

**Guidance for Industry**  
**Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials**  
**Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases**

るための材料の評価などが含まれる。生物製品の製造での使用を意図する細胞の適格性確認には、下記の評価が含まれる：

- ・ 細胞の履歴および一般的特性；
- ・ 細胞バンキングシステム；および
- ・ 品質管理試験による細胞の特性評価。

状況によっては、製造工程でのウイルスの除去および/または不活化を証明するバリデーション研究がさらに必要となるかもしれない。

## **B. 細胞基質の特性評価と適格性確認に影響する製品固有のパラメータ**

### **1. ワクチンの純度**

21 CFR 610.13 における規定には、「製品には、承認済の生物製品許可申請で示した製造工程で不可避なもの以外の外来性病原体が存在してはならない」と記述されている。21 CFR 600.3(r)では、純度とは、「最終製品において、レシipientまたは製品のいずれに対しても有害な外来物質が比較的少ないこと」とであると定義している（第VI章の用語解説を参照）。弱毒化生ウイルス、完全不活化ピリオン、あるいはウイルス様粒子は、ウイルスサブユニットワクチンほど厳密に精製できないことがしばしばあるため、汚染の可能性はサブユニットワクチンよりも高い。時として、生ウイルスワクチンの産生により、細胞が破壊されることがある。また、上記ワクチンの精製は、十分になされないことがしばしばあり、その場合はいかなる不活化の段階にも入ることはない。生ウイルスワクチンの製造業者が、すべての外来性病原体のクリアランスを確認することは不可能であるため、生物学的出発物質および原材料の包括的試験と適格性確認を実施し、ロット毎に外来性病原体を試験することが必要となる。

後処理工程中にウイルスクリアランスが達成された高度に精製製品に関しては、プロセスバリデーションをさらに信頼してもよい（参考文献2）。不活化ワクチンに関しては、ワクチンウイルスを不活化するために用いる工程では、（初期の不活化ポリオウイルスワクチンで発生するような（参考文献4））生じ得るすべての外来性病原体が不活化されない可能性があるため、外来性病原体の不活化に関するバリデーションについての文書を作成する。試験およびその試験が適用されるステージの選択は、不活化プロセスにより異なる。実行可能なウイルスクリアランスの程度は、実施することが望ましい製品の汚染を否定する試験の感度に影響を与える可能性がある。

製品の純度は、ワクチン作製に用いる試薬や生物学的原材料の純度の影響を受けるため、作製するために使用する出発物質を含むワクチンの作製中は、潜在的ウ

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

ウイルスを不活化あるいは汚染を除去するために用いるすべての方法をバリデートするとよい。例えば、血清の放射線照射によるウイルスの不活化で、最終製品の純度がさらに保証される。ワクチンの作製で使用されるすべての試薬および生物学的原材料に関する分析試験成績書(COA)を、申請時に添付することが望ましい。

既知の外來性病原体に暴露されたシード、あるいはウイルスシードの継代履歴が不明である場合、ウイルスシードを(分子クローニング、外來性病原体に対する中和抗体を含む培地での連続継代、あるいはプラーク精製などにより)精製することが望ましい。各自の精製方法で、ウイルスシードからすべての外來性病原体を許容可能な安全域まで除去することが可能であれば、シードの適格性を確認するために、このアプローチを使用することができる。シードの精製を検討している場合は、そのプロセスの初期に提案された方法論とそのバリデーションについて、我々と検討することが望ましい。

## 2. 潜在的汚染源

製品のすべての汚染源を特定し、かつ調査することが重要である。例えば、多くの認可ウイルスワクチンの作製で使用するウイルスシードは、細胞を単離するヒトまたは動物、単離や弱毒化に使用した細胞および原材料(血清やトリプシンなど)、ウイルスシードの増殖での細胞のバンキングおよび増殖に使用する材料、およびシードの作製や充填の際に用いるその他の材料などの潜在的汚染源に暴露される。また、試験の選択において、細胞基質、ウイルスシード、およびその他の生物学的出発物質の起源となる種についても検討することが望ましい。開発や製造の過程のいかなる時でも、製品と接触する可能性がある場合は、あらゆる感染性ウイルス(ヒト以外の種に感染するウイルスを含む)を潜在的汚染として見なし、適当なステージで製品の汚染因子を試験する。最終的に、複数のロットの組換えタンパク質におけるマウス微小ウイルス(MVM)の有無を報告することなどにより、特異的起源からの汚染の可能性を考慮する(参考文献5)。その他の汚染因子、特に使用する細胞基質により増殖が促進される病原体が存在するかを検証する試験が必要となる場合がある。

## 3. 品質設計

現行の製造に関する基準(cGMP)と前臨床研究に関する基準(GLP)に一致する品質設計の概念(21 CFR のパート 211 と 58 を参照)は、適当な細胞基質とウイルスシードの選択に関連するものである。細胞基質またはウイルス分離株が、cGMP および GLP と一致する概念に基づいた独自の方法によるものでない場合、その使用に有用な追加文書(ドナーおよび原材料の起源など)、試験、および製造段階が必要となる。これには、外來性病原体による汚染の可能性を低減するための一部のウイルスシー

ドの再生成や追加的に行う精製などが含まれる。

#### 4. 対照細胞培養物の使用

ワクチンウイルスを増殖するために初代細胞培養物を使用する場合は、ウイルス接種前に初代培養物を完全に試験できない可能性がある。この場合は、同時に作製し、製造培養と同じ方法で操作した非感染対照細胞培養物を製造および試験することが望ましい。対照細胞培養物は、各自の製造培養物と同時に処理することが望ましいが、非感染の状態を維持し、細胞シートの直接的観察と試験および適切な試験による培養液の試験を行い、外来性病原体の有無を試験する(第Ⅲ章の A および第Ⅳ章の E の表1に示す)。可能であれば、作製した製品に対する類似試験を実施する際に、時折外来性病原体試験を行うとよい。

ワクチンウイルスが、例えば外来性病原体を試験できるようにするためのウイルスの中和が容易にできない等、製品の製造工程での試験結果を干渉する場合、対照細胞培養物の使用が重要となる。潜在性または内在性の外来性病原体および未複製の外来性病原体で起こり得る再活性化や検出可能な適当な期間での製造と類似した状況で、対照細胞培養物を増殖する。試験前の製品容器への接種から少なくとも14日間は、培養期間とする。一部の物質を検出するには、さらに長い期間を要するかもしれない。対照細胞の試験で、必ずしも完成細胞を試験する必要性がなくなるわけではなく、ワクチン作製中に生じる病原体の有無を明示することが必要となる可能性がある。

