV-40 virus, and VSV (Fig. 4).

Since it is assumed that several viruses can potentially contaminate a sample simultaneously, we examined the ability of PEI-magnetic beads to concentrate each virus in mixtures of various viruses. We prepared a mixed suspension of SV-40, Sindbis virus, and HSV-1 that had been diluted with the medium to near the detection limit. The mixed suspension was then subjected to concentration by the PEI-magnetic bead method. After adsorption onto the

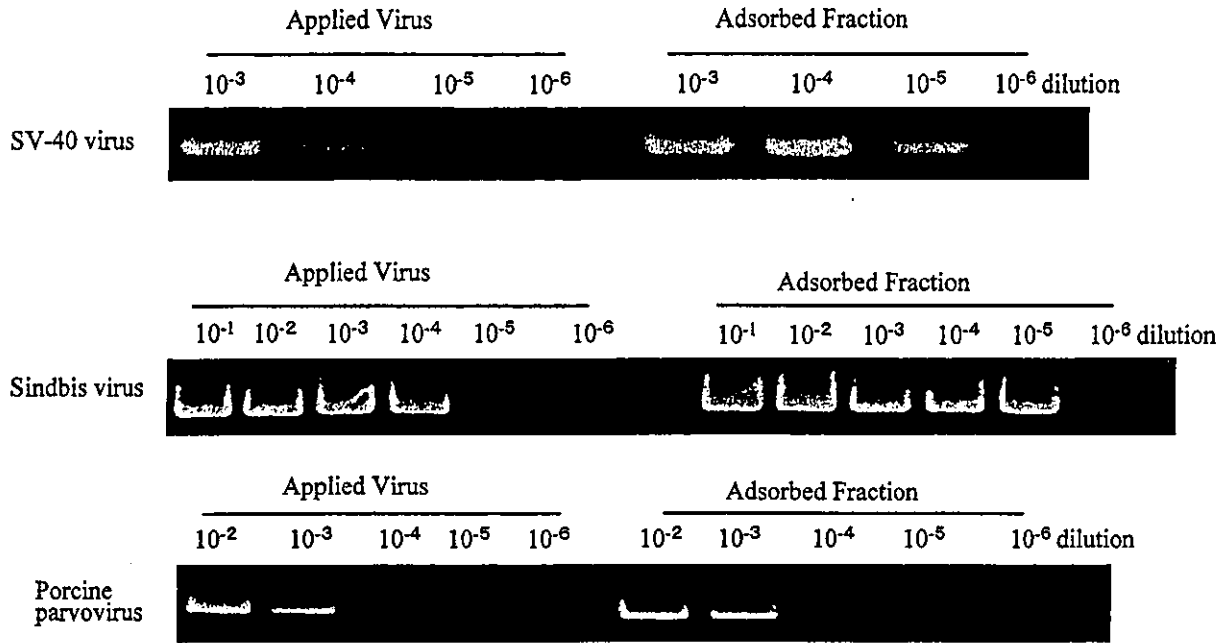


Fig. 1. Concentration of model viruses using PEI-magnetic beads. One milliliter of virus-infected culture medium was incubated with PEI-magnetic beads. Viruses bound to the PEI-magnetic beads were re-suspended in 100 μ l of medium, and the virus genome was then extracted as described in Section 2. Serial dilutions of extract from virus-infected culture medium were compared with those of PEI-magnetic bead-concentrated samples subjected to PCR or RT-PCR.

PEI-magnetic beads, the concentration of virus genomes in the virus suspension was compared to that in the original mixed suspension. Fig. 5 shows the results that were obtained when the mixture of HSV-1, SV-40 virus, and Sindbis virus was adsorbed, and the concentration efficiencies were evaluated by PCR and RT-PCR. Each virus was clearly concentrated by the PEI-magnetic beads. Furthermore, we used quantitative PCR to evaluate the ability of PEI-magnetic beads to concentrate mixed virus samples (Table 4). These results thus demonstrated that PEI-magnetic beads are also able to concentrate this mixture of viruses.

4. Discussion

The results of the present study show that PEI-magnetic beads adsorb SV-40 virus, Sindbis virus, HSV-1, and VSV. Based on the PCR analysis of the genome number in serial dilution of viruses concentrated by PEI-magnetic beads, it was found that this method of PEI-magnetic bead virus concentration will improve the sensitivity of both PCR and RT-PCR for the detection of viral genomes. Based on our study of real-time PCR analysis, PEI-magnetic beads quantitatively concentrated DNA viruses and also allowed

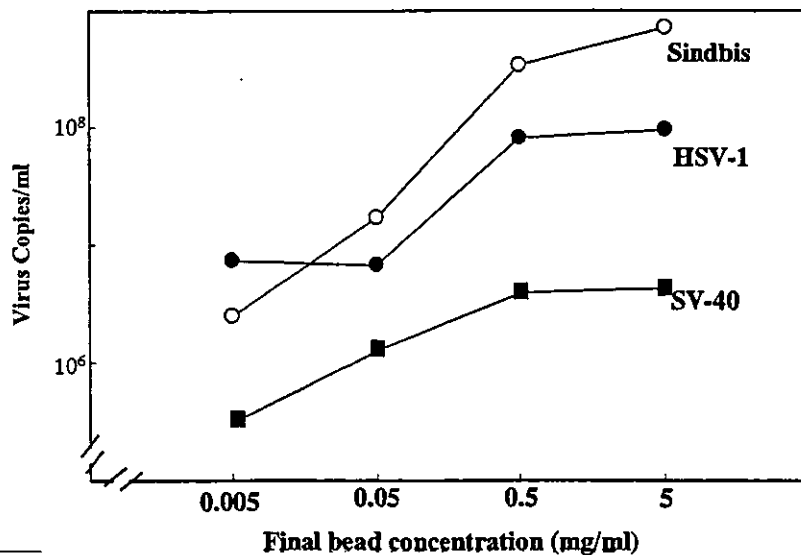


Fig. 2. Virus-adsorption capacity of PEI-magnetic beads. Various volumes of the PEI-magnetic bead suspension were incubated with 1 ml of Sindbis virus, HSV-1 or SV-40 virus suspension. The virus genome copy number in the extract of PEI-magnetic beads was determined by real-time PCR and RT-PCR.

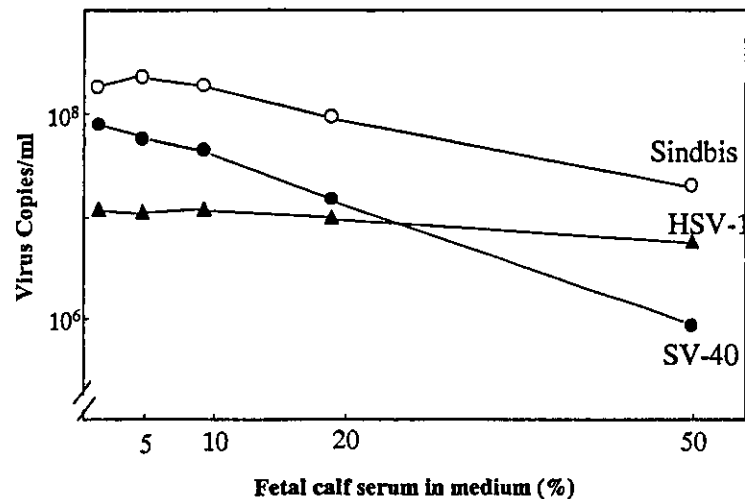


Fig. 3. Effect of serum on virus concentration by PEI-magnetic beads. One milliliter of virus suspension was incubated with PEI-magnetic beads in the presence of various amounts of fetal calf serum. After the incubation, the virus copy number in the extract of PEI-magnetic beads was determined by real-time PCR or RT-PCR.

the detection of lower virus concentrations. In contrast, when PEI-magnetic beads were applied to a concentration of RNA viruses, a concentration efficiency greater than the theoretical value was obtained. These results suggest that during the concentration procedure involving RNA viruses, certain factors such as inhibitors of reverse-transcription (Konet et al., 2000) may be removed from the virus sample, resulting in more than the expected virus genome concentration being detected by the quantitative RT-PCR. For example, RNase is thought to be removed during the adsorption of the virus onto the PEI-beads. From the present results, it is concluded that PEI-magnetic beads can indeed be successfully used in the context of this novel and efficient method of concentrating enveloped viruses and SV-40 virus.

