

CID-MS/MSにより取得されたプロダクトイオンを帰属することで、ジスルフィド結合の位置を確認することができる<sup>21)</sup>。ジスルフィド結合を含むペプチドのCIDでは十分なフラグメントが得られず、配列を確認できないケースでは、電子移動解離(ETD)による断片化が利用できるかもしれない。ETDを用いるとジスルフィド結合が優先的に切断されるので、生じたペプチド部分に相当するプロダクトイオンを前駆イオンとしてMS/MS/MSを行い、ジスルフィド結合を形成していたペプチド部分のアミノ酸配列を確認した例が報告されている<sup>22,23)</sup>。

ジスルフィド結合ミスマッチ体が生じやすいバイオ医薬品の一つとして、IgG抗体が挙げられる<sup>24)</sup>。現在承認されているIgG抗体医薬品のサブクラスは主にIgG1であり、多くはないがIgG2及びIgG4型の抗体医薬品も上市されている。いずれも12本の分子内ジスルフィド結合を有し、さらにヒンジ領域に、IgG1とIgG4では2本、並びにIgG2では4本のH鎖間ジスルフィド結合が存在する(図7)。ミスマッチ体が生じやすいサブクラスは、IgG2とIgG4である。あるIgG2抗体では、リジレンドペプチダーゼC消化物のLC/MSにより、2種類のジスルフィド結合ミスマッチ体が存在することが確認されている<sup>25)</sup>。

IgG4では、ヒンジ部のジスルフィド結合のミスマッチが、分子間ではなく分子内で生じやすいことが知られている。分子内ジスルフィド結合に組み変わると、H鎖間の結合がC<sub>H</sub>3領域の非共有結合性の親和性のみによって保たれることになり、2本鎖型(1本のH鎖と1本のL鎖で構成される分子)が形成されやすくなる<sup>26,27)</sup>。そのためIgG4型の抗体医薬品では、2本鎖型の有無を確認するとともに、その生成を管理することが重要となる。2本鎖型の存在は、還元状態でSDS-PAGEを行うことで確認できるが、インタクトのままMSを行うことにより、その有無をより簡便に確認することができる。IgG4は高濃度になるほど4本鎖型(2本のH鎖と2本のL鎖で構成される分子)を形成しやすくなり、逆に、低濃度になると2本鎖型に解離しやすくなるので、IgG4試料の濃度を変えてインタクトのMSを行い、「2本鎖型と4本鎖型の総ピーク強度」に対する「2本鎖型のピーク強度」を縦軸に、試料濃度を横軸にとることにより、解離定数( $K_D$ )を求めることも可能である<sup>28)</sup>。

余談ではあるが、IgG2やIgG4抗体のジスルフィド結合ミスマッチ体は、製造工程だけではなく血液中でも生じることがある。2006年英国において、サイトカイン放出を伴う重篤な有害事象を引き起こした抗体TGN1412のサブクラスはIgG4であり、*in vitro*の実験で2本鎖型形成に伴う“Fab-arm exchange”が生じることが報告されている<sup>29)</sup>。IgG2及びIgG4型抗体医薬品の薬物動態を明らかにするために、ミスマッチ体を検出できる分析技術の開発が待たれる。現在、バイオ医薬品のバイオアナリシスはenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)等によるリガンド結合アッセイが一般的であるが、今後は構造情報が得られるLC/MS等を用いた分析が必要になってくるだろう。

稀なケースではあるが、トリスルフィド結合(Cys-S-S-S-Cys)が形成されることがある<sup>30-32)</sup>。最初の報告は遺伝子組換えモノクローナルIgG<sub>2</sub>抗体のヒンジ部における形成であったが、その後、他のサブクラスでも形成が確認されている。生成機構の詳細は明らかにされていないが、培養中に生じた硫化水素がジスルフィド結合に反応することで生じることが示唆されている。トリスルフィド結合の位置もジスルフィド結合と同様にLC/MSによるペプチドマッピングにより確認することができる。

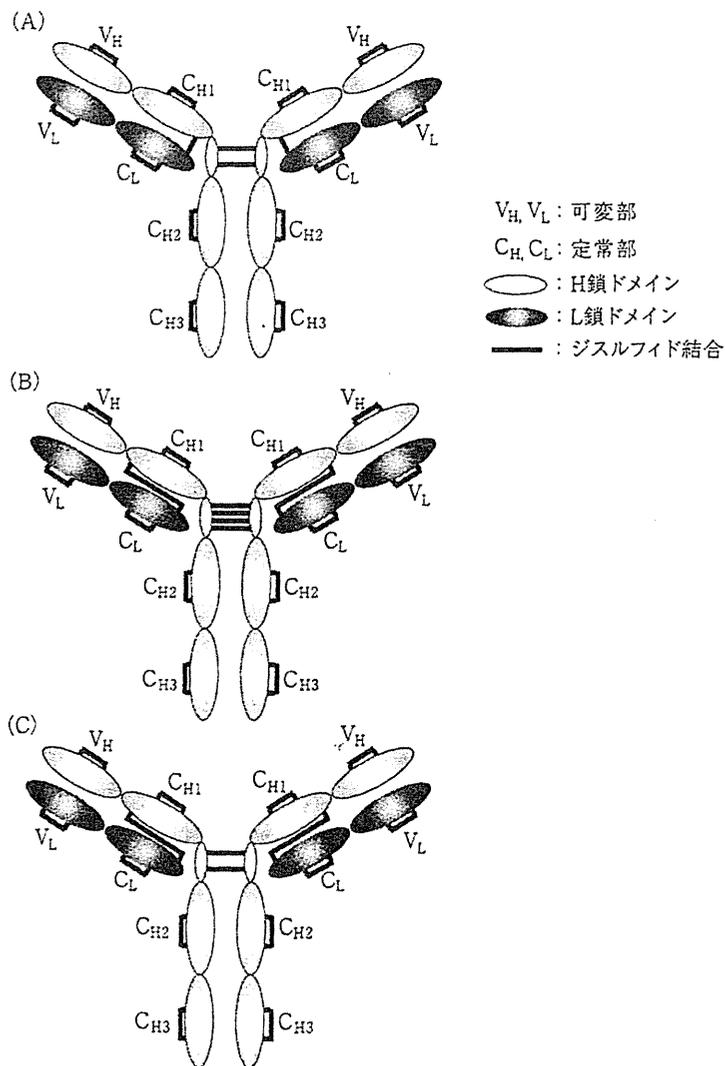


図7 IgGサブクラスのジスルフィド結合の位置  
 (A) IgG1, (B) IgG2, (C) IgG4

## 2.5 切断

切断体とは、加水分解酵素や化学反応により、目的物質のペプチド結合が開裂することで生じる分子変化物のことである。抗体は切断体を生じやすいタンパク質の一つであり、酸性あるいはアルカリ性溶液中で抗体を保存すると、ヒンジ領域付近が開裂し、切断体が生じることが報告されている<sup>33)</sup>。また、熱ストレスによっても、ヒンジ領域及びC<sub>H2</sub>ドメイン付近が開裂し、切断体が産生されることが報告されている<sup>34-37)</sup>。エタネルセプト、ゴリムマブ及びモガムリズマブ等では、切断体は目的物質由来不純物として扱われているようである<sup>38-40)</sup>。切断体の有無は、タンパク質の分離に適した逆相C4カラム等を用いたLC/MSでインタクトのまま分析して確認する。検出された場合は、HPLCで切断体を分取した後、ペプチドマッピングにより切断位置を確認する。

