

proceeded rapidly. 2: TNF- α could induce intracellular changes by chance. According to this explanation, TNF- α molecules would bind with the TNF receptor, but only some of them would be able to induce intracellular change. If some TNF- α molecules successfully induce intracellular changes, then the cell death cascade would proceed rapidly. The more TNF- α molecules that are present around the cell, and/or the longer these TNF- α molecules attack the cell, the higher the probability of a successful attack, and it can be expected that more cells will die. According to both of these models, the cell death process would not proceed in the absence of TNF- α exposure; therefore, those cells that survived during TNF- α exposure would not be expected to die after the removal of TNF- α .

One of the Bcl-2 family proteins, Bid, was cleaved to tBid due to the cell death signal, and the tBid transferred the signal from the cytosol to the mitochondria (36). Exogenous treatment with tBid is known to induce cell death immediately (37), and thus reactions that delay signal transduction may occur at an earlier step than either Bid cleavage or mitochondrial changes.

As cell death reactions often occur in a rapid manner and because the timing of the onset of intracellular reactions varies among cells, precise temporal relationships between cellular events during cell death should be further analyzed at the single-cell level with high temporal resolution. Single-cell imaging analyses of early stages (e.g., receptor oligomerization and the recruitment of adaptor proteins) will help to elucidate the mechanism of the entire cell death process.

Acknowledgments

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Science Foundation; a Grant-in-Aid for Research on Advanced Medical Technology from the Ministry of Health, Labour, and Welfare; and a grant (MF-16) from the Organization for Pharmaceutical Safety and Research.

References

- 1 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312-1316.
- 2 Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of caspases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1387:17-31.
- 3 Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85:803-815.
- 4 Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signal complex. *Cell*. 1996;85:817-827.
- 5 Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*. 1997;16:2794-2804.
- 6 Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem*. 1998;273:4345-4349.
- 7 Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14486-14491.
- 8 Orth K, O'Rourke K, Salvesen GS, Dixit VM. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J Biol Chem*. 1996;271:20977-20980.
- 9 Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 1995;81:801-809.
- 10 Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-1312.
- 11 Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:63-67.
- 12 Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem*. 1999;274:17941-17945.
- 13 Shiozaki EN, Chai J, Shi Y. Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:4197-4202.
- 14 Tyas L, Brophy VA, Pope A, Rivett AJ, Tavare JM. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO reports*. 2000;1:266-270.
- 15 Rehm M, Dussmann H, Janicke RU, Tavare JM, Kogel D, Prehn JHM. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process: role of caspase-3. *J Biol Chem*. 2002;277: 24506-24514.
- 16 Luo KQ, Yu VC, Pu Y, Chang DC. Application of the fluorescence resonance energy transfer method for studying the dynamics of caspase-3 activation during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283:1054-1060.
- 17 Morgan MJ, Thorburn A. Measurement of caspase activity in individual cells reveals differences in the kinetics of caspase activation between cells. *Cell Death Differ*. 2001;8:38-43.
- 18 Tsien RY, Miyawaki A. Seeing the machinery of live cells. *Science*. 1998;280:1954-1955.
- 19 Miyawaki A, Sawano A, Kogure T. Lighting up cells: labeling proteins with fluorophores. *Nat Cell Biol*. 2003;S1-S7.
- 20 Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:509-544.
- 21 Erickson MG, Moon DL, Yue DT. DsRed as a potential FRET partner with CFP and GFP. *Biophys J*. 2003;85:599-611.
- 22 Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor

- /acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem J.* 2004;381:307-312.
- 23 Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kawanishi T. Simultaneous imaging of initiator/effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1693:101-110.
- 24 Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Sakurai H, Ohata H, Honda K, et al. Simultaneous real-time detection of initiator- and effector-caspase activation by double fluorescence resonance energy transfer analysis. *J Pharmacol Sci.* 2005;97:361-368.
- 25 Scaduto RC Jr, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J.* 1999;76:469-477.
- 26 Rehm M, Dussmann H, Prehn JHM. Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis. *J Cell Biol.* 2003;162:1031-1043.
- 27 Li X, Du L, Darzynkiewicz Z. During apoptosis of HL-60 and U-937 cells caspases are activated independently of dissipation of mitochondrial electrochemical potential. *Exp Cell Res.* 2000;257:290-297.
- 28 Krohn AJ, Wahlbrink T, Prehn JHM. Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 1999;19:7394-7404.
- 29 Heiskanen KM, Bhat MB, Wang H-W, Ma J, Nieminen A-L. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem.* 1999;274:5654-5658.
- 30 Ohnuki R, Nagasaki A, Kawasaki H, Baba T, Uyeda TQP, Taira K. Confirmation by FRET in individual living cells of the absence of significant amyloid β -mediated caspase 8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:14716-14721.
- 31 Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, Miura M. Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J Cell Biol.* 2003;160:235-243.
- 32 Luo KQ, Yu VC, Pu Y, Chang DC. Measuring dynamics of caspase-8 activation in a single living HeLa cell during TNF α -induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:217-222.
- 33 Lim MLR, Lum M-G, Hansen TM, Roucou X, Nagley P. On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci.* 2002;9:488-506.
- 34 Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2000;2:156-162.
- 35 Goldstein JC, Munoz-Pinedo C, Ricci J-E, Adams SR, Kelekar A, Schuler M, et al. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2005;12:453-462.
- 36 Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94:481-490.
- 37 Madesh M, Antonsson B, Srinivasula SM, Alnemri ES, Hajnóczky G. Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem.* 2002;277:5651-5659.

概論 細胞基材の品質・安全性評価

1. はじめに

バイオテクノロジーを応用して生産される医薬品(以下バイオ医薬品)には、

- 1) 組換え DNA 技術あるいは細胞培養技術を応用して製造され、組換え DNA 技術応用医薬品(以下組換え医薬品)あるいは細胞培養技術応用医薬品(以下細胞培養医薬品)として臨床に使用されているタンパク質性医薬品
- 2) 遺伝子治療用医薬品
- 3) 細胞・組織加工医薬品等
- 4) トランスジェニック/クローン動物によるタンパク質性医薬品
- 5) トランスジェニック動物由来細胞・組織利用医薬品

などがある。これらのうち、組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品といわれるタンパク質性医薬品が、最も早くから実用化されているバイオ医薬品であり、わが国でもすでに 70 品目を越える製品が臨床に使用されている。

本稿では、上記のバイオ医薬品のうち、実用化が最も進み、特性解析、品質・安全性試験や評価のあり方についても多くの知見や経験の蓄積がある組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品における医薬品製造素材としての「細胞基材」の特性解析、品質・安全性評価について、ICH ガイドラインに盛り込まれている事項を中心に概説する。

2. 組換え医薬品及び細胞培養医薬品の品質、安全性等確保に必要な一般的留意事項

本題に入る前に、現時点で、組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質、安全性等を確保するために必要と考えられる一般的留意事項について簡単にふれておく。その要点は以下のように整理される。

- 1) 採用した製造方法についてその詳細を明らかにし、それが一定の目的物質を製造する上で適正なものであることを立証し、かつ、そうした製造方法の恒常性を維持していくことを保証する必要がある。このことは、遺伝子操作、生きた細胞の加工、細胞の大量培養といった複雑でかつ変動要因の多い人工的な製造過程を経て生産され、またそれ自体複雑で変化しやすい高分子タンパク質(組換え医薬品及び細胞培養医薬品)の品質、有効性、安全性を確保する上できわめて重要な意味を持っている。
- 2) 組換え医薬品や細胞培養医薬品は人工的シナリオで得られる人工的産物で、かつ変化しやすい高分子タンパク質であるので、生産物の構造、特性や品質について物理的・化学的方法、免疫学的方法あるいは生物学的方法などを駆使して徹底的に解析する必要がある。また、目的成分の物質構造面における不可避的な不均一性問題に適切に対応する必要がある。
- 3) 最終目的物質に混入してくる可能性がある有害因子、あるいは製造工程由来不純物や目的物質由来不純物について特に注意を払う必要がある。プロセス評価や工程内管理試験の合

