

(残存DNAのがん原性についての記述、略)

You should measure the amount and size distribution of residual DNA in your final product. For widely used human diploid cell strains, such as MRC-5 and WI-38 cells, measurement of residual DNA might be unnecessary because we do not consider residual DNA from these human diploid cells to be a safety issue. We might require limitation of the amount of residual DNA, depending on the potential risks associated with that DNA, for human diploid or primary cell types for which there is less experience. You should limit residual DNA for continuous non-tumorigenic cells, such as low-passage Vero cells, to less than 10 ng/dose for parenteral inoculation as recommended by WHO. Because orally administered DNA is taken up approximately 10,000-fold less efficiently than parenterally administered DNA, we recommend limiting DNA to less than 100 µg/dose for oral vaccines. If you are using cells with tumorigenic phenotypes or other characteristics that give rise to special concerns, more stringent limitation of residual DNA quantities might be needed to assure product safety.

3. General Safety Test (GST)

The requirements for, and the exceptions and criteria for exception from, the GST are set forth in 21 CFR 610.11.

要点は「残存細胞や残存DNAの否定試験やプロセスコントロール、その他21 CFR610.11に定められた一般的な安全性試験が要求される」「残存DNAの許容量は細胞基材の腫瘍原性の有無や、作製した製剤を注射用に供するか、経口投与に供するか、あるいは特段の状況を勘案して安全性に資するよう決定されるべき」である。

EMA/CPMP/SWP/465/95には以下の通りに記載されている。

P3: Potential safety concerns associated with vaccines include general systemic toxicity, (paradoxical) enhancement of the intended disease, induction of local toxicity, pyrogenicity, adverse immunologic effects such as autoimmunity or sensitisation, and in some cases teratogenic/reproductive effects. Historically, serious neurological events have been associated with the use of some vaccines. The availability of animal models to address these issues should be considered in the development of a new vaccine.

P4: The applicant should consider the following points on a case by case basis:

- Where appropriate, specific consideration should be given to immunological aspects of toxicity, such as production of complexes with host immunoglobulins (e.g. antibody-dependent enhancement of disease) or release of immunofunctional molecules, (e.g. cytokines) affecting functions of the immune system.
- Hypersensitivity reactions, induced by the antigen itself, by antigens (toxins) modified in new ways (new detoxification procedure, by antigen-carrier complex or presence of minute amounts of impurities) or by additives (adjuvants/excipients/preservatives) may be increased (especially for vaccines proposed to be injected more than once).
- In some rare cases, antigenic substances can induce antibodies that can cross-react with human tissue resulting in possible adverse effects and the availability of an animal model to address these issues should be considered.

要点は、「ワクチン使用における安全性の問題として、全身毒性、病気の悪化、局所的毒性、発熱、自己免疫や感作、催奇形性や生殖系への影響などの副作用がある」「過去には重篤な神経系への有害事象を引き起こした事例もある」「安全性については、免疫複合体形成等の免疫毒性、過敏反応、自己組織への交叉反応などの点に注意すべきである」である。

参考として、ヒトで使用するワクチンのアジュバントについてのガイドラインである

EMA/CHMP/VEG/134716/2004から引用したい。DNAやライセートに対する反応等は記載されていないが、アジュバントに関連する副反応について記載されている。アジュバントの存在がDNAやライセートに対する反応等を増強する可能性にも注意が必要であろう。なお以下の文章は、アジュバント単体の毒性に関する大項目中の、過敏症・アナフィラキシーに関する1小項目の文章であるが、他に局所忍容性、発熱性、全身毒性、生殖毒性、遺伝毒性、がん原性、混合アジュバントについての小項目が同じ大項目中にある。

P11:Adjuvants themselves might be immunogenic and testing should be considered with respect to the induction of hypersensitivity in appropriate models (e.g. passive cutaneous anaphylaxis assay [PCA], and the active systemic anaphylaxis assay [ASA]). An adjuvant-induced increase of IgE against the antigen should be considered as a possible concern for induction of hypersensitivity and anaphylaxis.

要点は、「アジュバントはそれ自体免疫原性があり、適切なモデルによって過敏症についての試験を考慮すべきである。アジュバントによるIgE上昇は過敏症・アナフィラキシーと関連があると考えるべきであろう」である。

EMA/CHMP/BWP/68803/2010中の次の記述は、不純物混入回避の観点から一考すべきものと思われる。

P4: The composition and source of media used for all cell culture manipulations including cell passaging, virus isolation and virus propagation should be recorded in detail. If substances of human or animal origin are used they should be free from extraneous agents. Bovine serum used for the preparation and maintenance of cell cultures should be irradiated and should comply, in principal, with the Note for guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products. Animal-derived materials used in cell culture manipulations must be compliant with the current version of the Transmissible Spongiform Encephalopathy Note for Guidance.

要点は

「細胞取扱時に用いた培地の組成や原料は詳細に記録されるべき」

「ヒトや動物由来の物質を材料には、外来物質が存在しないものを使用する」

「培養維持に牛血清を使う場合、放射線照射したものを用いる等、牛血清使用に関する規定を遵守する。

動物由来原料の使用に関してもTSEに関する現行の規定を遵守すること」

【ディスカッション】

ICH S6には「宿主細胞成分の混入によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起される可能性がある」とあり、WHO TRS 927には「ワクチンそのものや不純物、混入物による毒性の発現、およびワクチンを構成する要素の相互作用による毒性の発現が、安全上の問題点としてある」とある。

また、EMA/CPMP/SWP/465/95には「ワクチン使用における安全性の問題として、全身毒性、病気の悪化、局所的毒性、発熱、自己免疫や感作、催奇形性や生殖系への影響などの副作用がある」「過去には重篤な神経系への有害事象を引き起こした事例もある」「安全性については、免疫複合体形成等の免疫毒性、過敏反応、自己組織への交叉反応などの点に注意すべきである」とある。

これらのことから、研究班の中でも、ワクチンに混入してくる細胞由来成分によってアレルギー反応等が起こる可能性があり、注意する必要があるとのディスカッションがなされた。

アジュバントが入ることでこのような反応が増強されると推測されることや、将来季節性インフルエンザワクチンも細胞培養法で製造されるようになった場合のことを考えると、この点は重要であろう。

ICH Q6Bには「不純物がそれなりの量、生成する場合には、可能な範囲でそれらの特性解析を行う必要がある。できれば、生物活性についても評価する必要がある」「不純物クリアランス試験を、不純物について規格値を設定しない根拠に出来ることもある」とあり、いずれにしても不純物の量の評価が必要と考えられる。そのための方法としては、ICH Q6Bにある通り、細胞を免疫して得られたポリクローナル抗体によるイムノアッセイをあげることができる。

既存のガイドライン等では、細胞由来DNA量については10 ng/doseという上限が出されている。一方、細胞由来タンパク質量については特に値は定められていない。(ただしICH Q6Bについては、高純度精製生物薬品を念頭においており、通常のワクチンとは議論の前提が異なることに留意すべきである。)しかしワクチンに混入してくる細胞由来成分によって有害事象、副反応が生じる可能性があることから、これらの混入については可能な限り少なくなるように管理することが必要と思われる。