The virus-adsorption mechanism of PEI-magnetic beads remains unclear at present. Owada et al. (1999) have reported that PEI induces viral aggregation under conditions involving high titers of HIV-1. Preston et al. (1990) have reported that electronegative microporous filters composed of epoxy-fiberglass (Filterite) can be treated with cationic polymers (PEI) to enhance their virus-adsorbing properties. These reports have suggested that PEI might interact with certain kinds of viruses. PEI-magnetic beads are high cationic charge density polymers. The PEI-magnetic beads used in the present study adsorbed various viruses, i.e., SV-40 virus,

Sindbis virus, HSV-1, and VSV, but not poliovirus and PPV. Therefore, we hypothesize that the positive charge field of the PEI molecule may tightly interact with the negative charge of surface lipids or negatively charged proteins on viruses. In this study PEIs were used with an average molecular weight of 70,000 Da. In a preliminary experiment, the virus-adsorption abilities of various PEIs with average molecular masses of 70,000, 10,000, and 1,800 Da were compared. Upon analysis of these PEIs, we observed that the low molecular weight (1800 Da) PEI-magnetic beads were not sufficiently capable of adsorbing various viruses, but that both the 70,000 and 10,000 Da PEIs possessed similar abilities as regards the adsorption of enveloped viruses and SV-40. Therefore, it seems possible that a simple positive charge does not suffice to concentrate viruses, but that a certain degree of positively charged density on the surface of the magnetic beads may be required for efficient virus-adsorption.

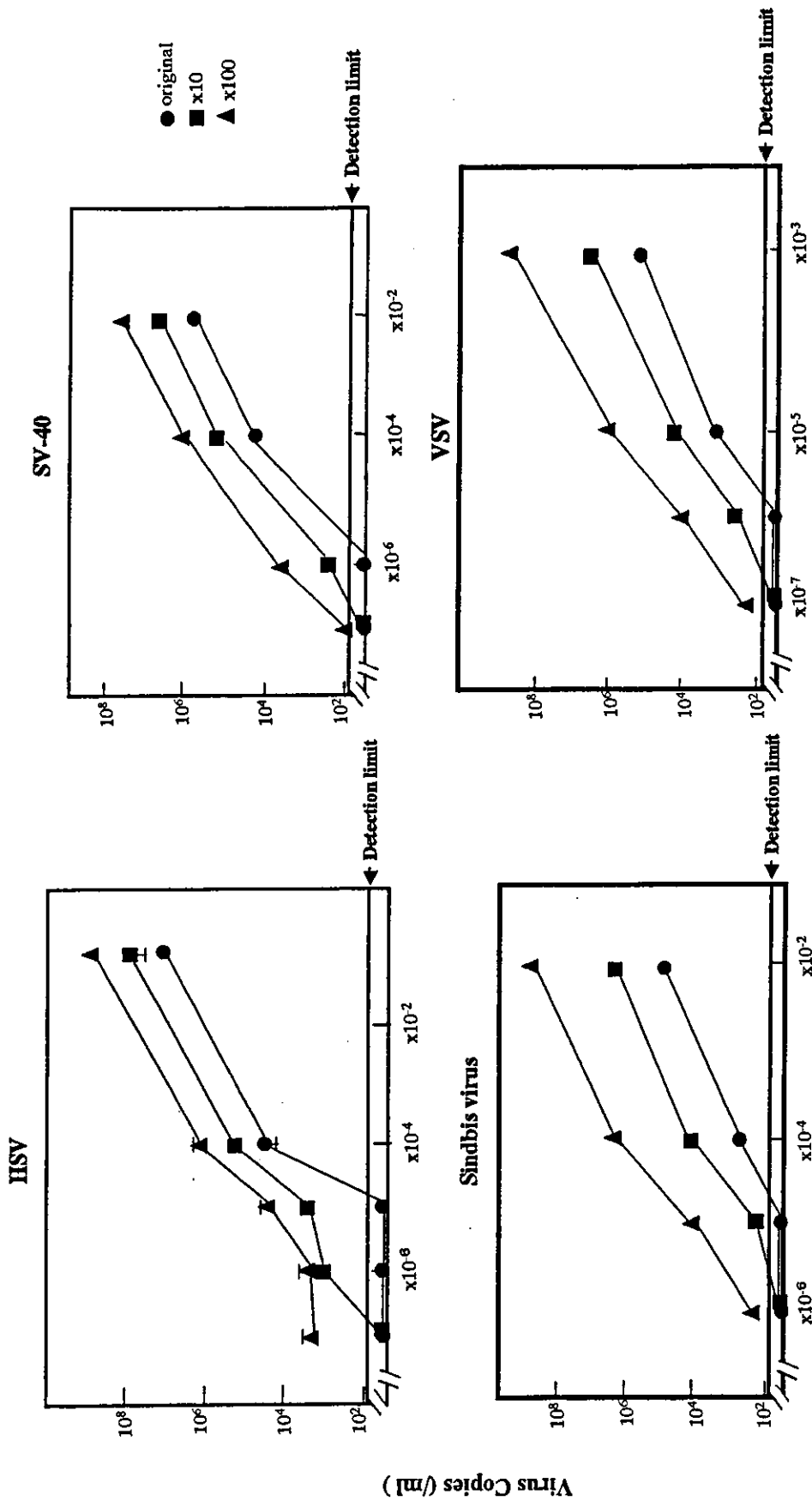
While complexes of viruses and PEI-magnetic beads cannot be applied for studies of infectivity, the virus genomes used in this study were recovered efficiently and detected quantitatively by real-time PCR. The combination of PEI-magnetic beads and PCR or real-time PCR provides a marked increase in the sensitivity of viral genome detection. Therefore, this novel virus concentration method has the potential to increase the safety of drug production and

Table 4
Quantitative analysis of SV-40 virus, Sindbis and HSV mixture concentrated by PEI-magnetic beads

Virus	Original solution	Concentration ($\times 10$)	Concentration ($\times 100$)
SV-40	$2.7 \times 10^3 \pm 2.7 \times 10^{2a}$	$2.8 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^3$	$3.2 \times 10^5 \pm 8.5 \times 10^4$
Sindbis virus	$8.2 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$	$1.8 \times 10^4 \pm 4.0 \times 10^3$	$5.5 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^4$
HSV-1	$1.6 \times 10^3 \pm 4.0 \times 10^2$	$1.7 \times 10^4 \pm 4.2 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5 \pm 3.3 \times 10^4$

One milliliter ($\times 10$) or 10 ml ($\times 100$) of each of the following was used to prepare a mixture: SV-40 virus-, Sindbis- and HSV-infected culture medium; the mixture was then incubated with PEI-magnetic beads. After incubation, the virus copy number was analyzed, as described in Fig. 4.

^a Mean \pm S.D. ($n = 4$).



Dilution of virus solution

Fig. 4. Quantitative analysis of virus concentration by PEI-magnetic beads. One milliliter ($\times 10$) or 10 ml ($\times 100$) of virus-infected culture medium was incubated with PEI-magnetic beads. After the incubation, viruses bound to the PEI-magnetic beads were re-suspended in $100 \mu\text{l}$ of medium, and the virus genome was then extracted as described in Section 2. The number of virus genome copies (original) in the serial dilutions of virus-infected medium was analyzed with real-time PCR, and was compared with that in the extract of PEI-magnetic beads. HSV-1, mean \pm S.D. ($n = 4$); Sindbis virus, means ($n = 3$); SV-40 virus and VSV, means ($n = 2$).