## 2.6 凝集

凝集体は免疫原性との関係が指摘されているため、その量と、可能であれば粒子サイズ等を評価しておくことが望ましい。培養・精製工程において凝集体形成に関与する因子としては、温度、タンパク質濃度、アンフォールディング/リフォールディング操作、凍結融解、ろ過工程における加圧、及び乾燥等が考えられる。製剤化工程あるいは保存中に凝集体形成を促進する因子としては、温度、光、容器/栓、溶液のpH、緩衝の種類及びタンパク質濃度などが挙げられる。

凝集体の分析法としては、一般にサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、超遠心分離法、SDS-PAGE、フィールドフローフラクショネーション、動的光散乱法などがある。しかし、凝集体の粒子サイズ及び形状等の評価には依然として課題があるようである<sup>10)</sup>。凝集体の形成に関与しているアミノ酸配列を特定することを目的として、架橋試薬を用いた架橋形成により凝集体の構造を固定した後、LC/MSによるペプチドマッピングを行った例が報告されている<sup>41)</sup>。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用の解析に利用されている水素/重水素交換反応とLC/MSによるペプチドマッピングを組み合わせた手法(HDX/MS)も凝集体解析に応用されており、モノクローナル抗体の凍結融解による凝集体形成にCDRの領域が関係していることが報告されている<sup>42,43)</sup>。

## 2.7 糖鎖

バイオ医薬品の多くは糖タンパク質である。糖鎖にはAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列のアスパラギン残基に結合するN-結合型糖鎖と、セリンまたはスレオニン残基に結合するO-結合型糖鎖がある。その他、ウロキナーゼにはO-結合型フコース(Fuc)が、ト

ロンモジュリンでは上皮成長因子受容体ドメインにO-結合型グルコース(Glc)が結合している<sup>44)</sup>。特性解析においては、糖鎖非付加体の有無と、糖鎖が結合していないことが生物活性・有効性に及ぼす影響を明らかにする必要がある。糖鎖非付加体の有無は、インタクトMSもしくはLC/MSを用いたペプチドマップにより確認することができる。

糖鎖は不均一性が高いので、結合している糖鎖の種類とその分布を明らかにすること、有効性及び安全性に寄与する糖鎖の構造を明らかにすることが重要である。抗体医薬品の中には、抗体依存性細胞障害(ADCC)活性及び補体依存性細胞障害(CDC)活性を主薬理作用とするものがあり、それぞれ、還元末端GlcNAcに $\alpha$ (1-6)結合しているFucの除去、及び還元末端ガラクトース(Gal)の付加によって活性が増大することが知られている<sup>45-47)</sup>。このような抗体医薬品においては、Fuc結合糖鎖及びGal非結合糖鎖をもつ分子種(グリコフォーム)の分布を明らかにし、これらを目的物質/目的物質関連物質と目的物質由来不純物のどちらとして管理するのかを明らかにする必要がある。また、マウスミエローマ細胞等で製造した抗体医薬品では、非ヒト型糖鎖抗原であるGal $\alpha$ (1-3)Galエпитープが結合し、アナフィラキシーが誘発された例が報告されているので、安全性に影響する糖鎖の有無と許容範囲を明らかにする必要がある<sup>48)</sup>。図8は、ある抗体医薬品からN-結合型糖鎖を遊離させ、LC/MS/MSにより分析した例である。糖鎖kは、CID-MS/MSにより生じたプロダクトイオンより、Gal $\alpha$ (1-3)Galエпитープが結合した糖鎖と推定された。

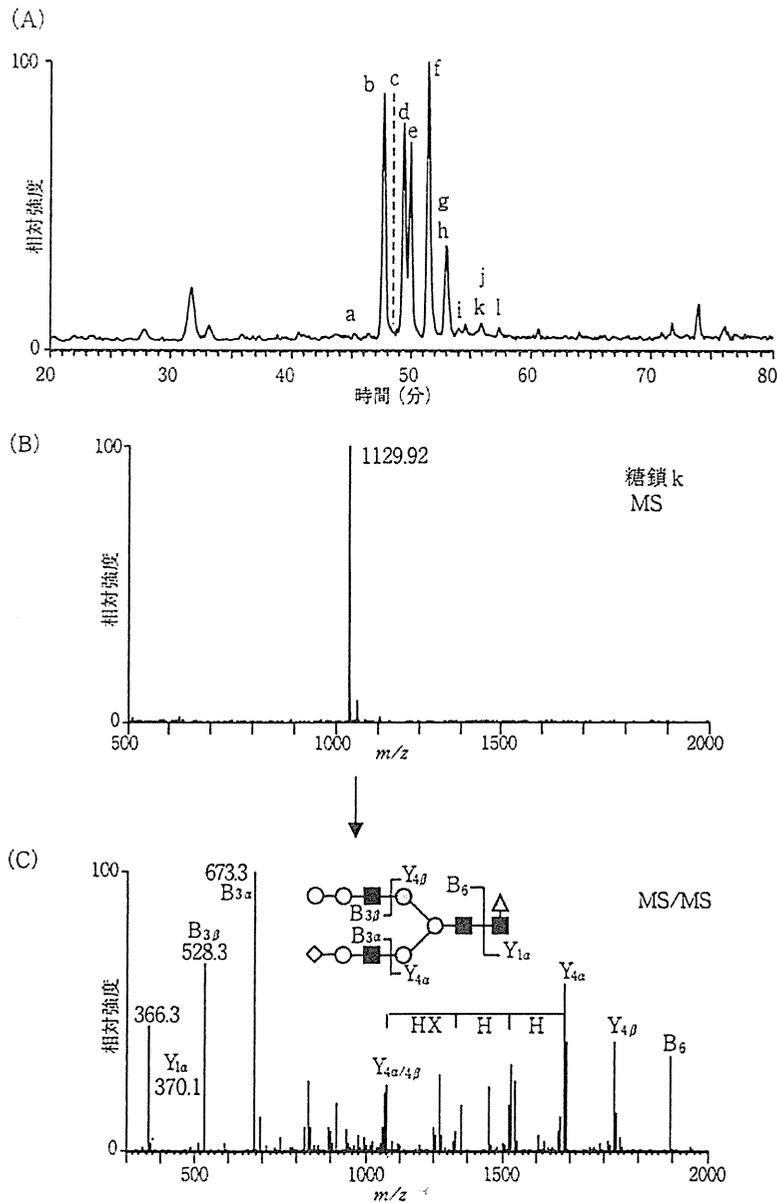


図8 抗体医薬品の糖鎖プロファイリング<sup>4)</sup>  
 (A) LC/MSにより取得されたTIC, (B) 糖鎖kの質量スペクトル, (C) 糖鎖kのプロダクトイオンスペクトル。  
 ▲フコース, ■N-アセチルグルコサミン, ●マンノース, ○ガラクトース, ◇N-グリコシルノイ  
 ラミン酸, HX N-アセチルヘキサミン, Hヘキソース

## 2.8 糖化

糖化体は、グルコースなどの還元糖が非酵素的にタンパク質に付加したものであり、還元糖のアルデヒド基が、タンパク質のN末端アミノ基やリシン残基のεアミノ基と Schiff塩基を