#### 5. アッセイバリデーション

アッセイあるいは意図する使用に関連する細胞基質の評価で用いる試験の信頼性を証明する。分析用アッセイをバリデートするのに適当な方法に関するガイダンスは、ICH Q2A(参考文献6)および Q2B(参考文献7)の文書から入手してもよい。米国薬局方(USP)の第 1225(参考文献8)では、さらに詳述している。これらガイダンス文書で定義する原則に基づいて、試験方法をバリデートするとよい。

特定の「簡潔な」方法には、実際の使用状況での適合性が検証されている限り、完全なバリデーションは必要でない。使用に関する適合性の検証には、検出限界と既刊文献に記載されている方法の限界の間にある比較可能性の明示も含まれている場合がある。

各自のアッセイバリデーションにおける適切な統計分析があることが望ましい。これには、アッセイの確度、精度、検出限界、適格性確認の限界、特異度、直線性と範

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

困、耐久性と頑健性、およびシステム適合性の評価などが含まれる。これに関するガイダンスをさらに希望する場合は、ICH Q2A 文書から入手する(参考文献6)。

#### Ⅲ. 細胞基質、ウイルスシード、生物学的原材料およびワクチン作製の特性評価と適格性確認

本節では、細胞バンキング、製造段階、各ステージで推奨される外来性病原体試験または特性評価、および試験の選択に影響する可能性があるファクターに関する戦略について述べる。各自の試験が、ウイルスワクチン製品に特異的な課題に対応することが望ましいが、下記の勧告で総合的ガイダンスについて述べる。推奨する試験の価値を最大限にするには、最も汚染が検出される可能性が高い製造段階で、各試験を実施することが重要である。

##### A. 細胞基質の特性

ウイルスワクチンの作製で選択した細胞基質の特性を十分に評価する。それを適用することにより、次の問題に対処する。

###### 1. 細胞基質の選択に適切な特性

ワクチンの安全性および有効性は、細胞基質の特性により異なる。審査を受けた適当なドナーからのウイルス株の初期分離から始まり、認可ワクチンとなるまでの考え得るワクチン候補を開発するすべてのステージは、十分な特性評価がされた細胞基質を使用して行う。

細胞培養の継代中に、確実にワクチンウイルス株を安定した状態に維持することは、細胞基質を選択する上で重要な要素である。種々の細胞タイプにより、ワクチンウイルスに種々の選択圧が加わる可能性があり、それによりその配列や場合によってはその表現型が変わるかもしれない。例えば、異なる細胞でセービンポリオウイルス株が培養されれば、神経毒性が復帰する可能性も様々である(参考文献9)。ワクチンウイルスの弱毒性突然変異やその他の遺伝マーカー(免疫応答に関連する抗原の発現など)が分かっている場合、これらマーカーで残留した細胞基質における連続継代が受ける影響は、ワクチンウイルスの遺伝的安定性を特性評価するのに有用である。

細胞基質(トランスフェクションで用いる親細胞またはプラスミドなど)の作製に、どの出発物質が使用される場合も、これら出発物質および実施しているあらゆる特性評価(プラスミドの配列など)に関する情報を提供することが望ましい。新種の細胞基質を作製するため、初代培養から開始する申請者の場合は、ドナーのスクリーニングおよび試験についての完全な情報を提供する。ドナーのスクリーニングおよび試験についての詳細は、第Ⅲ章の A.2 を参照。

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

#### 2. ソース

起源となる種および細胞基質の組織タイプに関する文書を作成する。また、ドナーの病歴およびドナーやドナーのサンプルに実施したあらゆるスクリーニングと試験の結果も提供する。通常、21CFR パート 640 に記載の通り、全血または原料血漿のドナーを用いた同様の方法で、ヒトドナーを審査かつ試験する。動物ドナーは、同様の概念で審査および試験する。ドナーは、健康状態が良好(腫瘍由来細胞基質の場合を除く)で、感染性疾患の徴候がないことが望ましい。死に至らしめるか、細胞基質を作製するために使用するサンプルを得る前に、ドナーとなる動物を隔離するのが理想的である(参考文献10)。ウシ由来材料およびブタ由来材料の特異的課題については、第Ⅲ節の A.2.fおよび A.2.g)で述べる。種々の動物には、様々な汚染の可能性があり、一部の動物細胞では、外来性病原体となる可能性が懸念されるヒトウイルスが増殖可能であるため、起源となる種との関係は非常に深い。組織タイプもまた、試験のストラテジーの決定において、記述および検討するのに重要な要素である。例えば、神経細胞は、潜在ウイルス(ヘルペスウイルスなど)を保有する、あるいは感染性プリオンタンパク質(PrP)を発現する可能性があり、これらの潜在的な外来性病原体について検討することが望ましい。腫瘍由来細胞についても、さらに検討する。

#### 3. 履歴(特性の同定を含む)およびその他の重要な特性

ウイルスワクチンの細胞基質の履歴は、21 CFR 610.18(c)(1)(i)に基づいて同定しなければならないが、それには経過履歴で明らかとなっているものの原材料の起源および試験、細胞基質の継代前後に設備内で培養したその他の物質すべての目録、および継代時の状況(該当する場合は、GLPs または cGMPs の遵守など)が含まれるとよい。一部の例では(チャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞やペロ細胞など)、複合的に関連した細胞系や細胞クローンが存在し、それを得たソースおよびその時点の継代(または細胞集団倍加)のレベルなど使用するラインに関連することを特定することが重要となる。全継代履歴で使用したすべての原材料に関する文書を作成することが望ましいが、特に重要となるのが、英国で BSE が出現した 1980 年以降にウシから採取した材料を使用した継代である。最初のプライマリドナーからの単離以降に、細胞基質に対して行ったことが分かっているすべての操作(アダプテーション、エンジニアリング、クローニング)を記録し、それらが細胞を受理した前後どちらで行われたかも記録する。

