

下には、そのさらに根幹をなす部分に焦点をあて概説する。

1.1 ウイルス汚染の可能性

バイオ医薬品のウイルス汚染は、細胞基材に起因するものと製造工程中におけるウイルスの迷入に起因するものがある。

ウイルスは次のような経緯により細胞基材に混入してくる可能性がある。

- 1) 感染した動物からの細胞株の入手
- 2) 細胞株を樹立するためのウイルスの使用
- 3) 汚染された生物起源由来の試薬(例：動物血清成分)の使用
- 4) 細胞取り扱い中における汚染

医薬品製造過程で、外来性ウイルスは、例えば、次のような原因・経路により最終製品に迷入する可能性がある。

- 1) 培養等に使用する血清成分のような生物起源由来の試薬の汚染
 - 2) 目的タンパクをコードする特定の遺伝子の発現を誘導するためのウイルスの使用
 - 3) 精製等に使用するモノクローナル抗体アフィニティーカラムのような試薬の汚染
 - 4) 製剤化に使用する添加剤の汚染
 - 5) 細胞及び培養液の取り扱い中における汚染
- なお、細胞培養パラメータをモニターすれば、外来性ウイルスの汚染の早期発見に役立つ。

1.2 細胞株適格性試験：各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験の要領

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生産用細胞系及び製造関連物質を選択するとともに、これらにつき徹底的なスクリーニングを行うことは、ウイルス面からみた安全性を確保する上で、なによりもまず実施すべき基本的アプローチである。ICHガイドラインには、マスター・セ

ル・バンク(MCB)、ワーキング・セル・バンク(WCB)、及び医薬品製造条件として提案された *in vitro* 細胞齢の上限まで培養された細胞(CAL)などの各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験の実施要領が例示されている(本章第1節の表5参照)。

MCBに関しては、当然、各細胞株の由来、種類及び汚染の可能性のあるウイルス類を考慮に入れながら、非内在性ウイルス(一般にいう外来性ウイルスと同義)と内在性ウイルスを対象に、ウイルス汚染に関する徹底的な試験を実施する必要がある。

内在性ウイルス試験については、レトロウイルス、又は内在性のウイルス類には、潜在化した状態のものが大量培養すると出てくるという特性もあり得るのでそれを考慮するとCALにおいて、適切な試験を実施する必要がある。

CALでの外来性ウイルスに対する試験の種類と程度に関しては、例えば、*in vitro* あるいは *in vivo* 試験のような適切な試験を少なくとも1度実施すれば、製造過程が外来性ウイルスによって汚染されるようなことはないことをなお一層確実に保証することになるとされている。

WCBは、医薬品製造の出発細胞基材であるので、外来性ウイルスが存在しないことを立証しておく必要がある。しかし、WCBからさらに培養を重ねて上限に達した細胞(CAL)で試験する場合には、WCB段階で重ねて試験することはない。CALでチェックしない状況、すなわちWCBの更新時などでは直接試験する必要がある。なお、WCBについて、MCBにおいて必要とされるすべての試験を実施し、MCBにおける試験の代わりとしてもよい。

ウイルスの検出及び確認のための試験に関してICHガイドラインでは、現時点において推奨される方法として抗体産生試験、*in vivo* 試験、*in vitro* 試験、レトロウイルス試験といった原理的に異なるウイルス試験の基本的かつ代表的なものを全て取り上げ、その試験に適用可能な検体はどのような状態のものか、それぞれのウイルス試験の用途

(すなわち検出可能なウイルスの種類など)やそれぞれのウイルス試験の限界などを例示している(表1)。しかし、必ずしもすべての試験法が網羅されているわけでもなければ、これらを用いなければならないと定めたものでもないとし、科学の進歩とともに変わる最も適切な技術が合理的根拠のもとで活用される余地を残している。また、ウイルスの検出と確認のための試験の実施計画を立案し、あるいは実施した試験を評価する際、その妥当性を総括し、また理論的根拠を示す上で参考になる事項が概説されている。

1.3 ウイルスが検出された細胞株の使用について

細胞レベルでの試験の結果、ウイルスが仮に検出された場合、その細胞をどのように取り扱うかについての問題がある。医薬品の製造に用いる細胞株には、内在性のレトロウイルス、その他のウイルスあるいはウイルス由来の塩基配列を含むことが知られているものがある。例えば、最もよく用いられるCHO細胞にはレトロウイルス様粒子が必ずといっていいほど観察され、また、げっ歯類固有のレオウイルス、パラミクソウイルスあるいは小型のバルボウイルス(MVMなど)に感染することが知られている。CHO細胞を医薬品の製造に使用することについては、異なる種類のウイルスを検出できる試験を組み合わせ、最終医薬品に対する安全性を総合的に考察することによって可能となる。すなわち、MCBのウイルス試験において、電子顕微鏡観察でレトロウイルス様粒子(A粒子、R粒子、C粒子など)が細胞内に存在しているのが観察されるが、内在性ウイルスの感染性試験であるミンクS⁺L⁻フォーカスアッセイ及びげっ歯類固有のウイルスの感染性を検出するXCブランクアッセイで陰性との試験結果が得られた場合、電子顕微鏡で観察されるレトロウイルス様粒子はヒトには感染しないことが分かっているため、他の

試験も陰性であれば、内在性ウイルスに関して使用するCHO細胞は安全であるとの総合判断ができる。ICHガイドラインでは、げっ歯類由来の細胞株に通常存在する内在性レトロウイルス粒子については、マウス白血病ウイルスを“特異的モデルウイルス”として用い、その製造工程がげっ歯類レトロウイルスを不活化/除去する能力を有していることを明らかにしておくことを推奨している。

内在性のレトロウイルス以外のウイルスを含有した細胞株の使用の可否は、ケース・バイ・ケースで規制当局が考慮・判断することになる。その際には、製品のベネフィットや予定される臨床上の用途、混入するウイルスの種類・性質、ヒトへの感染性又は病原性、製品の精製工程(ウイルスクリアランスに関する評価データ等)、及び精製バルクにおいてどの程度のウイルス試験を実施したかなどに基づくリスク/ベネフィットのバランスを勘案し、判断することになる。

非内在性ウイルス試験としては、第1節の表5のように、指示細胞(ヒト由来細胞、サル由来細胞又は宿主細胞)に接種して感染性ウイルスを検出する*in vitro*試験、乳のみマウス、モルモットや鶏卵に播種した後外観観察又は血球凝集阻止反応により感染性ウイルスを検出する*in vivo*試験、あるいはウイルスフリーのマウスやハムスターにサンプルを接種後血清中の各種ウイルスに対する抗体の有無を調べる抗体産生試験などが共通の試験としてよく用いられる他、宿主細胞あるいは原料から混入するおそれのある特定のウイルスに感受性を持つ細胞を用いて細胞変性の有無を観察する特異的ウイルス試験なども行われておりリスク評価に有用な情報を与えてくれる。なお、これらの試験よりも高感度でウイルス遺伝子を検出できるPCR試験も多く実施されるようになり、試験法の改良が重ねられて定量的かつ信頼性の高い結果が得られるようになってきている。ただし、注意しなければならないのは、ウイルス遺伝子の検出がすなわちヒトへの感染あるいは発症を意味

表1 ウイルス試験に用いられるアッセイ法の例とその限界

試験方法	試験検体	検出可能な対象	試験方法としての限界
抗体産生試験	溶解処理後の細胞/培養液	特異的ウイルス抗原	動物に感染性を示さないウイルスの抗原は検出できない
<i>In vivo</i> 試験	溶解処理後の細胞/培養液	ヒトへの病原性を有する広範なウイルス	当該試験系で複製しない又は病原性を示さないウイルスは検出できない
<i>In vitro</i> 試験		ヒトへの病原性を有する広範なウイルス	当該試験系で複製しない又は病原性を示さないウイルスは検出できない
適用:			
1. セルバンクの解析	1. 溶解処理後の細胞/培養液(混合培養の場合、試験検体として細胞そのものを用いること)		
2. 製造工程中での検査	2. 未加工/未精製バルク又は製造用培養器から採取した培養液/溶解処理後の細胞		
電子顕微鏡観察		ウイルス及びウイルス様粒子	同定評価法であり定性的である
1. 細胞基材	1. 生細胞		
2. 細胞培養液上清	2. 細胞フリー培養上清		
逆転写酵素活性(RT)	細胞フリー培養上清	レトロウイルス及び発現されたレトロウイルスのRT	適切な条件下で活性を最大限に発現した酵素のみを検出。細胞由来酵素の活性の存在により評価が困難な場合がある。濃縮された検体ではバックグラウンドが高くなることもある
レトロウイルス(RV)感染性試験	細胞フリー培養上清	感染性レトロウイルス	当該試験系で複製しない又はフォーカスやプラークを形成しないレトロウイルスは検出できない
混合培養	生細胞	感染性レトロウイルス	当該試験系で複製しないレトロウイルスは検出できない
エンドポイント:			
1. 感染性による場合			1. 「レトロウイルス(RV)感染性試験」を参照
2. TEMによる場合			2. 「電子顕微鏡観察」を参照*
3. RTによる場合			3. 「逆転写酵素活性(RT)」を参照
NAT法(核酸増幅法)	細胞、培養液及びその他の材料	特異ウイルス塩基配列	プライマーの配列と呼応する配列の存在が必要である。ウイルスの感染性の有無は示されない

a. 加えて、指標細胞から試験検体を識別することが困難。

ICH Topic Q5A; Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin, Step 4 Consensus Guideline, 4 March, 1997. より。