形成した後、1,2-エミナールを経て、アマドリ転位によって生成される(アマドリ化合物)(図9)。糖化には、培養工程で培地に添加するグルコースが関係していることが示唆されている<sup>49)</sup>。また、試験的にグルコースを含む輸液を用いて抗体を製剤化した場合にも糖化体が生成されることが報告されている<sup>50,51)</sup>。糖化されたアミノ酸残基は、LC/MSを用いたペプチドマッピングにより特定することができる。ボロン酸アフィニティークロマトグラフィーは、アルカリ条件でボロン酸のジオール基と糖のシスジオール基がエーテル結合することから、糖化体の分離に利用されている<sup>52)</sup>。また、SDS-キャピラリー電気泳動法により、還元化抗体の分析を行い、糖化されたL鎖及びH鎖が幅広いピークとなって観測された例が報告されている<sup>53)</sup>。

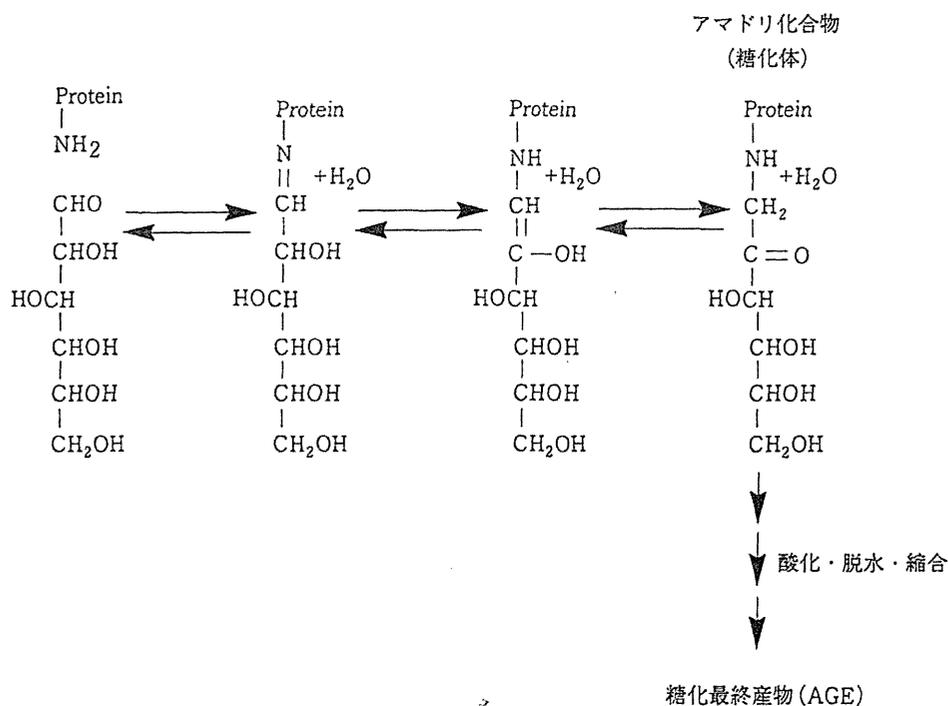


図9 糖化反応経路<sup>10)</sup>

## 2.9 意図的修飾

血中半減期の延長を意図してポリエチレングリコール(PEG)、アルブミン及び脂肪酸などを結合させたタンパク質やペプチド、抗腫瘍活性を有する低分子化合物を結合させた抗体薬物複合体(ADC)、並びに診断・治療を目的とした放射性同位体ラベル抗体など、体内動態の改善、分子標的性の付与及び副作用の低減等を期待した修飾タンパク質やペプチド医薬品が次々と開発されている。これらの医薬品では、非修飾体の有無を確認するとともに、非修飾体が生物活

性や有効性に与える影響を確認しておくことが重要である。非修飾体の有無は、SECやSDS-PAGE等でも確認できるが、インタクトのままMSで分析し、デコンボリューション質量スペクトルを解析することでも確認できる<sup>54)</sup>。遊離した修飾分子も目的物質由来不純物として管理する必要があるので、例えば、ADCの場合では、細胞障害性薬物、及びリンカー部分が結合した細胞障害性薬物(リンカー結合細胞障害性薬物)の有無を確認する必要がある<sup>55)</sup>。「細胞障害性薬物」及び「リンカー結合細胞障害性薬物」は、抗「細胞障害性薬物」抗体が入手できる場合は、その抗体を用いたアフィニティーカラムで精製した後、LC/MS/MSで解析することができる<sup>56)</sup>。

尚、リンカーの末端官能基がマレイミド基で、スルフヒドリル基を「リンカー結合細胞障害性薬物」の結合位置とするADCにおいて、「リンカー結合細胞障害性薬物」部分が血液中でアルブミンに転位することが報告されている。このように内在性タンパク質に転位した「リンカー結合細胞障害性薬物」を解析する場合は、アフィニティーカラムで精製後、ペプチドマッピングを行うことにより、受け手のタンパク質の同定と結合部位の特定ができる<sup>56)</sup>。

### 3. LC/MSによる製造工程由来不純物の解析

製造工程由来不純物とは、製造基材、細胞培養液、抽出・加工・精製工程等に由来する不純物で、宿主細胞由来タンパク質(HCP)、宿主細胞由来DNA、細胞培養液に由来する抗生物質や培地成分、クロマトグラフィー担体であるプロテインAなどが該当する(表1)。宿主細胞由

表1 製造工程由来不純物の例<sup>60)</sup>

由来	不純物の例
細胞基材	<ul style="list-style-type: none"> <li>・宿主細胞由来タンパク質</li> <li>・核酸(例:宿主ゲノム由来,ベクター由来,総DNA)</li> </ul>
細胞培養液	<ul style="list-style-type: none"> <li>・培地成分</li> <li>・添加物(例:インスリン,トランスフェリン,メトトレキサート)</li> <li>・血清由来成分(例:アルブミン)</li> <li>・抗生物質(例:テトラサイクリン,ゲンタマイシン)</li> <li>・細胞からの分泌物</li> </ul>
抽出・分離・加工・精製工程	<ul style="list-style-type: none"> <li>・酵素</li> <li>・化学的・生化学的試薬(例:臭化シアン,グアニジン,酸化剤,還元剤)</li> <li>・無機塩(例:重金属,ヒ素,非金属イオン)</li> <li>・溶媒</li> <li>・クロマトグラフ用担体</li> <li>・アフィニティークロマトグラフ用担体のリガンド(例:モノクローナル抗体,プロテインA)</li> <li>・その他の漏出物</li> </ul>

来DNAは、ハイブリダイゼーション法、DNA結合免疫リガンドアッセイ、及び定量的PCR法で、また、プロテインA及びHCPは、それらに対する抗体を用いたELISA法により測定されることが多く、LC/MSの利用は一般的ではないようである。しかし、近年、HCPの解析法としてLC/MSに注目が集まっていおり、3.1のような解析例も報告されている。ADCやPEG体のように、意図的に修飾を施したバイオ医薬品においては、残存する修飾剤は製造工程由来不純物として扱う。(分析法については「2.9 意図的修飾のあるタンパク質・ペプチド医薬品」を参照のこと。)

