

5. バイオ医薬品の製品群におけるウイルス安全性

生物由来原料基準は生物由来製品を8つに分類し、製品ごとに原材料や材料のリスクに応じて求められるウイルス試験検査、工程で実施すべき安全対策、市販後安全対策などの基本要件を示している(表3)。既に述べたように、特定生物由来製品と生物由来製品の分類は必ずしも全てがこの分類の適用を受けるわけではない。例えば自己由来製品であっても、培養工程で同種血清を用いたりすれば特定生物由来製品の指定を受ける可能性があると思われる。ここでは、細胞治療医薬品や遺伝子治療医薬品などの先端バイオ医薬品をはじめとして生物由来原料基準の適用を受ける製品を想定して概説する。

1) 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性

「2. 生物由来原料基準」の項で、生物由来製品や特定生物由来製品に指定される製品の原材料や材料、製造工程を含めた上乘せ基準について概説した。生物由来原料基準の策定過程の議論では、今後開発が進められると考えられていたヒト細胞や動物細胞を用いた細胞治療の安全性確保が大きな焦点となっていた。そのため、ヒト細胞を有効性成分とする製品および動物細胞を有効性成分とする製品として、それぞれヒト細胞組織製品原料基準、および動物細胞組織製品原料基準が設定された。これらの細胞治療薬は生きている細胞を用いるということから病原体の不活化を実施することはほとんど期待できず、感染因子の安全性については、ドナーのウイルススクリーニング、製造機関への細胞の受け入れ時の試験、さらに適切な製造工程での工程内管理ウイルス試験等が想定されていた。ドナースクリーニングにあたっては、自己細胞を用いるか同種細胞かによってその感染症リスクは大きく異なると想定されていた。すなわち自己由来細胞を用いる場合には万が一採取した細胞にウイルス等が感染していても、ドナーである本人に戻るのであれば感染症の新たな発生にはつながらないと想定されていた。

平成20年に細胞治療薬の品質・安全性・有効性を規定する指針である「細胞組織加工医薬品」の指針が改定され、自己細胞を用いるか同種細胞を用いるかによってその感染症のリスクは異なることが想定され、この点も考慮して自己および同種ヒト細胞に分けた指針が作成された^{11, 12)}。指針の改定に当たって、特にウイルス等の安全性確保に関しては生物由来原料基準に沿った試験の要件を明確にするとともに、自己細胞を用いる場合には、主として製造工程における交差汚染、作業従事者の安全確保、さらには培養工程中でのウイルス増幅の危険性を考慮して、HCV、HBV、HIV等の試験を実施することが求められるとされている。一方同種細胞を用いる場合には、血液製剤のドナー適格性基準に加え、パルボウイルスB19の試験や必要に応じて他のウイルス試験を行うことが示されている。各国のガイドラインとの比較表をまとめてみた(表4)。

さらにウイルス試験にどの検体を用いるかは、採取される細胞や組織の特性や自己細胞か同種細胞か、ロットを構成するか否かによって異なるとされている(表5)。また試験法そのものについても、血清学的試験やPCR等のNATに加え、必要に応じて*in vitro*試験などによるウイルス検査が用いられることになると考えられ、採用する試験については対象とする被検検体への適応性も考慮することが求められる。

生物由来原料基準では、表3に示すように同種ヒト細胞製品のほうが異種動物細胞製品よりもウ

表4 各国の細胞治療薬のウイルススクリーニング試験

ドナースクリーニング	日本	EU	米国
試験項目	HIV-1, 2, HBV, HCV, HTLV-1, 2, パルボウイルス B19	HIV-1, 2, HBV, HCV	HIV-1, 2, HBV, HCV
必要に応じて	CMV, EB ウイルス		HTLV-1, 2, CMV
他の試験	問診(病歴), TSE 等	問診(病歴), 遺伝子疾患に関する家族歴等	血液ドナー基準への適合, 病歴, 臓器・組織ドナー基準

表5 ウイルス試験の実施

	ドナースクリーニング	採取した組織・細胞	中間工程や最終製品
被検対象	血清, 血漿	細胞, 培養上清	細胞, 培養上清
血清学試験	抗体, 抗原検出系	抗原検出系	抗原検出系
核酸増幅検査 (NAT)	感度・精度の保証	感度・精度の保証	感度・精度の保証
他のウイルス検出法		<i>in vitro</i> ウイルス試験等	<i>in vitro</i> ウイルス試験等

ウイルス感染におけるリスクは相対的に高いとされていた。これは、動物ウイルスは種の壁がありヒトへの感染性が弱く、また多くのウイルスが感染性も重篤化しないと考えられていたことによる。一方、EUの異種細胞治療薬のガイドライン¹³⁾では、動物細胞治療薬のウイルスリスクは比較的高いと想定している。すなわち、日常的な人獣共通感染症の感染では上記したように、種の壁があり感染してもそれほど重篤化しないケースがほとんどであるが、一方、生きた細胞とともにヒトへ動物由来ウイルスが伝播した場合には、種の壁が作用せず従来の知見で想定できない感染症が起こる可能性を憂慮しているといえる。