以上を踏まえて、研究班としては以下のように考える。

ワクチンに混入してくる細胞由来成分によって有害事象、副反応(例えばアレルギー反応等)が生じる可能性があることから、細胞由来成分については可能な限り混入しないよう管理することが必要であろう。細胞由来DNAの量については、10 ng/dose 以下が必要条件である。他の細胞由来成分については、非臨床試験(反復投与毒性試験等)や臨床試験を通じて個別のワクチンごとに設定されるべきであろう。

3) ウイルス増殖に使用する細胞の、ウイルスの遺伝学的・抗原的变化への影響の検討方法と認められる変化の許容範囲について

【関連する既存のガイドライン等での規定】

参考としてICH Q5Bを以下に引用する。ICH Q5B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に関するガイドラインである。本来は従来型のワクチンを対象とはしていないが、参考になる視点が含まれている。ワクチン製造においてICH Q5Bでの遺伝子発現構成体(組換え蛋白質をコードする配列を含む発現ベクター)に相当するものは、シードウイルスであろう。シードウイルスの持つ遺伝子配列を元としてワクチンウイルスが大量に産生され、それが不活化や精製の工程を経てワクチンとなるが、これには組換えDNA技術を応用した蛋白質生産と類似する点もあると思われる。以下Q5Bは、ワクチン製造にあてはめる形で読むこととしたい。

ICH Q5Bには次のように記載されている。

P1: 遺伝子発現構成体の解析の目的は、宿主細胞に導入された目的産物をコードする遺伝子の塩基配列が正しいことを立証すること及びこの塩基配列が医薬品製造条件下で製造終了時まで安定に維持されていることを立証することにある。生きた細胞中では、組換えタンパク質の遺伝子配列が変異を起こし、これがタンパク質の特性を変化させ、ひいては患者にとって安全性上問題になるような事態につながる可能性がある。

P3: 組換えDNA応用医薬品の生産の恒常性を図るには、遺伝子発現構成体と最終精製タンパク質の解析いずれもが重要である。これまで述べてきたように、核酸分析データと最終精製タンパク質の解析データの両方を組換えタンパク質医薬品の品質を確保する上での評価資料とすべきであると考えられる。

要点は、「遺伝子発現構成体の塩基配列とタンパク質を解析し、両者が製造終了時まで安定に維持されていることを示す必要がある」である。

ICH Q5Dには以下の通りに記載されている。

P10: 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、考慮すべき点が2つある。すなわち、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、及び定められた条件下での保存期間中も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、「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:前出)に記載されているように、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べきである。目的タンパク質をコードする配列が既に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、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。

要点は、「目的タンパク質をコードする配列が、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培養期間中に変化しないこと、及び定められた条件下での保存期間中も生産能力を保持していることを、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」「いずれかの方法で目的タンパク質の解析ができないときは、生化学的指標や免疫学的指標など種々の方法によって、細胞基材の安定性を示すことが有用な場合がある」である。

CBER Guidance for Industryには以下の通りに記載されている。

P6: Assuring that the vaccine virus strain remains stable during passage in cell culture is an important component of cell substrate selection. Different cell lines may apply different selective pressures on the vaccine virus, which could alter its sequence and possibly its phenotype. For example, when Sabin poliovirus strains are grown in different cells, their likelihood of reversion to neurovirulence is different (Ref. 8). If attenuating mutations or other genetic markers

(including expression of antigens relevant to immune response) of the vaccine virus are known, data regarding the influence of serial passage in the cell substrate on retention of these markers can be useful in characterizing the genetic stability of the vaccine virus.

Whatever starting materials are used for the generation of the cell substrate (e.g., parent cells or plasmids used for genetically engineered cells), any available information about those starting materials and their characterization (e.g., sequence of the plasmid) should be provided. If a sponsor starts with a primary cell to generate a novel cell substrate, complete information on donor screening and testing should be provided.

P15: We recommend that you extensively characterize your MVS, as this characterization also provides assurance regarding the characteristics of subsequent passages, including the WVS. In addition, you should demonstrate the stability of the genotype and phenotype following viral passages beyond the level used in your production. Genotypic characterization of a viral seed includes its sequence, and may include analysis of viral subpopulations and its genetic stability, including susceptibility to reversion. Phenotypic characterization of a viral seed may include assessment of tissue tropism, attenuation properties, and temperature sensitivity, if applicable.

P36: You should demonstrate the genetic stability of your cell substrate from the establishment of the MCB through and perhaps beyond the end of production.

要点は、「ワクチン株が細胞での継代で安定であることは、細胞基材を選択する上で大切な要件である」「MVSの特性については、幅広く解析することが推奨される。それによって、WVSも含めた継代ウイルスの特性に保証を与えることが出来るからである」「MVSが製造過程での継代数を越えて継代されても、遺伝的および形質的に安定であることを示す必要がある」「MVSの遺伝学的解析にはシーケンス解析が含まれ、非主流群の解析やそれらの遺伝的安定性の解析も含まれる」「MVSの形質的解析には、組織指向性、弱毒性、温度感受性が含まれる」「細胞の遺伝子がMCBからEOPより先まで培養しても安定であることを示す必要がある」である。

EMA/CPMP/VEG/4717/03-Rev.1(draft guideline)には以下の通りに記載されている。

P6: Qualification i) The haemagglutinin and neuraminidase antigens of each seed lot are identified as originating from the correct strain of influenza by suitable methods. Usually, specific antisera obtained from a WHO Collaborating Centre for Influenza are used for determination of HA and NA identity. It is possible that reagents may not be available for the chosen mock-up vaccine, so alternative tests to identify the seed virus (e.g. PCR) should be developed for the mock-up vaccine.

P6: iii) Where the influenza seed virus is prepared using reverse genetics, the sequence of the HA and NA genome segment of the influenza virus should be verified and compared to the genome segments of reference virus to confirm the genetic stability of the production influenza virus. This should preferably be done at the level of the Working Seed Virus, and at least up to one passage beyond the level representing the final vaccine.

要点は「シードロットのHAとNAが正しい株由来であることを適切な方法によって確認する。通常はWHO CCから入手した特異的抗血清を使用してHAとNAの同等性を確認する」「シードウイルスがリバーサジェネティクスで作製された場合には、HAとNAの配列が最終製品より1代後まで安定であることを示す必要がある」である。

次にWHO/BS/10.2132を引用する。以下の文章はワクチンを主な対象としては想定していないが、参考になる視点が含まれている。

P40: Any form of genetic stability could potentially affect the quality of the final product and it will be important to know if the cells in culture are changing in a way that could affect the nature or safety of the product. Any features of the cell lines that might affect quality should be discussed with the NRA/NCL to ensure that tests used by the manufacturer to monitor genetic stability are adequate. The specific tests will vary according to the nature of the product, but the aim is to show consistency in the amount and characteristics of the product derived from cells within a few passages of the MCB or WCB with those derived from an ECB or EOPC.

要点は、「遺伝子の安定性は最終製品の品質に影響する可能性があるため、培養過程の細胞が製品の安全性に影響を及ぼす可能性があるかどうかを確認することが重要である。製造工程における生産性という点から細胞機能の安定性について評価する必要があるかもしれない」である。

P40: For cell lines containing DNA expression constructs, the stability of these constructs between the MCB/WCB and an ECB or EOPC should be determined. The copy number of the construct and, if relevant, the sites of chromosomal insertion should be determined. The latter is accomplished by sequencing into the cellular flanking regions, but methods like fluorescent in situ hybridization may provide useful additional information, particularly where concatamers of the gene insert are present at individual chromosomal loci. The sequence of the construct within the cells should be determined.