理的導入を図る必要がある。

- 4) 組換え医薬品や細胞培養医薬品の原薬及び製剤及び必要に応じて中間体について適切な安定性試験及び評価を行う。
- 5) 組換え医薬品や細胞培養医薬品は、例えばヒト型のホルモンや酵素、サイトカイン、モノクローナル抗体、ワクチンなどといった、きわめて特異な化学的あるいは生物学的特徴を有するものであるから、毒性試験などの非臨床動物試験を実施するにあたって、従来の低分子の有機合成医薬品に用いられたようなアプローチをとることは必ずしも適切ではなく、その製品の特性や臨床上的使用目的を考慮しながらケース・バイ・ケースの原則で対処する必要がある。その際、目的とする製品の生化学、生理学あるいは薬理学的作用を十分に把握し、生物学的応答性などに関して適切な試験動物を選択することが重要である。
- 6) 臨床試験の目的や実施方法自体は他の医薬品の場合と変わるところはないが、組換え医薬品や細胞培養医薬品の場合は、それ自体がタンパク質であり、また、不純物の多くが高分子であるので、目的有効成分や不純物が患者になんらかの免疫応答を引き起こし、結果的にその有効性、安全性に影響を及ぼす可能性に関して特に留意する必要がある。
- 7) 品質の恒常性を保証するための適切な規格及び試験方法を確立する必要がある。その際、製品の分子特性・品質解析・安定性など製品レベルでの他の要素、また、非臨床・臨床試験における有効性・安全性評価結果との関係、採用する分析法の感度・精度その他の能力などの要素、さらには原材料における品質管理・製造工程の評価/検証・工程内管理/工程内管理試験など製造工程レベルでの要素との相互補完的組合せ、などを勘案して適切な規格及び試験方法を確立する必要がある。
- 8) 開発段階あるいは市販後に製法変更した場合

の是非の評価は、新旧製品において安全性、有効性に差異があるか否かによって判断する(コンパラビリティ)。一般には安全性、有効性と品質特性の相関に関する情報が存在しているので、まず、品質特性における新旧製品の差異を検討し、その差異が安全性、有効性に影響を及ぼさないと判断できる情報が実験、経験あるいは文献等から得られれば新旧製品は同等・同質すなわち製法変更は是とする。新旧製品の品質特性のコンパラビリティのみで結論が得られない場合は、必要なサイズの新臨床さらには臨床試験の実施を含めた検討を行い、安全性、有効性に影響を及ぼすか否かを指標に製法変更の是非を判断する。なお、新旧製品が同等・同質ではなくとも新製品における品質・安全性等の向上がみられる場合は、当然奨励する。

- 9) 個々の組換え医薬品や細胞培養医薬品に関して、最も適切な非臨床試験及び臨床試験は、目的物質の製造方法、成分の種類・特性、臨床適用上の対象とする効能・効果、臨床用量、臨床投与経路、投与頻度、投与対象患者などに応じて実施することにある。

3. 製造方法において、その詳細を明確にし、その恒常性を維持すべき主な項目

上で述べたように、製品の品質・安全性の確保とその恒常性を図るためには、その方策の一環として、まず、それぞれのケースごとに、採用された製造方法の詳細を明確にしてその科学的妥当性を示すとともに、その恒常性の維持を図る必要がある。

承認申請時に、製造方法において、詳細と妥当性を明確にし、恒常性を維持すべき主な項目例を次に示す。

- 1) 細胞基材の起源、履歴
- 2) 細胞基材の調製過程における親細胞株の選択や細胞加工(処理)操作

- 3) マスター・セル・バンク (MCB) の出発素材としての細胞基材：クローン(種)細胞株の樹立(組換え医薬品の場合は遺伝子操作の妥当性を含む)
 - 4) セル・バンク・システムの構築法，バンクを構成する細胞の調製法，保存管理法や更新方法
 - 5) セル・バンクの特性解析及び生物学的純度を含む品質評価
 - 6) 目的タンパク質を恒常的に生産できる能力に関する細胞基材の安定性評価
 - 7) 細胞基材の保存中の安定性評価
 - 8) 細胞培養方法
 - 9) 精製方法
- などである。また、
- 10) 製造工程全体にわたって、プロセス評価試験による、細胞由来の目的外タンパク質やDNAなどの製法由来不純物の除去状況や効率、ウイルス等有害因子の不活化・除去に関する工程の妥当性評価を実施する必要性

さらに、

- 11) 製品の品質の恒常性を図るために適切な工程内品質管理試験を設定する必要性
などが考えられる。さらに承認時には、
- 12) フルスケールでの製造工程の妥当性の検証のためのバリデーションやGMPの設定、恒常性を常にモニターするために、製品のみならず、原材料の品質、機械や装置の作動状況にかかわる工程内管理試験
などが実施されていることになる。

これらのうち、1)から7)が細胞基材に直接にかかわる課題である。これに関連する詳細な検討事項については、現在のわが国のガイドラインやICH国際調和ガイドライン及び関連記事などに記載されているが、ここでは紙数の関係で主な要点だけを述べることにする。

なお、開発段階で製造方法の変更を行い、旧製法で得た製品のデータを申請資料として利用したい場合や承認後に製造方法の変更を行いたい場合には、前項8)で述べたように製法変更前後の製

品に関するコンパラビリティ試験を実施し、新旧製品の同等性/同質性を立証する必要がある。細胞基材が関連する場面での変更にあたっては、経緯、背景を明らかにするとともに、ケースに応じて、1)から12)の関係部分に関する検討とデータの整備・提出が必要である。

4. 医薬品製造素材としての細胞基材

組換え医薬品や細胞培養医薬品の製造素材としての「細胞基材」とは、微生物細胞あるいはヒト又は動物由来の細胞株で、通常、セル・バンク・システムを持ち、ヒトを対象に*in vivo*又は*ex vivo*で投与される医薬品を生産する能力を有するものである。細胞株の起源となる微生物には、細菌、真菌、酵母、及びその他の単細胞生物が含まれる。細胞株の起源となる動物には、すべての後生動物が含まれる。また、細胞株の寿命の面では、*in vitro*で細胞寿命を有さない連続継代性細胞株、及び細胞寿命を有する正常二倍体細胞のいずれもが含まれる。なお、組換え医薬品や細胞培養医薬品に実例はないが、ある種のウイルスワクチンのようなものでは、動物組織又は器官から直接得られる初代培養細胞を用いて製造されることがある。初代培養細胞の場合にはバンク化された細胞基材のように使用前に細胞の特性を詳細に解析することはできず、また、その生産物を得るのに十分な処理工程(例えば、精製工程)を経ない場合が多い。このような特殊な細胞基材については、その特殊性を加味した対応が必要である。

組換え医薬品や細胞培養医薬品を製造するためには、遺伝子組換え技術、細胞工学技術、あるいは細胞分離・培養技術といったバイオテクノロジーを駆使して、目的とする有用タンパク質生産性と増殖性に優れた細胞株を医薬品製造素材、すなわち「細胞基材」として得ることがなによりも肝要である。組換えDNA技術応用医薬品の場合、

「細胞基材」としてまず樹立、調製されるものは、目的の遺伝子配列が導入された形質転換細胞であり、さらに、単一の前駆細胞からクローニングされたものである。非組換え医薬品及び非組換えワクチンの場合のそれは、MCB調製用として最終的に選出され、それ以上の育種操作を加えない段階となった細胞である。また、最近ほとんど例がないが、ハイブリドーマ由来の医薬品の場合、「細胞基材」としてまず樹立、調製されるものは、親細胞である骨髄腫細胞株と他方の親細胞(例えば、感作脾臓細胞)との融合により得られたハイブリドーマ細胞株である。一方、モノクローナル抗体の製造に際して、最近の常法である細胞基材の調製段階で遺伝子組換え技術を応用する場合には、それ以降に得られた「細胞基材」は組換え医薬品製造素材としての取り扱いをするのが合理的であると思われる。

得られた細胞株はバンク化し、その特性解析、微生物汚染や他の細胞混入否定を含めた品質評価を綿密に行い、その医薬品製造素材としての適格性を立証するとともに、適切な維持管理を行う必要がある。

さらに、細胞から目的タンパク質を大量に製造するための発酵あるいは細胞大量培養に際して、安定でかつ安全な製造が行われるものであることを保証する必要がある。

4.1 細胞基材の品質、安全性試験や評価のあり方に関連するガイドライン

細胞基材の品質、安全性試験や評価のあり方に関連するICHガイドラインは3種類存在する。すなわち、細胞基材に関するガイドライン(Q5D)、培養中の細胞における遺伝子の安定性に関するガイドライン(Q5B)、ウイルス安全性評価に関するガイドライン(Q5A)である。また、WHOでも、対応するICHガイドラインと整合性を図りつつ、1998年に細胞基材に関するガイドラインを公表している。最近、WHOガイドラインについては改訂版