加えて、次のウイルスワクチンの作製で使用したあらゆる細胞基質に関する情報を提供しなければならない(21 CFR 610.18(c)(3)は除く。継代培養をしていない、あるいは非常に限られた数のみでの細胞集団倍加で、後に継代培養をした初代細胞培養を使用する場合、これら要素は必ずしも必要ではなく、その場合でも FDA はそれ

Guidance for Industry  
Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials  
Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

ら情報の提供を推奨している):

- ・ 細胞を同定するために使用する可能性があるあらゆる特性(21 CFR 610.18(c)(1)(ii)で要求される細胞遺伝学的特性など)に関する情報を含むすべての同一性試験の結果;
- ・ すべての有用な外来性病原体試験の結果(21 CFR 610.18(c)(1)(iv));

下記のものもまた、提供することが望ましい:

- ・ ドナーの年齢、性別および種;
- ・ ドナーの病歴および外来性病原体を検出するため、ドナーに行った試験の結果;
- ・ 由来する細胞系から得た組織の単離に使用した方法を含む細胞系の培養履歴、継代履歴、使用した培地、および動物における継代履歴;
- ・ 細胞の継代中に使用したヒト由来材料および動物由来材料の履歴に関する文書;および
- ・ 細胞基質に導入したすべての遺伝物質に関する文書。

#### 4. 培養特性

21 CFR 610.18(c)(3)の要求事項の適用から除外された初代細胞培養を用いる場合を除いて、細胞基質の *in vitro* での培養特性(懸濁培養または単層培養、培養率など)を明確にしなければならない。細胞の寿命が有限である場合は、老齢期の細胞集団倍加レベル合計数を定め、連続細胞系に腫瘍形成試験を実施する。細胞の腫瘍形成特性に関する記述が、すべての二倍体細胞および非二倍体細胞で要求されるが(21 CFR 610.18(c)(1)(ii))、継代培養をしていない、あるいは非常に限られた数の細胞集団倍加で、後に継代培養をした初代細胞培養には該当しない(21 CFR 610.18(c)(3))。マスター細胞バンクから完成細胞まで、細胞基質を常に顕微鏡で観察する。細胞系の特性を評価するのに有用な特定のマーカー(標識染色体、トランスフェクションした遺伝要素、特異的細胞表面マーカーなど)がある場合、その作製中の継代レベルでの安定性を分析することが望ましい。

#### 5. 発現特性

組換えタンパク質を作製するために細胞基質を使用する場合、特性評価の一部として、その能力を評価する。これには、導入された核酸のコピー数と安定性、および発現タンパク質の量と質の評価が含まれる。中には、細胞表現型に適したその他の遺伝子の発現を評価するのに適当な場合がある。一部の細胞基質では、内在性あるいは潜在性のウイルスの遺伝子が発現(または発現を誘発)する可能性があり、それ

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

が安全性に関する問題に関与している、あるいは細胞の同定に使用されている場合は、前述のような発現に関しても、記述することが望ましい。ウイルス配列が確認された場合は、外来性病原体試験によりその感染力と干渉の可能性を評価する必要がある。

#### 6. 外来性病原体に対する感受性

外来性病原体に関する包括的かつ適切な試験戦略の開発において、ウイルス株以外のウイルスによる感染に対する細胞基質の感受性について検討する。例えば、認可経口ポリオウイルスワクチン(サル腎初代細胞)の作製で使用される細胞基質には、SV40 やヘルペス B ウイルスなどある種のシミアンウイルスによる汚染に対する感受性があったため、各ロットのウイルスを分析する特定試験が必要だった。一方では、ヒトパピローマウイルスを細胞培養で増殖させることができなかったため、初期の細胞基質およびウイルスシードには、これら外来性病原体が存在しないことが証明された時点で、申請者が各ロットのウイルス製品のヒトパピローマウイルスに関する評価をするようには通常は推奨していない。新たな細胞基質の開発およびその試験戦略においては、同様の概念が有用であるかもしれない。

#### 7. 細胞基質の作製

ウイルス抗原を発現させるための *in vitro* での操作や処理により作製した細胞基質を使用する際は、細胞の特性に対する操作の影響に関して、細胞基質の特性を評価することが望ましい。例えば、欠損ウイルスやウイルスベクターの作製で補体細胞系を作製するためのウイルスのがん遺伝子による初代細胞の不死化が、細胞表現型を変えることは回避できないだろう。上記のような操作は、潜伏性または内在性のウイルスの出現および/または細胞の腫瘍形成を誘起するかもしれない。さらに、細胞クローニングを由来する細胞基質の特性は、親細胞系とは異なる可能性がある。それは、一つあるいは数個の細胞から由来したものであるため、クローニングによるオリジナルの細胞集団では代表的な特性を有する。培養での急速な増殖、またはワクチンウイルスの複製を促進する培養特性を変える特異的な細胞の培養状況に対するアダプテーションなどのアウトライヤーには特有の特徴があるため、細胞基質として、代わりにクローンが選択される(例えば、接着細胞からの懸濁細胞培養の開発など)。親細胞の特性が、製品の細胞基質を生成するための操作を行った後にも維持されているかを想定することはできないため、生成または処理された細胞基質の特性を十分に評価することが重要である。

#### B. 細胞バンキング

細胞バンキングにより、製品の耐用保存期間以上生存する作製に十分な特性評

**Guidance for Industry**  
**Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials**  
**Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases**

価を受けた細胞の適切な供給が保証される。一定の生物学的出発物質の供給に加えて、細胞バンキングでは、企業が細胞基質の包括的特性評価を行い、外来性病原体による汚染の可能性を最低限に抑え、および/あるいは存在する汚染を可能な限り検出できるようにすることとなる。

**1. 細胞バンキングのストラテジーおよび方法**

通常、マスターセルバンク(MCB)とワーキングセルバンク(WCB)の二層からなる細胞バンクシステムは、しばしば製造業者のワーキングセルバンク(MWCB)と呼ばれる。MCB は、特定の培養条件で調整した単一ソースに由来する一様な構成の細胞を収集することを示す。マスターセルバンクに対する前駆細胞のバイアルから成る親細胞バンクも、整備されていることがある。