Where proteins are derived from non-genetically modified cells, consistency in the yield and properties of the protein should be evaluated together with the sequence of the mRNA encoding the protein of interest. Additional characterization of the cell-biological processes and responses during cultivation (for instance using global or targeted gene expression, proteomic or metabolic profiles and other phenotypic markers) might be useful in further developing a broad understanding of the cell substrate. Appropriate methods should be applied to assure that cell age is correctly assessed in the event that cell viability falls dramatically at any given step. Losses in viability are reflected in increased cultivation times to reach defined levels of growth.

要点は、「DNA発現構成体を導入した細胞株を用いる場合は、MCB/WCBとECB/EOPCの構成体が安定であることを立証すべきである。細胞内の構成体の塩基配列を解析すべきである。非遺伝的改変細胞由来のタンパク質が恒常的に生成されるかどうか、またそのタンパク質の特性についても目的タンパク質のmRNAをコードする塩基配列とともに評価すべきである」である。

EMA/CHMP/BWP/68803/2010 (draft)には以下の通りに記載されている。

P3: Manufacturers of cell-derived influenza vaccine may prefer to use a cell-only passaged virus instead of one that has been egg-adapted. This is because research indicates that when a human influenza virus is adapted to grow in eggs, it undergoes phenotypic changes that might include changes to its antigenicity/immunogenicity [1]. Virus isolated on mammalian cell cultures do not, at least initially, undergo the type of selection that occurs during initial passage in eggs and typically the haemagglutinin (HA) of a cell isolated virus is structurally identical to the virus found in clinical specimens in contrast to egg-adapted variants in which specific HA amino acid substitutions have been identified [1]. Thus a cell-isolated virus might be more clinically relevant for vaccine than an egg isolate although to date this has not been fully demonstrated scientifically.

[1] Robertson, J.S. (1993) Clinical influenza virus and the embryonated hen's egg. *Reviews in Medical Virology* 3,

要点は、「ヒトインフルエンザウイルスは、鶏卵で継代培養すると抗原性／免疫原性に変化が生じる可能性があるため、細胞培養インフルエンザワクチンの製造は細胞でのみ継代することが望ましい。培養細胞から分離されたウイルスのHAは、臨床検体から検出されたウイルスと構造的に一致している」である。

【ディスカッション】

ICH Q5Bには「遺伝子発現構成体の塩基配列とタンパク質を解析し、両者が製造終了時まで安定に維持されていることを示す必要がある」とある。遺伝子発現構成体に相当するものは、細胞培養ワクチンの中では「ウイルス」ということになるであろう。ICH Q5Bからは、ウイルスの性質が製造終了時まで安定であることの必要性及び定められた条件下での保存期間中も細胞が生産能力を保持していることの必要性が読み取れる。

また、ICH Q5Dには「目的タンパク質をコードする配列が既にMCB又はWCBのレベルと*in vitro*細胞齢の上限まで、又はそれを超えて培養した細胞とで、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」とあり、CBER Guidance for Industryにも「ワクチン株が細胞での継代で安定であることは、細胞基材を選択する上で大切な要件である」「MVSの特性については、幅広く解析することが推奨される。それによって、WVSも含めた継代ウイルスの特性に保証を与えることが出来るからである」「MVSが製造過程での継代数を越えて継代されても、遺伝的および形質的に安定であることを示す必要がある」「MVSの遺伝学的解析にはシーケンス解析が含まれ、非主流群の解析やそれらの遺伝的安定性の解析も含まれる」「MVSの形質的解析には、組織指向性、弱毒性、温度感受性が含まれる」「細胞の遺伝子がMCBからEOPより先まで培養しても安定であることを示す必要がある」とある。

以上のことをふまえて、研究班でも「ウイルスを細胞培養法によって増殖させる際、ウイルスの性質が大きく変化してしまうと、それはワクチンとして役に立たなくなってしまうと考えられる。従って、シードウイルスの性状と増殖後のウイルスの性状を比較することは重要であろう」とのディスカッションがなされた。

次にどのような方法で増殖前後のウイルスHA・NAの同一性を調べるかであるが、一つはシーケンス解析であり、もう一つは抗血清を使用する方法である。

ワクチンは、接種を受けた者に免疫を付与するものであることから、免疫学的な反応について増殖前後のウイルスで同等性が示されることが重要である。仮にシーケンス解析で塩基配列の変化が確認された場合でも、免疫学的な反応に関して同等性が示されれば、その変化は許容できるものと考えられる。

抗血清を用いた試験については、EMEA/CPMP/VEG/4717/03-Rev.1に「通常はWHO CCから入手した特異的抗血清を使用してHAとNAの同等性を確認する」とあるが、これと同じ方法で行うのが良いと思われる。

シーケンス解析については、EMEA/CPMP/VEG/4717/03-Rev.1に「シードウイルスがリバーシジェネティクスで作製された場合には、HAとNAの配列が最終製品より1代後まで安定であることを示す必要がある」とあり、国内においてもシーケンス解析を元にシードウイルスのHA・NAと増殖後のHA・NAを比較することは可能である。

1塩基も変異が入っていなければシーケンス解析だけでも評価可能であるが、RNAウイルスは元々変異が入りやすい性質を持っており、また変異の数・場所とそれらが免疫学的活性に与える影響の関係

は複雑であるため、シーケンス解析と合わせて特異的抗血清を用いた試験を行うことが必要であろう。

結論としては、特異的抗血清を用いた試験とシーケンス解析の結果を総合的に判断して、HA・NAの同等性を確認することが重要と思われる。

また、現状ではシードウイルスとして鶏卵を通したウイルスが使用されているが、EMA/CHMP/BWP/68803/2010 (draft)には「ヒトインフルエンザウイルスは、鶏卵で継代培養すると抗原性／免疫原性に変化が生じる可能性があるため、細胞培養インフルエンザワクチンの製造は細胞でのみ継代することが望ましい。培養細胞から分離されたウイルスのHAは、臨床検体から検出されたウイルスと構造的に一致している」とあり、将来的には、シードウイルスを細胞培養法で作製することも十分考えられる。よって、シードウイルス作製法の変化を見据え、これにも対応できることが望ましい。

以上を踏まえて、研究班としては以下のように考える。

ワクチンの有効性を確保するという観点から、ワクチン株が細胞での継代で安定であることを確認する必要があると考える。具体的には、特異的抗血清を用いた試験とシーケンス解析の結果を総合的に判断して、HA・NAの同等性を確認する。シーケンス解析で塩基配列の変化が確認された場合は、免疫学的な反応における同等性を確認すると共に、ウイルスの形質（弱毒性等）に問題がないことの確認を適切な方法を用いて行う。

4) ウイルス増殖用細胞株の内因性感染性因子（内在性レトロウイルス等）の試験の範囲について

【関連する既存のガイドライン等での規定】

WHO TRS 878には、細胞株と感染性因子に関して種々の記載がある。

Continuous-cell-line substratesの項には以下の通りに記載されている。

P23: However, many continuous cell lines express endogenous viruses and are tumorigenic.