しないことである。ウイルス遺伝子(DNAあるいはRNA)が検出された場合、ヒトへ感染するかどうかを考察に加えることによってはじめて安全性に関して結論を導くことができる。

ところで、規制当局が考慮・判断することになるという部分については、応用問題として規制当局が正しい科学的判断を下していく必要がある。科学的合理性がある前例があり、それを参考にするケースは別にして、ない場合には新しいコンセプトや新しいアプローチを作り出すことも含めて、国内外で誰もが納得する判断や概念に至るように科学的検討を行う必要がある。

安全性の議論をするとき、考慮すべき様々な要素とのバランスを抜きにして、安全か、安全ではないかということについて、どのようなウイルスであれ、存在すれば危険であるといった一義的あるいは定性的な議論に陥ってしまうことに注意する必要がある。さらに極端には、「未知のウイルス」をめぐる論議としてしばしばみられるように、科学的にどう対策を講ずるべきかということではなく、感覚的な懸念のみがいたずらに強調されるという出口のないエンドレスな論議に至ることも避けねばならない。「何らかの方法でウイルス、ウイルス様粒子又はレトロウイルス様粒子が検出されるが、その正体については未知」という状況には対策を講ずる必然性と手段もあり得るが、「現在利用可能な方法では検出されない未知のウイルスへの懸念」という状況に立ち向かうすべはない。同様に、「製造工程に既存の知識の範囲内にある種類・性状のどのようなウイルスが迷入してくるかが未知」という課題には、後述するウイルスクリアランス「工程特性解析試験」により対処可能であるが、「未知のウイルスが世に存在していて、それが迷入してくるかが未知」には対処できない。少なくとも科学的観点からは、「問題」と「対策」に関係付けができることでないと、「対策」が「問題」に対して有効であることは期待できない。このような問題の立て方を前提としつつ、どのよう

な種類のウイルスが、どの段階でどの程度存在するか、精製工程中でどの程度不活化/除去できるかなどを含めて最終製品中に含まれる可能性と危険性を定量的に評価した上で、使い方との関係でどうなるか、ベネフィットとの関係でどうなるか、国際的な議論の趨勢も含めて今の時点でどれがベストかという点を勘案し、科学的に合理性のある結論を下す必要がある。

1.4 未加工/未精製バルクにおけるウイルス試験

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は、製品のウイルス安全性確保上の第2の基本的アプローチともいえるべき必須事項である。

医薬品生産のための培養を終了し精製工程へ受け入れる段階での製品を未加工/未精製バルク(unprocessed bulk)と称している。この未加工/未精製バルクは、最終製品への外来性微生物汚染の可能性を高確率で測定することができる最も効果的なレベルの1つであること、また、各細胞レベルでの1回のウイルス試験は、細胞株適格性についてであって、それらの細胞株に外来性ウイルスが存在しないことが、次々生産されるバルク各ロットにもウイルスが存在しないことを必ずしも常に保証するものではないということから、少なくとも3ロットのデータが評価資料として必要であるとされている。この段階で外来ウイルスの迷入が検出された場合には、一般にそのバルクを製品生産用を使用すべきではないことはいままでもなく、また汚染原因をつきとめるなど適切な対応が必要である。

この段階でのウイルス汚染の原因の主な要素の1つとして、培地成分に使用される血清や生体由来成分が汚染されていることが考えられる。したがって、汚染の可能性を極力回避するための適切な培地成分の選択と品質確保、品質管理が重要である。

血清等の使用に関しては、新規にバイオ医薬品

の開発を行おうとする際には無血清培地での細胞培養を当初から計画的に考慮すべきであるとの意見が強い。一方、すでに医薬品生産が行われているものや開発段階が進んでいるものについて、血清等の使用を中止あるいは変更すべきという公的見解は日・米・欧いずれからも出されていない(供給国についてはプリオンの問題から使用範囲が定められている)。血清や生体由来成分の代替品を容易に見出すことができれば理想的であるが、現実には、合成培地に切替えるためには、非常に綿密な研究を必要とし、膨大な時間と労力が費やされることは一般によく知られている。血清等の使用を継続するリスクと、有用なバイオ医薬品を臨床の場に早急に提供していくことや、既存の製品について現行の供給体制を維持していくことの医療上の重要性というベネフィットとのバランスを勘案したとき、血清等の使用は認知できるというのが現在の国際的コンセンサスである。もとより血清等に関して、現行よりさらにリスクを低減させる方策をとることは極めて重要とされ、その品質・安全性をさらに適正にチェックする方法の採用、適切なウイルス不活化・除去法が新たに開発された場合の積極的採用などが提言されている。ちなみに、ICHガイドラインの未加工/未精製バルクにおけるウイルス試験は、血清等の使用も念頭においた上で、万が一由来するウイルス汚染の可能性をチェックし、リスクを回避するための方策の1つを示している。次項で述べるウイルスクリアランス試験もさらに安全性の確保をより確実にするための方策である。

1.5 ウィルスクリアランスに関する工程の評価及び精製バルクでのウイルス試験実施要領

MCBを含めた細胞レベルにおいて適切で合理的なウイルス試験を実施すること及び製造工程の適切な段階の製品レベルにおいて適切で合理的なウイルス試験を実施することという2つの基本的アプ

ローチに加えて、未加工/未精製バルクからの製品の精製工程がいかにウイルスを不活化/除去できるかに関するクリアランス能力を適切に試験・評価することは、ウイルス安全性確保上もう1つの柱となるべき必要なアプローチである。このウイルスクリアランス試験のプロトコールの設定にあたっては、製品がウイルスに汚染されないことを最も確実にかつ合理的に保証することを目標とすべきである。

細胞レベルでのウイルス試験や未加工/未精製バルクでの試験結果により、ウイルスの存在の有無、同定の可否、存在ウイルスのヒトへの病原性の可能性が明らかになるが、これら様々なケースに応じて、ウイルス不活化/除去に関する工程の評価をどのように実施すべきか、あるいは精製バルクでどのように対応すべきかに関する考え方が表2に要約されている。ここでは、5つのケースを想定した上で、とるべき対応策を提示している。

例えば、ケースAは、細胞又は未加工/未精製バルク中にウイルス、ウイルス様粒子又はレトロウイルス様粒子のいずれの存在も認められないケースである。このケースでは、“非特異的モデルウイルス”を用いたクリアランスに関する「工程特性解析試験」は必要であるが、「工程評価試験」や精製バルクでの試験は不要である。

ケースBは、げっ歯動物のレトロウイルス(又は、げっ歯動物のA型粒子及びR型粒子のような非病原性であるとされているレトロウイルス様粒子)のみが細胞又は未加工/未精製バルク中に存在するケースである。本ケースではマウス白血病ウイルス(murine leukemia virus)等の“特異的モデルウイルス”を用いた「工程評価試験」が実施されるべきである。精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する適切な検出方法を用いて試験する必要がある。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも3ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出する必要がある。CHO, C127, BHK等の細胞株、及び