### 3.1 HCP

HCPとは、バイオ医薬品の製造に使用される、大腸菌、酵母、及びチャイニーズハムスター卵巣細胞やマウスミエローマ細胞等の細胞に由来するタンパク質のことである。HCPの中には免疫原性やアジュバント様活性をもつタンパク質が含まれている可能性があること、またプロテアーゼ等の残存により、製剤の安定性が低下することなどが報告されている<sup>57-59)</sup>。HCPの定量に最も利用されている手法は、多成分のHCPに対するポリクローナル抗体を用いたELISA法である。HCPの許容値は規制上設定されていないが、ELISA法で測定するとき100 ppm未満とする例が多いようである<sup>60,61)</sup>。しかしELISA法では、使用する抗HCP抗体により得られる結果が変わる可能性があること、品目ごとにHCP抗体を調製する必要があること、検出されているタンパク質を特定できないので免疫原性やアジュバント活性などを予測できないことなど、課題が残されている。これらの課題を克服するために、近年、超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)を用いた二次元LC/MS及び多重反応モニタリング(MRM)を組み合わせたHCPの定性的・定量的分析を行った例が報告されている<sup>62)</sup>。僅か10 ppm程度のHCPでも定量できるようである<sup>59)</sup>。HCPを網羅的に同定する場合には、二次元電気泳動とMSを組み合わせたプロテオミクス的手法も有用であり、今後HCPの特定と管理に発展することが期待される<sup>63)</sup>。

### おわりに

装置の普及、分析技術の高度化、及び研究の進展により、LC/MSは、バイオ医薬品の品質評価に不可欠な分析手法となっている。特に、アミノ酸配列、アミノ酸残基の変化、ジスルフィド結合、糖鎖、修飾状態、及び不均一性の解析において、第一に選択される分析手法となっており、目的物質はもちろん、分子変化体の構造・物理的・化学的性質の解析に大きく貢献している。今後はさらに、結合活性測定、安定性、及びHCP等工程由来不純物の評価など、構造・物理的・化学的性質以外の評価法としても発展していくことが期待される。

## 引用文献

- 1) 原園 景, 橋井則貴, 多田 稔, "バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第8回)バイオ医薬品の規格・試験方法", *PHARM TECH JAPAN* 28, No.9, 2012, pp.91-100.
- 2) P. Roepstorff, J. Fohlman, "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides", *Biomed Mass Spectrom* 11, No.11, 1984, pp.601.
- 3) B. Domon, C. E. Costello, "Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB/MS of Glycoconjugates", *Glycoconjugate J* 5, 1988, pp.397-409.
- 4) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英, "抗体医薬の最前線 第10章 抗体医薬品のLC/MS, 監修: 植田充美", シーエムシー出版, 2007, pp.105-115.
- 5) 第十六改正日本薬局方, ヘプチド及びタンパク質の質量分析, pp.2024: 厚生労働省.
- 6) R. B. Kotia, A. R. Raghani, "Analysis of monoclonal antibody product heterogeneity resulting from alternate cleavage sites of signal peptide", *Anal Biochem* 399, No.2, 2010, pp.190-195.
- 7) D. H. Patterson, G. E. Tarr, F. E. Regnier, S. A. Martin, "C-terminal ladder sequencing via matrix-assisted laser desorption mass spectrometry coupled with carboxypeptidase Y time-dependent and concentration-dependent digestions", *Anal Chem* 67, No.21, 1995, pp.3971-3978.
- 8) A. Hamberg, M. Kempka, J. Sjobahl, J. Roeraade, K. Hult, "C-terminal ladder sequencing of peptides using an alternative nucleophile in carboxypeptidase Y digests", *Anal Biochem* 357, No.2, 2006, pp.167-172.
- 9) I. R. Correia, "Stability of IgG isotypes in serum", *MAbs* 2, No.3, 2010, pp.221-232.
- 10) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ, "バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第3回)バイオ医薬品の不純物の評価(1)", *PHARM TECH JAPAN* 28, No.3, 2012, pp.43-48.
- 11) R. J. Harris, B. Kabakoff, F. D. Macchi, F. J. Shen, M. Kwong, J. D. Andya, S. J. Shire, N. Bjork, K. Totpal, A. B. Chen, "Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody", *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 752, No.2, 2001, pp.233-245.
- 12) L. Huang, J. Lu, V. J. Wroblewski, J. M. Beals, R. M. Rigglin, "In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS", *Anal Chem* 77, No.5, 2005, pp.1432-1439.
- 13) S. Hovorka, C. Schoneich, "Oxidative degradation of pharmaceuticals: theory, mechanisms and inhibition", *J Pharm Sci* 90, No.3, 2001, pp.253-269.
- 14) J. A. Ji, B. Zhang, W. Cheng, Y. J. Wang, "Methionine, tryptophan, and histidine oxidation in a model protein, PTH: mechanisms and stabilization", *J Pharm Sci* 98, No.12, 2009, pp.4485-4500.
- 15) S. Li, C. Schoneich, R. T. Borchart, "Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization", *Biotechnol Bioeng* 48, No.5, 1995, pp.490-500.
- 16) T. H. Nguyen, J. Burnier, W. Meng, "The kinetics of relaxin oxidation by hydrogen peroxide", *Pharm Res* 10, No.11, 1993, pp.1563-1571.
- 17) R. Kuribayashi, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki, "Rapid evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/mass spectrometry with a column-switching system", *J Pharm Biomed Anal* 67-68, 2012, pp.1-9.
- 18) D. Houde, P. Kauppinen, R. Mhatre, Y. Lyubarskaya, "Determination of protein oxidation by mass spectrometry and method transfer to quality control", *J Chromatogr A* 1123, No.2, 2006, pp.189-198.