要点は「多くの不死化細胞株は内在性ウイルスを発現し、造腫瘍性がある」である。

続くPotential risks associated with biologicals produced in animal cellsの項には以下のように記載されている。

P24: The main potential risks associated with the use of biologicals produced in animal cells are directly related to contaminants from the cells, and they fall into three categories: viruses and other transmissible agents; cellular DNA; and growth-promoting proteins.

要点は「動物細胞を用いることのリスクは、ウイルス等感染性因子、細胞DNA、増殖促進タンパク質の3つと関連している」である。

この項に属する小項目として(1)viruses and other transmissible agents (2)cellular DNA (3)growth-promoting proteinsが続いており、(1)viruses and other transmissible agentsでは細胞の種類ごとに注意すべき感染性因子が説明されている。

P31よりTests applicable to all types of cell cultures の項が始まり、この項に属する小項目として(1)Tests for viral agents (2)Serum used in cell-culture media (3)Trypsin used for preparing cell cultures (4)Tests for bacteria, fungi,

and mycoplasmas at the end of production (5)Tests for adventitious viruses at the end of productionが続いている。

P37からはIdentification and characteristics of continuous cell line の項が始まり、この項に属する小項目として(1)Identity test (2)Sterility tests (3)Tests for viral agents using cell cultures (4)Tests for viral agents using animals and eggs (5)Tests for retroviruses and other endogenous viruses or viral nucleic acid (6)Tests for selected viruses (7)Tests for tumorigenicity (8)Tests on cells carrying a recombinant-DNA expression system についての記載がある。

要点は、「細胞に存在するウイルス等感染性因子について調べる必要があり、特に潜伏感染するウイルスについては注意が必要」「細胞培養に使用された血清・トリブシンについては、培養可能な細菌、真菌、マイコプラズマ、感染可能なウイルスが存在しないことを示すための試験が必要」「トリブシンについてはウシパルボウイルス、ブタパルボウイルスに注意が必要」「ウシ由来の血清・トリブシンについては国の規制当局が定めている」「in vitro試験においては、製造に使用される細胞と同種の細胞、ヒト2倍体細胞、異なる種に由来する別の細胞 の3種類の細胞に試料をかけて、迷入ウイルスの存在を調べる」「in vivo試験においては、乳飲みマウス、成熟マウス等の動物および発育鶏卵を用いて迷入ウイルスの試験を行う」「MCBとCALに対して感染性試験・TEM・RTase試験を行い、レトロウイルスの有無を調べる」「選択的ウイルス試験としては、マウス細胞株を使用する場合の抗体産生試験、lymphocytic choriomeningitis virusの試験があり、またヒト細胞株を使用する場合のヒトウイルスに対する試験 (Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human retroviruses, hepatitis B virus, hepatitis C virus等) がある」である。

WHO TRS 745にも、細胞株と感染性因子に関して種々の記載がある。

P98にはTests for adventitious agents の項が設けられており、この項には以下のように記載されている。

P98: Tests in the following sections are intended to identify any endogenous or exogenous agents that may be present in the cell line. Special attention should be given to tests for agents known to be present in a latent state in the species from which the cells were derived (e.g., SV-40 virus in rhesus monkeys).

要点は、「様々な試験によって細胞株に存在する内在性および外来性の感染性因子を調べる」「細胞株が由来する生物種に潜伏していることが知られている感染性因子については、特に注意を払う」である。

Tests for adventitious agents の項に属する小項目として(1)Tests in animals and eggs (2)Sterility tests (3)Morphological tests (4)Tests on cell cultures (5)Tests for retroviruses (6)Other testsがある。

要点は、「様々な試験によって細胞株に存在する内在性および外来性の感染性因子を調べる」「細胞株が由来する生物種に潜伏していることが知られている感染性因子については、特に注意を払う」「動物および発育鶏卵を用いて迷入ウイルスの試験を行う」「細菌、真菌、マイコプラズマについての試験を行う」「最大倍加数よりも10以上倍加数が多く培養された細胞に対し、化学物質による誘導をかけ、電子顕微鏡を用いたウイルス粒子の形態学的検索およびウイルス逆転写酵素活性試験を行う」である。

次にWHO/BS/10.2132 (draft) から引用する。

WHO/BS/10.2132 (draft) はWHO TRS 878に代わる新しい文書と位置づけられており、対象とする範囲はWHO TRS 878と重なる部分が多いが、新しいポイントも含まれている。以下には、WHO/BS/10.2132 (draft) で新しく触れられているものについて示す。

WHO/BS/10.2132 (draft)では、細胞基材やワクチンに混入する感染性因子を検出するための手段として、次世代シーケンシング (massively parallel (deep) sequencing, MPS) 等の新しい解析技術についての記載がなされている。

MPS法等による感染性因子の検出に関しては、様々な観点からの更なる検討が今後必要と思われる。

P18: Early in 2010 NRA as well as WHO were aware of new information regarding the presence of DNA sequences of porcine circovirus in live attenuated rotavirus vaccines. The detection of these sequences by the use of advanced analytical methods raised complex questions, e.g., the evaluation of the potential risk, specific testing of vaccines and the general use of these methods for the characterization of vaccine cell substrates. The power of the new methodology that was used (i.e., massively parallel (deep) sequencing) may uncover the presence of adventitious agents that might not be detected with current methods. While the implementation for routine use of such methods has benefits as well as challenges and risks, NRAs need to be prepared for similar situations.

要点は、「弱毒生ロタウイルスワクチンでブタサーコウウイルスのDNAが見つかったように、今後新しい解析技術によって、これまで検出されて来なかった迷入因子の存在が明らかにされると予測される。新しい解析技術を導入することには有用性と共に課題と危険性もあるが、国の規制当局はこのような状況に対して準備しておく必要がある」である。

新規細胞基材における感染性因子を調べるための方法として、トランスクリプトーム・シーケンシング等の新しい技術について記載がある。

P51: For new cell substrates, induction of a lytic infection by exposing the cells to special conditions (e.g., chemical induction; heat shock) may be required, and special detection techniques like transcriptome sequencing or degenerate primer PCR may have utility.

要点は、「新規細胞基材を使用する場合は、特定の条件下 (例、化学誘導、熱ショック) で細胞を曝露して溶解感染を誘導する必要があるかもしれないし、トランスクリプトーム・シーケンシングあるいは変性プライマーPCRなど特殊な検出技術が有用かもしれない」である。

P63: New, sensitive, molecular methods, with broad detection capabilities are being developed. These are not yet in routine use, but as they become widely available and validated, they will play an increasing role in the evaluation of cell substrates. The sensitivity of these methods as well as their breadth of detection should be considered when evaluating their applicability. One of the advantages of some of these new methods is that they have the potential to discover new viruses. These new approaches involve either degenerate PCR for whole virus families or random-priming methods, which do not depend on a known sequence. Analysis of the resulting amplicons has employed sequencing, hybridization to oligonucleotide arrays, and mass spectrometry [101, 102, 103]. The new generation of massively parallel (deep) sequencing (MPS) methods have particular utility. They can be applied to detect virions after nuclease treatment to remove cellular DNA and unencapsidated genomes. Used in this mode, MPS has been used to discover new viruses in serum and other tissues and has revealed the contamination of human vaccines by porcine circoviruses [101, 104, 105, 106, 107, 108]. MPS can also be employed to screen cell substrates for both latent and lytic viruses by sequencing the transcriptome. In this mode, enormous quantities of data are generated, and robust bioinformatic methods are required to detect viral sequences by either positive selection against viral databases or negative selection to remove cellular sequences [101, 108, 109]. Care is required to exclude false

“hits” to viruses due to recognition of transduced cellular sequences present in some viral genomes or due to viral genes like virokines that have a close homology to cellular genes.