WCB は、MCB からの一つ以上の細胞のバイアルに由来するものであり、連続的継代培養により増殖する。プールされた細胞を個々のバイアルで調整し、凍結保存して WCB を作製する。一つ以上の WCB からバイアルは、通常、ワクチンロットの作製に使用される。一つ以上の WCB バイアルからの細胞を用いる場合は、細胞懸濁液を解凍時にプールするとよい。作製に使用する細胞の細胞集団倍加レベルや継代レベルは、各企業で規定した基準に基づいた上限を超えないことが望ましい。

二層構造のバンキングシステムを用いる場合は、大規模な MCB の特性評価を実施するよう勧告している。すべての WCB は、十分な特性評価を受けた MCB 由来のものと思われるため、各企業の WCB は、MCB からの増殖中に暴露した可能性がある WCB に対する外来性病原体に焦点を当てたさらに限定的な方法で試験してもよい。細胞バンキングシステムを使用することにより、WCB から作製する間に暴露した可能性がある細胞に対する外来性病原体に焦点を当てたさらに限定的な個々のワクチンロットの試験が可能となる。また、一部の製造業者では、徹底した MCB の特性評価を行う代わりに、各 WCB の大規模な特性評価の実施が選択されるかもしれない。選択した試験ストラテジーは、各企業が置かれている状況により異なるが、少なくとも一つのバンクに対して大規模な特性評価を行うことが望ましい。MCB の試験は、一度限りの試験となるだろうが、MCB に対する徹底した特性評価が行われていない場合、FDA は、各ロットを作製するために使用した WCB の特性を完全に評価するよう要請するかもしれない。

例えば、細胞基質のオリジナルソースに限りがある、および/または継代レベルを低く維持する必要性により細胞数の増殖が制限される場合には、別の細胞



## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

バンキングシステムを使用してもよい。企業がどの細胞バンキングシステムを使用しているかに関わらず、あるレベルまで増殖した細胞の特性評価を十分に行うことが望ましい。いずれの場合にせよ、その由来と細胞バンクの指定について、十分に記述かつ説明する。

すべての細胞バンクを、液相式または気相式いずれかの液体窒素で保存することを推奨する。気相式液体窒素での細胞バンクの保存により、相互汚染の可能性が低減される。各企業の生物学的許可申請において、個々の細胞のアンブールの場所、識別および目録を記録する。細胞の回復や生存度に関するデータについては、凍結および保存した状態の細胞の安定性を証明したものを記録するとよい。地域災害や故障による細胞基質の喪失を避けるため、遠隔地と同様に製造設備内にある二ヶ所以上の場所で、別々に MCB と WCB を保存する。従業員による細胞への接触は、制限かつ管理することが望ましい。

#### 2. 細胞バンクおよび初代細胞の適格性確認

細胞バンクの適格性を確認する目的は、ワクチン作製における使用での安定性を証明することにある。本節には、細胞バンキングの種々の細胞タイプおよびステージでの試験に関する勧告が含まれており、初代細胞の使用にも適用する。すべての細胞分類(初代、二倍体、連続または腫瘍由来)が、すべてのタイプのワクチン(生、不活化、組換え型、または高精製)に該当するわけではないだろう。その使用および特定の使用により異なる細胞バンクの特性評価は、どの推奨試験が必要で、さらに試験を追加する必要があるかを判定するのに役立つ。試験の選択は、細胞基質が作製のタイプおよびその臨床的徴候を示すリスク評価に基づいて検討されることになるだろう。

MCB の適格性を評価する試験は、細胞バンク由来の細胞培養物の試験において、より適している場合を除いて、細胞バンクで直接的に実施する。

MCB に対して行う試験には、細菌、真菌、マイコプラズマおよびウイルス(例として、*in vitro* および *in vivo* での試験、レトロウイルスの特異的試験、および由来する種あるいは細胞培養での連続継代中に発生する可能性があることが分かっているウイルスの特異的試験など)の試験が含まれる。細胞基質の継代履歴に応じて、その他の特異的試験が必要となる可能性がある。組織培養や動物における試験の多くは、本来、21 CFR のパート 630 で発布されたものであり、1996 年に規制(61 FR 40153)に改訂されるまでは、その規制に含まれていた。FDA は、有用になると思われる適切な試験を、新たに製造業者が柔軟性をもって選択で

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

きるように、その規制から多くの特異的試験を削除した。これら試験については、第4節で詳述する。由来する細胞が採取された種に、ヒト結核菌感染の感受性がある場合、この病原体に対しても適切な試験を行う。ソースとなる種に応じて、トリの細胞で作製した製品の鳥類白血病ウイルス試験のような特異的試験を検討するかもしれない。例えば、サルの腎初代細胞培養を用いる場合、SV40、ヘルペスBウイルスのような特異的なサルの病原体、およびサルポリオマウイルスやサルサイトメガロウイルスなどその他のサルの病原体の試験を行う。

MCB あるいは MCB が暴露するすべての動物由来の試薬のいずれにおいても、ソースとなる動物で生じる可能性がある感染性病原体が含まれていないことを示す。ウシ(第IV節のA.2.f)やブタ(第IV節の A.2.g)の病原体に関する試験などの選択した状況に適した数種類の試験については、第4節で述べる。さらなる検討事項について、血清に関しては第III節の D.1 で、およびトリプシンに関しては第III節の D.2 で述べる。ウシ血清の場合、TSE 病原体についての問題を検討する必要があるだろう。最終的には、その細胞がレトロウイルスやレトロウイルス粒子を作製するかどうかを判定するため、殆どの状況で試験が実施されることが望ましい。この試験については、第IV節の A.2.c およびA.2.d に示す。

大規模な MCB の特性評価を一度は実施し、第III節のB.1における問題も解決することが望ましい。MCB の同一性試験で使用方法については、第IV節の B.3 で論じる。

### 3. 初代細胞に関する特別検討事項

初代細胞は、健康な動物の組織から直接的に入手する。ニワトリやアヒルの胚、サルの腎臓、およびその他の組織などからの初代細胞培養で調整したワクチンを幅広く使用することにより、ポリオ、麻疹、流行性耳下腺炎、および風疹などのウイルス性疾患の予防が大いに可能となった。サル腎細胞の培養は、ほぼ50年もの間、世界各国でポリオを予防するため、不活化ポリオウイルスワクチンおよび経口ポリオワクチンの作製で使用されている。ニワトリの胚線維芽初代細胞や鶏卵の培養が、安全かつ有効的なインフルエンザ、麻疹および流行性耳下腺炎のワクチンを作製するために、現在も使用されている。