- 19) M. Hensel, R. Steurer, J. Fichtl, C. Elger, F. Wedekind, A. Petzold, T. Schlothauer, M. Molhoj, D. Reusch, P. Bulau, "Identification of potential sites for tryptophan oxidation in recombinant antibodies using tert-butylhydroperoxide and quantitative LC-MS", *PLoS One* 6, No.3, 2011, pp.e17708.
- 20) T. M. Dillon, M. S. Ricci, C. Vezina, G. C. Flynn, Y. D. Liu, D. S. Rehder, M. Plant, B. Henkle, Y. Li, S. Deechongkit, B. Varnum, J. Wypych, A. Balland, P. V. Bondarenko, "Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass", *J Biol Chem* 283, No.23, 2008, pp.16206-16215.
- 21) W. Zhang, L. A. Marzilli, J. C. Rouse, M. J. Czupryn, "Complete disulfide bond assignment of a recombinant immunoglobulin G4 monoclonal antibody", *Anal Biochem* 311, No.1, 2002, pp.1-9.
- 22) Y. Wang, Q. Lu, S. L. Wu, B. L. Karger, W. S. Hancock, "Characterization and comparison of disulfide linkages and scrambling patterns in therapeutic monoclonal antibodies: using LC-MS with electron transfer dissociation", *Anal Chem* 83, No.8, 2011, pp.3133-3140.
- 23) S. L. Wu, H. Jiang, Q. Lu, S. Dai, W. S. Hancock, B. L. Karger, "Mass spectrometric determination of disulfide linkages in recombinant therapeutic proteins using online LC-MS with electron-transfer dissociation", *Anal Chem* 81, No.1, 2009, pp.112-122.
- 24) H. Liu, K. May, "Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function", *MAbs* 4, No.1, 2012, pp.17-23.
- 25) J. Wypych, M. Li, A. Guo, Z. Zhang, T. Martinez, M. J. Allen, S. Fodor, D. N. Kelner, G. C. Flynn, Y. D. Liu, P. V. Bondarenko, M. S. Ricci, T. M. Dillon, A. Balland, "Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms", *J Biol Chem* 283, No.23, 2008, pp.16194-16205.
- 26) R. C. Aalberse, J. Schuurman, "IgG4 breaking the rules", *Immunology* 105, No.1, 2002, pp.9-19.
- 27) J. Schuurman, G. J. Perdok, A. D. Gorter, R. C. Aalberse, "The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds", *Mol Immunol* 38, No.1, 2001, pp.1-8.
- 28) R. J. Rose, A. F. Labrijn, E. T. van den Bremer, S. Loverix, I. Lasters, P. H. van Berkel, J. G. van de Winkel, J. Schuurman, P. W. Parren, A. J. Heck, "Quantitative analysis of the interaction strength and dynamics of human IgG4 half molecules by native mass spectrometry", *Structure* 19, No.9, 2011, pp.1274-1282.
- 29) A. F. Labrijn, A. O. Buijsse, E. T. van den Bremer, A. Y. Verwilligen, W. K. Bleeker, S. J. Thorpe, J. Killestein, C. H. Polman, R. C. Aalberse, J. Schuurman, J. G. van de Winkel, P. W. Parren, "Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo", *Nat Biotechnol* 27, No.8, 2009, pp.767-771.
- 30) H. Aono, D. Wen, L. Zang, D. Houde, R. B. Pepinsky, D. R. Evans, "Efficient on-column conversion of IgG1 trisulfide linkages to native disulfides in tandem with Protein A affinity chromatography", *J Chromatogr A* 1217, No.32, 2010, pp.5225-5232.
- 31) S. Gu, D. Wen, P. H. Weinreb, Y. Sun, L. Zhang, S. F. Foley, R. Kshirsagar, D. Evans, S. Mi, W. Meier, R. B. Pepinsky, "Characterization of trisulfide modification in antibodies", *Anal Biochem* 400, No.1, 2010, pp.89-98.
- 32) P. Pristatsky, S. L. Cohen, D. Krantz, J. Acevedo, R. Ionescu, J. Vlasak, "Evidence for trisulfide bonds in a recombinant variant of a human IgG2 monoclonal antibody", *Anal Chem* 81, No.15, 2009, pp.6148-6155.
- 33) G. Gaza-Bulseco, H. Liu, "Fragmentation of a recombinant monoclonal antibody at various pH",

- Pharm Res* 25, No.8, 2008, pp.1881-1890.
- 34) A. J. Cordoba, B. J. Shyong, D. Breen, R. J. Harris, "Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution", *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 818, No.2, 2005, pp.115-121.
  - 35) H. Liu, G. Gaza-Bulseco, J. Sun, "Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature", *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 837, No.1-2, 2006, pp.35-43.
  - 36) T. M. Dillon, P. V. Bondarenko, D. S. Rehder, G. D. Pipes, G. R. Kleemann, M. S. Ricci, "Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability", *J Chromatogr A* 1120, No.1-2, 2006, pp.112-120.
  - 37) T. Xiang, E. Lundell, Z. Sun, H. Liu, "Structural effect of a recombinant monoclonal antibody on hinge region peptide bond hydrolysis", *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 858, No.1-2, 2007, pp.254-262.
  - 38) エンブレル, 医薬品インタビューフォーム, 2010年10月(改訂第16版).
  - 39) 医薬品食品局審査管理課, "ゴリムマブ(遺伝子組換え)", 審議結果報告書, 平成23年5月9日.
  - 40) 医薬品食品局審査管理課, "モガムリズムマブ(遺伝子組換え)", 審議結果報告書, 平成24年2月6日.
  - 41) A. Zhao, G. Hao, J. Gu, "Chemical crosslinking and mass spectrometric identification of interaction sites within soluble aggregate of protein therapeutics", *J Pharm Biomed Anal*, 2012.
  - 42) S. A. Tobler, E. J. Fernandez, "Structural features of interferon-gamma aggregation revealed by hydrogen exchange", *Protein Sci* 11, No.6, 2002, pp.1340-1352.
  - 43) A. Zhang, S. K. Singh, M. R. Shirts, S. Kumar, E. J. Fernandez, "Distinct aggregation mechanisms of monoclonal antibody under thermal and freeze-thaw stresses revealed by hydrogen exchange", *Pharm Res* 29, No.1, 2012, pp.236-250.
  - 44) Y. Sakaidani, K. Furukawa, T. Okajima, "O-GlcNAc modification of the extracellular domain of Notch receptors", *Methods Enzymol* 480, 2010, pp.355-373.
  - 45) R. Niwa, S. Hatanaka, E. Shoji-Hosaka, M. Sakurada, Y. Kobayashi, A. Uehara, H. Yokoi, K. Nakamura, K. Shitara, "Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 Is independent of FcγRIIIa functional polymorphism", *Clin Cancer Res* 10, No.18 Pt 1, 2004, pp.6248-6255.
  - 46) J. N. Arnold, M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd, R. A. Dwek, "The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins", *Annu Rev Immunol* 25, 2007, pp.21-50.
  - 47) T. S. Raju, "Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs", *Curr Opin Immunol* 20, No.4, 2008, pp.471-478.
  - 48) C. H. Chung, B. Mirakhur, E. Chan, Q. T. Le, J. Berlin, M. Morse, B. A. Murphy, S. M. Satinover, J. Hosen, D. Mauro, R. J. Slebos, Q. Zhou, D. Gold, T. Hatley, D. J. Hicklin, T. A. Platts-Mills, "Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-α-1,3-galactose", *N Engl J Med* 358, No.11, 2008, pp.1109-1117.
  - 49) I. H. Yuk, B. Zhang, Y. Yang, G. Dutina, K. D. Leach, N. Vijayasankaran, A. Y. Shen, D. C. Andersen, B. R. Snedecor, J. C. Joly, "Controlling glycation of recombinant antibody in fed-batch cell cultures", *Biotechnol Bioeng* 108, No.11, 2011, pp.2600-2610.
  - 50) S. Fischer, J. Hoernschemeyer, H. C. Mahler, "Glycation during storage and administration of