2) 遺伝子治療医薬品

生物由来原料基準では遺伝子治療薬については対象とされていない。もちろん自己細胞を用いた *ex vivo* 遺伝子治療では細胞治療薬としてのウイルス等の安全性確保が求められるとともに、ウイルスベクターを製造する場合には、ヒトや動物細胞を用いることからヒト由来原料基準や動物由来原料基準が適用されることになる。一方で *E. coli* を用いて遺伝子治療用プラスミドを作製する場合には、ウイルス等の感染因子が混入するリスクはないと考えられ、無菌製剤も可能であることから生物由来原料基準の適用は受けないと思われる。

遺伝子治療用ウイルスベクターの製造では、細胞培養技術を利用することによるウイルス安全性の考慮が必要であるが、さらにウイルスベクター特有の観点からの安全性評価が必要となる。

多くの遺伝子治療ウイルスベクターは増殖能を欠損させた非増殖性ウイルスベクターである。一般に非増殖性ウイルスベクターの製造では、増殖性に関連するウイルスタンパク質の遺伝子を欠損させるとともに、欠損させた部位に目的遺伝子を組み換えた遺伝子コンストラクトを作製する。この遺伝子コンストラクトをパッケージ細胞に導入することにより増殖能のないウイルスベクターを製造する。しかし、製造時にパッケージ細胞に導入したウイルス遺伝子と遺伝子コンストラクトの間で相同組換えが起こり増殖性のウイルスベクターが発現することがある。

アデノウイルスやレトロウイルスベクターの製造では、相同組換えで生じる可能性のある増殖ウイルスの出現について試験をすることが求められる。増殖性ウイルスについてどの程度の感度が要求されるかは我が国の基準では示されていないが、FDA が示している値は参考になると思われる。FDA はアデノウイルスベクターでは増殖性アデノウイルスの規格値として 3×10^{10} ベクター粒子あたり 1 未満であることを求めている。またレトロウイルスベクターでは、増殖性レトロウイルスは 0.01 RCR/mL 以下であることが望ましいとしている。また増殖性ウイルスの試験は、セルバンク、製造後の細胞やベクター上清、さらには *ex vivo* 遺伝子導入細胞での試験が求められている。EU のレンチウイルスベクターガイドラインでは増殖性レンチウイルスの検出試験の実施が求められており、その限度値は投与量やロットサイズを考慮して設定するように言及されている。

ウイルスベクター遺伝子治療薬のウイルス安全性は製造細胞や製造工程に由来するウイルス安全性に加えて、ウイルスベクター特有の増殖ウイルスについての考慮が求められる。今後、新たなウイルスベクターの開発においても同じような対応が必要となる。また、従来の遺伝子治療薬とは大きく異なる腫瘍細胞で増殖能をもつ腫瘍溶解性ウイルスベクターの開発が行われている。これは、腫瘍細胞・組織でのみ増殖するウイルスベクターであり、この場合には増殖性のウイルスが目的有効成分となるが、目的外の変異ウイルスの試験も必要となるであろう。

3) 組換えタンパク質医薬品

組換え DNA 技術を用いて製造される細胞培養由来バイオ医薬品のウイルス安全性に関しては、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドラインである ICH Q5A が示されており、承認審査にあたっては本ガイドラインに従って審査が行われている。生物由来原料基準がこのような細胞培養由来製品で用いられる細胞の基本的要件等を定めているのに対して、ICH Q5A ではウイルス試験の具体的方法の提示や工程でのウイルスクリアランスの評価法を具体的に示している。既に多くのバイオ医薬品が ICH Q5A ガイドラインに従って製造され、承認されており、これまでウイルス感染に関する有害事象は報告されていない。

一方で、これまで外来性ウイルスセルバンクに汚染が認められた事例があり、汚染が起こることにより製造が中断し、その製剤が必要な患者への供給不足が起こる危険性がある。例えば、図 2 に示すように、Genzyme 社のファブラザイム、セラザイムの製剤の製造工場である Allston 工場でウイルス汚染が発生し、製造停止に陥った。これらの製剤は、Fabry 病および Gaucher 病の治療に必須のバイオ医薬品であり、需給のひっ迫は患者や医療従事者にとっては極めて憂慮すべき事態であった。非エンベロープウイルスである Calicivirus 属ウイルスである vesivirus 2117 が汚染ウイルスであることが確認され、汚染源の特定はされていないが、ペット等に感染しているウイルスであることから、従業員等を介してウイルスが混入した可能性が指摘されている。特に重要な点は、このウイルスは細胞変性効果 cytopathic effect (CPE) を起こしにくく、採用されていた *in vitro* ウイルス試験では検出されずに、細胞の増殖能が悪くなって初めて気づいたという点であろう。こういった通常の *in vitro* 試験系で用いられる細胞では CPE が起こらない非エンベロープウイルスの汚染については、適切な細胞系を使うことも考慮する必要がある。