の作成が進められており、終局を迎えている。

「細胞基材に関するICHガイドライン」は、組換え医薬品や細胞培養医薬品の製造に用いられるヒト、動物及び微生物由来の細胞株の調製、並びにセル・バンクの調製及び特性解析が適切に実施されるよう一般的なガイダンスを提供することを目的とし、これらの医薬品の承認申請に際して、記載すべきデータや情報についての勧告が示されている。その背景には、“細胞基材の特性あるいは細胞基材に関連する事項が、その生産物である組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質及び安全性に影響を与える可能性がある”ことや、“これらの医薬品の品質管理を効果的に行うために細胞基材の取扱いに関するすべての局面において適切な管理が必要である”との認識がある。その主な項目は、

- 1) 細胞の起源、由来及び履歴
- 2) 細胞基材の調製
- 3) セル・バンク・システム
- 4) セル・バンク化の手法
- 5) セル・バンクの特性解析
- 6) セル・バンクの純度試験
- 7) 細胞基材の安定性

8) 核型分析及び造腫瘍性試験

などである。初代培養細胞基材を使用する場合には、

- 1) 初代培養細胞基材の調製に用いた起源としての組織(器官)及びその他動物由来の原材料
- 2) 初代培養細胞基材の調製
- 3) 医薬品の安全性を保証する目的で初代培養細胞基材について実施する試験

などである。

「遺伝子の安定性」に関するICHガイドライン(Q5B)は、組換えDNAタンパク質の製造に用いる細胞中の遺伝子発現構成体(目的タンパク質をコードする遺伝子暗号塩基配列を含む発現ベクター)の解析に関する指針を提供し、これらにより組換え医薬品の品質確保及び生産の恒常性を図る一環とすることを目的としている。すなわち、

- 1) 組換え医薬品の生産に用いる遺伝子発現構成

体の構築と解析

- 2) MCB の出発素材としての組換え体クローン細胞株の樹立
 - 3) セル・バンク・システムの確立とバンクを構成する細胞中における遺伝子発現構成体の解析
 - 4) 細胞を大量培養した後の細胞(医薬品製造のための *in vitro* 細胞齢の上限の細胞)中での遺伝子発現構成体の構造・状態を解析し、大量培養中に遺伝子発現構成体が安定に維持されていること、すなわち目的遺伝子暗号塩基配列が正しく発現されていることの立証
- などに関する指針を示している。

「ウイルス安全性」に関する ICH ガイドライン(Q5A)は、ヒトや動物(ほ乳類、鳥類、昆虫類)由来の特性解析がなされた細胞株を用いて製造される組換え医薬品や細胞培養医薬品のウイルス安全性に係わる試験及び評価のあり方に関するものである。その目的は、ウイルス試験及びウイルスクリアランスの評価に必要な試験並びにそれらをどのようにデザインすればよいかについての方策を関係付け、包括的に示すことである。具体的には、

- ① 細胞レベルでのウイルス安全性評価試験のあり方
- ② 細胞培養終了後でのウイルス試験のあり方
- ③ 未精製/未加工バルクでのウイルス試験のあり方
- ④ 精製過程における不活化・除去等のウイルスクリアランスに関する評価試験のあり方
- ⑤ 精製目的産物でのウイルス試験のあり方

などに関する指針を提示している。

これらのガイドラインは、「細胞基材」の品質・安全性に関わるさまざまな角度からの指針を示しており、相補い合いながら活用すべきものと考えられる。

本稿では、主にこれらのガイドラインの細胞基材に関連する部分を参照しながら、組換え医薬品や細胞培養医薬品の製造に用いられる細胞基材の品質、安全性試験や評価のあり方について概説する。

4.2 細胞基材の起源、履歴に関する情報とその妥当性

組換え医薬品及び細胞培養医薬品の製造に用いられる細胞基材の履歴及びその妥当性を記載した資料を提出することは、医薬品の品質及び安全性を保証するための総合評価を効率的に行うのに役立つという意味で重要である。細胞基材が何らかの親細胞株から全面的もしくは部分的に由来したものであるについては、当該親細胞株の履歴及びその妥当性を記載した資料も重要である。細胞基材の研究開発段階で起きた事象に関する記述も、当該細胞基材を製造用細胞として使用する場合の安全性を判断する上で、重要となる。こうした細胞履歴に関する情報が欠如あるいは不足していても、それだけの理由で医薬品が承認されないということにはならない。しかし、細胞基材の履歴に関する情報の欠如や不足の程度に応じて、細胞基材の特性を解析するための他の方法への依存度が高くなることになる。

細胞基材のもとになる細胞がどこで樹立され、どこから供給されたか(例えば、研究所又は細胞保存供給機関など)について明らかにし、また、文献的に適切な参考事項があればこれらを引用記載しておくべきである。これらの情報については、細胞の起源となった研究所から直接得たものが望ましいが、できない場合は文献から得た情報を利用してもよい。

細胞基材の起源、由来及び履歴に関する情報提供とその妥当性評価に関する留意事項を以下に示す。

- 1) ヒト細胞株の場合、その起源であるドナーについて、細胞が由来した組織又は器官、ドナーの人種及び出生地や生育した地域、年齢、性別、並びに一般的な健康状態などを明らかにする必要がある。ドナーの健康診断結果や病歴に関する情報があれば、ドナーについて行われた病原体に関する試験結果とともに、明らかにすべきである。特に、ヒト正常二倍体線維芽細胞の場合、ドナーの年齢は細胞株の *in*

in vitro 細胞寿命に影響するので、可能な範囲で情報を入手し、明らかにする必要がある。動物細胞株の場合、その起源に関連して記載すべき事項には、細胞が由来した動物の種、系統、繁殖条件、組織又は器官、出生地や生育した地域、年齢及び性別、病原体に関する試験結果、並びに一般的な健康状態が含まれる。

- 2) 微生物細胞の場合、細胞基材の由来となる微生物の種及び系統、並びに当該微生物において知られている遺伝型及び表現型に関する特性を明らかにする必要がある。また、病原性、毒素産生性、及びその他のバイオハザードに関わる情報があれば、それらについても明記しておくべきである。
- 3) 細胞の培養歴を記載した文書を提出すべきである。細胞を分離する際に最初に用いられた方法はもとより、*in vitro* での細胞培養、その他細胞株樹立に用いられたあらゆる操作(例えば、物理的、化学的又は生物学的手法、あるいは遺伝子導入)について明らかにする必要がある。遺伝学的操作や細胞の選択を行った場合には、そのすべてを明らかにする必要がある。また、細胞の同定、特性、並びに内因性及び外来性因子に関する試験結果について得た情報は、すべて提供すべきである。
- 4) 後生動物由来の連続継代性細胞株の場合、通常、その培養期間は、細胞数倍加レベル(PDL)、特定可能な希釈倍率で行われた継代数、又は培養日数のいずれかの値で示す。*In vitro* で細胞寿命を有する正常二倍体細胞株の場合、研究開発及び医薬品製造のすべての段階を通して、正確なPDLを測定しておくことが重要である。微生物細胞の場合、細胞株として樹立した後の継代数を示すこと。
- 5) 細胞基材の調製に関して、細胞が感染性物質に曝露される可能性がある操作過程について、詳細な考察を加えておく必要がある。培地の構成成分についても、明らかにする必要がある。

る。特に、血清、酵素、加水分解物、又はその他の生細胞等、ヒト又は動物由来の材料に細胞が曝露されることがあったのか、あったとすればどのようにかなどに関する情報を、明らかにすべきである。その資料には、それら生体成分の起源、調製及び管理方法、各種試験結果、並びに品質保証に関する情報を含む必要がある。以上の点について記載された適切な文献がある場合には、それを引用してもよい。こうした情報から、上記の様々なソースに由来する外来性因子がどのような経路から迷入する可能性があるのかについて、詳細に解析することが可能となる。また、これらの情報は、当該医薬品におけるリスク/ベネフィットの評価の一部ともなる。