初代細胞は、バンキングされ十分に特性評価された細胞よりも外来性病原体を有している可能性が高い。初代細胞に関するこの問題は、ソースとなる動物および初代細胞基質の厳正な適格性確認により減少する。初代培養の確立に使用する動物は、可能であれば、特定の病原体が存在しない閉鎖された群や団体

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

またはコロニーからのものであることが望ましい。「閉鎖」という用語は、新たな動物(新遺伝物質)を導入していないグループ(群、団体およびコロニー)を維持していることに対して用いている。閉鎖された群、団体またはコロニーからでない動物は、その群、団体またはコロニーに導入する前に、疾患や感染の徴候を感知するのに十分な期間隔離し、かつ十分な評価を行う。初代細胞基質のソースとしての適合性を判定するため、その動物特有の外来性病原体の血清学的スクリーニングを行う。畜産でのプラクティスでは、その適用において記述することが望ましい。

ウイルスワクチンの伝播でのニワトリの胚組織のソースとして使用する有精鶏卵は、サルモネラ菌の一種であるヒナ白痢菌、トリ結核菌、鶏痘、ラウス肉腫、トリ白血症ウイルス、細網内皮症ウイルス、およびその他のニワトリでの外来性病原体は存在しないと分析された群に由来するものであることが望ましい。分析試験成績書(COA)は、書面で提出する。分析していない群から採取した卵である場合、ワクチンには上述の病原体が存在しないことを実証する試験を行う。

しばしば初代細胞基質で使用される対象細胞に関しては、第Ⅱ節の B.4 でさらに詳しく述べる。

#### 4. 二倍体細胞株に関する特別検討事項

増殖および細胞バンキングにより、初代細胞培養で二倍体細胞株を確立する。これらのタイプの細胞の生存期間は有限であり、細胞系のように不死化していない。通常、二倍体細胞は、細胞系とも異なる二倍体あるいはほぼ二倍体の核型の特性を有しており、一般的には異数体または非二倍体である。

細胞株の同一性の確立や特性評価に有用である可能性があるため、各自の細胞ソースの核型を判定する。上記の分析により、細胞の二倍体の形質が明確となり、別の細胞株による汚染がないことが判定される。また、作製中に二倍体細胞株の遺伝的安定性を監視するのも有用であるかもしれない。同一性(第Ⅳ節参照)に関する別の試験も適切となる可能性がある。

MRC-5、WI-38、およびFRhL-2 のような遺伝学的操作をしていない二倍体細胞株を使用する場合、動物腫瘍形成試験は必要ではない。これは、以前に行った大規模な特性評価および明確に造腫瘍能を有さない表現型が、腫瘍形成に関して記述している 21 CFR 610.18(c)(1)(ii)の要求事項に適合しているからである。しかしながら、その造腫瘍能に関する 21 CFR 610.18(c)(1)(ii)の要求事項に

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

適合するのに上記試験が必要となるため、新種の二倍体細胞基質については、腫瘍形成試験を実施する必要がある。

#### 5. 連続細胞系に関する特別検討事項

ベロ細胞および CHO 細胞などの一部の連続細胞系は、認可生物製品に関する基質として使用されている。細胞系は、初代細胞あるいは二倍体細胞(例えば、典型的な異数体であり、幾度も遺伝子変化が起きている)とは異なる生化学的、生物学的、および遺伝学的特性を有している。殆ど細胞が不死化するメカニズムは一般的に分かっていないこと、および一部の細胞系は免疫不全のげっ歯類に接種すると腫瘍を形成することから、潜在的な外来性病原体および残存 DNA を含む二倍体細胞と比較すると、連続細胞系に関する問題はさらに多い。

細胞系(ホルモン、血液成分、ウイルスワクチンなど)で調整した製品の許容性に関する一般基準については、数多くの国際的考察がなされている。これらの製品は、外来性病原体および残存細胞が存在しない(第VI節の用語解説)ように精製され、細胞基質 DNA は低レベルであることが望ましい。残存する細胞基質 DNA が生物学的に活性化する可能性が懸念される時は、大々的な DNA の除去または分解をするための手順を導入する。細胞系の使用を検討している場合は、あらゆる製品開発プログラムの必須要素として、製品の精製に関する有効的方法の開発および評価を行うよう推奨している。

特定の細胞系から内在性ウイルス(レトロウイルスなど)が生じる可能性があるため、上記病原体を検出することができる試験を、作製条件下で培養されている細胞に行う(第IV節の A の外来性病原体に関する試験を参照)。特定の汚染が、使用している MCB や WCB における内在性病原体として確認されている場合は、作製において使用している精製手順により定めたレベルまで、クリアランス(不活化および/または除去)を行うことが必須となる。当該事項に関するガイダンスの詳細は、ICH Q5A の文書(参考文献2)から入手してもよい。

21 CFR 610.18(c)(ii)に従い、細胞系の造腫瘍能について記述しなければならない。継代レベルが上がることにより、細胞系が造腫瘍能の特性を得る可能性がある。したがって、作製に使用する細胞の継代レベルを制限し、この作製を完了した時点での制限あるいはそれ以上で、細胞の特性評価をすることが重要となる。完成時の最大継代レベルは、作製条件に相当あるいは類似する条件で増殖した製品の細胞から得たデータに従う。この評価で、MCB あるいは WCB のいずれかから得た細胞を増殖させてもよい。腫瘍形成試験は、このレベル以上で行う。各

**Guidance for Industry**  
**Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials  
Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases**

自分で定めた完成時点の制限を増やす場合、新たに提示した作成完了時点のレベル以上の継代レベルや細胞集団倍加レベルまで増殖した細胞のデータを使用して、この安全性をサポートする。

**6. 造腫瘍能を有するまたは腫瘍由来の細胞系に関する付加的検討事項**

自社で使用する細胞系が、造腫瘍能を有するまたは腫瘍由来のものである場合、さらに試験を行う。ワクチンのレシピエントにおける新形成過程の誘導に関与する潜在性発癌ウイルスと発癌性物質に関して、造腫瘍能を有するまたは腫瘍由来の細胞系を評価する。潜在性発癌ウイルスや発癌性物質に関する試験ストラテジーを、組織タイプ、ソースとなる種、継代履歴、および形質転換を起こしうるウイルスに関する知識の範囲により、個々に判定する。(腫瘍形成試験の考察については第IV節の B.1 を、および発癌性試験の考察に関しては、第IV節の B.2 を参照)