要点は、「様々なウイルスを高感度に検出するための新しいウイルス核酸検出法が開発されてきており、まだこれらは恒常的には使用されていないが、将来、細胞基質の評価に重要な役割を担うようになるだろう。ある新しい方法は、新しいウイルスを検出することができるという利点を持つ。これにはウイルス全体を対象とした変性PCRまたはランダムプライミング法を含み、既知の配列に依存しない方法である。増幅された核酸は、シーケンシング、オリゴヌクレオチドアレイに対するハイブリダイゼーション、質量分析に供される。次世代大量平行シーケンシング (Massively Parallel Sequencing, MPS) 法は特に有用である。MPS法は血清や他の組織に存在する新しいウイルスを発見するために使用されており、ヒトで使用されるワクチンのブタサーコウイルスによる汚染を明らかにした。MPS法でトランスクリプトームを解析することによって、潜伏感染ウイルスと溶解感染ウイルスの両方を検出することも行われている。大量のデータが生成されるので、バイオインフォマティクスの手法が必要であり、擬陽性については注意すべきである。」である。

WHO/BS/10.2132 (draft)では、細胞基材中の存在が懸念される内因性感染性因子は多岐にわたる旨が記述されており、容易には検出されないウイルスやその検出方法について、項目B11.2.1、B11.2.2、B11.2.3において例示されている。

昆虫細胞に関する考慮点として以下の記述がある。

P58 B.11.2.2.3: Additional considerations to the tests in cell culture for insect viruses

Many insect cell lines carry persistent viral infections that do not routinely produce a noticeable CPE (e.g., some clones of the Hi-5 cell line are persistently infected with an insect nodavirus). However, the viruses may be induced to replicate by stressing the cells using a variety of techniques such as increased/reduced culture temperature (above or below that routinely used for production), heatshock for a short period, super-infection with other insect viruses, or chemical inducers. Therefore, the probability of detecting such low-level persistent infections may be increased by stressing the cells prior to analysis.

要点は「多くの昆虫細胞は明瞭なCPEを起こさない持続感染ウイルスを保持している」

「細胞ストレスや他種ウイルスの重複感染により、これらウイルスの増殖が誘導され得るので、細胞にストレス負荷をかけることでウイルスの検出効率が上がる場合がある。」

Intact and cell lysates from a passage level at or beyond that equivalent to the EOPC is co-cultivated with indicator cells from at least three different species of insect in addition to the indicator cells as noted in section B.11.2.2.2. Cell lines should be selected on the following basis: one of the lines has been demonstrated to be permissive for the growth of human arboviruses, one has been shown to be permissive for the growth of a range of insect viruses, and the third has been derived from a species that is closely related to the host from which the MCB is derived (or another line from the same species). Duplicate cultures of indicator cells are typically incubated at two temperatures, such as $37 \pm 1^\circ\text{C}$ and a lower temperature, such as $28 \pm 1^\circ\text{C}$, observed for a period of 14 days, and examined for possible morphological changes. The cell-culture fluids from the end of the test period are tested for haemagglutinating viruses, or the intact cells from the end of the test period are tested for haemadsorbing viruses. The cells comply with the test if no evidence of any viral agent is found.

要点は「EOPCあるいはそれ以上の継代数の細胞について、B.12.2.2.2で例示したindicator細胞に加えて3種以上の昆虫由来細胞との共培養を行う」「indicatorに供する細胞はアルボウイルスに感受性をもつ、昆虫ウイルスに対する増殖感受性をもつ、MCBと近縁な宿主に由来する、という観点から選択すべき」「共培養試験は2種類の温度条件下で行い、14日間細胞の形態変化を観察する」「試験期間終了時に培養上清の血球凝集試験、細胞への血球吸着試験を実施し、ウイルスが存在する証拠を認めなかった場合、条件を満たしたものとする。

Several mosquito cell lines are available that are permissive for the growth of some human arboviruses and could be considered for these tests. Alternatively, BHK-21 cells could be considered for this purpose. The most permissive insect cell lines characterised to date have been derived from embryonic *Drosophila* tissues. While the mosquito and *Drosophila* cell lines may be suitable for some aspects of the testing, it should be remembered that many insect cell lines are persistently infected with insect viruses that usually produce no obvious CPE. In addition, many insect cells may be infected with mammalian viruses, such as BVDV, that are known to replicate in insect cells. Demonstrating that the indicator cell lines are themselves free from adventitious agents is an important pre-requisite to their use in the testing outlined above. Consideration should also be given to risk-mitigation strategies as discussed above for highly purified products for which viral clearance can be achieved and validated.

要点は「幾つかのアルボウイルスに感受性をもつ蚊由来の細胞株、あるいはBHK-21細胞も共培養試験に有用」「蚊あるいはショウジョウバエ由来の細胞は試験に供するに至適な細胞ではあるが、多くの昆虫細胞が明瞭なCPEを起こさずに昆虫ウイルスに持続感染しているということやBVDVといったほ乳類ウイルスにも感染する可能性があることは留意しておくべき」「indicator細胞が外来性（ウイルス）因子に汚染されていないことを実証しておくことは不可欠」

内在性レトロウイルスに特化した記述として以下のものがある。

P59 B.11.2.4: Tests for retroviruses

All vertebrate and insect cells that have been analysed possess endogenous, genetically acquired retroviral sequences integrated into chromosomal DNA in the form of proviruses. These sequences may be expressed, or be induced, as mRNA. In some cases, the mRNA is translated into viral protein and virus particles (virions) are produced. In many cases, these virions are defective for replication (e.g., avian endogenous retrovirus EAV, Chinese hamster ovary cell line gamma-retrovirus [85]) whereas in others (e.g., X-MuLV) the retroviruses may be capable of infecting cells of other species including human cells.

Consideration should also be given to the possibility that cell banks may be infected with nongenetically acquired retroviruses (exogenous retroviruses), either because the donor animal was infected or through laboratory contamination.

要点は

「全ての脊椎動物や昆虫由来の細胞の染色体中には内在性レトロウイルスが組み込まれている」

「この内在性配列からmRNAが転写されたり、時にはビリオン産生に至る場合もある。X-MuLVのように他種細胞に感染能を有すものもあるが、多くの場合、ウイルスは複製できない。」

「細胞バンクが外来性レトロウイルスに感染している可能性にも留意すべき」

である。

内在性レトロウイルスの検査対象、検出法に関する記載は既述のガイドラインに準じる。そのうち鶏胚繊維芽細胞については以下の記述がある。

P60 中段: Chick embryo fibroblasts (CEF) contain defective retroviral elements that frequently produce defective particles with reverse transcriptase activity. This has been the subject of many studies and WHO consultations because they are used for live viral vaccine production. If evidence is presented that the donor flock is free of infectious retroviruses and there is no evidence that the cultures are contaminated with infectious retroviruses, then the cultures can be considered acceptable with respect to retrovirus tests.