4) 血液製剤

血液製剤は、1999 年に従来の血清学的検査に加え、HIV、HCV、HBV をターゲットした NAT

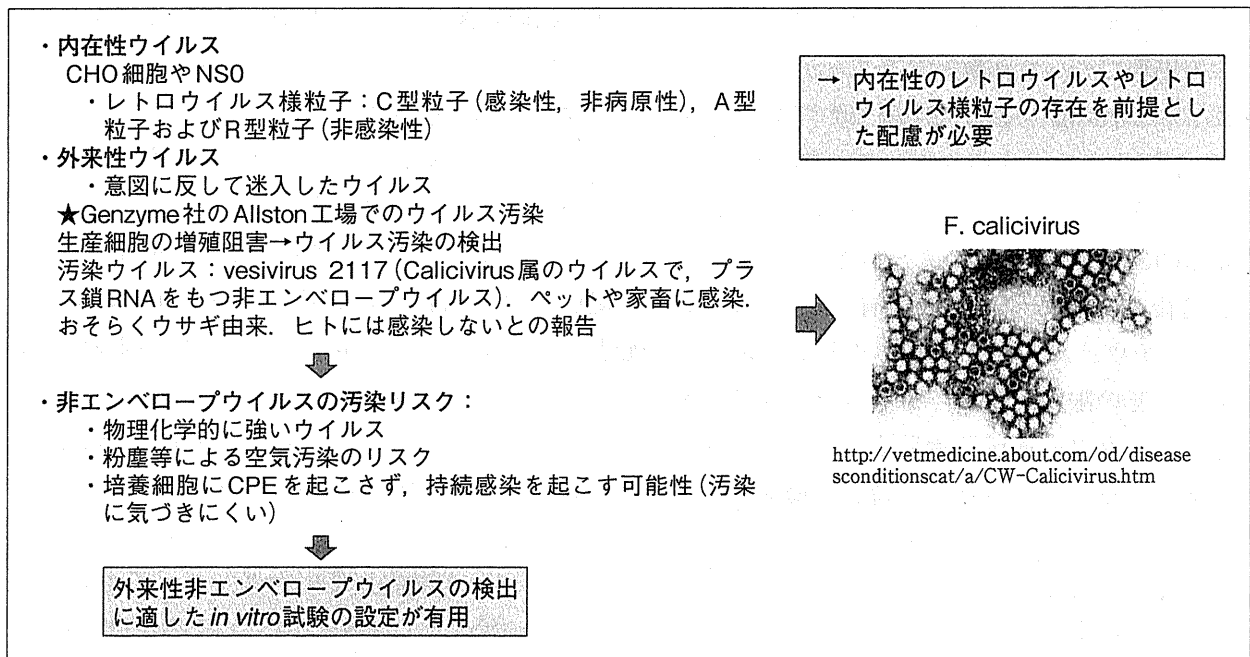


図2 バイオ医薬品のウイルス汚染リスク

が実施されるようになった。このことにより血清学的ウインドウ期によってすり抜けるウイルス感染は激減した。生物由来原料基準では、血清学的検査とNATの両方の試験を行うことが明記されている。血液製剤の生物由来原料基準に加え、「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関する」ガイドラインによって、製造工程でのウイルスクリアランス評価の方法を詳細に規定し、より安全な血液製剤の供給を担保することを目指している。

さらに、NATの採用にあたってどのような評価を行うべきかについては、「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドライン」により、具体的な手法や求めるべき感度が明示されている。血液製剤のウイルス安全性において極めて重要な役割を果たしているNATについては科学技術の進歩が急速であり、適切な時期に見直すこととされている。一方で、ウイルスの変異により従来のNATのプライマーやプローブでは検出できない場合も想定され、このような変異の出現については、感染症定期報告等を通じて常に最新の動向を監視することが求められている。

おわりに

2002年に実施された薬事法改正では、感染症の安全には制御できないリスクが内包されるバイオ医薬品について原材料や材料、さらには製造工程における安全対策の基準を示すとともに、医薬品のライフサイクルを通じての安全対策の一環として、生物由来製品や特定生物由来製品の指定や資料の保管、さらには感染症定期報告を通じた安全情報の収集と必要な対策をとることを求めている。このような上乗せの安全対策は、血液製剤における苦い経験を生かすための方策として我が国独自に実施されているものも多い。これらの薬事法改正は、バイオ医薬品のウイルス等の安全対策