4.3 細胞基材の調製過程における親細胞株の選択

細胞基材の調製過程における極めて重要な事項の1つとして、適切な親細胞の選択に関する事項が挙げられる。例えば、組換え医薬品の場合、「親細胞株」とは、通常、目的の遺伝子が導入され形質転換される前の宿主細胞株のことである。こうした「親細胞株」についての情報が豊富であればあるほど、これに由来する細胞基材の特性解析、品質評価の参考にできる度合いが高くなる。特に、「親細胞株」の特性が十分に明らかにされ、「親細胞のセル・バンク」として存在し、それがMCB調製に用いられるというケースでは、細胞特性や品質に関する一連の情報がすでに得られているという点で、MCBの細胞特性や品質評価がより効率的にかつ適正に実施できることになる。ハイブリドーマ類の例にみられるごとく、複数の細胞基材を調製する際に、同一の骨髓腫細胞株を一方の親細胞として用いるような場合には、親細胞(骨髓腫細胞株)のセル・バンクを用いることには利点がある。しかし、「親細胞のセル・バンク

化」が必須の要件ということではなく、また、必ずしも一般に行われている訳でもない。

4.4 細胞基材調製過程における特別な細胞加工(処理)操作

細胞基材を調製していく過程においては、細胞に目的の特性を付与するために、特別な細胞加工(処理)操作を行うことがある。これらの加工(処理)操作は1種類であることもそれ以上であることもある。細胞加工(処理)操作の例としては、細胞融合、形質導入、細胞の選択、コロニー分離、クローニング、遺伝子増幅、特定の培養環境や培地への適応化などが挙げられる。細胞基材の開発過程でどのような方法が用いられたかに関する情報は、細胞基材の履歴を明確に理解するために役立つ。

4.5 医薬品製造の各段階を構成する細胞基材

組換え医薬品や細胞培養医薬品の製造素材としての「細胞基材」とは、医薬品を生産する能力を有する細胞と定義されている。したがって組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品の製造過程に関係する細胞は、いずれの過程であるかを問わず「細胞基材」と総称される。そして「細胞基材」は医薬品製造のさまざまな段階に登場する。しかし、実際には、各医薬品製造段階での「細胞基材」の位置づけや果たしている役割は様々ではない。各医薬品製造段階での「細胞基材」の位置づけや役割は、医薬品製造が全体として最も合理的に効率よく、かつ安定で恒常的な医薬品製造を可能にできるよう設定されている。したがって、特性・品質や安全性評価の対象としてみた場合の「細胞基材」も各医薬品製造段階での位置づけや役割に応じた適切で合理的な取り扱いが必要である。一般的に、「4つの段階の細胞基材」が考えられる。すなわち、

- 1) クローン細胞株又は種細胞株
- 2) MCB

3) ワーキング・セル・バンク(WCB)

4) 医薬品製造のための *in vitro* 細胞齢の上限の細胞(CAL)

である。

「種細胞株」とは、文字どおりその後の“各段階の「細胞基材」の種になる「細胞基材」として樹立したものである。この種細胞を必要最小限度増やして-70℃以下で保存し、生産のもととなる細胞銀行としたのが、マスター・セル・バンク：MCBである。この2-3アンプルをさらに必要最小限度増やしてもう一度細胞銀行を調製する。これが、ワーキング・セル・バンク：WCBである。このバンクから2-3アンプル使用して、実際の医薬品生産のための培養段階に入ることになる。

「医薬品製造のための *in vitro* 細胞齢の上限の細胞(CAL)」は、医薬品製造条件下で、細胞が変異せず安定で一定の目的産物を生産することを検証しておくことが組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質の恒常性確保上きわめて重要であるとの認識に基づき、試験、評価対象とされる「細胞基材」である。このCALは、医薬品製造のためにどこまでの期間あるいは細胞数倍加レベルまで細胞を増殖培養するのか、できるのか、すなわち細胞齢の上限について、製造メーカーが、パイロットスケールあるいはフルスケールで、医薬品製造条件として提案する *in vitro* 細胞齢まで、あるいはそれ以上に増殖させた製造用細胞から得たデータに基づき決定することになっている。そうした上限にある細胞において、いろいろな細胞特性、目的産物をコードする遺伝子の塩基配列、あるいは生産物であるタンパク質の特性などを指標として MCB(WCB)の細胞特性との比較により安定性を明らかにする必要があるとされているステージにある「細胞基材」である。

4.6 MCBの出発素材としての細胞基材： クローン(種)細胞株の樹立

「細胞基材」のうち、組換え医薬品や細胞培養

医薬品の製造段階における最も初期の段階に該当するものは、医薬品製造用の細胞株として樹立された段階のものである。この細胞基材は、一般には、MCBの出発素材としてのクローン細胞株や種細胞株にあたる。組換え医薬品製造用のクローン細胞株は、目的の遺伝子配列が導入された形質転換細胞であり、さらに、単一の前駆細胞からクローニングされたものである。非組換え医薬品及び非組換えワクチン製造用の種細胞株は、MCB調製用として最終的に選び出され、それ以上の育種操作を加えない段階となった細胞である。また、ハイブリドーマ由来の医薬品の場合、親細胞である骨髓腫細胞株と他方の親細胞(例えば、感作脾臓細胞)との融合により得られたハイブリドーマ細胞株がクローン細胞株である。なお、ヒト正常二倍体線維芽細胞のようなある種の細胞基材では、バンク化する前に、厳密な育種操作又はクローニングを実施する必要がない場合もある。

いずれにしても、

- 1) 細胞の起源、由来、特性
 - 2) 細胞の培養歴、培養方法
 - 3) セル・バンクのもととなる細胞株(種細胞株)の樹立方法、関連情報
- などについて明らかにすることが重要である。

4.7 組換え医薬品製造用のクローン株樹立のための遺伝子操作の妥当性

組換え医薬品製造用の細胞基材調製にあたっては、一般的な細胞基材調製に関する情報に加え、特に適用した遺伝子操作について明らかにし、その妥当性を示す必要がある。すなわち、

- ① 目的発現タンパク質をコードする遺伝子(塩基配列)の起源(入手方法)と構造
- ② 遺伝子発現構成体(目的タンパク質をコードする遺伝子暗号塩基配列を含む発現ベクター)を構成する諸要素(例えば複製開始点、抗生物質耐性遺伝子、プロモーター、エン

ハンサーなど)の由来と機能及び構造

- ③ 目的タンパク質の発現方法に関する記述
- ④ 遺伝子発現構成体を構築する手順と構造
- ⑤ 宿主細胞の由来や特性と選択理由
- ⑥ 遺伝子発現構成体を宿主細胞に入れる方法
- ⑦ 遺伝子発現構成体を増幅する方法
- ⑧ クローン細胞株の選択に用いた評価基準と樹立方法

などを含む遺伝子操作の妥当性を明らかにすることが重要である。

4.8 セル・バンク・システム

組換え医薬品及び細胞培養医薬品を製造する上で、段階的に継代培養された細胞基材を使用することの最も有利な点の1つは、特性解析された同一の出発素材、すなわちセル・バンクを、全製造ロットに使用できることである。MCBからWCBを調製するという2段階方式のセル・バンクの考え方は、医薬品製造を継続的に行う上で、細胞基材を供給するための最も実的な方法として、一般的に受け入れられている。医薬品製造に用いられるセル・バンクの予想使用頻度、セル・バンクの予想更新頻度、及びセル・バンクの適格性に関する評価基準などを含め、セル・バンクの細胞を継続的に医薬品製造に供給するための長期的、総合的方策を明らかにする必要がある。

初代のMCBは、通常、出発素材としてのクローン(種)細胞から直接調製されるか、当該クローン(種)細胞から予備的に作られたセル・バンクをもとに調製される。ただし、*in vitro*で細胞寿命を有する正常二倍体細胞、又は技術的な要因によってクローニングが実質的にできない細胞の例のように、細胞の種類や状況によっては、クローン細胞からセル・バンクを調製する必要はない。また、クローニングはされていないが、すでに十分均一であり、製造目的に叶う細胞集団の場合も、クローン細胞からセル・バンクを調製する必要はない。

WCBは、容器1本又はそれ以上の数のMCBに由来するものである。医薬品製造のための細胞大量培養工程に用いられる細胞の直接の供給源として使用されるのは、通常、WCBである。WCBの更新は、必要に応じてMCBから行う。新たに調製されたWCBについては、特性解析や試験を行うことによって、その適格性を適切に確認する必要がある。

MCBとWCBとは、例えば、調製時の培養条件や培地成分が異なるなど、互いに相異なる点があり得ることに留意すべきである。同様に、MCB及びWCBの調製に用いられる培養条件が、実生産工程での条件と異なる場合もある。重要な点は、特性解析されたセル・バンクが一定の使われ方することによって、一定品質の医薬品が得られるということである。