要点は

「CEFには欠失型のレトロウイルスエレメントが存在し、RT活性をもつ不完全粒子を産生している」

「CEFは生ワクチンの製造にも供されることから、このレトロエレメントの存在については多くの研究およびWHOの協議の対象となってきた」

「CEFのドナーにあたる鶏群がレトロウイルスに感染していないという証拠があり、培養物が感染性レトロウイルスに汚染されていない場合、この基材はレトロウイルス試験に関しては許容範囲とみなされる」である。

P61 中段: CEFs and other cells of avian origin are known to express retroviral elements. With such cells, the appropriateness of this test should be discussed with the NRA/NCL. For example, it may be appropriate to direct testing strategies at the detection of infectious avian retroviruses, such as avian leukosis viruses and reticuloendotheliosis virus. Additionally, it is known that insect cells have retroviral elements that are detected by a PERT assay, and so they too can test positive by this assay.

要点は

「CEFやその他の鳥由来の細胞はレトロウイルスエレメントを発現していることが知られており、これらの試験の適正性についてはNRAやNCLと協議すべき」

「ニワトリ白血病や細網内皮症ウイルスを直接検出する方法が、適切な試験法の一例としてあげられる」である。

P64: Mollicutes are distinguished by an absence of a cell wall and includes mycoplasmas, acholeplasmas, spiroplasmas, and others. They are parasites of various animals and plants, living on or in the host's cells. They are also a frequent contaminant of cell cultures. In addition to their potential pathogenicity, mycoplasmas compete for nutrients, induce chromosomal abnormalities, interrupt metabolism and inhibit cell fusion of host cells. *M. pneumoniae* is pathogenic for humans, although there are no reported cases of human infections with this organism arising from exposure to cell cultures or cell-derived products. In any case, cell banks should be demonstrated to be free of such contamination in order to be suitable for the production of biologicals.

要点は、「Mollicutesと呼ばれる細胞壁のない細菌綱は様々な細胞に寄生し、細胞に障害を与えるため、注意が必要」である。

P66: TSEs are a group of slowly developing fatal neurological diseases affecting the brain of animals and humans. The accepted view at present is that they are caused by non-conventional infectious agents known as prions (PrP^{Sc}),

which are made up of a normal host protein (PrP) in an abnormal conformation. TSEs include BSE of cattle, scrapie of sheep, CJD and its variant form (vCJD), GSS and FFI in humans, CWD in elk and deer, and transmissible mink encephalopathy (TME) [116, 117]. Normal PrP (PrPc) protein may be expressed on cell surfaces, but in vivo this protein can mis-fold and become the abnormal disease-causing type PrPsc, which is able to catalyse the conversion of PrPc protein into the abnormal conformation. PrPsc is relatively resistant to common proteolytic enzymes, such as proteinase K, compared with PrPc.

P68: Currently, there are no suitable screening tests available for TSE agents in raw materials of human/ruminant origin similar to serological or PCR assays for the screening for viral agents. Newer tests are being developed to screen for the presence of TSE agents in blood (such as PMCA, epitope protection assay, etc.). Such tests, once validated, could eventually become suitable for the screening of raw materials and cell banks.

要点は、「TSE(Transmissible Spongiform Encephalopathies)の原因はプリオンであると考えられている。TSEは細胞表面に発現している正常型プリオンタンパク質が異常型プリオンタンパク質の混入でミスフォールドすることで発症するとされている。現在、TSE因子のよい検出法はないが、血中のTSE因子を検索するための新しい方法が開発されつつある。それらの有効性が実証されれば、原料やセルバンクの試験に適したものとなるであろう」である。

ICH Q5Aには以下の通りに記載されている。

P3: MCBにおいては、内在性及び非内在性のウイルスによる汚染の有無を徹底的に検討する必要がある。ヒト又はヒト以外の霊長類細胞に由来するウイルス汚染は特に安全性上問題となる可能性があるので、これらの細胞をパートナーとするヘテロな融合細胞株については、ヒトを含む霊長類に特有のウイルスを検出するための試験を実施すること。

非内在性ウイルスの存在の有無を検討するには、*in vitro* 試験、*in vivo* 試験、及びその他細胞種特異ウイルス試験（マウス抗体産生（MAP）試験のような種特異性試験を含む）が必要である。細胞種特異ウイルス試験とは、細胞株個々の継代経歴から混入が予測されるウイルスを検出するために適した試験である。

P4: 内在性ウイルスについては、MCB、WCBで検出されないものもありうるので、CALで必ず1度は、その存在の有無について試験を実施し、評価する必要がある。

表1: 各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験

（レトロウイルス及び内在性ウイルス試験（感染性試験、電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性、その他細胞種特異ウイルス試験）、非内在性ウイルス又は外来性ウイルス試験（*in vitro* 試験、*in vivo* 試験、抗体産生試験、その他細胞種特異ウイルス試験））

P4: MCBとCALについては、感受性細胞を用いた感染性試験と電子顕微鏡観察を含むレトロウイルス試験を行うこと。感染性が認められず、レトロウイルス又はレトロウイルス様粒子が電顕で認められない場合、非感染性のレトロウイルスの有無について検討するため、逆転写酵素活性の試験を含む適切な試験を実施すること。

P5: *In vitro* 試験は、広範囲のヒトウイルスやある種の動物ウイルスを検出することができる感受性を有する各種指示細胞に、被検試料を接種することにより実施する。本試験に使用する細胞の種類は試験対象となるセル・バンクがどのような種由来であるかによって左右されるが、ヒトウイルスに感受性のある

ヒト及びヒト以外の霊長類に由来する細胞を含むべきである。どのような試験方法及び被検試料で試験を実施するかは、細胞基材の由来やその調製過程からみて混入の可能性が考えられるウイルスの種類に応じて決定すること。細胞変性及び血球凝集を判定法とするウイルス検査を実施すること。

P5: *In vivo* 試験

被検試料(表2)を乳飲みマウス、成熟マウスを含む動物、及び発育鶏卵に接種することにより、細胞培養(*in vitro* 試験)では増殖できないウイルスを検出するための試験である。細胞基材の特性や由来によっては、動物種を追加して試験を実施する場合もありうる。被検動物の健康状態を観察し、異常が認められた場合は、その病因を調査すること。

P5: 抗体産生試験

げっ歯類由来細胞株中に存在する可能性がある種特異的ウイルスについては、被検試料(表2)をウイルスフリーの動物に接種し、一定期間後、被検動物血清中の抗体レベルあるいは酵素活性を測定することにより検出できる。例としてマウス抗体産生(MAP)試験、ラット抗体産生(RAP)試験、ハムスター抗体産生(HAP)試験がある。現在、これら抗体産生試験によりスクリーニングされているウイルスを表3に示す。

P5: ウイルスが検出された細胞株の使用について

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。そのような場合に製造業者が行うべき対応策が本文書の第V章に記載されている。内在性のレトロウイルス以外のウイルスが存在する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することになるが、その際、製品のベネフィットや予定される臨床上的用途、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。

要点は、「レトロウイルス及び内在性ウイルス試験については、感染性試験、電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性試験、その他細胞種特異ウイルス試験をMCBとCALに対して行う。」「非内在性又は外来性ウイルス試験については、*in vitro* 試験、*in vivo* 試験をMCBとCALに対して行い、抗体産生試験、その他細胞種特異ウイルス試験をMCBに対して行う」「内在性のレトロウイルス以外のウイルスが存在する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する」である。

ICH Q5Dには以下の通りに記載されている。

P9: 細胞基材のウイルス試験は、細胞株の培養歴を考慮し、汚染の可能性の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。

ICH Q6Bには以下の通りに記載されている。

P22: 製造工程中で意図的に添加したウイルス、内在性のウイルス、及び製造工程に迷入する可能性のあるウイルスについては、製造工程のウイルス除去/不活化の能力を示す必要がある。

CBER Guidance for Industryには以下の通りに記載されている。

P4: Retroviruses may be either endogenous (i.e., encoded by the cell substrate genome) or exogenously acquired. Retrovirus testing should address the possibility that either type of retrovirus could contaminate a product.