としての環境整備といえるものである。ウイルス等の安全対策は、製造・販売業者がその責を負って複合的な対策をとることが求められているが、万が一現時点では未知のウイルス等によって有害事象が起きたとしても、製造・販売業者のみならず、規制当局等を含めてその対応が可能となるようにするシステムであり、具体的事例で若干概説したようにできる限り合理的に生かしていく必要がある。

(山口照英)

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局長：ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品、医療機器、医薬部外品及び化粧品取扱について。薬食発第 0731010 号, 2002 年 7 月 31 日
- 2) 厚生労働省医薬食品局長：生物由来製品及び特定生物由来製品の指定並びに生物由来原料基準の制定等について。薬食発第 0520001 号, 2003 年 5 月 20 日
- 3) WHO guidelines for the global surveillance of severe acute respiratory syndrome(SARS). Updated recommendations, WHO/CDS/CSR/ARO/2004.1, October 2004
- 4) 奈良岡美玲, 佐藤淳也, 大泉昭良 他：弘前大学医学部附属病院における血液製剤の使用状況～バーコードシステムを用いた使用記録の管理～。医薬ジャーナル 37 (10) : 232-237, 2001
- 5) <http://www.fda.gov/cber/rules/catruminat.htm>
- 6) Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in Collagenase Enzymes. http://www.celltherapysociety.org/files/PDF/Resources/Risk_BSE_in_Collagenase_Enzymes.pdf
- 7) Schlaberga R, Choeb DJ, Brown KR et al : XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. Proc Nat Acad Sci 106 : 16351-16356, 2006
- 8) Hagen KS, Peterson PL, Ruscetti SK et al : Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. Science 326 : 585-589, 2009
- 9) Erlwein O, Kaye S, McClure MO et al : Failure to detect the novel retrovirus XMRV in chronic fatigue syndrome. PLoS One 5 : e8519, 2010
- 10) Smith RA : Contamination of clinical specimens with MLV-encoding nucleic acids : implications for XMRV and other candidate human retroviruses. Retrovirology 7 : 112, 2010
- 11) 厚生労働省医薬食品局長：ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針。薬食発第 0208003 号, 2008 年 2 月 8 日
- 12) 厚生労働省医薬食品局長：ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針。薬食発第 0912006 号, 2008 年 9 月 12 日
- 13) Guideline on xenogeneic cell-based medicinal products. CHMP/CPWP/83508/09, 2009
- 14) Guidance for industry : Guidance for human somatic cell therapy and gen therapy. FDA CBER, 1998
- 15) Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors. CHMP/BWP/2458/03, 2005
- 16) ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価。ICH Q5A (R1), 2000
- 17) 厚生労働省医薬食品局長：血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて。薬食発第 1047 号, 1999 年 8 月 30 日
- 18) 厚生労働省医薬食品局長：血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドライン。血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて。薬食発第 0803002 号, 2004 年 8 月 3 日

第2章 医薬品に関するウイルス安全性確保と薬事法

3) バイオ医薬品・生物薬品のウイルス安全性に関する国際動向

はじめに

21世紀に入り、医療技術の中でのバイオ医薬品(バイオテクノロジー応用医薬品)の役割が急速に増している。バイオ医薬品には、モノクローナル抗体や組換えDNA技術を用いて製造される遺伝子組換え医薬品、インターフェロンなどの細胞培養技術を用いて製造されるタンパク質性医薬品のみならず、遺伝子治療用医薬品、細胞組織加工医薬品等の先端技術応用医薬品が含まれる。細胞や生体成分を生産基材や生産原料として製造されるバイオ医薬品は、その安全性の懸念として生体成分に由来する感染性因子の混入が最も危惧されてきた。特に、血液製剤によるヒト免疫不全ウイルス(HIV)やC型肝炎ウイルス(HCV)の感染の経験は、いかにして安全性を確保しつつバイオ医薬品の有効性を医療に用いていくかという課題につながっていった。そのためにバイオ医薬品、タンパク質性医薬品のウイルス安全性確保を目的として、ICH Q5Aガイドラインの策定と生物由来原料基準の策定など幾つかの安全対策がとられ、これまでバイオ医薬品によるウイルス感染に関する重大な事態はみられていない。

本節では、バイオ医薬品のこれまでのウイルス安全対策について復習するとともに、ここ10年ほどのバイオ医薬品のウイルス安全性についての歴史を振り返り、将来のバイオ医薬品のウイルス安全性について議論してみたい。ただし、核酸やウイルスを本体とする遺伝子治療用医薬品や、細胞や組織から構成される細胞組織加工医薬品のウイルス安全性確保には、タンパク質性医薬品とは異なる考慮が必要であることから他の章に譲り、ここでは遺伝子組換え医薬品、細胞培養由来医薬品および血漿分画製剤等の生物薬品を中心にウイルス安全性確保に関する国際動向を紹介したい。