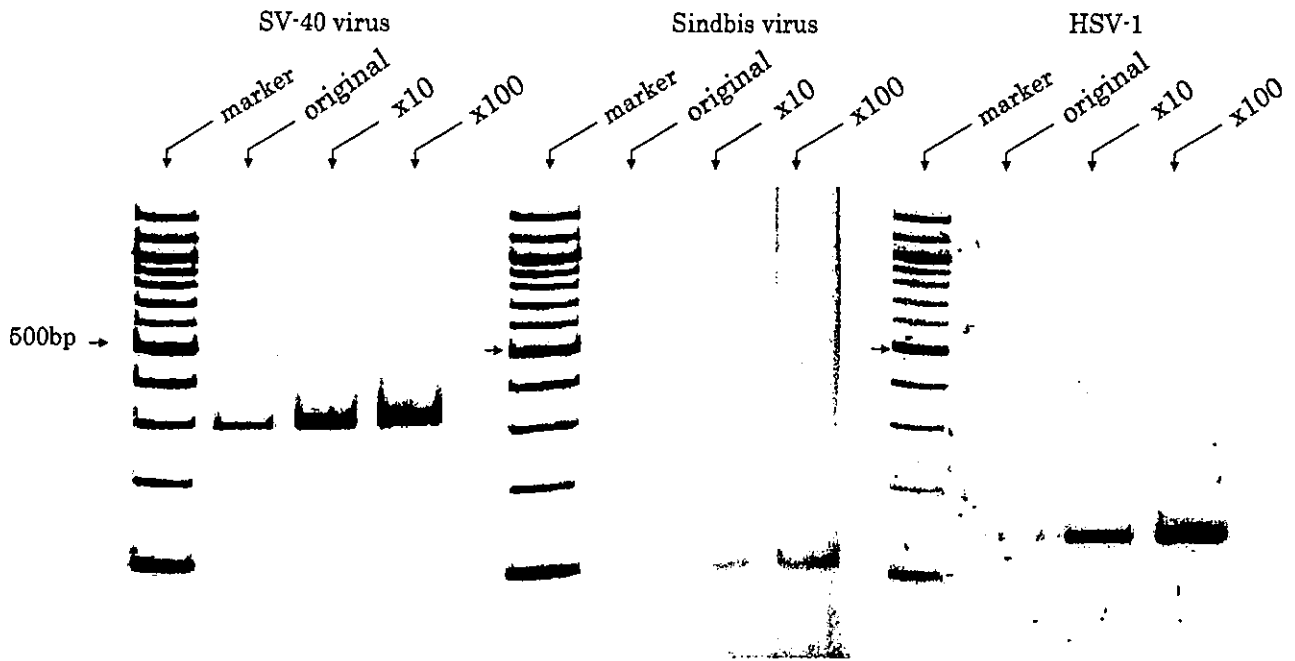


Fig. 5. Concentration of mixed viruses with the use of PEI-magnetic beads. One milliliter ($\times 10$) or 10 ml ($\times 100$) of SV-40 virus-, Sindbis- and HSV-1-infected culture medium were mixed and then the mixture was incubated with PEI-magnetic beads. After the incubation, viruses bound to the PEI-magnetic beads were re-suspended in 100 μ l of medium, and the virus genome was then extracted as described in Section 2. The virus genome in the extract of PEI-magnetic beads was amplified by PCR or RT-PCR. A one-third dilution of each virus suspension was also analyzed as a control (original).

cell therapies by enhancing the sensitivity of the detection of many viruses.

In conclusion, this new method is very simple to use, is not time-consuming, and is suitable for the detection of virus genomes using PCR reactions.

Acknowledgements

We are deeply grateful to Professor Tadashi Mayumi of the Jichi Medical School for his helpful suggestions.

References

- Alter, H.J., Sanchez-Pescador, R., Urdea, M.S., Wilber, J.C., Lagier, R.J., Di Bisceglie, A.M., Shih, J.W., Neuwald, P.D., 1995. Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. *J. Viral. Hepat.* 2, 121–132.
- Barrera, J.C., Letchworth, G.J., 1996. Persistence of vesicular stomatitis virus New Jersey RNA in convalescent hamsters. *Virology* 15, 453–464.
- Fedele, C.G., Ciardi, M., Delia, S., Echevarria, J.M., Tenorio, A., 1999. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J. Virol. Methods* 82, 137–144.
- Fernandez-Munoz, R., Coca-Prados, M., Hsu, M.T., 1979. Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. I. Methods of isolation and characterization in CV-1 cells. *J. Virol.* 29, 612–623.
- Ferrari, M., GL, G., 1987. Cultivation of a pig parvovirus in various cell cultures. *Microbiologica* 10, 301–309.
- Guideline, I.H.T., 1997. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human and animal origin. In: Arcy, P.F.D., Harron, D.W.G. (Eds.), *Proceeding of the Fourth International Conference on Harmonization, Brussels*. The Queen's University of Belfast, pp. 877–914.
- Hudson, J.B., Imperial, V., Haugland, R.P., Diwu, Z., 1997. Antiviral activities of photoactive perylenequinones. *Photochem. Photobiol.* 65, 352–354.
- Johnson, K.L., Samow, P., 1991. Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *J. Virol.* 65, 4341–4349.
- Kamisango, K., Kamogawa, C., Sumi, M., Goto, S., Hirao, A., Gonzales, F., Yasuda, K., Iino, S., 1999. Quantitative detection of hepatitis B virus by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *J. Clin. Microbiol.* 3, 310–314.
- Kanarek, A.D., Tribe, G.W., 1967. Concentration of certain myxoviruses with polyethylene glycol. *Nature* 214 (91), 927–928.
- Kawamura, H., Fujita, T., Imada, T., 1988. Plaque formation and replication of porcine parvovirus in embryonic swine kidney cell line, ESK cells. *Nippon. Juigaku. Zasshi.* 50 (3), 803–808.
- Kern, D., Collins, M., Fultz, T., Detmer, J., Hamren, S., Peterkin, J.J., Sheridan, P., Urdea, M., White, R., Yeghiazarian, T., Todd, J., 1996. An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 34, 3196–3202.
- Kessler, H.H., Muhlbauer, G., Rinner, B., Stelzl, E., Berger, A., Dorr, H.W., Santner, B., Marth, E., Rabenau, H., 2000. Detection of Herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38 (7), 2638–2642.
- Kilpatrick, D.R., Nottay, B., Yang, C.F., Yang, S.J., Da Silva, E., Penaranda, S., Pallansch, M., Kew, O., 1998. Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. *J. Clin. Microbiol.* 36, 352–357.
- Konet, D.S., Mezencio, J.M., Babcock, G., Brown, F., 2000. Inhibitors of RT-PCR in serum. *J. Virol. Methods* 84, 95–98.
- Kwok, S., Ehrlich, G., Poiesz, B., Kalish, R., Sninsky, J., 1988. Enzymatic amplification of HTLV-I viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. *Blood* 72, 1117–1123.