形質転換が起きている事象(例えば、既知のがん遺伝子により、細胞の形質転換が起きた場合など)が認められた場合、最終製品に形質転換を起こしうるウイルスの存在を否定する試験を行う。例えば、細胞系(293 の細胞など)を作製するために、ヒトの初代細胞の形質転換を起こすアデノウイルスの配列を使用する際は、導入されたウイルスの配列が最終製品には存在しないことを証明する試験を行うことが望ましい。同様に、細胞の形質転換を起こすためにウイルスを使用する場合も、安全性を確保するための十分な精度をもつアッセイにより回収した製品において、ウイルスおよびその遺伝物質が検出されてはならない。形質転換のメカニズムが分かっていない造腫瘍能を有するあるいは腫瘍由来の細胞系では、形質転換の可能性や発癌因子がないことを保証する試験がさらに要求されるだろう。実施する試験および追跡する方法については、CBER に相談するとよい。

細胞基質および細胞バンクの適格性確認で推奨される試験も、げっ歯類の細胞株に適用するが、生物製品の作製で用いるげっ歯類の細胞系の多くに造腫瘍能が認められているため、げっ歯類の細胞系の造腫瘍能を試験する必要はないと考えられている。上記の細胞は造腫瘍能を有していると推測されており、前述のとおり懸念されている。さらに、げっ歯類の細胞系には、内在性レトロウイルスを作製する能力があると考えられている。作製されるレトロウイルスの数やタイプの評価を行う。レトロウイルスの感染性のアッセイも、推奨されている。レトロウイルス粒子の汚染を受けていない最終製品を保証できるレベルにあるウイルスクリアランスを証明するため、各自の細胞を十分に精製することができるのであれ

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

ば、げっ歯類の細胞系のみを使用する。ウイルスクリアランスのバリデーションに関するガイダンスの詳細は、ICH Q5A の文書から入手してもよい(参考文献 2)。

#### 7. 完成細胞

完成時点の継代レベルを越えて増殖した一つ以上のロットや細胞から得た実際の完成細胞を特性評価する。上記の細胞を、完成細胞(EOPC)と示す。EOPCを用いて細胞基質特性の安定性を証明する。その特性評価には、培養特性、腫瘍表現型、内在性ウイルスの発生、挿入あるいは改変された遺伝子の発現、および遺伝学的安定性が含まれていることが望ましい。

#### C. ウイルスシード

ワクチンウイルスシードのストックをバンキングする方法は、細胞バンキングで用いられている方法と類似する。細胞バンクと同様、ウイルスシードの継代履歴と誘導履歴を記録する。その記述には、ドナーのスクリーニング、試験、およびドナーの医療記録が含まれていることが望ましい。低温適応、温度感受性の発達、あるいは弱毒化などウイルスの表現型の操作については、十分に記録かつ記載する。再集合や組換えなどあらゆる遺伝子操作でもまた、核酸配列の決定および各生物学的出発物質(プラスミド、親ウイルスなど)の調達などを記録かつ記載する。

これらワクチンウイルスバンクは、マスターウイルスシード(MVS)およびワーキングウイルスシード(WVS)と呼ばれることが多い。ウイルスシードは、液体窒素に入れ、製造設備内にある一ヶ所以上の場所、または安全上の理由がある場合は遠隔地で保管する。作製した細胞基質、組織親和性、遺伝マーカー、保存中の生存度、作製中の遺伝的安定性、弱毒化(該当する場合)、および外来性病原体の不在を含む培養特性について、ウイルスシードを評価する。異種からの様々な細胞タイプでの継代により弱毒化や誘導をする場合は、これらの各ステージで使用する原材料で発生する可能性がある種を含む、単離、継代、および作製中に暴露するかもしれないすべての種に、外来性病原体が存在することがない様ウイルスシードを処理することが望ましい。

##### 1. マスターウイルスシード

大規模な MVS の特性評価を実施し、さらに作製で用いるレベル以上の継代数で、遺伝子型と表現型の安定性を立証する。例えば、MVS を 47 回継代し、WVS を 48 回継代する場合、49 回継代して培養した WVS が接種される製品で

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

あり、その作製過程ではウイルス複製を一回のみすることが可能となる。その結果、47回から51回(5継代)の継代にあるワクチンウイルスの安定性を評価することが適切となる。

同一性(ワクチンウイルス全体の配列を決める必要がある)、細菌および真菌の滅菌、マイコプラズマの有無、ヒト結核菌(該当する場合)、外来性ウイルス(*in vitro*および*in vivo*での試験)、ウイルス表現型(組織親和性、弱毒化の特性、温度感受性など)に関する試験を行う。また、継代履歴からシードに存在する可能性がある病原体の特異的試験も検討する。

一部の例では、ワクチンウイルスの弱毒性および幅広い宿主域により、*in vitro*と*in vivo*での外来性病原体試験が複雑となっている。その結果、外来性病原体試験には、ウイルスシードの中和が必要となる。中和抗体は、モノクローナル抗体であり、調整した MVS における細胞以外の種で調整したものであることが好ましい。さらに、外来性ヒトウイルスの相互中和が起こる可能性があるため、通常、ヒトまたは霊長類の血清から、中和抗体を調整しない。中和手順が、外来性病原体の検出を干渉しないことを証明することが重要である。しばしば、ウイルスシードを効果的に中和できないことがあり、その場合は、比較的少量のシード、*in vitro*での外来性病原体試験における新鮮標的細胞への継代培養、あるいは付加的試験の導入(PCR、抗体作製アッセイなど)などの代替的な戦略を選択してもよい(参考文献11)。

神経毒性評価が適当であることも多く、前述した研究を開始する前に行う評価に適切な動物モデル、方法、およびスコアリングシステムについて、CBERに相談するよう推奨している。神経毒性を有するウイルスまたは神経毒性が復帰する可能性があるウイルス(ポリオウイルスなど)に関しては、MVSあるいは作製を完了した継代レベルにあるウイルスのストックについてのみでなく、ロット毎の製品の神経毒性を評価する必要があるかもしれない。