- monoclonal antibody formulations". *Eur J Pharm Biopharm* 70, No.1, 2008, pp.42-50.
- 51) H. S. Gadgil, P. V. Bondarenko, G. Pipes, D. Rehder, A. McAuley, N. Perico, T. Dillon, M. Ricci, M. Treuheit, "The LC/MS analysis of glycation of IgG molecules in sucrose containing formulations", *J Pharm Sci* 96, No.10, 2007, pp.2607-2621.
  - 52) A. Takatsy, K. Boddi, L. Nagy, G. Nagy, S. Szabo, L. Marko, I. Wittmann, R. Ohmacht, T. Ringer, G. K. Bonn, D. Gjerde, Z. Szabo, "Enrichment of Amadori products derived from the nonenzymatic glycation of proteins using microscale boronate affinity chromatography", *Anal Biochem* 393, No.1, 2009, pp.8-22.
  - 53) T. Kaschak, D. Boyd, B. Yan, "Characterization of glycation in an IgG1 by capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate and mass spectrometry", *Anal Biochem* 417, No.2, 2011, pp.256-263.
  - 54) K. Xu, L. Liu, O. M. Saad, J. Baudys, L. Williams, D. Leipold, B. Shen, H. Raab, J. R. Junutula, A. Kim, S. Kaur, "Characterization of intact antibody-drug conjugates from plasma/serum in vivo by affinity capture capillary liquid chromatography-mass spectrometry", *Anal Biochem* 412, No.1, 2011, pp.56-66.
  - 55) L. Ducry, B. Stump, "Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies", *Bioconjug Chem* 21, No.1, 2010, pp.5-13.
  - 56) S. C. Alley, D. R. Benjamin, S. C. Jeffrey, N. M. Okeley, D. L. Meyer, R. J. Sanderson, P. D. Senter, "Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates", *Bioconjug Chem* 19, No.3, 2008, pp.759-765.
  - 57) X. Wang, A. K. Hunter, N. M. Mozier, "Host cell proteins in biologics development: Identification, quantitation and risk assessment", *Biotechnol Bioeng* 103, No.3, 2009, pp.446-458.
  - 58) S. X. Gao, Y. Zhang, K. Stansberry-Perkins, A. Buko, S. Bai, V. Nguyen, M. L. Brader, "Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity", *Biotechnol Bioeng* 108, No.4, 2011, pp.977-982.
  - 59) M. R. Schenauer, G. C. Flynn, A. M. Goetze, "Identification and quantification of host cell protein impurities in biotherapeutics using mass spectrometry", *Anal Biochem* 428, No.2, 2012, pp.150-157.
  - 60) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ, "バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第3回)バイオ医薬品の不純物の評価(2)", *PHARM TECH JAPAN* 28, No.4, 2012, pp.113-119.
  - 61) K. Champion, H. Madden, J. Dougherty, E. Shacter, "Defining your product profile and maintaining control over it: 2. Challenges of monitoring host cell protein impurities", *BioProcess Int.* 3, No.8, 2005, pp.52-57.
  - 62) C. E. Doneanu, A. Xenopoulos, K. Fadgen, J. Murphy, S. J. Skilton, H. Prentice, M. Stapels, W. Chen, "Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry", *MAbs* 4, No.1, 2012, pp.24-44.
  - 63) D. C. Krawitz, W. Forrest, G. T. Moreno, J. Kittleson, K. M. Champion, "Proteomic studies support the use of multi-product immunoassays to monitor host cell protein impurities", *Proteomics* 6, No.1, 2006, pp.94-110.
  - 64) 原園景, 未発表データ.

**バイオ(抗体)医薬品における  
不純物/凝集の評価・試験と  
免疫原性, ウイルス安全性への対応**

監修 吉森 孝行

サイエンス&テクノロジー

## 第11章 バイオ医薬品のウイルス安全性

国立医薬品食品衛生研究所 遊佐 敬介

### はじめに

バイオ医薬品の範囲には、組換えDNA技術や細胞培養技術を用いて生産される医薬品の他、先端的技術を応用して生産される遺伝子治療用医薬品、細胞・組織加工医薬品および医療機器、将来的には遺伝子組換え動物、植物などにより生産される医薬品などが含まれる。ここでは、組換えDNA技術や細胞培養技術を用いて生産される医薬品に関するウイルス安全性について述べる。

組換え医薬品には、細菌、酵母を利用して生産されるものと、ヒトや動物細胞を利用して生産される製品がある。細菌、酵母を利用する場合には、ヒトに感染を引き起こすウイルスが製品に混入する可能性が極めて少ない。というのも細菌、酵母に感染するウイルスでヒトにも共通感染するウイルスは知られていないからである。そのため細菌や酵母を利用して生産される組換え医薬品に関しては、ウイルスの混入は想定されていない。これに対して、動物細胞を利用する場合には、ウイルスが製品に混入する可能性について十分考慮する必要がある。外来から迷入したウイルスは、医薬品製造細胞に感染し、組換えタンパク質の生産性を低下させ、製品を汚染する可能性がある。そのウイルスがヒトに感染性をもつウイルスの場合には、重大な医療事故を引き起こすケースが想定される。幸いなことにバイオ医薬品に関して現在まで製品のウイルスによる汚染は報告されていない。しかし過去には、製造用培養槽などでウイルス汚染事故が、起きていることも事実である。いずれもウイルスによる汚染が動物細胞培養の時点で見つかって製品の汚染が食い止められている。これは今後バイオ医薬品の市場規模がさらに拡大するに従い、製品のウイルス汚染の危険性に対する備えをおろそかにすることはできないことを示している。

### 1. ウイルス安全性の考え方

現在日本では、90品目もの組換え・細胞培養医薬品が国内で承認され、臨床現場で使われている。これらの医薬品のうち動物細胞を用いて製造される医薬品は、生体成分を利用して製造されるために生産基材や原材料がウイルスを含んでいる可能性があるため、バイオ医薬品の安全性はガイドラインに沿った合理的なルールによって守られている。バイオ医薬品のウイル

スの汚染を防ぐための基準作りが日米欧三極で行われ、平成12年にガイドライン「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」(Q5A)が通知された<sup>1)</sup>。細胞培養に使われる原材料は「生物由来原料基準」<sup>2)</sup>および細胞基材については「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」(Q5D)<sup>3)</sup>などを考慮してウイルス安全性に努めることになっている。「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」に示されている特徴的な安全性の考えは、低濃度のウイルス検出感度には限界があるため、ウイルスクリアランス試験というプロセス評価を加えることにより、最終製品のウイルスに対する安全性を担保するという点である。そのために、適切な工程でのウイルス試験や精製工程でのウイルス不活化・除去能を定量的に示すことによって、工程全体を通じてその妥当性を明らかにする必要がある。

ウイルス安全性の考え方について、組換え医薬品の製造工程をたどりながら大まかな流れを見ていこう(図1)。通常組換えタンパク質は、動物細胞の上清に分泌され、培養上清(未精製バルク)を出発点として、タンパク質性医薬品の精製工程が始まる。まず未精製バルクまでにウイルスが混入する可能性について検討すると、ウイルス混入の可能性として以下をあげることができる。①医薬品生産に用いる動物細胞のウイルス感染、②培地に添加されるウシ胎児血清へのウイルスの混入、③培地に含まれる生物由来成分へのウイルスの混入、④細胞の継代の際に使われるブタ膵臓由来のトリプシンのウイルス汚染、⑤細胞の取り扱い時に外来性ウイルスが迷入する可能性などである。ウイルスによる汚染を防ぐためには、これらの可能性を考慮し、安全性を確保することが重要である。

また培養工程で得られる未精製バルクは、ウイルス検出に適した段階であることから、未精製バルクにおけるウイルス試験も重要である。これに続く精製工程では、前述したように、万が一ウイルスによって未精製バルクが汚染されていても、その後の精製工程が、ウイルス除去・不活化に十分な能力を備えていれば、最終製品の安全性を確保することができる。そのため精製工程には、低pHやウイルスフィルターといったウイルスの不活化、除去工程が含まれている。そして各工程の前後で実際にウイルスがどの程度除去・不活化されるかを、混入が想定されるウイルスやその近縁のウ