- LaBarre, D.D., Lowy, R.J., 2001. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays. *J. Virol. Methods* 96, 107–126.
- Larzul, D., Guigue, F., Sninsky, J., Mack, D., Brechot, C., Guesdon, J., 1988. Detection of hepatitis B virus sequences in serum by using in vitro enzymatic amplification. *J. Virol. Methods* 20, 227–237.
- Laure, F., Courgnaud, V., Rouzioux, C., Blanche, S., Veber, F., Burgard, M., Jacomet, C., Griscelli, C., Brechot, C., 1988. Detection of HIV-1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* 2 (8610), 538–541.
- Li, J.W., Wang, X.W., Rui, Q.Y., Song, N., Zhang, F.G., Ou, Y.C., Chao, F.H., 1998. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J. Virol. Methods* 74, 99–108.
- Mannini-Palenzona, A., Costanzo, F., Fiorilli, M.P., Derenzini, M., 1998. Growth, spread, and extracellular localization of Herpes simplex virus 1 in Vero cells in the presence of an anti-gD plaque inhibiting monoclonal antibody. *New Microbiol.* 21, 65–76.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Owada, T., Miyashita, Y., Motomura, T., Onishi, M., Yamashita, S., Yamamoto, N., 1999. Anti-HIV-1 activity of an ionically modified porous polypropylene membrane determined by filtration of a viral suspension. *Microbiol. Immunol.* 43, 141–151.
- Preston, D.R., Bitton, G., Farrah, S.R., 1990. Enhancement of enterovirus infectivity in vitro by pretreating host cell monolayers with the cationic polymer polyethyleneimine. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 295–297.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., HA, E., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Sanyal, D., Kudesia, G., Corbitt, G., 1991. Comparison of ultracentrifugation and polyethylene glycol precipitation for concentration of hepatitis B virus (HBV) DNA for molecular hybridisation tests and the relationship of HBV-DNA to HBe antigen and anti-HBe status. *J. Med. Microbiol.* 35, 291–293.
- Sanyal, D., Kudesia, G., Corbitt, G., 1991. Comparison of ultracentrifugation and polyethylene glycol precipitation for concentration of hepatitis B virus (HBV) DNA for molecular hybridisation tests and the relationship of HBV-DNA to HBe antigen and anti-HBe status. *J. Med. Microbiol.* 35, 291–293.
- Sarrazin, C., Teuber, G., Kokka, R., Rabenau, H., Zeuzem, S., 2000. Detection of residual hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction-based assays. *Hepatology* 32, 818–823.
- Schloer, G.M., Breese Jr., S.S., 1982. Purification of African malignant catarrhal fever virus using a two-phase aqueous polymer system. *J. Gen. Virol.* 59 (1), 101–110.
- Soares, R.M., Durigon, E.L., Bersano, J.G., Richtzenhain, L.J., 1999. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J. Virol. Methods* 78, 191–198.
- Stow, N.D., Wilkie, N.M., 1976. An improved technique for obtaining enhanced infectivity with Herpes simplex virus type 1 DNA. *J. Gen. Virol.* 33 (3), 447–458.
- Watanabe, W., Konno, K., Ijichi, K., Inoue, H., Yokota, T., Shigeta, S., 1994. MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo and anti-paramyxoviral agents. *J. Virol. Methods* 48, 257–265.
- Wiedmann, M., Wilson, W.J., Czajka, J., Luo, J., Barany, F., Batt, C.A., 1994. Ligase chain reaction (LCA)—overview and application. *PCR Methods Appl. (Cold Spring Harbor Lab.)* 3, S51–S64.
- Willkommen, H., Schmidt, I., Lower, J., 1999. Safety issues for plasma derivatives and benefit from NAT testing. *Biologicals* 27, 325–331.

バイオリジクスの品質と安全性評価

I. バイオリジクス概論

バイオリジクスとは、起源・製造方法面からみれば、「生物由来の医薬品・医療機器または生物機能を利用して製造した医薬品・医療機器」となる。機能面からみれば、「生体内機能分子としての作用を発現させようとするもの」、「生体内機能分子の作用を促進または制御するもの」、「生体細胞・組織などの再生・修復または代替に資するもの」といえる。物質面からみれば、「ペプチド・タンパク質、核酸、糖質、細胞・組織、あるいは臓器抽出物など」ということになる。古典的なバイオリジクスとしては、組織・臓器や体液等由来のホルモン、酵素、血液凝固因子類のようなペプチド・タンパク質性の医薬品およびそれを利用した医療機器のほかに、ワクチン・抗毒素類、全血製剤や赤血球・血小板製剤があり、また広い意味ではヘパリンやコンドロイチン硫酸のような糖質なども含まれ得る。微生物の生産する抗生物質や抗腫瘍薬なども生物由来の医薬品ととらえることが可能であるが、本章の対象としては取り扱わない。

1980年代以後、生命科学の進歩および遺伝子組換え技術、細胞工学技術、あるいは細胞分離・培養技術、動物育種・繁殖技術、核酸分析・合成技術などのバイオテクノロジーを中心とする先端技術の飛躍的な発展を背景に、遺伝子組換え技術を用いて改変された大腸菌や動物細胞など、および有用物質生産細胞株として選抜あるいは加工された培養細胞によるヒトタンパク質などの恒常的な大量生産が可能となった。その結果、ヒトインスリンやヒト成長ホルモンなど、従来の方法では生体から高純度の医薬品として安定供給できる量を得ることが困難であったホルモン・酵素類が大量に供給されるようになり、さらに、血液を原材料とする限りにおいてはウイルスなどの感染性病原因子の混入が理論上完全には否定し得なかったヒト血液凝固因子類などがバイオテクノロジーを応用して生産できるようになった。また、インターフェロンをはじめとするサイトカイン類、エリスロポエチン、コロニー形成刺激因子などの分化・増

殖・成長因子が臨床の場に提供され、さらに最近では細胞膜上のタンパク質などを標的とした抗体類なども新たに医薬品として開発・実用化されている。また、バイオテクノロジーの応用により元の構造の一部を改変し、例えば生体内での血中半減期の延長や作用特異性の向上など、新たな機能を人為的に付加した改変型ペプチド・タンパク質性医薬品も開発されている。

上記のような細胞基材から生産されるタンパク質性医薬品以外にも、新しいタイプのバイオテクノロジー応用医薬品として、「遺伝子治療用医薬品」、アンチセンスやリボザイムなどの「核酸医薬品」、細胞や組織そのものを医薬品として応用した「細胞・組織利用医薬品」、トランスジェニック動物（人為的に外来遺伝子を導入した動物）やクローン動物（遺伝子レベルでみてまったく同一の動物個体群）またはトランスジェニック植物に生産させたタンパク質や細胞などを有効成分とした「動物工場/植物工場由来医薬品」が注目を浴びている。このうち遺伝子治療用医薬品は、一般にベクター（目的遺伝子の担い手、本来の病原性を消失させてヒト細胞への感染性のみを保持したウイルス由来のものやプラスミドなど）に目的とするタンパク質の遺伝子を組み込み、これをヒトに投与することにより生体内での目的タンパク質の発現を期待するものである。アンチセンス医薬品は、標的とするタンパク質の遺伝子または mRNA に相補的な配列をもつ核酸を有効成分とし、これをヒトに投与することにより標的タンパク質の発現抑制を期待するものである。またリボザイム医薬品は、特定の配列の RNA 鎖を認識して切断するなどの酵素活性をもつ RNA 分子を有効成分とする医薬品で、アンチセンス医薬品と同様に標的タンパク質の発現抑制を期待するものである。バイオロジクスの分類を表3-1に示す。

表3-1 バイオロジクス（医薬品）の分類

<古典的バイオロジクス>

- 組織・臓器や尿などから抽出したペプチド・タンパク質性医薬品
- 血液製剤（全血製剤、赤血球・血小板製剤、血漿分画製剤）
- ワクチン・抗毒素類

<バイオテクノロジーなどを用いて生産される先端的バイオロジクス>

- 細胞基材より生産されるペプチド・タンパク質性医薬品（遺伝子組換え技術応用医薬品、細胞培養技術応用医薬品）
- 遺伝子治療用医薬品
- 細胞・組織利用医薬品（細胞・組織加工医薬品も含む）
- 動物工場/植物工場由来医薬品（ペプチド・タンパク質性医薬品や細胞・組織利用医薬品）
- 核酸医薬品（アンチセンス、リボザイムなど）