P11: Tests that you might perform on your MCB include tests for bacteria, fungi, mycoplasma, and viruses (e.g., in vitro and in vivo testing, specific tests for retroviruses, and specific tests for viruses known to exist in the species of origin or that could be acquired during serial passage in cell culture).

P13: Because certain cell lines express endogenous viruses (e.g., retroviruses), tests capable of detecting such agents should be completed on cells grown under production conditions (See Section IV.A. Testing for Adventitious Agents).

P26: Retrovirus testing using reverse transcriptase (RT) assays should be performed on cell-free culture medium to detect retroviruses. RT assays can detect any retrovirus, as all retroviruses encode and contain RT. You should test cell substrates, viral seeds, and/or harvests of all viral vaccines produced in mammalian and insect cell substrates (or that use or include mammalian-derived materials) using a highly sensitive PCR-based RT (PBRT) assay. In certain situations, it may be appropriate to pre-treat the cells with chemical inducers of endogenous retroviruses.

P26: TEM can detect viral particles in a cell substrate, including those from endogenous retroviruses. Under some circumstances, it might be appropriate to pre-treat cells with chemical or inducing agents to activate production of endogenous or latent viruses (Ref. 14). While TEM is fairly insensitive, it is a test that can detect adventitious agents of many types.

P27: In cases where viruses cannot be readily grown in culture, PCR is an effective tool to assess a cell substrate for contamination with such viruses. Due to the specificity of PCR, you might need to perform multiple PCR assays in order to be able to detect the full range of viruses detectable in a single more general biological assay. You should consider the tissue source and medical history of the donor from which the cell line was derived in determining what testing is appropriate. Specific PCR tests for human viruses that you should consider include assays for hepatitis A, B, and C viruses, enteroviruses, human HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, circoviruses, parvovirus B19, papillomaviruses, human polyomaviruses, human adenoviruses, Epstein-Barr virus, human cytomegalovirus, and human herpes viruses 6, 7, and 8. Specific tests for simian viruses that could potentially infect humans, including simian polyomaviruses (e.g., SV40), simian foamy virus (SFV), simian immunodeficiency virus (SIV), simian retrovirus (SRV), and simian T-cell lymphotropic virus (STLV), should also be considered. You also should consider using PCR assays that detect several agents using degenerate or consensus primers provided that the sensitivity of these assays is sufficient to improve assurance of product safety. PCR testing also can play an important role in qualification of insect cell substrates.

P27: Under some circumstances, for example when tumorigenic cell substrates are proposed for use, it might be appropriate for you to pre-treat cells with chemical agents known to induce reactivation or replication of endogenous or latent viruses (Ref. 14).

要点は、「内在性レトロウイルス、外来性レトロウイルス、宿主細胞が感染しうるウイルスについて試験を行う」「生産条件で培養した細胞で試験をするべき」

「高い感度を持つPBRT法で細胞、シードウイルス、ハーベスタの試験を行う。

内在性レトロウイルスの誘導剤を用いるのもよい」「TEMは、感度は低いが多種の迷入ウイルスを検出できる」「ヒトおよびサルウイルスの中で、特異的PCR試験の標的としては以下のものがある。hepatitis A,

B, and C viruses, enteroviruses, human HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, circoviruses, parvovirus B19, papillomaviruses, human polyomaviruses, human adenoviruses, Epstein-Barr virus, human cytomegalovirus, and human herpes viruses 6, 7, and 8, simian polyomaviruses (e.g., SV40), simian foamy virus (SFV), simian immunodeficiency virus (SIV), simian retrovirus (SRV), and simian T-cell lymphotropic virus (STLV)」である。

【ディスカッション】

ICH Q5Aには「レトロウイルス及び内在性ウイルス試験については、感染性試験、電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性試験、その他細胞種特異ウイルス試験をMCBとCALに対して行う。」「非内在性又は外来性ウイルス試験については、in vitro 試験、in vivo 試験をMCBとCALに対して行い、抗体産生試験、その他細胞種特異ウイルス試験をMCBに対して行う」とあり、さらに血清やトリプシンについてはそれらが由来するウシ・ブタの感染性因子について注意が必要な旨が記載されている。ICH Q5Dには「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」とある。また、CBER Guidance for Industryに「内在性レトロウイルス、外来性レトロウイルス、宿主細胞が感染しうるウイルスについて試験を行う」とある。

研究班としてもMCBまたはMCBとCALの両方に対して、内在性レトロウイルス、外来性レトロウイルス、宿主細胞が感染しうるウイルスの試験を行うことは妥当であると考ええる。

WHO TRS 878、WHO/BS/10.2132には「特に潜伏感染するウイルスについては注意が必要」とあり、WHO TRS 745には「最大倍加数を10以上超えて培養された細胞に対し、化学物質による誘導をかけた状態でレトロウイルス試験を行うのがよい」とある。これについては研究班内でも、レトロウイルスや他の潜伏感染するウイルスは、誘導をかけた状態での試験も考慮したほうが良いとのディスカッションがなされた。

試験方法については、WHO TRS 878、WHO/BS/10.2132、CBER Guidance for Industryにも示されている通り、感染性試験、TEM、従来のRTase試験、高い感度を持つPBRT法、感受性細胞を用いたin vitro試験、乳飲みマウス・成熟マウス・発育鶏卵等を用いたin vivo試験、抗体産生試験などがあり、これらによる試験は妥当であると考ええる。

以上を踏まえて、研究班としては以下のように考える。

安全性の観点から、MCBまたはMCBとCALの両方に対して、誘導剤も組み合わせ、内在性レトロウイルス、外来性レトロウイルス、宿主細胞が感染しうるウイルスの試験を行うことは妥当であると考ええる。試験方法については、感染性試験、TEM、従来のRTase試験、高い感度を持つPBRT法、感受性細胞を用いたin vitro試験、乳飲みマウス・成熟マウス・発育鶏卵等を用いたin vivo試験、抗体産生試験などがあり、これらによる試験は妥当であると考ええる。

5) 製造の過程で混入する可能性のある病原体の試験の範囲について

【関連する既存のガイドライン等での規定】

WHO TRS 878には以下の通りに記載されている。

P32: For virus-based products, control cell cultures are necessary when the product interferes with the test systems

used to monitor the absence of adventitious agents. These control cell cultures shall be observed at the end of the production period for viral cytopathic effects and tested for haemadsorbing viruses.

P34: Evidence that the cell line is free from cultivable bacteria, mycoplasmas, fungi and infectious viruses, and where appropriate, potentially oncogenic adventitious agents should be provided. Special attention should be given to viruses that commonly contaminate the animal species from which the cell line is derived. Cell seed should preferably be free from all adventitious agents.