## 2. ワーキングウイルスシード

由来するMVSと比較すると厳密には特性評価を受けないワーキングウイルスシード(WVS)を、特性評価の対象にしてもよい。MVSに、単離中および継代履歴においてワクチンウイルスが暴露していたその種からの外来性病原体が存在しないことを立証すれば、WVS(作製した細胞および増殖とプロセッシングで用いる原材料など)に、WVSを作製するために使用する種からの外来性病原体が存在していないことを示すことのみが必要となる。

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

#### D. 生物学的原材料および補助試薬

細胞バンクとウイルスシードの作製中を含むワクチン作製で使用する原材料および補助試薬を試験し、保証する。動物またはヒトに由来する原材料に、由来する種の外来性病原体が存在しないかを試験し、その不在を保証する。製造供給元のCOAに試験を委託している、または自社で原材料の試験を行っているのかを記録する。

細胞の継代で使用する原材料に関する書類が十分でない場合、細胞基質自体を該当する種の外来性病原体試験を行う。ヒト由来の原材料および試薬に関する書類に、適切なスクリーニングと試験を受けたドナーからのソーシング(ガイドラインとして21 CFR 640.3 と 640.63 を使用)またはヒトへの使用が既に許可された製品の使用について含むことが望ましい。ウシ由来材料の試験とソーシング、およびブタ由来材料に関する特別検討事項については、第Ⅲ節で述べる。すべての生物学的原材料には、細菌性および真菌性の病原体、増殖可能および非増殖可能なマイコプラズマ、マイコバクテリアおよびウイルスなどの外来性病原体が存在しないことが望ましい。各自のプロセスに、生物学的原材料からの潜在的感染性汚染菌の除去や不活化が含まれる場合、そのプロセスをバリデートする。

##### 1. 血清

培養培地あるいはワクチンウイルスの安定化に用いるヒト血清アルブミンで使用されるウシ血清などのワクチン作製(細胞バンクおよびウイルスシードの作製を含む)で使用する血清を試験かつ保証する。ヒト血清アルブミンは、米国でヒトへの使用が認可された原料からのもの、あるいは適切なスクリーニングと試験を受けたドナー由来であることが望ましい(21 CFR 640.3 または 640.63)。ウシ血清は、細菌性および真菌性の病原体、マイコプラズマ、マイコバクテリア、およびウシウイルスなどの外来性病原体が存在しないことが望ましい(第Ⅳ節の A.2.f)。

さらに、確実に BSE のリスクを最小限に抑えるための適切な行動を起こすため、CBER に相談するとよい。

##### 2. トリプシン

ワクチン作製(細胞バンクおよびウイルスシードの作製を含む)で使用するトリプシンは、どの種から得たかを明確に同定する。ウシのトリプシンを使用する場合は、第Ⅳ節の A.2.f の「ウシ由来材料の試験およびソーシング」で定めた検討事項に適用する。ブタのトリプシンが使用される場合、第Ⅳ節の A.2.g の「ブタ由来試薬の試験」に記載する勧告に従って試験する。



**Guidance for Industry**  
**Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials**  
**Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases**

**3. アミノ酸**

成長培地あるいは作製に使用するアミノ酸のソースを記録する。また、確実に BSE のリスクを最小限に抑えるための適切な行動を起こすため、CBER に相談するとよい。

**4. その他の生物学的試薬**

起源となる種に適した成長培地で用いるトランスフェリン、インスリンまたはその他の増殖因子のような作製中に使用する別の生物学的試薬を管理かつ試験する。ヒト由来である場合、補助試薬は、米国で認可を受けた、または適切なスクリーニングと試験を受けたドナー由来であるかのいずれかであることが望ましい(該当する場合は、血液またはソースプラズマのドナーに匹敵する。CFR 640.3 または 640.63 参照)

21 CFR 640.15(c)に基づいて、ペニシリンをウイルスワクチンの製造基質に添加しなくてもよい。また、別のβラクタム系抗生物質は、作製した細胞培養物に加えない方がよい。

**E. 種々の製造段階での試験における検討事項**

ウイルスワクチンの各製造段階で検討する試験リストについては、附属書1を参照。

**1. 細胞バンク**

細胞バンクの適格性確認については、第Ⅲ節の B で述べる。

**2. 作製前の細胞**

細胞の同一性試験を、作製前に直接細胞に行ってもよい。

**3. 濾過前の回収または完成細胞**

通常、最も外来性病原体が見つかる可能性が高い段階が、各製品に対して最も大規模な外来性病原体試験を実施するとよい段階である。ウイルスワクチンの多くでは、濾過前の回収が最も集中する製造段階であり、少なくともその段階でプロセッシングが行われている。これらの理由から、この段階が製品に対して外来性病原体試験を行う最適な時であると思われる。

培養可能なマイコプラズマに関するウイルスまたはワクチンのバルク回収試験に加えて、21 CFR 610.30 で要求されるように、in vitro および in vivo での方法により、培養不可能なマイコプラズマ(および該当する場合は、スピロプラズマ)

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

ならびに外来性病原体でのウイルスまたはワクチンのバルク回収を試験することが望ましい。これには、血球吸着ウイルス試験も含まれる場合がある。製造工程でレトロウイルスの出現を促すことが可能である場合、RT 試験に基づいた PCR や感染性試験もまた、この段階で実施するように推奨されるかもしれない。適切である場合、ヒト結核菌の試験を一つ以上実施する。

MVS について記述したとおり(第Ⅲ節の C.1)、in vitro または in vivo での外来性病原体試験で使用するアッセイシステムがワクチンウイルスの複製を支持する可能性がある場合、および外来性病原体試験を干渉するレベルまでワクチンウイルスが複製した場合は、これら試験の実施前にワクチンウイルスを中和する必要があるかもしれない。中和が困難である場合は、第Ⅲ節の C.1 におけるその他の検討事項に適用することができる場合がある。