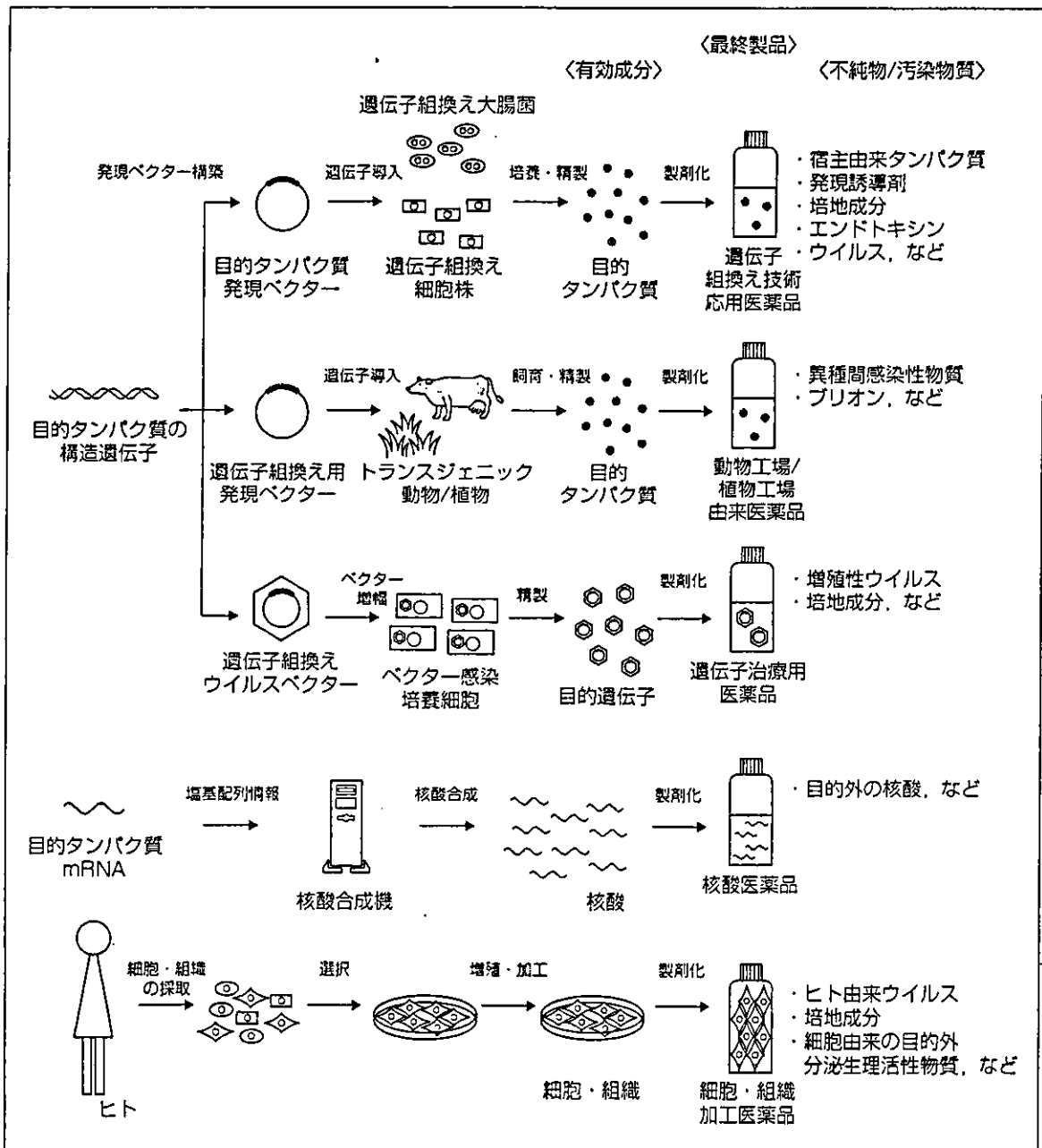
注) この分類はあくまで便宜的なものである。また、上記の区分は必ずしも各々独立しておらず、製品によっては複数の区分にまたがる場合もある。

II. バイオロジクスの品質・安全性確保

バイオロジクスは有効成分および最終製品の構造、組成、特性、品質、安定性、毒性、薬理および体内動態のあらゆる面において化学合成医薬品とは異なる際立った特徴をもつ。すなわちバイオロジクスは、細胞基材由来ペプチド・タンパク質性医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞・組織利用医薬品などのように医薬品製造用基材や製造方法、そして有効成分の本質や不純物、外来性有害因子の種類や混在の可能性の有無などが異なるいくつかのカテゴリーに分類さ

第3
バイオロジクスの品質

図3-1 代表的な先端的生物ロジクス（医薬品）の製造方法の概略



れる（図3-1）。また同じカテゴリーに属する製品であっても、製造方法は製品間で本質的にすべて異なっている。しかも、採用された製造方法如何で品質、安全性および有効性に重大な影響が及ぶ可能性があることもバイオロジクスの特徴である。このため、各々のバイオロジクスの製造方法や特性、品質その他の特徴・特殊性が、医薬品としての臨床上の有効性や安全性にどのような影響を及ぼす可能性があるか十分に検討しておくことがきわめて重要である。

本項では、先端技術を用いて生産されるバイオロジクスを採り上げ、その特徴・特殊性や安全性確保の面で留意すべきと考えられる事項について概説する。なお、バイオロジクスの品質・安全性確保上のポイントは、

- ①原材料の採取段階も含めた製造工程の厳密な管理
- ②各バイオロジクスに特徴的な有効成分および目的物質由来不純物や製造工程由来不純物・汚染物質などの特性・品質解析や品質管理
- ③各バイオロジクスに特徴的な有効成分および目的物質由来不純物や製造工程由来不純物・汚染物質などに関わる安全性の確認
- ④感染性物質に関わる安全性の確保

である。より詳細な情報については、表の脚注に示したホームページ（ガイドライン類）や章末参考文献を参照されたい。

A 細胞基材より生産されるペプチド・タンパク質性医薬品の品質・安全性確保

現在までのところ、医療現場で広く用いられている先端的バイオロジクスの大半は、遺伝子組換え微生物細胞あるいはヒトまたは動物由来の組換え（または非組換え）培養細胞を医薬品製造用基材として、細胞大量培養技術を用いて製造されるペプチド・タンパク質性の医薬品である。わが国では1983年以後このカテゴリーに属する種々の医薬品が承認されている（表3-2）。

遺伝子組換え技術応用医薬品や細胞培養技術応用医薬品は、遺伝子組換え操作を施した大腸菌、酵母、動物細胞や、動物またはヒト由来の非組換え培養細胞などから生産される。その際、どのような細胞基材や培養条件あるいは目的タンパク質の発現誘導条件を選択するかについては医薬品製造業者の任意なシナリオに委ねられており、実際に各社各様である。さらに、細胞基材を培養して目的とする発現タンパク質を産生させた後の製造工程に関しても、精製/処理のスキームや製剤化の方法を採用するにあたって幅広い選択肢が存在する（表3-3）。つまり、これらの医薬品の製造方法全般にわたって、多様なシナリオが存在するということである。

さらに、細胞という生き物を用いて医薬品を生産するという不確定要素を秘めた製造方法であることも留意しておく必要がある。例えば、細胞株（種細胞

【表3-2 わが国で承認された細胞基材より生産されるペプチド・タンパク質性医薬品の分類 (ワクチン・抗毒素類は除く。2003年8月現在)