1. バイオ医薬品・生物薬品のウイルス安全性と国際調和指針

バイオ医薬品、特にヒトや動物由来の細胞株を生産細胞として用いたバイオ医薬品のウイルス安全性の担保にあたっては、国際調和指針であるICH Q5Aガイドライン¹⁾や生物由来原料基準²⁾に従い総合的な対策をとることが求められている。十分に特性解析されたセルバンクを出発基材とするバイオ医薬品のウイルス安全性に関しては、製品のウイルス汚染源(表1)として2つの面から対策を立てることが必要となる。一つは、用いる細胞基材に内在するウイルスあるいはウイルス様粒子である。抗体医薬品をはじめとして、ほとんどのバイオ医薬品はCHO(Chinese hamster ovary)細胞や、NS0細胞、Sp2/0細胞といったげっ歯類由来細胞が用いられているが、これらの細胞には

表1 バイオ医薬品のウイルス汚染の可能性(ウイルス汚染源)(文献1より)

マスター・セルバンク(MCB)にウイルスが存在する可能性	医薬品製造過程でウイルスが迷入する可能性
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	1) 培養等に使用する血清成分などの生物起源由来の試薬の汚染 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ーカラムや製造に用いる試薬由来の汚染 4) 製剤化に使用する賦形剤の汚染 5) 細胞および培養液の取り扱い中における汚染

内在性のレトロウイルスやレトロウイルス様粒子が存在する。これらのげっ歯類細胞に内在しているレトロウイルス様粒子等に関してはヒトへの感染性や病原性が認められておらず、比較的安全性の高い細胞とされている。それ以外の内在性ウイルスの有無については徹底した解析を行うことが必要である。もう一つの可能性は、培養工程や精製工程で用いる試薬や環境から迷入してくる外来性ウイルスによる汚染が挙げられる。したがって、出発素材である細胞基材に存在する内在性ウイルスと製造工程で迷入してくる可能性のある外来性ウイルスを想定して安全対策を立てることが求められる。また、試薬や環境からの外来性ウイルスの汚染のリスクを低減化するために、ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような製造用細胞系および製造関連物質(培地成分、試薬、抗体カラムなど)を選択することが重要となる。さらに、ウイルスの潜在を前提とした安全対策が必要とされる。このようなバイオ医薬品のウイルス汚染を防ぐためのアプローチとしてICH Q5Aでは次の3つの方法を挙げている。

- ① 細胞株その他培地成分を含む原材料の選択、試験
- ② 製造工程のウイルス不活化・除去能の評価
- ③ 製造工程の適切な段階における感染性ウイルス否定試験

ウイルス試験には必ず検出限界があるため、これらの方策は単独で安全性を確立するのに十分なものはなく、段階的かつ相互補完的に活用していくことが重要である。また、現時点では未知のウイルスの存在を前提として、万が一そのようなウイルスが明らかになった場合の遡及調査のための対策や市販後の安全対策については、生物由来原料基準や関連する薬事法上の上乗せ対策がとられている。

以下に、ICH Q5A ガイドライン等で示されている、抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品の安全性確保のための方策と海外を含めた最新の動向を示す。

1) 医薬品製造基材(細胞株)のウイルス試験

現在、抗体医薬品や他のバイオ医薬品の製造に用いられているげっ歯類由来細胞には内在性レトロウイルスが存在しており、感染性のないA型粒子およびC型粒子、さらに感染性はあるものの病原性のないR型粒子が知られている。ワクチン製造にはこのようなレトロウイルスの存在がないとされている非げっ歯類由来細胞株も利用されているが、生産性の観点からバイオ医薬品の製造には用いられていない。一方、Per.C6細胞のようにタンパク質生産性の極めて高いヒト由来細胞を用いたバイオ医薬品の製造も試みられているが、このような細胞を用いて我が国で承認された製品はまだない。

表2 MCB で実施すべきウイルス安全性試験

内在性レトロウイルス	<ul style="list-style-type: none"> ・透過型電子顕微鏡観察 (TEM) ・XC プラークアッセイ/S⁺L⁻フォーカスアッセイ ・共培養 ・逆転写酵素活性 (Mg⁺⁺, Mn⁺⁺)
外来性ウイルス	<i>in vitro</i> 試験 <ul style="list-style-type: none"> ・MRC-5 細胞, Vero 細胞, CHO-K 細胞, (324K, BT, PK13 等) <i>in vivo</i> 試験 <ul style="list-style-type: none"> ・発育鶏卵 (尿膜, 卵黄) ・成熟マウスおよび乳飲みマウス ・モルモット
種特異的ウイルス	<ul style="list-style-type: none"> ・MMV (マウス微小ウイルス) ・ウシ由来ウイルス ・ブタ由来ウイルス ・げっ歯類: マウス抗体産生 (MAP) 試験, ハムスター抗体産生 (HAP) 試験, ラット抗体産生 (RAP) 試験