イルス、またはモデルウイルスを用いてウイルスクリアランス試験を行う。

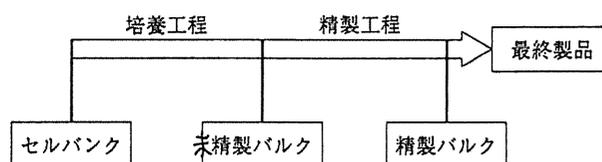


図1 バイオ医薬品の製造工程

## 2. バイオ医薬品の汚染事例とその特徴

動物細胞を用いた医薬品製造は、CHO細胞を用いた医薬品製造のプラットフォーム化などが進み、今後しばらくCHO細胞が、その中心を担うものと予想される。CHO細胞で起きた組換えタンパク質性医薬品製造における汚染事例のいくつかを表1にまとめた。この表を見ても明らかなのは、事例のいくつかで、細胞培養に用いたウシ胎児血清が汚染源となっていることである。したがってその場合、混入ウイルスは、伝染性出血熱ウイルス<sup>4)</sup>、カシェ溪谷ウイルス<sup>7)</sup>など、ウシを宿主としている。伝染性出血熱ウイルスは、レオウイルス科に属し、通常北米のオジロジカを宿主とするウイルスだが、稀にウシ胎児にも感染する。カシェ溪谷ウイルスは、蚊によって媒介され、ウシ、ヒツジ、ウマ、シカなどに感染する北米で知られるブニヤウイルス科の一種である。これらはいずれもウシ胎児血清によって、培養槽にウイルスが持ち込まれたケースである。

表1 CHO細胞を用いたバイオ医薬品製造におけるウイルス汚染事例

ウイルス	汚染源	製品(会社)	文献
伝染性出血熱ウイルス	ウシ胎児血清	Recombinant protein for phase I clinical trials (Biofen GmbH & Co.)	4)
マウス微小ウイルス	培地(生物由来成分)	Pulmozyme®(Genentech)	5)
ベシウイルス 2117	ウシ胎児血清	不明 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)	6)
レオウイルス	ウシ胎児血清	不明	7)
カシェ溪谷ウイルス	ウシ胎児血清	不明	7)
ベシウイルス 2117	培地(生物由来成分)	Cerezyme® and Favrazyme® (Genzyme)	8)

最近では2008, 2009年にライソゾーム酵素欠損疾患の治療薬を製造していた Genzyme 社が、培養槽のウイルス汚染によって、一時操業停止に追い込まれた。培養槽の除染に数週間を要したために製品である Cerezyme と Favrazyme の供給不足を招く結果となった<sup>6)</sup>。これはウイルス感染によって、CHO細胞の増殖性が低下したためにウイルス汚染が見つかった例である。原因となったウイルスは分離され、Vesivirus 2117と名づけられた<sup>8)</sup>。このウイルスは、正二十面体構造(40 nm)のカリシウイルス科のウイルスで、その塩基配列の解析からミンクカリシウイルスやイヌカリシウイルスによく似ていることがわかった。幸いこのウイルスは、ヒト

には感染しないものと考えられており、また製品の汚染も防がれた。重要な点は、同じウイルスによる汚染が続いて起きたことである。2008年にベルギーのプラントでウイルスの汚染が見つかり、その汚染の原因がはっきりしないまま、翌年には同社の米国のプラントで同じウイルスによる汚染が見つかった。当初汚染ウイルスは、ペット由来のカリシウイルスの一種ではないかと疑われたが、現在では、培地中に添加された汚染された海産生物由来成分によって引き起こされたのではないかと考えられている。カリシウイルスは、+鎖RNAをウイルス粒子内にもつウイルスで、本来の宿主と異なる細胞にわずかでも感染性があると、短期間に馴化して強い感染性を獲得することができる。培養槽を汚染した Vesivirus 2117は、短期間でCHO細胞への馴化が起きた可能性が高い。

### 3. 製造用細胞と培養に関するウイルス安全性

医薬品製造に用いられる細胞は、一括して増幅・分注・保存される。管理の基本となる製造用細胞は、マスター・セル・バンク(MCB)と呼ばれ、医薬品製造の出発基材である。実際の製造には、マスター・セル・バンクから再度増幅、分注した細胞が使われる。これをワーキング・セル・バンク(WCB)と呼び、製造の度に融解して用いられる。このように医薬品製造に用いられる細胞は、マスター・セル・バンクとワーキング・セル・バンクの2種類の細胞バンクとして管理されている。マスター・セル・バンクは、医薬品製造の起点となる細胞なので、ウイルス安全性を考える上で、厳しい管理が必須である。マスター・セル・バンクの純度試験では、無菌性やマイコプラズマの否定試験に加えて、多様なウイルス検出のための試験が行われる(表2)。ウイルスが細胞に感染すると、検出が容易なほどさかんにウイルスを産生する場合もある一方で、ウイルスの顕著な産生を伴わない(潜伏感染)場合がある。検出しにくいウイルス感染を明らかにするためには、感度の高い手法を組み合わせる必要があり、直接的なウイルス粒子の観察だけでなく、小動物を用いて、ウイルスに対する抗体の検出などを含め、多様なウイルス試験を行う。マスター・セル・バンクのウイルス試験に要求されるものには、①レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験(表3)、②*In vitro*試験、③*In vivo*試験、④抗体産生試験、④その他細胞特異ウイルス試験(適宜実施)がある(表4)。また、これに加えてCAL(医薬品製造のために*in vitro*細胞齢の上限までに培養された細胞)についても、①～③のウイルス試験が必要となる。これらのウイルス試験で重要視されているのは、電子顕微鏡などでウイルス様粒子を確認することに加えて、感染性のあるウイルスを感度の高い*in vitro*、*in vivo*の検出系を用いて調べることである。NAT(核酸増幅法)は検出感度も高いが、特異性も高いため、既知のウイルスを標的とした場合は検出が容易だが、未知ウイルスの存在を検出するには

必ずしも適当でない。また感染性を失ったウイルス核酸が存在しても、ウイルス陽性と判断してしまうという欠点もある。そのため、細胞種特異的なウイルスを検出するための試験法として用いられる。

ほ乳類のゲノムには、進化の過程で感染したレトロウイルスが、プロウイルスの形で散在していることが知られている。CHO細胞も例外ではなく、すでに感染性は失われているものの、ウイルス様の粒子を絶えず産生しており、電子顕微鏡観察によって細胞内にウイルス様粒子が認められる。このようなウイルス様粒子は、感染性をもたず、安全性がすでに明らかになっているため、バイオ医薬品製造に用いられている。