表2 ウイルスクリアランス工程評価と精製バルクにおけるウイルス試験に関する実施要領

	ケースA	ケースB	ケースC ²	ケースD ²	ケースE ²
[細胞や未精製バルクでのウイルス試験結果]					
ウイルスの存在 ¹	-	-	+	+	(+) ³
ウイルス様粒子の存在 ¹	-	-	-	-	(+) ³
レトロウイルス様粒子の存在 ¹	-	+	-	-	(+) ³
ウイルスの分離同定の否定	適用外	+	+	+	-
ウイルスのヒトへの感染性	適用外	- ⁴	- ⁴	+	未知
[必要とする対応]					
非特異的モデルウイルスを用いたウイルススクリアランスに関する工程特性解析試験	必要 ⁵	必要 ⁵	必要 ⁵	必要 ⁵	必要 ⁷
関連ウイルス又は特異的モデルウイルスを用いたウイルススクリアランスに関する工程評価試験	不要	必要 ⁶	必要 ⁶	必要 ⁶	必要 ⁷
精製目的産物でのウイルス否定試験	適用外	必要 ⁸	必要 ⁸	必要 ⁸	必要 ⁸

1. 細胞及び未加工/未精製バルクについてのウイルス試験の結果。ウイルスで汚染された細胞/培養液は、通常使用しない。MCBの構成要素の一部となっているレトロウイルス等の内在性ウイルスあるいはウイルス類が存在する細胞については、適切なウイルススクリアランス評価試験を行いさえすればその限りではない。
2. ウイルスに汚染された細胞及び未加工/未精製バルクの使用は、そのウイルスのヒトへの感染性及び病原性の有無にかかわらず、例外的な場合にしか認められない。
3. 未知のウイルス、ウイルス様粒子、又はレトロウイルス様粒子を直接あるいは間接法で検出。
4. 非病原性とされているケース。
5. “非特異的モデルウイルス”を用いたウイルススクリアランスに関する「工程特性解析試験」を実施すること。
6. “関連ウイルス”又は“特異的モデルウイルス”を用いたウイルススクリアランスに関する「工程評価試験」を実施すること。
7. ICHガイドライン本文のケースEの項を参照すること。
8. 精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する検出方法を用いてウイルスの存在を否定すること。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも3ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出すること。一方、細胞株における内在性レトロウイルス様粒子が十分に解析され、適切なクリアランスも示されている場合のCHO細胞などの例では、精製バルクでの非病原性レトロウイルス様粒子に関する試験は、通常不要である。

ネズミのハイブリドーマ細胞株は医薬品製造にしばしば用いられているが、ウイルス汚染に起因する安全上の問題は報告されていない。これらの細胞株の内在性レトロウイルス様粒子は十分に解析されており、“特異的モデルウイルス”を用いた「工程評価試験」も実施されることから、精製バルクでの内在性レトロウイルス様粒子に関する試験は、通常、不要である。なお、本ケースでも、ケースAと同様、“非特異的モデルウイルス”を用いた「工程特性解析試験」は実施する必要がある。

この「工程評価試験」及び「工程特性解析試

験」という2つのウイルススクリアランス試験については後に改めて述べる。

げっ歯類のレトロウイルス以外のウイルスに汚染されたケースは、通常、医薬品の製造方法としては不適切と考えられる。ケースC、D又はEでも医薬品製造の必要性が認められ、かつ理由を十分に説明できるという場合は、そのことの是非について、規制当局と協議する必要がある。ケースC、D及びEの場合、当該ウイルスを有効に不活化/除去することが検証された工程を製造工程中に有していることが重要である。

1.6 ウイルスクリアランス試験の目的

十分に特性解析された細胞株で過去にウイルス汚染による有害事象が発生した例はない。しかし、十分に特性解析された細胞株由来の製品においてもウイルススクリアランスに関する評価を行っておくことは、未知の、あるいは不測の有害ウイルスを除去できることへの一定限の保証になる。

表2に示したような方策においてウイルススクリアランス試験は特に中心的な役割を果たす。ウイルススクリアランス試験の目的は、ウイルス不活化や除去に有効であると考えられる工程について評価すること、それらの各工程を合わせて全体としてウイルスがどの程度減少したかを定量的に評価することにある。

この目的を達成するには、未加工/未精製バルクや、製造工程における様々な段階にしかるべき量のウイルスを意図的に添加(スパイク)し、以降のそれぞれの工程を経る間に添加されたウイルスがどの程度除去又は不活化されるかを示す必要がある。もし、いくつかのステップにより十分なクリアランスが示されるのであれば、必ずしも製造工程のすべての工程について「工程評価」又は「工程特性解析」する必要はない。しかし、評価対象以外のステップが、ウイルスの不活化/除去に関する結果に間接的に影響を与える可能性についても留意しておくべきである。ウイルススクリアランス試験に用いたアプローチについては十分な説明と妥当性を明らかにすることが求められる。

ウイルス量(ウイルス感染性)は、ウイルス粒子の除去又はウイルス感染性の不活化により減少する。ウイルススクリアランスに関して評価の対象とした各製造工程については、ウイルス量減少のメカニズムが不活化によるのか除去によるのかに関して推定し、可能な範囲で明らかにしておく必要がある。不活化を評価しようとする工程における試験に際しては、検体を時間を変えてサンプリングし、不活化曲線が描けるように計画すべきである。

1.7 ウイルスクリアランス工程評価及び工程特性解析：2つのアプローチ

ICHガイドラインのウイルススクリアランス試験には、ウイルススクリアランス「工程評価試験」と「工程特性解析試験」という2つの異なるアプローチが提示されている。

まず、「ウイルススクリアランス工程評価試験」とは、細胞基材や未加工/未精製バルクなどに存在が知られているか予測されるウイルスに関して製造工程が有する不活化/除去能力を解析することを目的に行う試験である。試験に用いるウイルスは、製造工程で使用される細胞基材、その他の試薬類や各種製造関連物質に混在することが知られているか、あるいは存在の可能性のあるウイルス類と同一かあるいは同種のウイルス(“関連ウイルス”)である。精製工程や不活化工程がこれら“関連ウイルス”を不活化/除去する能力を有することを示す必要がある。この“関連ウイルス”の入手が困難であったり、ウイルススクリアランスに関する「工程評価試験」にうまく適用できない(例えば*in vitro*で十分に高力価になるまで培養できない)場合には、代替として“特異的モデルウイルス”を用いることになる。適切な“特異的モデルウイルス”とは、存在が知られているかあるいは存在が疑われるウイルスに密接に関連しているウイルス、すなわち同一の属もしくは科のもので、検出されたウイルスあるいは存在が疑われるウイルスと類似した物理的、化学的性質を有するものである。

こうしたウイルスやそれらのクリアランスに関する「工程評価試験」とは別に、それ以外のウイルスを不活化/除去する能力に関する工程の特性を評価する試験を一般に行うべきであるとされている。これは、「ウイルススクリアランス工程特性解析試験」と呼ばれている。その目的は、ある工程がウイルスの除去や不活化に関して一般にどの程度の能力を有するかを解析すること、すなわち工程が確実にウイルススクリアランス能力を発揮するとい

う面での特性(robustness)を解析することである。この「工程特性解析試験」には、細胞基材などに存在が知られていないか、予測されていないウイルスで、かつ広範な生化学的・生物物理的性質を有する様々なウイルス(“非特異的モデルウイルス”)を用いる。この試験は特定のウイルスによるリスクに対する安全性を評価するために行うわけではない。したがって、クリアランスに関して特定の数値目標が達成される必要はないものである。

1.8 ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析のためのウイルスの選択

前項で述べたように、ウイルスクリアランス「工程評価試験」及び「工程特性解析試験」に使用されるウイルスとしては、それぞれ、“関連ウイルス”、“特異的モデルウイルス”あるいは“非特異的モデルウイルス”の範疇に属するウイルスを適切に選択すべきである。また選択したウイルスについては、個々のケースごとにその目的に照らした選択の妥当性を説明する必要がある。

すでに述べたように、げっ歯類由来の細胞株には通常内在性レトロウイルス粒子又はレトロウイルス様粒子が存在しており、それらには感染性のももの(C型粒子)又は非感染性のももの(細胞質A型又はR型粒子)がある。それらの細胞由来の生産物については、その製造工程がげっ歯類レトロウイルスを不活化/除去する能力を有していることを明らかにしておく必要がある。このためには、げっ歯類由来の細胞の場合、マウス白血病ウイルスを“特異的モデルウイルス”として用いる。エプスタインバーウイルス(EBV)によりBリンパ球を不死化することで得られたモノクローナル抗体を分泌するヒト細胞株の場合、その製造工程が、(何らかの)ヘルペスウイルスを不活化/除去する能力を有することを明らかにしておくべきである。シュードラピースウイルス(仮性狂犬病ウイルス)も“特異的モデルウイルス”として使用できる。