ICH Q5A には、細胞の適格性試験として、マスター・セル・バンク (MCB), ワーキング・セル・バンク (WCB), *in vitro* 細胞齢の上限まで培養された細胞 (cells at the limit: CAL) の各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験が示されているが、まず宿主細胞に目的遺伝子を発現させシード細胞から MCB を樹立した際に、徹底したウイルス試験を行うことを求めている (表 2)。さらに、CAL 細胞で内在性ウイルス以外の潜在ウイルスが存在しないことの確認と、工程に由来する外来性ウイルスの混入がないことを示す必要がある。実施すべきウイルス試験としては、レトロウイルスや他の内在性ウイルス試験として感染性試験、電子顕微鏡観察、逆転写酵素活性、また外来性ウイルス試験としては *in vitro* 試験 (細胞への感染性試験), *in vivo* 試験 (乳飲みマウス, 成熟マウス, 発育鶏卵への接種), 抗体産生試験 (げっ歯類由来細胞株の場合, マウス抗体産生 (MAP) 試験, ハムスター抗体産生 (HAP) 試験, ラット抗体産生 (RAP) 試験) などが挙げられる。

2) 未加工・未精製バルクにおけるウイルス試験

未加工・未精製バルクは培養後にハーベストされた細胞や培養液のプールからなり、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であることから、ウイルス試験の適切な実施が求められる。承認申請には、少なくとも 3 ロットについて、げっ歯類細胞を用いている場合にはレトロウイルス以外の内在性ウイルスが存在せず、また外来性ウイルスも存在しないこと示すデータを提出する必要がある。外来性ウイルスの試験には、一般には用いている細胞種、使用する血清やトリプシン等の薬剤などを考慮し、迷入する可能性のある外来性ウイルスの検出に適切な数種の細胞株 (表 3) を用いる *in vitro* スクリーニング試験や PCR (polymerase chain reaction) 等の核酸増幅検査 nucleic acid amplification test (NAT) が用いられる。

3) ウイルスクリアランス評価試験・特性解析試験

製品のウイルス安全性の確保には、適切な細胞基材の選択と徹底したウイルス試験、製造工程の適切な段階でのウイルス試験 (例えばバルクハーベストでの試験) に加えて、製造工程が十分なウイルススクリアランス能をもつことを確認することが重要である。例えば、バイオ医薬品の精製工程は、図 1 のように複数のクロマトグラフィーによる精製と、ウイルスろ過工程などが採用されてい

表3 外来性ウイルスの *in vitro* 検出に適した細胞株

必須細胞	<ul style="list-style-type: none"> • MRC-5 (human diploid cell line) • Vero (monkey kidney cell line)
製品の由来する生物種や試験ウイルスの特異性により選択する細胞	<ul style="list-style-type: none"> • CHO (Chinese hamster ovary) • HEK 293 (human embryonic kidney-adenovirus type 5 transformed) • 324K (human SV-40-transformed fibroblast) • NIH/3T3 (murine fibroblast) • Hs68 (human foreskin) • A549 (human lung carcinoma) • BT (bovine turbinate) • HeLa (human adenocarcinoma cervix) • ST (swine testis) • BHK-21 (C-13 Syrian hamster kidney) • MDBK (bovine kidney) • HT 1080 (human fibrosarcoma with epithelial-like morphology) • XC-rat (Rous sarcoma virus induced tumor) • S-2 (<i>Drosophila melanogaster</i>) • LLC-MK2 (rhesus monkey kidney) • CV-1 (African green monkey kidney) • MDCK (canine kidney)