表2 各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB	CAL <sup>a)</sup>
レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験感染性試験	+	-	+
感染性試験	+	-	+
電子顕微鏡観察	+	-	+
逆転写酵素活性 <sup>b)</sup>	適宜実施	-	適宜実施
その他細胞種特異ウイルス試験 <sup>c)</sup>			
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験	+	- <sup>d)</sup>	+
<i>In vivo</i> 試験	+	- <sup>d)</sup>	+
抗体産生試験 <sup>e)</sup>	+	-	-
その他細胞種特異ウイルス試験 <sup>f)</sup>	+	-	-

a.) CAL：医薬品製造のために*in vitro*細胞齢の上限にまで培養された細胞。

b.) レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要。

c.) 細胞株個々の起源・由来から存在が予測されるウイルスを検出するために適した試験。

d.) 第1回目のWCBについては、CALの段階で実施すること。それ以降のWCBについては、それ自体又はCALの段階で*In vitro*試験および*In vivo*試験をそれぞれ1種類ずつ実施する。

e.) げっ歯類由来細胞株に対する試験の例として、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。

f.) ヒト由来細胞株、ヒト以外の霊長類由来細胞株あるいはげっ歯類以外の動物由来細胞株である場合は、それぞれの細胞株に適切な試験を適宜実施すること。

表3 レトロウイルスおよび内在性ウイルス試験

感染性試験	S <sup>+</sup> L <sup>-</sup> フォーカスアッセイ (異種指向性, 両指向性のマウスのレトロウイルスを調べる試験法) XCブランクアッセイ:(ラット横紋筋腫由来細胞を使う同種指向性マウスレトロウイルス試験法)
電子顕微鏡観察	透過型電子顕微鏡で, 細胞の超薄切片を観察する。げっ歯類の細胞株の多くは, 内在性レトロウイルス粒子, レトロウイルス様粒子 (A type, R type) が観察されるが, 感染性がなく, 医薬品製造に使用される。
逆転写酵素活性	レトロウイルスは, RNAを鋳型にしてDNA合成するために逆転写酵素をもっている。この活性は宿主にはないためレトロウイルスの検出に用いられる。
その他の細胞腫特異的ウイルス試験	その他の内在性ウイルスに関しては, 各ウイルスに特異的な検出系がある。NATなどは, 高感度であるが, 感染性のないウイルスの検出やコンタミネーションの可能性を考慮するべきである。

表4 非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験

<i>In vitro</i> 試験	<i>In vitro</i> 試験は広範囲のウイルスに感受性の高い培養細胞 (MRC-5細胞, Vero細胞等) を使用する。cell lysateを添加するか, 混合培養してCPEの有無や上清での血球凝集反応を観察する。 ① MRC-5細胞 (ヒト胎児正常肺組織由来) アデノウイルス, コクサッキーウイルスA, B, エコーウイルス, インフルエンザ, パラインフルエンザ, 単純ヘルペスウイルス, CMV, エンテロウイルス, ポリオウイルス, 麻疹ウイルス, ワクチニアウイルス, 風疹ウイルス, RSウイルス, アルボウイルスなどが検出できる。 ② Vero細胞 (アフリカミドリザル腎臓上皮細胞) アデノウイルス, コクサッキーウイルスA, B, エコーウイルス, インフルエンザ, パラインフルエンザ, 単純ヘルペスウイルス, CMV, エンテロウイルス, ポリオウイルス, 麻疹ウイルス, ワクチニアウイルス, 風疹ウイルス, RSウイルス, 日本脳炎ウイルス, ボックスウイルス, フラビウイルス, ポリオマウイルス, ロタウイルス, フィロウイルス, レオウイルス, アレナウイルス, プンヤウイルス, コロナウイルス, ジステンパーウイルス, アルボウイルスなどが検出できる。
<i>In vivo</i> 試験	① 発育鶏卵接種試験: インフルエンザ, 麻疹ウイルス, 風疹ウイルス, ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクチニアウイルスなどを検出できる。 ② 成熟マウス接種試験: ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクチニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルスなどを検出できる。 ③ 乳のみマウス接種試験: コクサッキーウイルスA, B, 単純ヘルペスウイルス, ラブドウイルス, ワクチニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルスなどを検出できる。 ④ モルモット接種試験: パラミクソウイルス, レオウイルス, ワクチニアウイルス, リンパ性脈絡髄膜炎ウイルス等を検出できる。
抗体産生試験	マウス, ハムスター, ラットなどに経口, 経鼻, 腹腔などから接種して4週間後の血清中の抗体産生の有無を調べ, ウイルスの有無を確認する。
その他細胞腫特異的ウイルス試験	特定のウイルスを標的にしたNAT等

#### 4. 医薬品製造工程におけるウイルスクリアランス試験

ウイルスクリアランス試験は、未精製バルクから、精製バルクまでの精製工程でのウイルスの不活化、除去能を評価することである(図2)。未精製バルクは培養後の上清であり、ウイルス汚染の有無を検出するのに適した段階である。未精製バルクのウイルス試験では、外来性ウイルスが存在しないことを高い特異性と感度をもつ検出法によって確認しなくてはならない。細胞や未精製バルクにウイルスが含まれているものについては、そのウイルスのヒトへの感染の有無にかかわらず、その利用は例外的なケースを除いて通常認められない。CHO細胞を用いて得られた未精製バルクには、すでに述べたように自身が産生するレトロウイルス様粒子が認められる可能性があるが、感染性はなく非病原性であると認められているため、ウイルスクリアランス試験では近縁のレトロウイルスとしてマウス白血病ウイルスを用いたクリアランス試験が必要になる(ウイルスクリアランス工程評価試験)。クリアランス試験では複数の性質の異なる既知のウイルスを使って、工程のウイルス除去・不活化能も同時に調べる必要がある。ここで使われるモデルウイルス

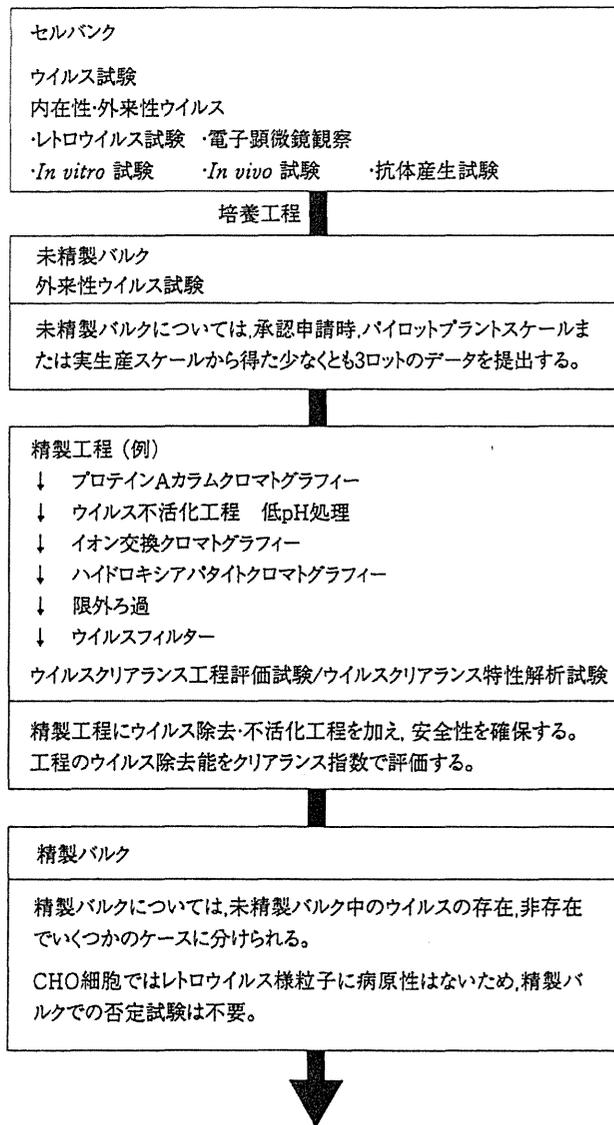


図2 バイオ医薬品製造におけるウイルス試験、ウイルスクリアランス試験