WCBを調製せずに、MCBのみを使用する1段階方式のバンク・システムを採用することもあり得る。例えば、目的の医薬品を製造するために必要な各年あたりのセル・バンクの使用本数が比較的少ない場合などはそうした方式がむしろ合理的であるかも知れない。

微生物発現系においては、セル・バンクの更新にあたって、形質転換を改めて行って、新たなセル・バンクを調製する場合がある。この方法は、新規の形質転換ごとに、あらかじめ綿密に試験してある宿主セル・バンク及びプラスミド・バンクを使用すること、並びに形質転換して得られたセル・バンクごとに改めて試験を実施することが前提となる。こうして得られたセル・バンクは、MCBとみなすことができ、医薬品製造用細胞基材の出発素材として用いられる。宿主セル・バンク及びプラスミド・バンク並びにMCBは、適切な保存方法により維持する。この際、宿主細胞、組換えDNA分子(例えば、プラスミド)、形質転換及びセル・バンク調製方法、並びに特性解析の結果に関する情報を提示する必要がある。

(1) セル・バンクの調製に際しての留意事項

セル・バンクを調製するにあたっての主な留意点を以下に列挙した。

- 1) 細胞基材(又はセル・バンク)を取り扱う上で最重要留意事項の1つは、汚染された細胞基材(又はセル・バンク)が医薬品製造に使用されないようにすることである。これは、汚染によりセル・バンクが使用不能となり、期待通りに製品が得られない事態や、セル・バンクを改めて調製せざるを得なくなった結果、開発時間が無駄に費やされる事態を避けるためである。セル・バンクで起こる可能性がある汚染すべてを検出できるような試験方法はないので、細胞をバンク化する過程で汚染回避を旨とする方策を講じることで、汚染という事態が発生しないことを合理的に保証し、細胞基材として信頼性が高いものとするのが肝要である。
- 2) 採用したバンク・システムの種類、セル・バンクのサイズ、用いる容器(バイアル、アンブル、その他の適当な容器など)及びその密封方法、凍結保護剤や培地を含むセル・バンクの調製方法、並びに凍結に際しての条件や保存条件について明らかにし、それぞれの妥当性を評価しておく。
- 3) 微生物汚染や同一室内で使用される他の細胞との交叉汚染を回避するための方法、並びに各セル・バンクを構成する容器について事後の追跡調査をするための方策を明らかにしておく。この方策には、その文書化システムに関する記載や、保存容器のラベルに記された情報が保存のための操作、保存中又は解凍作業の際に消失することのないようにしたラベリングシステムなども含まれている必要がある。
- 4) 細胞のバンク化に使用した手法について明らかにすべきである。一般的に、細胞をバンク化するには、バンクとして必要な容器本数を十分に充たす細胞プールが得られるまで、順次、培養容器の本数を増やしたり、又は培

養スケールを拡大して培養する。バンク化の際の培養を複数の培養容器で行う場合、バンクを構成する各保存容器の内容が均一であることを保証するためには、各容器に分注する前に、すべての培養容器の培養液からの細胞を合わせて、1つの細胞プールとすべきである。

- 5) この単一の(保存用培地に懸濁されている)細胞プールから細胞を滅菌済の容器に分注し、密栓後、適当な条件下で保存する。例えば、凍結保護剤を含む培養液中の動物細胞は、密栓容器中において、特定の、かつコントロールされた条件のもとで凍結され、その後、液体窒素の気相又は液相、あるいはそれと同等の超低温下で保存される。用いる生物種によっては他の保存方法が適している場合もあるが、その方法は、細胞をもとに戻した際に一定レベルの細胞生存率を保持しており、それによる医薬品製造が恒常的かつ適切に遂行できるものであるべきである。
- 6) 医薬品製造を継続的にを行い、かつ中断されることのないようにするためには、セル・バンクが使用不能となるような危機的な状況を回避するための対策を周到に講じておくべきである。このような状況の例としては、火災、停電、人的過失がある。こうした状況に対する予防措置について明らかにしておくべきである。例としては、複数の冷凍庫でのセル・バンクの重複保存、予備電源や液体窒素をセル・バンク保存ユニットへ自動供給するシステムの使用、MCBやWCBの遠隔施設での分割保存、MCBの更新などが挙げられる。
- 7) 医薬品製造にあたって、その間、細胞がどれだけの *in vitro* 細胞齢を経たかについて算出する際の起点は、その製造に使用するMCBの解凍時とすべきである。正常二倍体細胞株の場合、*in vitro* の細胞寿命はPDLで示すべきである。正常二倍体細胞株の場合、細胞が増殖しなくなるPDLを確認しておくべきである。

(2) セル・バンクの特性解析及び品質評価に際しての一般的留意事項

バンク化された細胞基材の特性解析及び品質評価試験は、組換え医薬品及び細胞培養医薬品の品質確保を図る上で必須の要素である。MCBの特性解析及び品質評価試験により、細胞基材への他の細胞株の混入、外来性の有害因子及び内在性因子やその他の混入物質(例えば、宿主由来の毒素や抗生物質)の有無について評価することが可能になる。この試験が目指すのは、製造に用いられる細胞基材の特性を明らかにすること、純度を確立すること、細胞基材が医薬品製造に適切であることを確認することである。造腫瘍性試験や核型分析のような試験を追加することが適切な場合もある。個々の細胞基材における試験項目は、当該細胞の生物学的性質(例えば、栄養要求性)、培養履歴(ヒトや動物由来の試薬の使用を含む)、及び試験の実施可能性によって変わる。細胞基材の特性解析及び品質評価をどの程度行っておくかが、後の製造段階で必要となるルーチン試験の種類や程度に影響する。MCBについては、調製するたびに細胞の特性解析試験及び純度試験を実施する必要がある。また、医薬品製造のための培養期間中の細胞の安定性試験は、承認申請品目ごとに1回実施すべきである。さらに、WCBを更新した場合には、その都度、純度試験及び一部の特性解析試験を実施すべきである。

セル・バンクのウイルス安全性面からみた適格性評価に関しては、本書第2章を参考にすること。また、「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イルス安全性評価」(ICH Q5Aガイドライン：平成12年2月22日付 医薬審第329号 厚生省医薬安全局審査管理課長通知)を参考にすること。

遺伝子発現構成体を含む組換え体細胞の場合は、「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」(ICH Q5Bガイドライン：平成10年1月6日付 医薬審

第3号 厚生省医薬安全局審査管理課長通知)を、塩基配列及びアミノ酸配列解析のガイダンスとして参照すること。非組換え体の細胞株においても、目的タンパク質をコードする遺伝子配列がすでに明らかにされている場合には、同様の方法により塩基配列を解析すれば、有用な情報となる。しかし、関連する遺伝子群から発現するタンパク質ファミリー、微生物ワクチン抗原、ハイブリドーマから得たモノクローナル抗体のような複雑な構造を持つタンパク質の場合、遺伝子配列の解析は、必ずしも必要とは考えられない。

しかるべき理由があれば、MCBの代わりにWCBで特性解析及び品質評価を行ってもよい。

(3) セル・バンクの特性解析試験

バンク化された細胞の特性を解析するためには、特有の表現型や遺伝型などを指標にした適切な試験を実施すべきである。しかし、実施可能な試験をすべて行う必要があるという訳ではない。細胞特性解析試験は、一般に、まずMCBについて実施するが、前項でも述べたように、通常、各WCBにおいても一部の特性確認試験を実施する必要がある。

基底層に接着して増殖するヒト又は動物細胞株の場合、形態的解析が、他の試験と合わせて、有効な特性解析手段となる。また、細胞種の起源を確認するには、ほとんどの場合、アイソザイム解析で十分であるが、細胞株の由来によっては、それ以外の試験が妥当な場合もある。アイソザイム解析法以外で由来する種の確認に用いられる方法としては、例えば、バンディングによる細胞遺伝学的手法、あるいは種特異的抗血清を使用する解析技術などがある。もう1つ別の方策として、細胞種特有のマーカ存在を立証するというやり方が考えられる。例えば、染色体のバンディング解析による細胞特有のマーカー染色体を検出する方法、あるいはDNA解析を利用し、ゲノムの多型パターン(例えば、制限酵素断片長の多型や、繰り返し配列の数、染色体中のジヌクレオチドの

繰り返し等)を検出するといった方法がある。由来する種の確認、既知の細胞株に特有のマーカ存在の確認、いずれも、細胞特性評価試験として適切と考えられる。目的タンパク質の発現を調べる試験も、細胞特性を表す上で、基本的な要素の1つとなり得る。今後はゲノミクスやプロテオミクスも適切に活用すれば有用な細胞特性評価指標となっていくと期待される。