“関連ウイルス”や“特異的モデルウイルス”は、実際に存在するウイルスのクリアランスに関する「工程評価」に用いられるものである。したがって、これらを用いた試験では、存在が予測される量をはるかに上回る量がクリアランスされ、最終段階の製品には検出されないという評価が必要である。

「工程特性解析試験」は、ある工程が未知並びに不特定のウイルスの除去や不活化に関して一般にどの程度の能力を有するかを解析することが目的である。この目的に叶えば、“関連ウイルス”や“特異的モデルウイルス”を用いたいわゆる「工程評価試験」により得られたデータがこうした面での評価資料として利用できる場合もある。しかし、一般的には異なる性質を持つ様々な“非特異的モデルウイルス”を用いる必要がある。ウイルスタイプのすべてにわたって試験する必要はない。どのようなウイルスを何種類選択するかは、細胞株の品質とこれをどう解析したかやどのような製造工程であるかに依存するが、通常、異なる性質を持つ、少なくとも3種の異なるウイルスをクリアランスする能力について、製造工程を評価すべきであるとされている。例えば、RNAウイルスとDNAウイルス、エンベロープの有無、サイズの大小、熱や化学的処理に対する抵抗性が強いものなど、様々な要素をカバーするウイルスのセットを選ぶ必要がある。これにより、精製工程が有するウイルス不活化/除去に関する特性を把握できるであろうということである。用いたモデルウイルスに比較して類似した性質を持つ不特定ウイルスは同様の挙動を示し、また、熱や化学的処理などの処理に対してより抵抗性の低い不特定ウイルスやサイズの大きい不特定ウイルスは用いたモデルウイルス以上に効率よく不活化あるいは除去されるであろうとの想定のもとにモデルを選択する。実際には3種類以上の適切なウイルスを選べばこれらの条件は充たされると考えられる。

この“非特異的モデルウイルス”を用いた「工程特性解析試験」は、その趣旨から前述したケース

AからEのいずれのケースでも実施する必要がある。

なお、HIVをモデルウイルスに使うという考え方が依然ある。しかし、HIVは危険であること、HIVは熱等に弱いウイルスでそれでいくら高いクリアランス指数が得られたとしても他の不特定ウイルスのクリアランスの参考にはならないこと、他の適切なモデルウイルスのクリアランス指数が満足できるものであれば、HIVのクリアランスも保証できることなどの理由から、HIVを用いるクリアランス試験は推奨できない。物理的処理や化学的処理に対して特に抵抗性を示すウイルスの選択が優先されるべきである。それらのウイルスにより得られた結果は製造工程のウイルス不活化／除去能力についてのより一般的で有益な情報となる。

ICHガイドラインには、広範囲な物理的・化学的構造を示す有用なモデルウイルスの例、及び過去にウイルスクリアランス試験に使用された実績のあるウイルスの例が示されている。

ウイルスの選択に関連するその他の留意事項としては、

- a) 高力価の材料が調製できるウイルスが望ましい
 - b) 使用するそれぞれのウイルスの検出に関して、効果的で信頼性の高いアッセイ法が確立されている必要がある
 - c) ウイルスの選択にあたっては、クリアランス試験従事者に健康被害をもたらす可能性を考慮すべきである
- ことなどが挙げられる。

1.9 ウイルスクリアランスの工程評価試験及び工程特性解析試験のデザインと実施要領

ウイルスクリアランスの「工程評価試験」及び「工程特性解析試験」をデザインし実施していく上でどのような点に留意すべきかに関する要領がICHガイドラインにまとめられている。その要旨は以下のようなものである。

- 1) 試験はウイルスを取り扱う上で適切な設備を備えた製造施設とは別の実験施設で、精製工程のスケールダウンを設計し、準備に関与した製造担当者とウイルスの専門知識を有する者が共同して実施するべきである。
- 2) スケールダウンの妥当性を明らかにすること。スケールダウンした精製工程の各要素は、実際の製造工程をできるかぎり反映したものとすべきである。やむを得ない事情により実際の製造工程を反映させることができない場合には、それが結果へどのような影響を及ぼすかを考察しておくべきである。
- 3) 試験を行う際、2つ以上の製造工程についてそれらがどのようなウイルス不活化／除去能力を有するかを評価することが望ましい。ウイルスを不活化／除去することが予想される工程について、その能力を個々に評価し、それぞれが不活化工程なのか、除去工程なのか、あるいは不活化／除去いずれにも関与しているのかを慎重に検討・考察する必要がある。各工程での効果を適切に評価するために、試験に供する各工程段階の試料には十分な量のウイルスを添加すべきである。感染性を定量するためのアッセイは十分な感度と再現性を有し、統計的に意味あるものである必要がある。また、低濃度のウイルス試料を取り扱う場合、ウイルス試料のサンプリングの仕方によって生じる統計学上の問題を考慮に入れるべきである。
- 4) 評価対象の各工程におけるウイルス感染性低減の機序が不活化によるのか、除去によるのかを推測し、記述すべきである。製品の安全性を確保する上で(既存の)製造工程におけるクリアランスの達成度が低い場合には、状況に応じた特別な不活化／除去工程あるいは付加的な不活化／除去工程を導入すべきである。工程によっては、除去への寄与分と不活化への寄与分とを区別すべき場合もある。
- 5) ウイルスの不活化を評価するためには、未加

工/未精製の原材料(未加工/未精製バルク)あるいは中間製品に感染性のウイルスをスパイクし、減少度を計算すべきである。試験に際しては、時間を変えて検体をサンプリングし、不活化曲線が描けるように計画すべきである。不活化試験においては、最短曝露時間でのポイントに加えて、曝露ゼロ時より長く、かつ最短曝露時間よりも短い時間でのポイントを少なくとも1点はとることを勧める。

試験対象としているウイルスが、ヒトへの病原性が知られている“関連ウイルス”である場合には、その不活化に効果的な工程をクリアランス試験に組み込むよう計画し、さらに詳しいデータ(より多数のポイント)をとることが、特に重要である。

一方、“非特異的モデルウイルス”を用いた不活化試験、あるいはCHO細胞の細胞質に存在するレトロウイルス様粒子のようなウイルス粒子に対する“特異的モデルウイルス”を使用する不活化試験の場合には、少なくとも2回の独立した試験を実施してクリアランスにおいて再現性があることが示されればよい。

ウイルス負荷量は、可能な限り、スパイクした出発物質中のウイルス量の実測値に基づいて定めるべきである。これが不可能な場合、スパイクに用いられるウイルス溶液の力価からウイルス負荷量を算出することになる。

- 6) 精製工程に使用するクロマトグラフィー用カラムが繰り返し使用ができるかどうかを評価しておくこと。
- 7) その他の特別な留意事項を以下に示す。
 - a) 高力価のウイルスを調製する場合には凝集を避けるよう注意を払うこと。
 - b) 評価に値するウイルスアッセイ結果が得られるような最小ウイルス量に留意すること。
 - c) 力価を測定するにあたっては、並行したコントロール実験を含むこと。
 - d) 添加(スパイク)するウイルスは、製品の特

性を変えたり希釈することがないような少ない容量で製品に添加すること。

- e) 例えば、緩衝液、培地、あるいは試薬類におけるわずかな相違が、ウイルスクリアランスに大きな影響を及ぼす可能性についても留意すること。
- f) スパイクされた試料が特定の緩衝液あるいは特定のクロマトグラフィーカラム内に存在する時間の長さは、商業生産スケールの工程条件を反映したものであること。
- g) 緩衝液や製品のウイルス力価測定法に対する毒性作用又は干渉作用をそれぞれ個別に評価して、測定に支障のないような対策を講ずること。製品そのものが抗ウイルス活性を持っている場合、製品そのものは含まない条件下でのクリアランス試験を実施すること。また、例えば、透析、保存など、測定試料調製の手順による影響をみるために、同様な調製手順を経るコントロール試験も実施すること。
- h) 同様な緩衝液又はカラムを複数の精製工程で繰り返し使用するケースでは、データを解析する際に、この繰り返し使用の影響を考慮すべきである。ウイルス除去の効果は、その方法が使用される製造工程の段階により変化する可能性があることに留意すること。
- i) 総ウイルスクリアランス指数は、製造条件が非常に強い殺ウイルス性を有している場合あるいは緩衝液などが指示細胞に対し非常に強い毒性や殺ウイルス性を有している場合には過小評価される可能性があるため、ケース・バイ・ケースの考え方に立脚して考察すること。逆に総ウイルスクリアランス指数は、ウイルスクリアランス試験に固有の限界ないしは不適当な試験計画のために過大評価される場合もあることに留意すること。