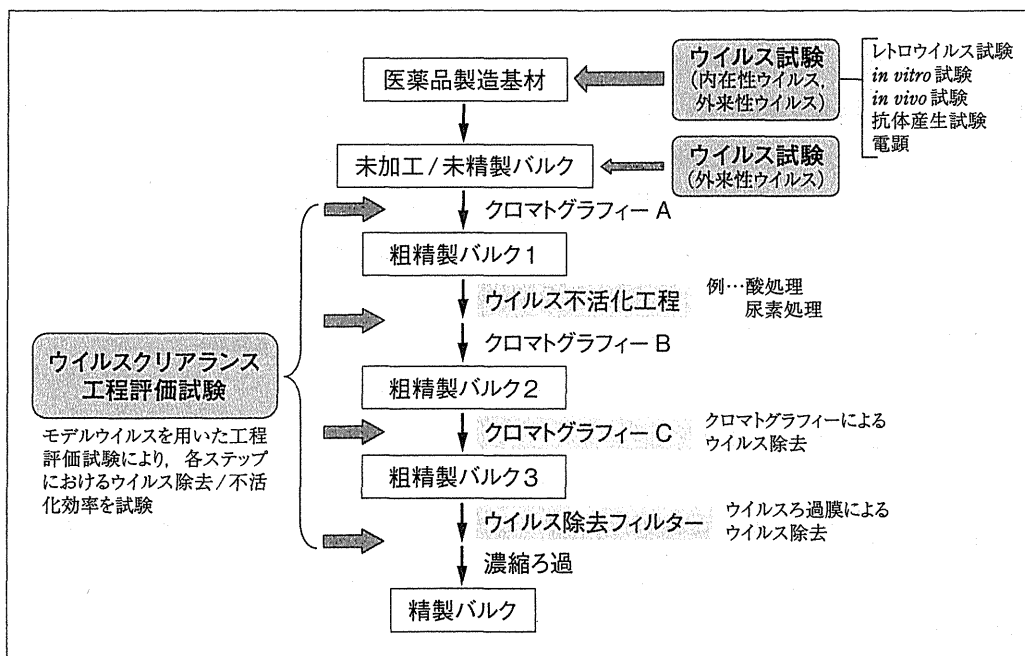


図1 バイオ医薬品の製造工程とウイルス安全性評価

る。この中で、ウイルス不活化除去工程としては、クロマトグラフィーによる除去工程と酸処理工程等による不活化、さらにウイルス除去フィルターによるろ過工程などがウイルススクリアランス能をもつ精製工程として採用されている。

ウイルススクリアランスを最大限達成するためには、製造工程中にウイルスの除去・不活化に関する複数の機序の異なる方法を用いること、頑健性のあるウイルススクリアランス工程を採用すること、さらに工程全体として十分なウイルススクリアランスを達成できるような精製工程を採用し、そのスクリアランス能を評価しておくことが必要である。スクリアランス能の評価には、存在が知られているウイルスに密接に関連している特異的 (specific) モデルウイルスを用いた除去能の評価 (工程評

表4 ウイルスクリアランス工程評価と精製バルクでのウイルス試験実施要領

	ケースA	ケースB	ケースC	ケースD	ケースE
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	－	－	＋	＋	(＋)
・ウイルス様粒子の存在	－	－	－	－	(＋)
・レトロウイルス様粒子の存在	－	＋	－	－	(＋)
・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	－	－	＋	未知
必要な対応					
・ウイルススクリアランス工程特性解析試験 (非特異的モデルウイルス)	必要	必要	必要	必要	必要
・ウイルススクリアランス工程評価試験 (関連ウイルスまたは特異的モデルウイルス)	不要	必要	必要	必要	必要
・精製バルクでのウイルス否定試験	適用外	必要	必要	必要	必要

価試験)と非特異的(non-specific)モデルウイルスを用いたクリアランス特性の評価(工程特性解析試験)がある。げっ歯類由来細胞を用いた場合には、レトロウイルスの特異的モデルウイルスとしてマウス白血病ウイルスを用いてレトロウイルスの十分なクリアランスが達成されていることを確認する必要がある。

ICH Q5A ガイドラインでは、ウイルススクリアランス工程特性解析試験とクリアランス工程評価試験、および精製バルクでのウイルス否定試験の実施については、細胞基材や未精製バルクでのウイルスの存在とその種類により、表4に示すA～Eの5つのケースに分けて考えるように提案されている。現在、ほとんどのバイオ医薬品の製造では、CHO細胞やNS0細胞のようにヒトへの感染性や病原性のない内在性レトロウイルスの存在が知られている細胞が用いられており、表4のケースAないしはBを想定した安全対策がとられている。すなわちCHO細胞やNS0細胞はケースBに該当し、特異的モデルウイルスを用いたクリアランス工程評価試験に加えて、外来性ウイルスの混入を想定し、非特異的モデルウイルスを用いた工程特性解析試験の実施と精製バルクでのウイルス否定試験の実施により、当該細胞を製造に使用することが可能である。細胞株や未精製バルクで外来性ウイルスが検出された場合(ケースC～E)は、例外的な場合を除き使用は認められていない。

2. バイオ医薬品製造技術の進歩とウイルススクリアランス

ICH Q5A ガイドラインが策定されて約10年が経過したが、この間に、バイオ医薬品製造技術には著しい進歩がみられた。特に、無血清条件下や、ヒトや動物由来タンパク質を使用しない製造技術³⁻⁵⁾が一般化してきており、培養工程で生物由来原料を使用しない技術がほぼ確立されてきたといえる。このような生物由来原料を用いない製造方法の開発により、培養工程からのウイルスや異常プリオンの混入のリスクは極めて低くなってきている。また、使い捨ての培養槽の使用⁶⁾などによる感染因子の混入リスクを低下させる技術やコスト面での最適化も進んでいる。

一方で、抗体医薬品をはじめとして多くのバイオ医薬品の製造に用いられているCHO細胞やSP0細胞、NS0細胞などの生産性を向上させる技術も開発され、さらにはより生産性の高い細胞基材の開発も行われている⁷⁻⁹⁾。生産性の高い細胞を用いることや上述した無血清培養等の技術の進