微生物細胞では、選択培地での増殖特性解析が宿主セル・バンクや形質転換細胞のセル・バンクの特性を確認するための適切な試験となる場合が多い。種々の株が使用される大腸菌の場合、フェージ型分析のような生物学的解析法を、細胞の特性を一層明らかにする試験として用いることができる。プラスミド・バンクの特性解析については、次項を参考にする。その他、目的タンパク質の発現を確認する試験も微生物発現系の特性解析法として適切である。

(4) プラスミド・バンク及びMCBにおける

遺伝子発現構成体の解析

プラスミド・バンク及びMCBにおける遺伝子発現構成体の解析については、「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」(ICH Q5B ガイドライン:前出)の記載を参考にする。しかし、当該分野の技術の進歩を反映した適切な手法があれば、その妥当性を示した上で用いることがむしろ望まれる。ここでは、ICH Q5B ガイドラインの勧告を参考として記載しておく。

遺伝子発現構成体であるプラスミドに含まれる各種要素(例えば、複製開始点、抗生物質耐性遺伝子、プロモーター、エンハンサーなど)に関する詳細なマップ及びプラスミドの全塩基配列を示す必要がある。その際、プラスミド構築中に配列分析した領域と、配列に関する情報を文献上から得た領域とを明らかにしておく。プラスミドに目的タンパク質以外のタンパク質発現に係わるコード

がある場合にはその旨を記載する必要がある。ベクターに挿入された目的タンパク質をコードする領域及びそのフランキング領域の塩基配列については、挿入のための連結部位を含め、遺伝子発現構成体を対象とした DNA 配列分析により決定する必要がある。

MCB 中の遺伝子発現構成体については以下に述べるような解析を行う必要がある。MCB での解析がなんらかの理由で不可能なときは、WCB での検討がなされることになるが、この場合には、WCB 調整ごとに試験を実施する必要がある。

遺伝子発現構成体のコピー数、挿入と欠失、組み込み部位の数については、制限酵素マップその他の適切な方法を用いて解析する必要がある。また、染色体外発現系の場合には、遺伝子発現構成体を保持する細胞の割合 (%) を測定しておく必要がある。

また、遺伝子発現構成体中の目的組換えタンパク質をコードする部分の塩基配列が正しいことを立証しておく必要がある。染色体外発現系の場合には、遺伝子発現構成体を単離後、再クローニングしないで目的タンパク質をコードする部分の塩基配列の妥当性を立証すべきである。目的タンパク質をコードする部分が染色体に組み込まれたものは、当該部分を再クローニングしたのち配列分析を行うことで妥当性を立証すればよいが、cDNA クローンをプールしたものや PCR で増幅して得た試料について配列分析し、評価するという方法も考えられる。これらの試験により解析された目的タンパク質をコードする塩基配列は、分析法の検出限度内で当初構築した遺伝子発現構成体中の塩基配列と同一であり、かつ目的タンパク質のアミノ酸配列に対応したものである必要がある。

(5) セル・バンクの純度試験

細胞を樹立しバンク化する上で、MCB 及び WCB が生物学的に汚染のないものであること、すなわち外来性の微生物因子や細胞の混入がないと評価・確認することは極めて重要である。なお、

このような純度試験を計画し実行する際には、検出系に存在する可能性がある試薬や抗生物質が外来性の微生物汚染の検出系に及ぼす影響を考慮した上で行うべきであることはいうまでもない。

動物細胞の場合、細菌や真菌の存在を否定するための試験は、MCB 及び WCB それぞれについて行うべきである(全容器数の 1%、ただし、2 本以上)。その他の点に関しては、欧州薬局方(Ph. Eur)、日本薬局方(JP)又は米国薬局方(USP)に記載されている現行の微生物限度試験法又は無菌試験法のいずれもが適切であると考えられる。

マイコプラズマの存在を否定するための試験は、MCB 及び WCB で行うべきである。現行の方法で適切と思われるものとしては、寒天平板培地と液体培地を用いた培養法、及び指標細胞培養法が挙げられる。現行のマイコプラズマ試験法は、Ph. Eur、JP 又は“Points to Consider in the Characterisation of Cell Lines Used to Produce Biologicals”(FDA, CBER, 1993)に記載されている。一般的には、容器 1 本の細胞を用いた試験で十分と考えられる。ほ乳類以外の動物細胞株の場合には、コントロールや試験条件を変更した方が適切であるかもしれない。

将来、細菌、真菌及びマイコプラズマに関する適切な国際調和試験法が作成された際には、それを用いる。

細胞基材のウイルス試験は、細胞株の培養歴を考慮し、汚染の可能性があるウイルスを検出するために、適切なスクリーニング法及び特異性の高い試験法を用いて、幅広い種類のウイルスを検出できるよう計画すべきである。この件に関しては、本書第 2 章及び「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イルス安全性評価」(ICH Q5A ガイドライン：前出)を参考にすること。当該ガイドラインで扱われない医薬品については、生物薬品生産のための動物細胞の使用に関する現行の世界保健機構(WHO)文書(後述)が参考になる。

細胞基材の純度は、同種又は異種生物由来の他

の細胞株が混入することによっても損なわれる。他の細胞株による交叉汚染の機会があったかどうかによって、実施すべき試験を選択する必要がある。他の細胞株を同じ室内で培養する必要がある場合でも、セル・バンクの調製作業を開放系で行う際には、交叉汚染防止のため、同時に他の細胞株を開放系で操作しないよう注意を払うべきである。バンク化の作業(選択した細胞株の増殖、プール、分注のような操作)が開放系で行われている際に、同じ室内に別の細胞株も存在していた場合には、調製したセル・バンクについて、別の細胞株(又はその産物)が汚染していないかどうかを試験すべきである。一般的に、前述した細胞の特性解析試験の評価方法は、他の細胞株による交叉汚染を検出するための適切な方法でもありと考えられる。細胞基材から目的タンパク質が当初の意図どおり得られたとすれば、そのことも、セル・バンクに交叉汚染がないことの保証の1つとなる。

微生物由来のセル・バンク中への外来性の微生物や細胞の混入に関する試験にあたっては、

- ① バンク化した細胞の特性
- ② 科学文献、起源、及び培養に用いた方法や材料から想定される汚染

並びに

- ③ バンクを調製する室内に存在する他の生物などの要素を考慮し、個々に応じた適切な試験計画を立て、実施すべきである。例えば、細胞基材が増殖可能な培地と不可能な培地をそれぞれ数種類用いて、明確に分離したコロニーの特徴を視覚的に観察する方法が考えられる。ただし、これらの試験の目的は、試験中に細胞基材から生じる増殖性を獲得した変異株やその他の人為的産物を調べることにあるのではなく、あくまで、バンク中にすでに存在する混入物を検出することにある。

- (6) 目的タンパク質を恒常的に生産できる能力に関する細胞基材の安定性評価
細胞の特性に関しては、もう1つ別の次元から

の見方がある。すなわち、医薬品製造に使用するとき、意図した目的を果たすのに適切であるかどうかについて細胞基材の安定性という面からの特性を解析することである。細胞基材の安定性に関して、考慮すべき点は2つある。すなわち、

- 1) 目的タンパク質を恒常的に生産できるかという観点での安定性及び
- 2) 定められた条件下での保存期間中に生産能力を保持しているかという観点での安定性の2つである。

医薬品製造のための培養期間中の安定性評価では、少なくとも2つの時点の細胞を材料に試験を実施する必要がある。その2つの時点の細胞とは、最小継代培養細胞、及び承認事項として申請書に記載された実製造に使用する際の *in vitro* 細胞齢の上限又はそれを超えて培養された細胞である。医薬品製造のための *in vitro* 細胞齢の上限は、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで、医薬品製造条件として提案された *in vitro* 細胞齢まで、又はそれ以上に培養させた製造用細胞から得られたデータに基づいて決定される必要がある。この製造用細胞は一般的にはWCBから増殖されるが、適切な理由がある場合はMCBから増殖させた細胞を用いてもよい。このような医薬品製造用細胞基材の安定性の検証は、各医薬品の承認申請ごとに、通常、1回実施する必要がある。