分類	製造過程での遺伝子組換え技術応用の有無	製造用細胞基材
<酵素> ウロキナーゼ (組織培養) ウロキナーゼ前駆体 グリコセレブロシダーゼ 組織プラスミノゲン活性化因子 (t-PA)	× × ○ ○/×	ヒト培養細胞 ヒト培養細胞 動物培養細胞 動物培養細胞/ ヒト培養細胞
<ホルモン> インスリン グルカゴン 成長ホルモン ソマトメジンC (インスリン様成長因子: IGF) ナトリウム利尿ペプチド	○ ○ ○ ○ ○	大腸菌/酵母 大腸菌 大腸菌/ 動物培養細胞 大腸菌 大腸菌
<サイトカイン> インターフェロン- α , β , γ インターロイキン-2 エリスロポエチン 顆粒球コロニー形成刺激因子 (G-CSF) G-CSF誘導体 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)	○/× ○ ○ ○ ○ ○	大腸菌/ ヒト培養細胞 大腸菌 動物培養細胞 大腸菌/ 動物培養細胞 大腸菌 大腸菌
<血液凝固因子> 血液凝固第VII因子 (活性型) 血液凝固第VIII因子	○ ○	動物培養細胞 動物培養細胞
<抗体> キメラ抗CD20モノクローナル抗体 キメラ抗CD25 (インターロイキン-2受容体 α)モノクローナル抗体 キメラ抗腫瘍壊死因子 (TNF) α モノクローナル抗体 ヒト化抗RS (Respiratory Syncytial) ウイルス抗体 ヒト化抗上皮成長因子 (EGF) 受容体 (HER2) モノクローナル抗体 マウス抗CD3モノクローナル抗体	○ ○ ○ ○ ○ ×	動物培養細胞 動物培養細胞 動物培養細胞 動物培養細胞 動物培養細胞 動物培養細胞

第3章
品質と安全性評価
バイオロジクスの

【表3-3 遺伝子組換え技術を応用して細胞基材より生産されるペプチド・タンパク質性医薬品の製造方法におけるシナリオの多様性

- 宿主細胞の選択
- 目的タンパク質 (第1次発現産物) の構造遺伝子 (アミノ酸を実際にコードする遺伝子配列) の由来や塩基配列の選択
 例・アミノ酸配列のデザインを人為的に改変するかどうかの選択。
 ・前駆体や融合タンパク質として産生させるか、単純タンパク質とするか、あるいは、翻訳後修飾を受ける複合タンパク質とするかどうか、などの選択。
- 発現ベクター (目的タンパク質を発現させる目的で宿主細胞に導入されるベクター) の種類や構築方法の選択
- 構造遺伝子の発現を調節する塩基配列 (プロモーターなど) の選択
- 組換え体 (宿主細胞に発現ベクターが導入された細胞) の作製・選抜方法、および選抜された組換え体のバンク化 (単一の性質をもつ細胞を分注した複数のバイアル/アンブルからなるセルバンカーこれが医薬品製造用基材にあたる) の作製の選択
- 培養方法や目的タンパク質の発現条件の選択
- 培養後の精製/処理方法や製剤化の方法の選択

株、セルバンク)は、保存管理法が不適切な場合には変化する可能性がある。また、大量培養中における細胞の変異も考えられる。培養中に生きた細胞内で起こる事象に関しては、人為的な制御が不可能もしくは困難な点が少なからずある。医薬品生産に関連して培養細胞内で起こる事象とは、例えば、遺伝子発現(複製、転写)、遺伝子からのタンパク質の発現(翻訳)、発現タンパク質のプロセッシング、糖鎖付加その他の翻訳後修飾、高次構造形成などである。これらは、最終的に採用された遺伝子発現構成体(遺伝子組換え技術応用医薬品の製造に用いられる、目的タンパク質の構造遺伝子を含む発現ベクター)の種類、培養細胞の種類、細胞の培養条件、目的産物の発現誘導条件などにより大きな影響を受ける。人為的にコントロールできるところもあるが、発現タンパク質のプロセッシング、糖鎖付加その他の翻訳後修飾、高次構造形成などは、前述した発現ベクター、細胞の種類、培養条件などの諸条件に応じてその挙動が変動する可能性を秘めた細胞任せの部分が多いところである。それに加えて、目的産物は一般に物理的・化学的にも、また生物活性の面からみても不安定で変化しやすい高分子活性タンパク質であるという点や、変化のしやすさが製造方法、製剤化、保存方法とも密接に関連しているという点にも着目する必要がある。

ところで、ペプチド・タンパク質性医薬品の物性面での大きな特徴としてあげられるのは、最終製品中の目的成分が多様な分子種から構成される不均一なものとなる可能性が高いことである。どのような不均一性のものが得られるかは、用いられた遺伝子発現ベクター、細胞の種類、培養条件、精製方法などに影響されるが、中でも培養細胞内で起こる遺伝子発現、翻訳、プロセッシング、翻訳後修飾などや製造工程中でのタンパク質の不安定さに起因する一部の構造変化などの影響が大きい。

一方、目的成分とは別に、最終製品に混入する可能性のある不純物や汚染物質(例えば、目的物質由来/製造方法由来不純物、感染性物質やエンドトキシン)の種類や量も製造方法と密接に関係する。

このようにペプチド・タンパク質性医薬品の場合、多様な人工的シナリオにより、不確定要素を秘める生細胞を用いて不安定な高分子タンパク質を生産し、高度に精製して医薬品として利用するという背景を考えると、目的有効成分に制御不能で不可避的な不均一性が生じたり、それとは別に化学構造や生物活性が変化したり、望ましくない不純物などが生成・混入することによって、製品の品質・安全性・有効性確保上の問題を生じる可能性が常に存在することに留意しておく必要がある。

これを別の観点からみると、同一の目的産物を有効成分とした医薬品の生産

を目指したとしても、製造業者が異なれば製造方法は当然異なるので、最終製品に含まれる目的産物の構造、組成や不均一性、不純物などの種類や混在量が個々の製品間で異なるケースがあり、またそれが品質・安全性などの確保上、問題となる可能性があるケースが少なからずあるということである。また同一の製造業者でも、製造方法を何らかの理由で変更した場合には同様の事態が発生する可能性が考えられる。

そうした中で製品の品質・安全性を確保し、その恒常性を保証する前提としては、まず、その製造方法で得た製品の分子特性、品質、安全性などに関する必要な検討を行い、どのような製品が得られたかを明らかにして、意図する製品の範囲のものが得られたことを確認することが何よりも重要である。目的とする製品が得られたことが立証できれば、それはとりもなおさず、採用した製造方法がとりあえず妥当であることを意味する。こうした製品面からの評価に加えて、バリデーションなどさまざまな角度からの検討によって、採用した製造方法が細胞基材の段階から培養工程、精製工程、製剤化に至るまで目的にかなう妥当なものであり、かつ品質・安全性の保証された製品の安定した生産が続けられるものであることを確認しておく必要がある。また、いったん妥当性が立証された製造方法は、その詳細を明確にしておき、その一定性の維持・管理を行うための適切な方策を講じておく必要がある。例えば、細胞基材由来のタンパク質性医薬品（遺伝子組換え技術応用医薬品や細胞培養技術応用医薬品）の製造用基材となるセルバンクについては、適切な調製法によるバンクの確立、徹底した特性解析、厳密な管理を行い、以後必要な際には定められた方法により再調製して一定の特性をもつセルバンクを用いるための方策を明らかにしておくことが重要である。もちろん、以降の培養工程や精製工程を含む製造工程全体も、使用する各種試薬やクロマトグラフ用カラムの担体、装置などの製造用資材の品質や管理法、手順などを含めて厳密に一定性を維持する必要がある。さらにII-F項で述べるように、細胞基材にもともと存在する可能性がある感染性物質のみならず、製造に用いられる培地や試薬など、生物由来の原料または材料からの感染性物質の混入についても特段の配慮が必要である。