1.10 ウイルスクリアランス試験の解釈

ウイルスの不活化／除去に関する評価の目的は、ウイルス不活化や除去に有効であると考えられる工程について「工程評価」及び「工程特性解析」すること、並びに、それらの各工程を合わせて全体としてウイルスがどの程度減少したかを定量的に評価することにある。表2のケースBからEのようにウイルス汚染がみられる場合、当該ウイルスが除去あるいは不活化されたということのみでなく、ウイルススクリアランスに関して必要な程度を上まわる能力が精製工程に組み込まれていて、最終製品の安全性が適切なレベルに確保されていることを示すことが重要である。

精製工程全体をとおして評価した場合、1回の臨床投与量に相当する未加工／未精製バルク中に存在すると推定されるウイルス量よりはるかに上まわるウイルス量を排除することができなければならない。

スクリアランスの機構はウイルスの種類によって異なる可能性があることを認識する必要がある。

ウイルス不活化／除去工程の有効性に関するデータを評価する際には、以下のような様々な要因を組み合わせて考察する必要がある。

- ① 試験に使用されたウイルスの適切さ
- ② クリアランス試験のデザイン
- ③ 対数で表されるウイルス減少度
- ④ 不活化の時間依存性
- ⑤ ウイルス不活化／除去に関するプロセス・パラメーターのばらつきによる影響
- ⑥ ウイルスアッセイ法の感度
- ⑦ ある不活化／除去工程が特定種類のウイルスに特に有効である可能性

ウイルススクリアランスは、例えば、不活化工程が2段階以上ある場合、相互補完的分離工程が複数ある場合、あるいは不活化及び分離工程が複数組み合わされたような場合に効果的に達成される。

少なくとも2回以上の独立した試験により添加

ウイルス量の低減に再現性があることを立証する必要がある。

総クリアランス指数は、通常、個々のクリアランス指数の総和として示される。しかし、ウイルス力価の除去が $1 \log_{10}$ 以下の場合には、合理的な理由がない限り加算しない。

ウイルススクリアランスが製品の安全性確保にとって重要な因子と考えられるにもかかわらず、製造工程による感染性に関するクリアランスの達成度が不十分である場合には、1つ又は複数の特別な不活化／除去工程あるいは追加的な不活化／除去工程を新たに導入すべきである。

1.11 ウイルスクリアランス試験の限界

ウイルススクリアランス試験は、最終製品がウイルス安全面からみて受け入れられるレベルに達しているという確証を得るのに寄与はするが、それそのものが安全性を保証する訳ではない。また、ウイルススクリアランス試験のデザインや実施に係わる以下のような様々な要因が製造工程のウイルス感染性除去能力について誤った評価に導くおそれもある。

- 1) 組織培養ウイルスの挙動は自然界に存在するウイルスの挙動とは異なっている可能性がある(例：純度や凝集の程度)。
- 2) ウイルス感染性の不活化は、急速な初期相とそれに続く遅い相からなる二相性の曲線を示すことが多い。そのような工程で不活化を免れたウイルスは次の不活化工程でより強い抵抗力を示す可能性がある。
- 3) 総クリアランス指数は、対数で表された各精製段階での減少度を加算することにより算出されるが、こうして複数の工程、特に $1 \log_{10}$ 以下の工程の減少度を加算すると、工程全体をとおしてのウイルス除去能力を過大評価してしまう可能性がある。なお、同一又は近似した方法を繰り返して達成されたクリアラン

ウイルス指数は、合理的な理由がない限り加算するべきでない。

- 4) ウイルス力価の減少度を対数で表してクリアランス指数とするため、残存感染性ウイルス量が著しく低減することは示せるが、力価は決してゼロにはならないという限界がある。例えば、mLあたり $8 \log_{10}$ 感染単位を含む標品から感染性が $8 \log_{10}$ 低減したとしても、試験の検出限界をも考慮すれば、mLあたりゼロ \log_{10} すなわち1感染単位を残していることになる。
- 5) スケールダウンした工程のデザインに万全を期したとしても実生産スケールとスケールダウン工程に違いが生じる可能性がある。
- 6) 製造工程中の類似の不活化機構で得られた各ウイルスクリアランス指数を加算することにより総クリアランス能を過大評価する可能性がある。

1.12 統計

ウイルスクリアランス試験における結果の評価にあたっては統計学的手法を活用してデータを解析する必要がある。また、得られた結論が支持されるためには、試験結果の妥当性が統計的に検証されたものである必要がある。

1.13 ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合

生産工程あるいは精製工程を変更する場合には、必ずその変更がウイルスクリアランス能力に関して、直接あるいは間接に影響しないかを考慮し、必要に応じてシステムを再度検証する必要がある。例えば、生産工程を変更すると細胞株によって生み出されるウイルス量に重大な変化を引き起こす可能性がある。また、精製工程を変更するとウイルスクリアランスの程度が変わる可能性がある。

1.14 他の生物薬品へのICHウイルスガイドラインの適用

ICHガイドラインは、ウイルス汚染の危険性を評価し、製品からウイルスを排除し、もって、ヒト又は動物細胞由来の安全な組換え医薬品や細胞培養医薬品を製造するためにどのようなアプローチをすればよいかを示唆している。当該分野においては、最も精緻を極め、国際的に認知された権威のあるガイドラインである。そして、ここに述べられている基本的考え方は生体材料からとる生物薬品のウイルス安全性評価、あるいは血液製剤のウイルスの安全性評価に関しても、概念としては同じように適用ができるものであると考えられる。再度要約すると以下のようなものになる。

- A) 出発素材その他製造関連物質におけるウイルス混入の可能性を避けるようその選択を厳密に行うとともに、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を確認すること。
- B) ウイルスが存在した場合、その同定と、どの程度ヒトへの有害性が高いかを決定すること。
- C) 製造段階の適切な段階においてウイルスを検出するための適切な試験を実施すること。
- D) 周到なウイルスクリアランス試験計画を立てること。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。
- E) ウイルス不活化及び除去を評価する試験を実施すること。

2. 細菌、真菌

医薬品製造工程や製品のいずれの段階においても、細菌や真菌による汚染を回避すべきことは、論をまたない。細胞基材及び規格に関するICHガイドラインにおいても、細胞基材及び製品の段階における無菌性等の立証の必要性が述べられている。

医薬品製造基材となる動物細胞においては、MCB及びWCBそれぞれについて全容器数の1%でかつ2本以上を試験対象として、例えば、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を用いて、細菌や真菌の存在を否定する試験を実施すべきであるとされている。

微生物のセル・バンク中への外来性の微生物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、実施すべきであるとされている。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により、バンク中にすでに存在する混入物を検出することを目指す。

ICHガイドラインには、製造工程管理を全般的に対象とするものが未だ作成されていない。したがって、培養終了後の細胞培養液あるいは未加工/未精製バルクでの無菌試験等に関する直接的な言及は既存のガイドラインにはないが、必要に応じてこのレベルにおける適切な無菌試験等の実施を考慮する必要がある。

製剤レベルでは、剤形等に応じて薬局方で定められた規定やそれに準拠する考え方により微生物限度試験法又は無菌試験法を実施する。

いずれのレベルの試験に際しても、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与える影響を考慮すべきである。

これらの無菌試験等で微生物汚染に関してシロであるべきことはいうまでもないが、これらの試験が限られた範囲での無菌性等を保証するための手段であることも十分認識しておく必要がある。製品における無菌性等を保証するための重要なも

う1つのポイントは、一連の無菌操作法の設定やバリデーション等を含め、製造工程をいかに目的に叶うよう適切に構築し、その妥当性を検証し、管理するかにある。

3. マイコプラズマ

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、人工培地に発育可能な最小の微生物である。動植物界に広く分布するが、宿主特異性が強く、それぞれの動物種には固有のマイコプラズマが感染する傾向を示す。しかし培養細胞に対しては細胞培養作業従事者や培地に添加される血清等を介して種を超えて感染し、細胞膜に付着して増殖することが知られている。マイコプラズマ汚染は培養細胞に高頻度に認められるが、汚染しても細胞傷害活性を示すことは少なく不顕性感染となるため看過されやすい。一方でマイコプラズマの汚染により細胞本来の機能や性質が様々に影響を受けることが知られており、汚染細胞を用いて医薬品が製造されると重大な事態を招く可能性がある。1度マイコプラズマに汚染された細胞から完全にマイコプラズマを除去することは極めて困難である。したがって、医薬品の製造に用いる細胞基材については、その時点で最良の方法を用いて高感度で迅速なマイコプラズマ試験を行い、汚染されていないことを確認することが必要である。