ここで、第一義的な課題は、目的タンパク質が恒常的に生産されるかどうかという点に関して細胞基材を評価することである。そのような評価に使われる試験の種類及び試験検体は、細胞基材の種類、培養方法、及び目的タンパク質の種類に応じて変わる。組換えDNA技術により作製された遺伝子発現構成体を導入した細胞株の場合は、実製造での *in vitro* 細胞齢の上限まで、又はそれを超えて培養した細胞について、遺伝子発現構成体中の目的タンパク質をコードする塩基配列が安定であることを、核酸解析又は最終的に得たタンパ

ク質の解析のいずれかの方法によって立証する必要がある。目的タンパク質をコードする配列がすでに MCB 又は WCB のレベルで解析されている非組換え体の細胞株では、実製造で予定されている *in vitro* 細胞齢の上限まで、又はそれを超えて培養した細胞を検体として、目的タンパク質をコードする塩基配列が培養期間中に変化しないことを、核酸解析又は精製タンパク質の解析のいずれかによって立証すべきである。

目的タンパク質が前記のように解析できないときは、例えば、形態学的特徴、増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、目的タンパク質の生産性、あるいはその他の適切な遺伝型又は表現型の指標を含む他の特性が、細胞基材の安定性を評価するために有用なものとなり得る。MCB の細胞特性と、*in vitro* 細胞齢の上限まで又はそれを超えて培養した製造用細胞の特性とを、直接に比較することが困難又は不可能な場合がある。そのような場合には、製造中の細胞の安定性を評価するために、増殖培養又は生産培養の初期の段階にある細胞の特性と、実製造での *in vitro* 細胞齢の上限まで又はそれを超えて培養した細胞の特性とを、比較するという評価法もある。そのような試験では、例えば、酸素又はブドウ糖の消費速度、あるいはアンモニア又は乳酸の産生速度が指標として利用できる。医薬品製造のための *in vitro* 細胞齢の上限を延長させたい場合は、新たな上限とする *in vitro* 細胞齢にまで増殖させた細胞から得られたデータに基づき、その妥当性を立証する必要がある。正常二倍体細胞株では、実製造を反映する条件下における WCB に由来する細胞の *in vitro* の細胞寿命をどのように決定したかについて、データを示す必要がある。

(7) 細胞基材の保存中の安定性評価

細胞基材の保存中の安定性評価については、多くの医薬品の安定性試験で実施されているように、一定期間ごとに経時的にサンプリングし、適切な

指標を試験するやり方も考えられる。しかし、実際に考えると、保存してある細胞を解凍して何かの用途に用いようとする際に、その用途に適しているかどうか、用いた結果どうであったかに関して実施した試験結果をもとに評価できれば、最も合理的である。

例えば、バンク化した細胞が、定めた保存条件下において安定であることの証拠は、通常、バンク化した細胞を用いて非臨床試験や臨床試験用の医薬品を製造する過程で得られる。これら治験薬等の製造のためには、保存細胞をもとの状態に戻し、細胞の生存率を調べるが、その際に得られるデータから、もとに戻された細胞が保存期間中にも生存していたことが証明される。また、治験薬等を製造して得られるデータからは、もとに戻された細胞が目的タンパク質の生産に使用できるものであることが実証される。こうして得られたデータは細胞基材の保存中の安定性評価申請資料として活用できる。これに加えて、申請時には、バンク化した細胞の安定性に関するモニタリング計画も提出する必要がある。モニタリングの実施にあたっては、次のようなタイミングが考えられる。すなわち、

- ① 凍結保存したバンクから細胞を製造のために保存容器 1 本又は数本分を解凍するとき
- ② 目的タンパク質又は製造の恒常性を適切な方法で調べるとき

あるいは

- ③ 凍結しておいた 1 本又は数本の MCB パイアルを解凍し、WCB を新たに調製するとき
(この新たに調製された WCB についても、適切な試験を行うこと)

などのタイミングで、適宜モニタリングを行うことができる。医薬品製造を長期間行わない場合、製造用細胞基材の出発素材として用いられるセル・バンクの生存率に関する試験は、そのようなケースに備えて予め承認申請書に記載された間隔で行うべきである。もし、この細胞基材の生存率に特に顕著な低下が認められない場合、一般的に

は、MCB又はWCBについて、それ以外の試験を追加実施する必要はないと考えられる。

(8) 核型分析及び造腫瘍性試験

かつて、核型分析及び造腫瘍性試験は細胞株の特性解析項目として必須に近いものであった。細胞株及び目的産物の種類並びに製造工程にもよるが、正常二倍体細胞株の安全性の評価又は新規細胞株の特性解析のために、核型分析や造腫瘍性試験を行うことが、有用な場合も確かにある。しかし、多くの科学的知見や経験の蓄積をもとにICH及びWHOで議論が重ねられた結果、核型分析及び造腫瘍性試験のあり方が見直されるに至っている。例えば、比較的多くの異数倍体細胞を対象とした場合に、これを詳細に解析することは、重要な意味を持たないと考えられるようになってきた。げっ歯類細胞株又は非二倍体であることが知られている新規細胞株について、核型分析を行う必要はない。一方で、すでに述べたように、細胞遺伝学的解析は細胞基材の特性解析試験又は純度試験の1つの方法として適切なものである。

造腫瘍性を示すことが文献等ですでに知られている細胞については、造腫瘍性試験を改めて実施する必要はないと考えられる。

核型試験や造腫瘍性試験は、細胞特性に関する試験であると同時に、製品における品質・安全性上の懸念から注目されてきた試験であった。今日では、最終的に製品の品質・安全性を確保するという観点に立った場合、高純度に精製され、かつ細胞を含まない製品については、工程評価/バリデーション又は規格試験のいずれかで、宿主細胞に由来する残存DNAが一貫して適正限度内であることが明らかにされていれば、通常、その生産細胞に対する核型試験や造腫瘍性試験を実施する必要はないと考えられるに至っている。

一方、製品中に生細胞の残存が否定できない場合、又は培養後に精製操作をほとんど行わない(例えば、従来の生ウイルスワクチンの)場合には、

通常、細胞基材について、核型分析や造腫瘍性試験を行う必要がある。精製操作をほとんど行わない医薬品の製造に用いられる新規細胞基材についての造腫瘍性試験や染色体解析の有用性は、ケース・バイ・ケースで評価すべきである。目的とする医薬品に細胞が残存する場合、又は高純度には精製されない医薬品を製造する場合に、造腫瘍性又は異常な核型を有することが知られている細胞株を使用することは是非については、各医薬品の承認申請ごとに、リスク/ベネフィットのバランスから評価すべきである。

遺伝子操作による形質転換が行われていないMRC-5細胞又はWI-38細胞を用いて医薬品を製造する場合、これら細胞株の特性はすでに詳細に解析、評価され、公表されているので、核型分析又は造腫瘍性試験によって改めて細胞基材を解析、評価する必要はない。しかし、新たに調製されたMRC-5細胞やWI-38細胞のWCBについては、実製造に用いる培養方法で培養した細胞が二倍体であること、及び予想通りの細胞寿命を有することを、一度確認する必要がある。

新規又は未だ特性解析が行われていない二倍体細胞の細胞基材の場合は、MCB由来の細胞を用いて、二倍体の核型を有すること、及び造腫瘍性の可能性の有無について確認すべきである。核型分析及び造腫瘍性試験の方法は、“WHO Requirements for the Use of Animal Cells as *in vitro* Substrates for the Production of Biologicals” (*in* WHO Expert Committee on Biological Standardization 47th Report, WHO Technical Report Series No. 878, 1998)と題するWHO文書に述べられている。

(9) 細胞培養法の妥当性の立証及び一定性の確保

細胞培養法の詳細を明らかにして、その妥当性を示す必要がある。また、その一定性を保つ必要がある。さもなければ、前々項で述べた医薬品製造条件下で、細胞が安定に一定の品質の目的物質を生産することの検証は意味をなさなくなる。培

地の組成など培養の方法が変われば、培地由来の不純物の混入が問題になるほか、培地の変更が実際の発現の場で誘導条件に影響し、発現状況が変わる可能性や、培養方法如何では細胞の安定性や変異の確率が変わることも懸念される。また、培地の成分による発現タンパク質の変性や修飾が安全性(免疫原性など)に影響を及ぼすことも考えられる。培地の組成に依存して、細胞中で、ある種のプロテアーゼの作用が発現して生産物を一部分解し、最終産物の品質の均一性が変動することもある。また、細胞の大量培養に動物などを經由する場合、動物の種類、株その他の条件を変更するようなケースも考え得るが、その際は動物由来の有害因子の混入問題等について改めて評価が必要になってくる。いずれにしても、細胞培養法のコアとなる要素は承認書記載必須要件になる。その変更にあたってはコンパラビリティ評価試験が必要である(第4章参照)。