製品レベルでその品質、有効性、安全性の恒常性を維持、保証するための方策も必要である。それには、ロット毎の品質規格、試験法を適正に定めることや、必要に応じて、工程内管理試験の設定を含む適切なプロセスコントロールを行うことが欠かせない重要事項となる。

生物学的な作用の面からみると、タンパク質性医薬品は一般的に化学合成医薬品に比べて微量で作用を示すものが多く、その作用も組織や部位、濃度に応じて多彩であることがしばしばである。また、作用に動物種特異性を示すケー

表3-4 バイオロジクスを適用対象としたICHガイドライン¹

○組換えDNA技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析 (1998年1月) ²
○生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の由来, 調製及び特性解析 (2000年7月) ³
○ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウィルス安全性評価 (2000年2月) ⁴
○生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の規格及び試験方法の設定 (2001年5月) ⁵
○生物薬品 (バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品) の安定性試験 (1998年1月) ⁶
○バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価 (2000年2月) ⁷

- 1 <http://www.nihs.go.jp/dlg/ich/lchindex.htm>
- 2 <http://www.nihs.go.jp/dlg/ich/quality/q5d/iyakusin-873.pdf>
- 3 <http://www.nihs.go.jp/dlg/ich/quality/q5b/q5bstep4j.html>
- 4 <http://www.nihs.go.jp/dlg/ich/quality/q5a/iyakusin329.pdf>
- 5 <http://www.nihs.go.jp/dlg/ich/quality/q5c/q5cstep4j.html>
- 6 http://www.ourei.mhlw.go.jp/~hourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3572
- 7 <http://www.nihs.go.jp/dlg/ich/safety/s6/iyakusin-326.pdf> (参考文献3)

スやタンパク質としての抗原性が問題となるケースが多いという特徴も持っている。安全性確保上、次項で述べるような点に留意しておく必要がある。

バイオロジクスの品質・安全性などを確保するための一般的留意事項について、日米EU医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: ICH) の場で三極の規制当局関係者および製薬業界の専門家を集めて議論が続けられており、合意に至った事項についてはガイドラインとして厚生労働省から各種公表されている (ICHガイドライン)。細胞基材由来のタンパク質性医薬品 (および一部の生物起源由来タンパク質性医薬品) に関してこれまでに公表されているICHガイドラインを表3-4に示す。また、医薬品開発途上や承認後に製造方法の変更を行う場合に、変更前後の製品の医薬品としてのcomparability (同等性/同質性) をいかに評価するかに関する議論が現在進行している。

B 細胞基材より生産されるペプチド・タンパク質性医薬品の非臨床安全性評価

1. 概論

不純物や感染性物質に起因する安全性の問題とは別に、有効成分そのものに関連した安全性上の問題がある。多くのホルモンやサイトカインに代表されるようにペプチド・タンパク質性医薬品中の目的タンパク質は多種多様な生物学的作用を微量で示し、生体内で必要なときに必要な場所で必要な濃度存在し、他の生体内機能分子と協同作業あるいは相互調節制御的作業を営みながら生体

のホメオスタシスの維持に関与している。そのため、これらの機能分子が医薬品として人為的に投与された場合、目的タンパク質自体が生体内で本来の生理的濃度をはるかに超えた状態または本来存在しない組織にまで存在する状態が生じることにより目的外の作用が発現したり、生体のホメオスタシスの乱れを招いて生体に望ましくない作用を発揮する可能性がある。したがって、期待する薬効やその効果発現のための作用機序はもとより、目的外の作用についても医薬品開発段階（非臨床試験段階）で十分に理解を深めておく必要がある。

さらに、特にタンパク質性医薬品では抗原性についても注意が必要である。これらの抗原性は、アレルギーやアナフィラキシー（即時型 I 型アレルギー反応、具体的な症状としてはショックなど）、アナフィラキシー様症状（臨床所見からはアナフィラキシーと区別できないが、発現機序において IgE が関与しないもの）あるいは中和抗体（インヒビター）の産生など、临床上重篤もしくは致命的な問題につながるケースもある。種差の問題から、製品のヒトに対する抗原性は最終的には臨床試験でしか確実な評価はできないが、

- ①目的タンパク質自体およびそれと同等な生物学的作用を示す目的タンパク質関連物質の抗原性
- ②精製工程により除去できなかった、あるいは製品の保存中に凝集、変性などの構造変化を起こして生成する目的タンパク質由来不純物の抗原性
- ③製品中の（目的タンパク質由来ではない）夾雑タンパク質や夾雑リポ多糖類などの不純物の抗原性
- ④製品中のタンパク質と添加剤（ヒト血清アルブミンや糖類など）との相互作用により形成される反応付加体の抗原性

の4点については、臨床試験の実施前に、

- ①製品の製造工程（細胞基材、培養工程に用いる培地成分、精製スキーム等々）の選択の妥当性に関する十分な検討
- ②品質面に関する徹底的な試験、解析（問題となる不純物混在量の上限值を規定するなど、保存中の変化も考慮した適切な品質規格の設定）

を行った上で、

- ③適切な非臨床安全性試験の実施、およびそこでの抗原性に関する注意深い観察と十分な考察

を行っておくことが望ましい。なお、添加剤や不純物がアジュバント（免疫増強物質）として作用するケースもあるので、この点にも注意が必要である。

2. 非臨床安全性試験—ICHガイドライン—

動物などを用いた非臨床安全性試験の主な目的は、まず、特に臨床試験開始前の段階において、

- ①当該医薬品をヒトに適用する際の投与量および投与スケジュールを設定するための安全性情報を可能な限り得ること
- ②医薬品として期待される薬効以外の毒性が発現するおそれのある臓器・組織を可能な限り特定し、かつその毒性の種類、程度、可逆性や発現機序を検討しておくこと

である。また、

- ③臨床試験を含めた臨床使用時においてモニタリングすべき具体的な安全性評価項目を見出すこと
- ④承認・上市前にヒトでの知見を十分に得ることが事実上困難なケースが多い安全性（例えば、がん原性、生殖・発生毒性、遺伝毒性）に関する情報を得ること

も重要な目的である。したがって新医薬品の開発研究上、非臨床安全性試験の実施は、安全性薬理試験も含めて一般的に必要な不可欠なものであり、それはバイオロジクスにおいても例外ではない。

また、開発途中や承認・上市後に製造方法を変更した場合や最終製品に重大な変更（例えば添加物に関する大きな変更）を加えた際にも、最終製品の comparability（同等性/同質性）を確認するため、品質面での評価のみならず、場合によっては追加の安全性試験、薬物動態試験、薬力学試験や臨床試験が必要となることもある。

目的タンパク質の構造の多様性や不均一性、作用発現の動物種特異性、免疫原性、予期しない部位での作用発現の可能性など、バイオロジクスの物性面や作用面での特徴・特殊性からみて、従来の医薬品（特に化学合成医薬品）における非臨床安全性試験の種類・項目および試験方法をバイオロジクスにそのまま機械的に適用することは必ずしも妥当ではなく、従来とは異なる観点や方法で試験を実施すべき場合が多い。このため、細菌、酵母、昆虫、植物および哺乳動物細胞を含む種々の発現系を用い、特性解析がなされた細胞から製造される医薬品（動物工場/植物工場由来医薬品も含む、遺伝子治療用医薬品および細胞・組織利用医薬品は除く）について、別途検討すべき非臨床安全性試験の内容や考え方がICHガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」として厚生労働省から公表されている（章末参考文献3、表3-4脚注7）。これは、化学合成医薬品を主な適用対象とした他の非臨床安全性ICHガイドラインを補完する位置付けにある。

上記ガイドラインの基本的考え方によれば、あらゆる遺伝子組換え技術応用医薬品や細胞培養技術応用医薬品に対して適切とされる画一的な非臨床安全性試験のプロトコールなるものは存在し得ず、対象とする医薬品の特性や臨床上