3.1 各公定書等でのマイコプラズマ否定試験

医薬品の製造に用いる細胞基材及び最終製品に対するマイコプラズマ否定試験は、日本薬局方(JP)、FDA/PTC(FDA Points to Consider in Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologics, Attachment #2: Recommended procedures for detection of mycoplasma contamination in biological products produced in cell substrates ; 1993)、ヨーロッパ薬局方(Ph. Eur.)、

米国連邦規則集(CFR 610.30), WHO ガイドライン, 及び生物学的製剤基準(マイコプラズマ否定試験法; 1993)などに収載されている。さらにバイオ工業製品の原材料や培養細胞の標準化・品質管理を目的として制定された JIS にもマイコプラズマ検出法が示されている。

マイコプラズマが細胞膜に付着して増殖するという特性を考えると, 組換え医薬品や細胞培養医薬品にあつては細胞基材での否定試験の実施がキーポイントになる。上記各ガイドラインのうち培養細胞を対象とした試験法を設定しているのは JP (MCB, WCB, 及びそれに由来する医薬品製造工程中の培養細胞: 当該細胞を用いて目的物質を産生する工程の培養終了後ないし培養終了前の細胞; ICH ガイドラインでの Cells at the Limit に相当), FDA/PTC MCB, 細胞基材, ワーキングセルストック, ウイルスシード, 製品ハーベスト濃縮液を対象), Ph. Eur. (MCB, WCB, ウイルスシードロット, コントロール細胞を対象)であり, 生物学的製剤基準, CFR, WHO のガイドラインはウイルスワクチン(濾過前, 不活化前)や製剤等の最終製品のみを対象としている。

ICH 細胞基材に関するガイドラインでは, マイコプラズマの存在を否定するための試験について, MCB 及び WCB で行うべきことを勧告している。現行の方法で適切と思われるものとして, 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を挙げ, 具体的なマイコプラズマ否定試験法の例は, Ph. Eur., JP 又は FDA/PTC にあるとしている。試験にあつては, 一般的に, 容器 1 本の細胞を用いた試験で十分とされている。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可能性もあり, 適切な方法については規制当局に相談することを勧告している。

3.2 日本薬局方におけるマイコプラズマ否定試験

日本薬局方(JP)では, 培養法(寒天及び液体培地法), 指標細胞を用いた DNA 染色法(指標細胞培養法), PCR 法をマイコプラズマ検出方法として挙げ, その利用の仕方及び詳細な操作法について述べている。

培養法は, マイコプラズマを培養・増殖させて顕微鏡下, コロニー形成を観察することにより判定する直接的検出法であり, 陽性の判定が得られた場合には最も確実な証明といえる。しかし, 熟練を要する方法であり, 14 日間~21 日間と長期間の培養が必要である。また, マイコプラズマの中には培養法では増殖しないために検出できない菌も存在することから, 陰性の判定には慎重さが必要と考えられる。いずれにしても培養法は従来最も代表的な試験法として各国で用いられてきた実績やデータの蓄積もあることから, JP でも基本となる試験法と位置づけられている。

DNA 染色法は, 指標細胞を用いて検体中のマイコプラズマを増殖させ, DNA 特異的蛍光色素により染色し, マイコプラズマを細胞核外の微小な DNA 蛍光斑点として検出する方法である。しかし, DNA を染色する方法自体は必ずしもマイコプラズマ DNA に特異的なものではなく間接的検出法であり, フラグメント化した細胞由来 DNA 等と紛らわしい場合もある。

PCR 法は最近注目されている検出方法で, 極めて微量のマイコプラズマ DNA でも特異的なプライマーを用いて増幅することにより検出することが理論的には可能である。比較的最近確立された方法であるため JP や JIS 以外のいずれのガイドラインや公定書でも現時点では採用されていない。JP では, 簡便さ, 迅速性, 検出感度, 特異性に優れていること, マイコプラズマ試験法の種類はなるべく多く, 選択肢が広く, 目的に応じた柔軟な活用が可能ないようにしておくのがよいと考えら

れたところから、方法の1つとしてPCR法が例示されている。しかし、PCR法で陽性反応を得ても必ずしも増殖能のあるマイコプラズマの存在を意味するものではなく死菌も検出する可能性があり、また試験の検出感度や特異性はプライマーの選択により変わってくることや、欧米での採用が未だなされていないこと、広範なマイコプラズマに対応するプライマーを用いたとしても全てのマイコプラズマを検出することは困難であることなどの問題点も多く指摘されている。

このようにいずれの方法にも一長一短があることから、検出法としては単独の試験ではなく複数の方法を組み合わせて厳密に行うことが必要と考えられる。

結論として、JPではMCB、WCB、培養終了後の細胞の試験についていずれも、「培養法とDNA染色法による試験を実施する」としている。ただし、「DNA染色法はマイコプラズマ由来以外のDNAも検出するので、DNA染色法のみ陽性を示した場合はPCR法によりマイコプラズマの存在を否定することも考えられる」としてPCR法の活用の仕方があるとしている。この場合、PCR法に用いるプライマーその他の試薬や反応条件を含めた試験方法の選択、方法の感度と特異性及び検体調製の妥当性を含め、マイコプラズマの存在を否定できると判定した合理的な理由を示す必要がある。

3.3 培養法(寒天及び液体培地法)

培地の性能試験に適合する寒天平板培地と液体培地の両方に検体(細胞懸濁液)を一定量(寒天培地:0.2 mL, 液体培地:10 mL)以上接種し、液体培地からは一定期間培養後、寒天培地に移植して14日間(EP以外)培養し、顕微鏡でマイコプラズマの集落の有無を観察するという方法である。試験法概要は次のとおりである。

① 検体(細胞懸濁液)を寒天平板培地と液体培地に接種する。

- ② 寒天培地は4枚以上に接種し、半数ずつ嫌気的条件と好気的条件下で14日間以上培養を行う。
- ③ 液体培地は2本に接種し、それぞれ1本ずつ嫌気的条件下と好気的条件下で培養する。培養開始後、3日目、7日目及び14日目の3回、寒天培地に移植する。
- ④ 液体培地より移植する寒天培地の枚数は嫌気的条件下と好気的条件下で培養したものに対してそれぞれ2枚以上とし、同条件下で14日間以上培養する。
- ⑤ 7日目及び14日目に集落の有無を100倍以上の倍率の顕微鏡で観察する。
- ⑥ 培地の性能試験の陽性対照としては、公的又は適当と認められた機関より入手後、適切に管理されたマイコプラズマ株、*M. pneumoniae* FH又は同等の種又は株及び*M. orale* CH 19299又は同等の種又は株を用い、100 CFU以下で培地に接種する。

3.4 指標細胞を用いたDNA染色法(指標細胞培養法)

JP法の原理はFDA/PTC, Ph. Eur. とほぼ同様で、Vero細胞を指標細胞とし、検体を2枚以上の細胞培養ディッシュに接種して培養後、DNAを蛍光染色して蛍光顕微鏡で観察するというものである。試験方法の要点は、

- ① DNA染色法は培養法と合わせて実施する。
- ② Vero細胞を指標細胞とするが、感度的に同等であれば他の細胞を用いてもよい。
- ③ 検体(細胞培養上清)0.5 mL以上を2枚以上の細胞培養ディッシュに接種する。
- ④ 陽性対照としては*M. hyorhinis* (DBS 1050)及び*M. orale* (CH 19299)について100 CFU以下の接種を行う。
- ⑤ 培養期間は3~6日間。
- ⑥ 鏡検は倍率400~600倍又はそれ以上の蛍光顕微鏡で行う。