要点は、「迷入ウイルスについて調べるには、コントロール培養が有用」「細胞株は、細菌、マイコプラズマ、真菌、ウイルス、がん原性を持つものなどがいないことを示す必要がある。細胞株が由来する動物種に感染するウイルスについては特に配慮が必要である」である。

ICH Q5Aには以下の通りに記載されている。

P2: 製造の各段階でどのようなウイルス試験及びウイルスクリアランス試験をどの程度実施すべきかは様々な要素により異なるので、ケースバイケースかつステップバイステップの原則で考える必要がある。考慮すべき要素としては、①セル・バンクの特性解析と適格性確認の程度、②検出されたすべてのウイルスの種類・性質、③培地成分、④培養方法、⑤施設及び設備の仕様、⑥細胞培養後のウイルス試験の結果、⑦工程のウイルス不活化/除去能力、⑧製品のタイプや臨床上的使用目的・用法等が含まれる。

P3: 外来性ウイルスは、次のような経路により最終製品に迷入する可能性がある（ただし、これに限定されるわけではない）。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が汚染されている、2) 目的タンパク質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クロマトグラフ用カラムのような試薬が汚染されている、4) 製剤化に使用する添加剤が汚染されている、5) 細胞及び培養液の取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。

P6: 未加工/未精製バルクとして典型的なサンプルは、培養槽から取り出されたのち処理を行っていないものである。これは、外来性ウイルス汚染の可能性を高確率で検出するのに最も効果的な段階の1つである。ウイルス試験はこの未加工/未精製バルクの段階で適切に実施されるべきである。

P7: 存在することが知られているウイルスのクリアランスを評価する場合には、不活化の時間依存性に関する詳細な検討、不活化/除去の再現性の実証、及びプロセスパラメータの評価が必要である。「非特異的モデルウイルス」を用いて製造工程のもつクリアランス能力の特性を解析する場合には、試験デザインの際に、非エンベロープ型ウイルスの使用を考慮することが必要である。

P9: 過去におけるウイルス汚染の事例の多くは、存在が知られていない、あるいは予測だにされていなかったウイルスにより引き起こされている。こうした過去の事例は、様々な起源に由来する生物起源由来製品で起こったことであって、十分に特性解析された細胞株での例ではない。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。

P9: ウイル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、及びそれらの各工程を併せて、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。

P10: クリアランス工程評価及び工程特性解析に使用されるウイルスとしては、製品を汚染する可能性のあるウイルスと同様とみなされるウイルス、及び一般的にウイルスを排除するためのシステムの能力をテストする目的に適う物理的・化学的に広範な特性を持ったウイルスを選択すべきである。

P11: 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が目的である場合、すなわち当該工程が確実にウイルスクリアランス能力を発揮するという面での特性(robustness)を解析することが目的である場合に実施するウイルスクリアランス特性解析試験では、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。

「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を用いた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。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。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を優先して選択すべきである。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関する一般的で有益な情報となる。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。

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を付録2と表A-1に示す。

付録2: 「非特異的モデルウイルス」:物理的・化学的構造の異なる様々なウイルスの代表例

SV40(Polyomavirus maccacae 1)、ヒトポリオウイルス Sabin 1 型(Human Polio Virus 1 (Sabin))、動物パルボウイルス、その他の小型・非エンベロープ型ウイルス

パラインフルエンザウイルス(Parainfluenza Virus)、インフルエンザウイルス (Influenza Virus)、シンドビスウイルス(Sindbis Virus)、その他の中~大型・エンベロープ型・RNA ウイルス

ヘルペスウイルス(例:HSV-1、仮性狂犬病ウイルス(Pseudorabies Virus))、その他の中~大型・DNA ウイルス

P12: ウイルスクリアランス試験を行う際、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。

要点は、「非特異的モデルウイルスをスパイクし、製造工程のもつクリアランス能力の特性を解析する。非特異的モデルウイルスの選定に関しては、複数ウイルス種を用いた広範な検討が必要であり、特に非エンベロープ型ウイルスの使用を考慮することが必要である」「ウイルスクリアランス試験を行う際、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」である。

CBER Guidance for Industryには以下の通りに記載されている。

P3: For inactivated vaccines, the concern is that the process used to inactivate the vaccine virus may not inactivate all adventitious agents potentially present (as occurred with early inactivated poliovirus vaccines [Ref. 4]). Therefore, you should validate your process for inactivation of adventitious agents using different model viruses (Ref. 2).

P4: You should also consider the species of origin of your cell substrates, viral seeds, and other biological starting

materials in selecting your tests to ensure the absence of contaminants. Furthermore, you should consider any infectious viruses (including those that infect nonhuman species) as potential contaminants if there is the possibility of contact with your product or cell substrate at any time during development or production.

要点は、「ワクチンウイルスを不活化する工程では、存在しうる全ての迷入病原体を不活化することができない可能性がある。したがって、他のモデルウイルスを使って不活化工程の評価を行うべきである」 「迷入病原体が存在しないことを確認するための方法を選択する際、細胞の由来、ウイルスシードの由来、材料の由来を考慮すべきである。また、製品や細胞と接触の可能性のある限りは、ヒト以外の種類も含めて、いかなるウイルスも潜在的混入ウイルスと考えるべきである」である。

EMA/CHMP/BWP/68803/2010には以下の通りに記載されている。

P4: It should be noted that some cell lines, e.g. Vero cells, are able to propagate a very wide range of (human) viruses and there is a greater risk of isolating a co-infecting human virus from a clinical specimen in addition to an influenza virus (where such co-infections exist).

要点は、「細胞株はインフルエンザウイルスだけではなく他のウイルスも増殖する危険性があることに注意すべき」である。

WHO/BS/10.2132 (draft) には以下の通りに記載されている。

P12: Cells of various species used in the in vitro adventitious agent test that are intended to amplify adventitious viruses to promote their detection. Generally, this would include a human diploid cell line, such as MRC-5, a monkey kidney cell line, such as Vero cells, and a cell line of the same species and tissue as the cell bank. The purpose of these cell lines is to indicate a viral infection of the cell bank either through observation of cytopathic effect during and after an appropriate observation period or by hemadsorption and/or hemagglutination at the end of the observation period.

P37: Evidence should be provided for any animal-cell line proposed for use as a substrate for the manufacture of a biological product demonstrating that it is free from cultivable bacteria, mycoplasmas, fungi, and infectious viruses, including potentially oncogenic agents to the limits of the assay's detection capabilities. Special attention should be given to viruses that commonly contaminate the animal species from which the cell line is derived, and to cell-culture reagents of biological origin.

要点は、「迷入ウイルスについて調べるには、コントロール培養が有用」である。

「細胞株は、細菌、マイコプラズマ、真菌、ウイルス、がん原性を持つものなどがいないことを示す必要がある。細胞株が由来する動物種に感染するウイルスについては特に配慮が必要である」である。

【ディスカッション】

どのようなウイルスが混入してくるかが分からないので、モデルウイルスをスパイクし、そのクリアランスを見るという試験が重要であろう。

ICH Q5Aには「非特異的モデルウイルスをスパイクし、製造工程のもつクリアランス能力の特性を解析する。非特異的モデルウイルスの選定に関しては、複数ウイルス種を用いた広範な検討が必要であり、特に非エンベロープ型ウイルスの使用を考慮することが必要である」「ウイルスクリアランス試験を行う際、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」とあり、CBER Guidance for Industryには、「ワ