の適用法などを考慮して医薬品毎にケース・バイ・ケースで合理的かつ柔軟に対応することが適切であるとされている。「ケース・バイ・ケース」といっても、あくまで当該医薬品の臨床上の安全性や有効性の適正な評価に役立つ知見を得ることを最終的な目標として、その時点で最も科学的に適切な試験を実施すべきであることは当然である。その上で、実施すべき試験の種類・項目および具体的な試験方法に関しては個々の医薬品毎に合理的な選択を行えばよい。逆に実施しないとされた試験については、実施しなくてよいと判断した合理的な理由が必要である。

化学合成医薬品と同様、バイオロジクスの非臨床安全性試験においても、

- ①適切な動物種を選択
- ②用いる動物の例数、性別および週齢
- ③用いる動物の生理的狀態
- ④投与量、投与経路、投与方法など動物への投与計画
- ⑤試験使用条件下での試料の安定性

などについて十分考慮しなければならない。

ガイドラインで適用対象としているバイオロジクスの多くには動物種特異性があるため、非臨床安全性試験において適切な動物種を選択することが特に重要である。*in vivo*での活性についてある特定の性質を予測したり、ヒトを含む複数の動物種の相対的な感受性を評価するためには、種々の動物由来の培養細胞系を利用することが適切なケースもある。①における「適切な動物種」とは、その動物種に目的産物の受容体が発現しており、用いる試料が薬理的活性を示すような動物種のことである。例えば、モノクローナル抗体医薬品の場合における「適切な動物種」は、意図するエピトープ（抗原決定基）を発現し、かつヒトと類似した組織交差反応性を示すような動物種に相当する。ヒト疾患と類似していると考えられる実験動物モデル、例えば誘発性および自然発症性病態モデル動物、遺伝子ノックアウトモデル動物、トランスジェニック動物などを非臨床安全性試験に用いることにより有益な知見を得られる場合もあるが、その際にはこのような動物モデルを用いて安全性評価を行う科学的妥当性を事前に明確にしておく必要がある。それぞれの安全性評価では通常2種類の「適切な動物種」を使用した試験を計画すべきであるが、十分な周辺データおよび考察に基づいた正当かつ合理的な理由があれば1種類の「適切な動物種」を用いた試験のみでも許容され得る。

上記の動物種を選択とも関係するが、②の例数について、使用される動物の例数が少ない場合（ヒト以外の霊長類を用いた試験においてしばしばみられる）、背景データなどの当該試験以外のデータの収集や総合的な考察をより綿

密に行う必要がある。観察の頻度を増やしたり観察期間を延長することによっても、例数が少ないことに起因する限界を部分的には補うことが可能である。

④の投与量、投与経路および投与回数は、臨床適用で予定される投与方法に可能な限り近い形とすべきである。投与量についてガイドラインでは「使用される動物種における医薬品の体内動態及び生物学的利用率並びに実験動物に安全かつ人道的に投与しうる投与量について考慮すべき」かつ「毒性用量及び無毒性用量（NOAEL）を含み、用量－反応関係に関する情報が得られるよう設定しなければならない」とされている。

ヒトに適用されるバイオロジクスの多くは動物で免疫原性を示すことから、動物における抗体産生がヒトでの抗体産生を直接意味するものではないものの、反復投与試験において当該医薬品の投与により産生する抗体を測定して（目的タンパク質に対する抗体の測定のみではなく、必要に応じて不純物などに対する抗体産生や添加剤共存による影響も含めた検討も行う）、観察された抗体反応の特性（例えば、抗体力価、応答した動物数、中和抗体であるか否か）を明らかにし、その上で抗体発現が本薬の薬理作用および毒性所見に及ぼす影響について検討する必要がある。このため、用いた動物のほとんどで、新たに産生した抗体により当該医薬品の薬理作用または毒性作用が中和されるケースを除いては、抗体が検出されたことだけを理由として安易に本来必要である他の非臨床安全性試験を省略したり試験期間を短縮したりすることは不適切である。なお、反復投与毒性試験における投与期間について、ガイドラインでは一般的に1～3ヵ月、臨床で短期使用（例えば7日以内）および急性の致死性疾患に対する適応が検討されている薬剤では2週間、慢性疾患に対する適応が検討されている薬剤では6ヵ月前後が推奨されている。

さらに、最終製品（科学的妥当性があればそれと類似の剤型でも可）を用いての局所刺激性試験を実施する必要がある。ただし、単回または反復投与毒性試験に局所刺激性の評価を組み込むことにより、局所刺激性試験を独立して実施しなくてよい場合もある。同様に、安全性薬理試験のうち、摘出臓器を用いる試験や*in vitro*での試験以外の一部は、毒性試験に組み込んで実施することも可能である。また、反復投与毒性試験には可能な限りトキシコキネティクスを組み込むことが望ましい。

特に免疫毒性試験、生殖・発生毒性試験、遺伝毒性試験およびがん原性試験では、従前の化学合成医薬品で確立された試験方法をそのままバイオロジクスに適用して試験を実施しても無意味な結果しか得られない場合が多い。これらの試験の実施にあたっては、そもそもの試験目的を十分に考えた上で、品質面や薬理学的作用の面あるいは予定される適応症や投与期間等の臨床的側面など

個々の医薬品の特性に合わせた試験計画を個別に立案して試験を実施する必要がある。なお、科学的にみて合理的な理由があれば試験内容を簡略化したり、場合によっては試験を実施しなくても問題はない。

C 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保

遺伝子治療用医薬品においては、

- ① ウイルスベクターの場合の複製（増殖）性ウイルスの検出方法、存在許容量と管理方法
- ② 抗原性、特にウイルスベクターの場合に、目的遺伝子以外で発現するウイルスタンパク質による抗原性に対する留意と軽減方策
- ③ 標的細胞指向性の付与などによる目的外の細胞・組織への遺伝子導入の回避と投与量の軽減のための方策
- ④ レトロウイルスベクターなどの染色体への遺伝子組み込みに伴う遺伝毒性、がん原性発現への慎重な対処などが重要課題である（表3-5）。

D 細胞・組織利用医薬品の品質・安全性確保

細胞・組織利用医薬品・医療機器においては、

表3-5 バイオロジクスの品質・安全性確保の方策に関するガイドライン類（ICHガイドライン以外）

- 生物学的製剤基準（1993年10月）¹
- 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針（1995年7月、一部改正2002年3月）^{2,3}
- 血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン（1999年8月）⁴
- 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方（2000年12月）⁵
- ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（2000年12月）⁶
- 異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針（2002年7月）⁷
- 日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件（第14改正日本薬局方第1追補・参考情報）（2002年12月）⁸
- 医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方（2003年2月）⁹
- 生物由来原料基準（輸血用血液製剤総則、血漿分画製剤総則、人細胞組織製品原料基準、人尿由来原料基準、人由来原料基準、反弱動物由来原料基準、動物細胞組織製品原料基準、動物由来原料基準）（2003年5月）¹⁰
- OBSEリスク評価の基本的な考え方（2003年8月）¹¹

1 1993年10月1日付け厚生省告示第217号（その後、適宜一部改正）

2 http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3109

3 http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3638

4 <http://www.ourei.mhlw.go.jp/ourei/doc/tsuchi/150702-a.pdf>

5 <http://www.nihs.go.jp/mhlw/jouhou/cell/cell-a.pdf>

6 <http://www.nihs.go.jp/mhlw/jouhou/cell/cell-b.pdf>

7 <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html#isyoku>

8 <http://pdb.nihs.go.jp/jp14supp1/dal1uibo.pdf>

9 http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3732

10 2003年5月20日付け厚生労働省告示第210号

11 <http://www.ourei.mhlw.go.jp/ourei/doc/tsuchi/150806-c.pdf>