- ⑦ 細胞核を囲むように微小な核外蛍光斑点を持つ細胞が1,000個のうち5個(0.5%)以上で陽性とする。

ことなどである。

3.5 PCR法

PCR法は比較的新しい方法でJP及びJIS以外ではどの国の公的ガイドラインにも採用されていない。

PCR法ではプライマーの選択が検出法としての妥当性を決めることになる。マイコプラズマのゲノムは異種間でよく保存されているrRNAオペロンを共有していることが知られている。そのため、比較的多くのマイコプラズマを検出する領域として、rRNAオペロン内の16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から、異種間で相同性のある領域を選択したプライマーが現在よく用いられている。さらに1次プライマー(アウタープライマー)の内側に2次プライマー(インナープライマー)を設定し、1段目のPCRを鋳型として2段階PCR(ネステッドPCR)を行うことにより検出感度を高めるとともに、特異性を確認することが可能である。しかし、構造未知の菌種もあり、これらがすべてのマイコプラズマ属に共通で、しかも同程度の反応性を持ったPCRプライマーセットというわけではなく、今後の研究の進展によって別の領域がより妥当であることも考えられることから、試験法としてはプライマーの領域を例示はしても固定的に指定するべきではないとされている。また、PCR法は簡便ではあるが、PCR法で陽性反応を得ても必ずしも増殖性のあるマイコプラズマの存在を意味するものではないことがPCR法をマイコプラズマ否定試験として採用することに対する懸念となっている。JIS試験法では、PCR法は不活性菌を検出する可能性があるため培養法又はDNA染色法との併用が必要であると結論し、例示したプライマーの適用範囲(菌種)も限定するなどPCR法の限界を認めた上で、

自己増殖能の必要な試験法(培養法、DNA染色法)が個々のマイコプラズマの培養系への適応性から必ずしも全てのマイコプラズマ種を検出できるわけではない点を補完し、広くマイコプラズマ汚染の可能性を検索するのに適した方法であるとされている。JP試験法では、

① PCR法によるマイコプラズマ検出は選択したプライマーに依存すること

② PCR法による検出の実績、データの蓄積が少ないこと

など、確実なマイコプラズマ否定試験として認知されていないことなどを背景に、現時点では、培養法及びDNA染色法による判定の補助的な試験法として捉えるのが現実的としている。しかし今後のデータの蓄積次第では試験法としての重要性が増すことも考えられる。したがって、JP試験法ではPCR法を補助的な試験法として取り扱うこととする一方で、プライマーや反応液の組成、反応条件等を操作法の例として明示することにより、感度、特異性の高い試験の実施が可能となるよう措置している。そこで例示されたプライマーは16S-23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域に対応するものであり、培養細胞を汚染しているとして文献上報告されているマイコプラズマ種(アコレプラズマ種を含む)の95%以上は検出可能と推定されるものである。もちろん、これらのプライマー、試液や反応条件等は例示の方法に限定されるものではないことも明示されている。

また、PCR法は不活性菌を検出することが欠点とされているが、試験対象の培養細胞から直接検体を調製する代わりにいったんVero細胞を用いてマイコプラズマを増殖させた後にDNAを調製してPCRを行うという、いわば指標細胞培養法とPCR法の利点を合わせれば、PCR試験法で検出されたDNAが感染性マイコプラズマ由来であることを保証することが可能であるとの改良法も提案されている。この方法により陽性と出た場合には、感染性マイコプラズマ陽性と判断するこ

とができる。このような観点から、JP法では、Vero細胞でマイコプラズマを増殖させる方法についても合わせて記載されている。

3.6 バイオ医薬品についてのマイコプラズマ否定試験法の国際調和

ICH細胞基材ガイドラインでは、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、それを用いるべきであると述べられている。

JP法は、試験法を作成する経緯の中で、FDA/PTCやPh. Eur.等の関連文書を参照して国際調和に努め、将来、3極間での国際調和マイコプラズマ試験法案が作成されるとしたときに備え、可能な限りそれに近い形になっているという方向を目指したものである。

3.7 関連生物学的製剤等におけるマイコプラズマ否定試験

生物学的製剤については、前述したように、生物学的製剤基準に製剤を対象としたマイコプラズマ否定試験法が収載されている。JP法は医薬品の製造に用いる細胞基材を対象としているが、細胞基材の適応範囲は以下に示す事情を勘案してバンク化された細胞に由来するものに限定し、MCB、WCB、及びそれに由来する医薬品製造工程中の培養細胞としている。ワクチン類等の製造に用いる動物組織、鶏胚細胞、サル腎初代培養細胞等については、JP法が対象とする培養細胞の範囲には含まれてはいない。これは、初代培養細胞の場合、たとえマイコプラズマが混入しても増殖期間が短いためほとんど無視できること、動物や鶏卵を個体別に全て試験し評価することは不可能なこと、またこれら動物個体に由来する初代培養細胞に対するマイコプラズマ試験は極めて困難なこと、さらにこれらを生産基材とする生物学的

製剤においては製剤のバルクレベルで厳密に試験するアプローチがなされていること、などの理由からである。なお、製造工程に不活化工程が入る生物学的製剤については、培養細胞レベルでの試験は不要とされていることから、これもJP法の対象から除外されている。結局、バンク化された細胞から生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)を生産する一連の製造過程における細胞基材のマイコプラズマ否定試験がJP法の適用範囲である。

先に述べたように、バンク化された細胞由来の組換え医薬品や細胞培養医薬品の場合、マイコプラズマが細胞膜に付着して増殖する特性を有すること、製品は細胞培養終了後高度に精製されるタンパク質であることなどを考慮すれば、細胞基材のレベルで適切なマイコプラズマ否定試験を実施しておくことがキーポイントであると考えられる。組換え医薬品や細胞培養医薬品については、一般に、製品レベルでマイコプラズマ否定試験を実施する必要があるとは考えられていない。

4. プリオン

プリオンは、いわゆるプリオン病、伝達性海綿状脳症(Transmissible Spongiform Encephalopathies : TSEs)の病原体として説明されているものである。その主体はプリオンタンパクである。もともと正常な生体にも存在する遺伝子の発現タンパク質であるが、プリオンの感染や他の宿主因子も関与する何らかの原因で質的变化をきたし、凝集した異常プリオンタンパクとして脳内に蓄積して神経細胞を傷害し、TSEsの発症原因となるとされている。

TSEsは、ヒトでは変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(variant Creutzfeldt-Jakob disease : vCJD)、ウシではウシ海綿状脳症(Bovine Spongiform Encephalopathy : BSE)、ヒツジやヤギではスクレイピー、シカではChronic Wasting Disease(CWD)

と呼ばれている。

プリオン病原体の感染には異常プリオンタンパク以外の因子の関与も想定されている。異常プリオンタンパクは他の因子とともに正常プリオンタンパクを異常プリオンタンパクに変換する。

生化学的には、異常プリオンタンパクはタンパク分解酵素(プロテナーゼK)に抵抗性を示すが、正常タンパクは抵抗性を示さないことで区別される。現在ほとんどの生化学的手法によるプリオン検出法は、この性質をもとにしたものである。すなわち、試料タンパクをプロテナーゼKで処理した後、さらに各種のタンパク質識別・検出法(電気泳動法、免疫化学的方法など)を組み合わせて特異性や感度を高めた試験法が用いられている。他に前処理に高選択的に異常プリオンタンパクをリガンドするポリマーを使用する方法や、異常プリオンタンパクの変性条件下と未変性条件下での抗正常プリオンタンパク抗体に対する反応性の差を利用するなど、プロテナーゼKを用いない迅速測定キットが実用化されている。感染性試験はマウス脳内接種で行われているが、試験期間はトランスジェニックマウスを用いて発症を早めた場合でも平均160日位、通常は600日程度を必要とするとされている。生化学試験においては、迅速性、簡便性はかなり改善されてきたものの、感染性試験とともにいずれも、生体試料中の感染性異常プリオンタンパクを特異的に、かつ高感度に検出するという理想にはまだ及ばない試験法で、汚染状況の迅速な把握や、品質管理手段としての実用性に乏しいのが現状である。

4.1 バイオ医薬品の安全性確保面からみたプリオン対策

バイオ医薬品の安全性確保面からみた感染性物質対策は、一般に、細胞基材、原材料、製品等での混在否定試験及び製造工程のクリアランスに関する評価試験の実施である。しかし、プリオンの感染性を効果的に、確実に不活化させるのには、相

当激しい物理的処理(高温、高圧)あるいは化学的処理が必要とされ、タンパク性医薬品の製造工程にそのような処理工程を導入するのは、まず、不可能である。除去に関しては、日本では2003年に血漿分画製剤の製造業者に対し、クリアランス試験等のバリデーションを実施するよう指導がなされ、各社からの報告がまとめられている。その結果から、従来の血漿分画製剤の製造工程で用いられてきたエタノール分画処理、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及び限外濾過が異常プリオンタンパクの除去にある程度の効果があると考えられている。しかしながらクリアランス試験の実施及び評価方法についてはスパイク試料の調製方法が統一されていない等、コンセンサスの得られた方法が無く、またバイオ医薬品製造工程中での異常プリオンタンパクの存在状態や人への感染のしくみも未解明であるため、当該試験の結果をもってバイオ医薬品の信頼できるプリオン感染性リスク評価を行える状況ではない。