細胞が製造工程で生存する場合は(ワクチンウイルスにより溶解性感染が生じない場合など)、完了細胞に対しても外来性病原体試験を行う。

複数の回収を単一のワクチンロットに行う場合、潜在的に汚染した回収が汚染のない回収により希薄化されないようにするため、個々の回収に対して試験を行うことが望ましい。

#### 4. 対照細胞

対照細胞試験に関する勧告については、第Ⅱ節の B.3 と 4 で述べる。

#### 5. 濾過後の回収または最終バルク

濾過後の回収または最終バルクの細菌と真菌の滅菌試験を実施する。別の試験も、最終バルクの安全性、同一性、純度、力価および品質に関して適切であるかもしれない。適切となる試験は、製品により異なる。これらには、残存する細胞タンパク質および細胞の核酸のレベルに関する試験も含まれる。ワクチンを作製するために使用する細胞系が、ワクチンウイルス以外のウイルスを作製することが分かっている場合は、その製造工程でこれらのウイルスクリアランスを実施する。ウイルスクリアランスに関連するガイダンスは、ICH Q5A 文書から入手してもよい(参考文献2を参照)。残存細胞のクリアランスでの工程がバリデートされていない場合は、この段階で試験を行うことを推奨する。

#### 6. 最終容器入り製品

21 CFR 610.12 において、サブセクション(g)(4)(ii)に基づいて免除を受けた製

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

品を含むサブセクション(g)に記載した製品以外は、そのセクションに記載した特定試験により、バルクと最終容器入り製品が滅菌されていることを証明しなければならない。経口製品が上記の免除を受ける可能性があるが、これらの製品も、生物汚染度での細菌限界試験により評価することが望ましい(参考文献13)。21 CFR 610.11aに基づき、FDA が定めたリファレンスと比較しながら、各ロットの不活化インフルエンザワクチンの内毒素をアッセイしなければならない。その他の最終容器入り製品の内毒素レベルも評価する。さらに 21 CFR 610.11 に基づく外来性毒性汚染物質を検出する総合的安全性試験が、21 CFR 610.11(g)に記載しているものを除く最終容器入り製品に要求される。最終容器入り製品の安全性、同一性、純度、力価および品質を評価するため、その他の試験を実施する。これら試験は、個々の製品に応じて決定し、INK および BLA の申請書に記載する。

ダウンストリームプロセッシングが、クリアランス、製品の濃度や希釈を規定する場合、製品が最終容器に充填される段階は、特定の試験(外来性病原体)を実施する最適な段階ではないかもしれない。

#### IV. 品質管理試験方法に関する説明

##### A. 外来性病原体試験

細菌、真菌、培養可能および不可能なマイコプラズマとスピロプラズマ、マイコバクテリア、ウイルス、リケッチア、原虫、および可能であれば伝染性海綿状脳症(TSE)に関連する病原体などの外来性感染性病原体が存在しないことを保証するため、各企業が用いる出発物質の特性を評価する。汚染がないと見なされる物質に関しては、予め定めた特定量の物質に汚染がないとするレベルの感度で、アッセイを実施する。代わりに、特定のレベルまで汚染を除去することが分かっているバリデートされたプロセスを、汚染がないことを証明するために使用してもよい。細胞基質やウイルスシードに外来性病原体が存在することが分かっている場合は、自社の製造工程が、病原体を適切な安全限界内になるまで除去あるいは不活化する程に十分確実なものであることを証明する。ヒトに感染することが分かっている(ワクチンウイルス以外の)病原体および/または試験手順に適切な感度があるかがバリデートされていない病原体に、製品が暴露することを避ける。上述のような暴露を予防するため、自社では適切かつ十分な管理がなされていることを示す文書を作成することが望ましい。

本来、本文書で後に説明する多くの推奨試験は、21 CFR のパート 630 で公表されたものであるが、1996年(61 FR 40153)に規制が改訂された際に削除された。FDA は、有用となるかもしれない新たな試験を、製造業者が柔軟性をもって選択できるようにするために、多くの特異的試験を規制から削除した。提案されている各外来性病原体試験

## Guidance for Industry

### Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Starting Materials Used in the Production of Viral Vaccines for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases

で、推奨試験に匹敵する感度を示すデータにより正当性が評価されれば、世界保健機関(WHO)や欧州薬局方(EP)が推奨した代替方法を検討してもよい。試験プログラム全体の内容が正当化された時には、細胞バンクの溶解産物およびウイルスの回収を試験するための様々な接種の戦略は、基準に合ったものであると思われる。適切な外来性病原体試験は、細胞基質の起源およびその履歴など種々のファクターによって異なる。製造業者が適切な試験については、FDAに相談するように奨励している。適切な試験の選択で考慮に入れるべきファクターに関する詳細は、第Ⅱ節および第Ⅲ節を参照のこと。

#### 1. *In vivo* 試験

ウイルスワクチン開発における *in vivo* での外来性病原体試験には、成体マウスと哺乳マウスへの接種、および有精鶏卵への接種などがある。例えば、げっ歯類またはげっ歯類の細胞に暴露することによって、存在するげっ歯類のウイルスに暴露する可能性がある場合は、動物抗体産生試験を行ってもよい。また、種に特異的なウイルスを検出するため、別の種に対してこれらの試験を実施してもよい。例えば、該当する場合は、外来性病原体を検出するためにウサギやモルモットへの接種をしてもよい。

##### a. 成体マウス

この試験は、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、コクサッキーウイルス、フラビウイルスおよび狂犬病ウイルスなどの外来性ウイルスを検出する。

試験済物質を、最低でも 20 匹の体重が 15~20g の成体マウスの腹腔内に 0.5 mL および大脳内に 0.03 mL 接種する。そのマウスを、21 日間毎日観察する。試験後の最初の 24 時間以降に死亡した、あるいは病死したマウスを剖検し、巨視的観察によりウイルス感染の事実があるかどうかを試験する。その後、追加した少なくとも 5 匹のマウスの腹腔内および大脳内へ適切にホモジネートした組織を接種し、かつ各マウスを 21 日間毎日観察する。最初に接種したマウスの内、最低 80% およびその後接種したマウスの各グループの最低 80% が、健康な状態を維持し、観察期間を生存した場合、および試験を受けた物質の成分(すなわち該当する場合、ウイルスワクチン株)であることが分かっている病原体以外の感染性病原体やその他のウイルス感染が、どのマウスにも見られなかった場合のみ、その物質を使用してもよい。

細胞基質を評価するためにこの試験を使用する場合、細胞の溶解産物お