5. 精製法の一定性の確保

精製法の詳細を明らかにして、その妥当性を示す必要がある。また、その一定性を保つ必要がある。特に、

- ① 目的物質の細胞からの分離と精製手順
- ② 各精製段階での精製状況(例えばタンパク質量、活性収率、比活性、電気泳動パターン等)
- ③ エンドトキシン等の有害因子や主な不純物の除去状況と除去効率
- ④ 一次産物を加工して目的物質に変換する場合はその手順と目的物質の精製手順

などについてその妥当性を証明し、その後はこの妥当性が証明された分離精製工程を一定しておく必要がある。目的物が比較的不安定な高分子タンパク質であることから、生産細胞(とくに菌体内)からの抽出・分離法の変更も含めて精製方法を変更した際に、分離精製過程での目的物質に

対する物理的、化学的あるいは生物学的作用の種類や程度が変わり、目的物の構造や性質に影響を及ぼす結果、最終製品の品質が変わることが懸念される。また、細胞の一次生産物がプロ体や雑種融合タンパク質あるいはインスリンのA鎖のような最終目的物の一部である場合には、最終産物を得るための加工の方法などが変更される可能性があるが、これも最終製品の品質に影響を及ぼすことが考えられる。細胞培養法によるインターフェロ α に典型的にみられるように、最終産物が不均一な複数の活性成分からなる場合には、精製方法の変更は最終産物中の(活性の異なる)成分の種類や成分比の変動につながり、有効性等に影響する可能性がある。生産菌体や動物細胞由来、培地由来その他製造工程中に混入する可能性がある有害因子や不純物の不活化や除去状況が精製工程に依存して変わることもきわめて重大な問題である。その他、精製工程中で用いる試薬の混入や抗体カラムからの抗体の漏出など、採用された精製方法そのものに由来する安全性上の問題もある。いずれにしても、精製法のコアとなる要素は承認書記載必須要件になる。その変更にあたってはコンパラビリティ評価試験が必要である(第4章参照)。

6. 補遺：初代培養細胞の細胞基材

これまで述べてきた考え方は、特性解析されたバンク化細胞を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品に一般的に適用される。しかしながら、一部の生物起源由来医薬品、特に、ある種のウイルスワクチンは、初代培養細胞を用いて製造されている。

初代培養細胞は、由来する組織より樹立された後、継代第1代目で使用されるので、バンク化された細胞基材のように、使用前に細胞の特性を詳細に解析することはできない。その上、初代培養細胞を細胞基材に用いて製造される生物起源由来

医薬品では、十分な処理工程(例えば、精製工程)を経ない場合が多い。このような違いはあるが、生物起源由来医薬品の製造に用いられる初代培養細胞基材の適格性及び安全性を保証するためにとられる方策は、多くの点で、前項までに述べてきたことやその他のガイドラインに述べられているものと類似している。

以下には、初代培養細胞を用いて製造される生物起源由来医薬品の承認申請にあたって盛り込まれるべき細胞基材に関する情報を概説する。

6.1 初代培養細胞基材の起源としての組織及びその他の生体由来材料

初代培養細胞基材の調製に用いた組織の起源となった動物に関する情報を提出すべきである。用いる組織は、病原体を含まないことが獣医学的観点及び試験室レベルでの検査によるモニタリングにより保証された健康な動物からのものであるべきである。可能な限り、組織を採取する動物は、隔離された閉鎖状態の、かつ(可能ならば)特定病原体感染防止条件(SPF)に適合したコロニー又は群を使用すべきである。組織を採取する動物は、それ以前に実験動物などとして使用されたものであってはならない。細胞調製の目的で用いる前に、当該動物を、適切な期間、適正に隔離検疫しなければならない。

初代培養細胞基材の調製に使用した材料や成分についての情報を、ヒト及び動物に由来するすべての試薬の種類、特徴及び由来も含めて提出する必要がある。動物由来の成分に関しては、検出可能な混入物や外来性因子によって汚染されていないことを証明するために実施した試験についても、記載すべきである。

6.2 初代培養細胞基材の調製

組織からの細胞の単離、初代培養細胞の調製及

び培養細胞を維持する方法について明らかにすべきである。

6.3 初代培養細胞基材について実施する試験

初代培養細胞基材が医薬品製造に使用するのに適格であることを示すために実施した試験について、申請資料に記載する必要がある。前述したように、初代培養細胞基材は、その性質上、使用前に詳細な試験を実施して、特性を解析することは不可能である。したがって、これらの基材に外来性因子が含まれないことを示す試験は、製造と並行して実施されることになる。それには、

① 製造の開始前、期間中及び終了後での実製造培養及び感染性物質の存在が否定されているコントロールの培養における細胞の状況を観察する試験の実施

② 実製造培養及び非感染のコントロール培養から得た培養液を、広範囲な関連ウイルスが検出可能な種々の鋭敏な指示細胞に接種した後、細胞変性試験及び赤血球吸着ウイルスの存在を否定するための試験の実施

並びに

③ (関連レトロウイルスのような)特殊な因子に対する試験を必要に応じて行うこと

などが含まれる。特殊ウイルス試験に関するさらなる情報は、関連する各国/地域のガイドラインや国際ガイドラインに示されている。

ある特定の医薬品の製造に用いられる細胞に対する適切な試験項目と試験法は、組織の起源としてのドナー動物の種、存在する可能性のある外来性因子、医薬品の性質、臨床上的用途、製造工程からの視点、及び最終製品に対して行われる試験の範囲等によって変わる。したがって、承認申請しようとする医薬品に関して、採用した方策について説明し、かつその妥当性を明らかにする必要がある。

(早川堯夫)

概論 感染性物質

感染性物質をめぐる問題はバイオ医薬品の品質・安全性試験や評価上、最大の関心事の1つである。これは、医薬品素材である細胞や医薬品製造過程で用いられる培地成分、各種試薬、器材、装置、製造工程、製造環境などと密接に関連した問題である。

感染性物質としては、ウイルスをはじめ、細菌、真菌、マイコプラズマやいわゆるプリオンなどが考えられる。

バイオ医薬品の開発にあたっては、それぞれの製品や製造工程について、これら感染性物質に対する安全性を保証するために検討した方策、実施した試験や評価結果を明らかにし、その妥当性を示す必要がある。

本項では、組換え DNA 技術を応用して生産される「組換え医薬品」や細胞培養技術を応用して生産される「細胞培養医薬品」などの細胞基由来タンパク質性医薬品の感染性物質をめぐるガイドラインや通知を中心に製品の安全性確保のあり方について概説する。

1. ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオ医薬品のウイルス安全性評価

ヒトあるいは動物細胞由来の組換え医薬品や細胞培養医薬品すべてに共通の課題で極めて重要な問題の1つにウイルス汚染という安全性上の問題がある。ウイルス汚染は、出発素材である細胞系に由来して起きる可能性がある。また、製造工程中に外来性因子として導入された結果生ずる可能性もある。この問題に対処するための指針としてICH

ガイドラインが作成された。本ガイドラインにおいて、これらの医薬品についてウイルス面からみた安全性を確保する方策として挙げられている主に考慮すべき事項は以下のようなものである。なお、これらの考慮事項はICHガイドラインの規定の範囲を越えたより広範な医薬品に適用できるものである。

- 1) ウイルス汚染の可能性(汚染源)について熟知しておくこと。
- 2) ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような製造用細胞系及び製造関連物質(培地成分、試薬、抗体カラムなど)を選択すること。
- 3) 出発素材である細胞基材などにつき徹底的な解析とスクリーニングを行い、ウイルス存在の有無及び存在するウイルスの種類・性質について検討すること。
- 4) ウイルスやウイルス様粒子が存在した場合、どの程度ヒトへの有害性が高いかを検討・確認すること。
- 5) 製造工程の適当な段階において製品のウイルス否定試験を実施すること、例えば、未加工/未精製バルクなどにおいて外来性ウイルスを検出するための適切な試験計画を設定すること。
- 6) ウイルスクリアランスを最大限達成するために製造工程中にウイルスの除去・不活化に関する各種の方法を用いること。
- 7) 周知なウイルススクリアランス試験計画を立てること。
- 8) ウイルス不活化及び除去を評価する試験を実施し、評価すること。

これらの方策は、段階的にかつ相互補完的に活用していくことが重要であると考えられている。以