以上のような事情を踏まえれば、現実的にとり得る手段は自ずと定まってくる。それはプリオン伝搬や汚染の原因となる可能性が考えられる要素を極力排除することである。

4.2 プリオン伝搬や汚染の原因となる可能性が考えられる要素とその排除策

プリオンによる伝搬や汚染を極力回避するための具体的手段は、

- ① スクレイピー、BSE、変異型CJDなどのTSEs発生地域(国)、リスクの高い地域(国)、及びリスク不明国由来の関連物質の使用を避けること
- ② スクレイピー、BSE、CJD等を発症している個体由来の物質の使用を避けること
- ③ リスクの高い器官、臓器、細胞等に由来する物質の使用を避けること
- ④ TSEsの発生状況、プリオンに関する疫学的

調査結果あるいは研究成果等に関する情報を収集して的確に対応すること

などである。

組換え医薬品や細胞培養医薬品などのバイオ医薬品の製造にあたって、ヒトや動物由来の素材/原材料が使用される局面を考えると、理論的には、

- ① 細胞基材
- ② 培地成分
- ③ 酵素等の製品加工のための生化学試薬
- ④ 製品への添加剤(添加剤としての血液製剤を含む)等の原料

としての使用がある。

このうち、①細胞基材については、とりあえず、ヒト又はウシ、ヒツジ、ヤギ、シカなどの動物由来のものが問題となるが、現在のところ、ヒト以外の細胞基材は医薬品生産には用いられていない。ヒト由来の細胞の場合は、対策として徹底的なドナースクリーニング及びその後の経過観察が可能である。現在用いられているヒト細胞株については、プリオンに関する問題提起はない。また、バイオ医薬品生産における細胞基材をめぐる状況を想定した場合、一般に種細胞/クローン細胞、MCB、WCBと培養を繰り返し、さらにWCBをもとに大量培養をするという経緯を辿る。もとの細胞は、いわば大幅に希釈されるので、細胞基材に由来して製品にプリオンが伝搬し、汚染が広がることは極めて考えにくい。現在までのところ国際的にも、既存の細胞基材がTSEs対策上の話題になったこともない。もともと、医薬品生産における細胞基材、特に親細胞とは、一般に不特定多数のものを次々と使用するものではなく、多くの選択肢の中から厳密な基準で選択を重ね、その上で樹立することが可能なものであり、また、いったん樹立された細胞株は、バンク化することでその品質の恒常性を確保できるものでもある。細胞基材はプリオン汚染のリスクを回避するための適切な対策や管理がしやすいものであるといえる。

次に、②培地成分、③酵素等の製品加工のため

の生化学試薬、④製品への添加剤(添加剤としての血液製剤を含む)の原料については、地域、動物の種類、個体のTSEs発生状況、採取部位などに着目した対応をする必要がある。このうち、組換え医薬品を含む生物製品等の製造において、実際に問題になるのはウシ及びヒトである。

ウシ等由来原材料に関する取り扱いについては、以下の対応がなされている。

ウシ及びその他類縁反芻動物(以下「ウシ等」という。)由来物を原料として製造される医薬品、医療用具、医薬部外品及び化粧品(以下「医薬品等」という。)については、厚生省医薬安全局長より、平成12年12月12日に「ウシ等由来物を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(以下「医薬発第1226号」という。)の通知が出された。これは、当時の欧州におけるBSEの発生動向を踏まえ、ウシ等に由来する原料(以下「ウシ等由来原料」という。)を用いて製造される医薬品等(以下「ウシ等由来医薬品等」という。)について、製造業者、輸入販売業者及び外国製造業者の国内管理人(以下「製造業者等」という。)において品質及び安全性確保対策を講ずることが必要と考えられたことから、製造業者等による自主点検及び承認書の整備等を行うよう通知されたものである。医薬発第1226号によれば、「ウシ等由来医薬品等の範囲」として、専ら人体に直接使用されないもの(体外診断用医薬品)を除く、

- (1)ウシ等の細胞・組織から構成される医薬品等
- (2)ウシ等の細胞・組織からの抽出物又は分泌物に由来する成分を含有する医薬品等
- (3)ウシ等の尿、血液等からの抽出物に由来する成分を含有する医薬品等
- (4)ウシ等由来細胞に対して細胞培養又は遺伝子組換え技術を応用して製造される医薬品等
- (5)添加剤(製造過程の培地を含む。)として上記(1)から(4)までの成分を用いて製造される医薬品等

が含まれている。さらに、医薬発第1226号通知

では、ウシ等由来医薬品等については、製造業者等の責任において、その品質及び安全性を確保するため、自主点検を実施することを求めている。その内容は、

- (1) ウシ等由来医薬品等に使用されるウシ等由来原料(細胞・組織、血清、尿等)の原産国、ウシ等の使用部位、これらに対して実施されるBSE感染がないことを確保する措置の内容(検査項目、検査方法及び処理方法を含む。)等がBSEの伝搬の防止の観点から適切なものかどうかを確認すること
- (2) 「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(案)：当時」等を参考とし、原料等を含む製造管理及び品質管理が適切に行われ、記録が保管されていることを確認すること。特に、ウシ等由来原料については、原産国、製造元、と殺場所、処理方法、使用部位等をロットごとに確認できる証明書等の記録が必要であること
- (3) 外国で使用されている物であって当該医薬品又は医療用具と成分が同一性を有すると認められるものに係る製造、輸入又は販売の中止、回収、廃棄その他保健衛生上の危害の発生により講じられ又はその発生を防止するために講じられた外国措置情報を迅速に収集することなどである。

この通知に続き、平成13年9月の国内初BSE感染牛の発見を踏まえ、ウシ等由来医薬品、医療用具等の一層の安全対策を強化するための予防措置とし、平成13年10月2日に「ウシ等由来物を原料として製造される医薬品、医療用具等の品質及び安全性確保の強化について」(以下「医薬発第1069号」という。)の通知が出された。その後も各国のサーベイランス等による新たなBSE発生情報を反映してBSE発生国やBSE発生リスク国のリストの改訂(平成14年8月27日医薬発第0827002号)、プリオン研究の成果や国際動向を踏まえた措置、平成15年4月14日「ウシ等由来

物及び人由来物を原料として製造される医薬品、医療用具等の品質及び安全性確保の強化について」(以下「医薬発第0414004号」という。)が追加通知されている。医薬発第0414004号では使用部位等からみて注意すべき事項として、以下の4項目が挙げられている。

- (1) 原材料に関するBSE感染リスクが高い部位の汚染を防止するための対応を行うこと。
- (2) 医薬品、医療用具等の製造に使用するウシ等の血液、体液等については、と畜前に採取したものであること。また、胎児血清については、胎盤、子宮等の母獣由来の臓器・組織の汚染がない方法で採取されたものであること。
- (3) ウシ等由来原料として、頭骨、脊椎、三叉神経節、背根神経節を原産国にかかわらず医薬品、医療用具等の製造に使用してはならないこと。ただし、ゼラチン等の製造に用いる骨については、これらの部位が分離できない場合であっても、ゼラチン等の製造工程においてアルカリ処理(pH 12.5を超える石灰溶液で20~50日浸漬したのち、138-140℃で4秒間滅菌する方法及びそれと同等の方法(平成13年10月16日医薬発第1434号医薬局審査管理課長通知の記の7の(2)参照))を施すものについては、異常プリオンの不活化効果を勘案し、欧州委員会における地理的リスク評価(以下「GBR」という。)が1の国を原産国とするもの及びGBRが2であって、先述した1069号通知の記の2の(1)の②に示された内容を満たすことが確認できるものはその限りではないこと。なお、GBRが2の原産国についてはBSE対策に関して欧州委員会による一定の評価を受けている国であることから、当該条件の(ア)及び(イ)は、確保されていると見なすことができるものであること。
- (4) ウシ等由来原料として、脳心臓浸出液(BHI)を使用しないこと。なお、ワクチン等の製造におけるマスターシードの構築等に用いていないか等について製造業者・輸入業者等にお