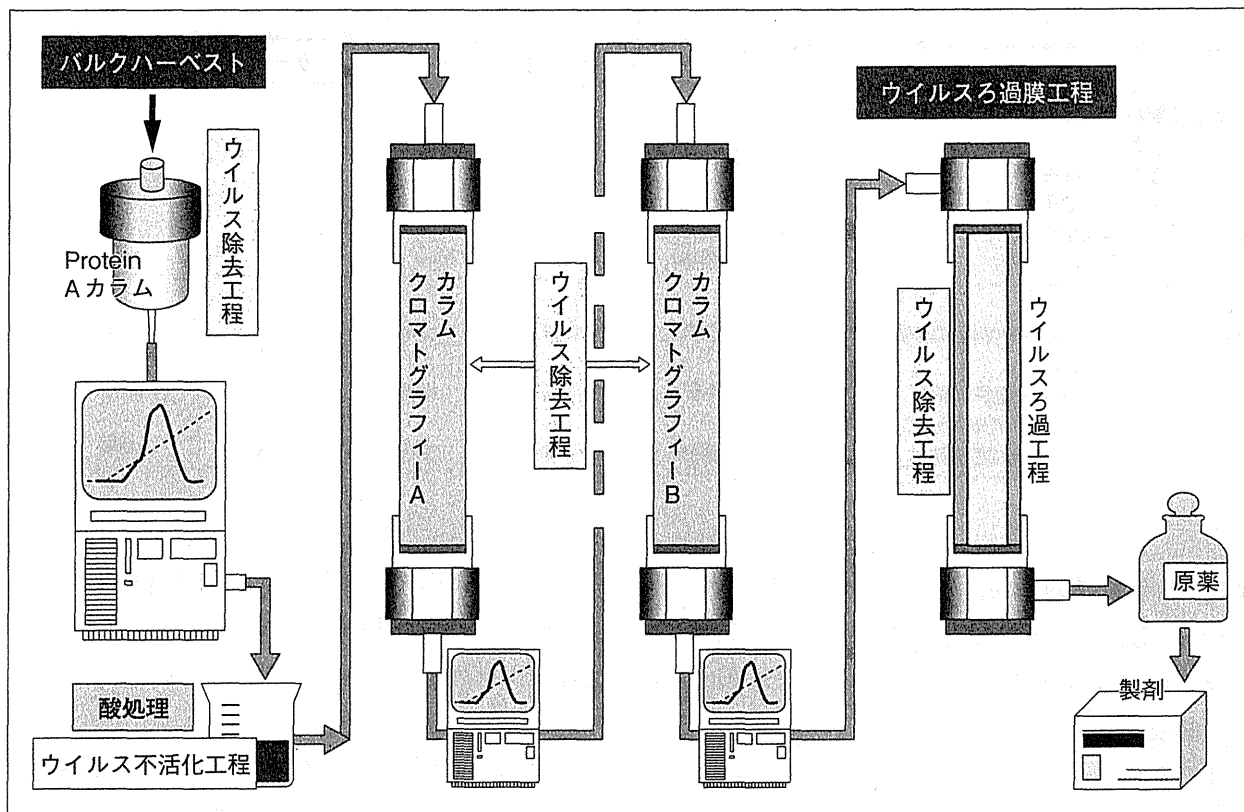


図2 代表的な抗体医薬品の精製工程とウイルスクリアランス

歩により、バルクハーベストでの目的タンパク質の純度も極めて高くなっている。バルクハーベスト以降のバイオ医薬品の製造工程は、目的タンパク質を精製していく工程であり、工程由来不純物含量の少ない高純度のバルクハーベストが得られることにより、工程由来不純物を除去するための工程の簡略化が可能になりつつある。そのため、内在性レトロウイルス粒子や迷入ウイルス除去能を担保するためのウイルスクリアランスの各工程の除去能を高めることが望まれている。

例えば、抗体医薬品の精製工程には、図2のように、プロテインA/Gによるアフィニティークロマトグラフィー工程やイオン交換クロマトグラフィー等による精製とウイルスろ過工程などが採用されているが、抗体医薬品の精製の初期工程で汎用されているアフィニティークロマトグラフィー工程では、ウイルス除去と酸処理によるウイルス不活化能を分けて評価可能であることが示されるようになりつつある。また、ウイルスろ過膜の性能が極めて高くなったことにより、ろ過工程でのクリアランス能が飛躍的に向上している。さらに、多くの血液製剤における不活化工程として採用されている solvent/detergent (S/D) 処理によりエンベロープウイルスの不活化を行う工程が採用されるケースもある。

バイオ医薬品の製造技術そのものが大きく変わりつつあり、技術革新に応じた合理的なウイルスクリアランス工程の評価が求められている。また、外来性ウイルスの混入の要因も、生物由来原料からよりも、むしろ環境的な要因に注意を払う必要があり、特に非エンベロープウイルスの迷入に対処可能なウイルスクリアランス工程を構築しておくことが有用と考えられる。

必要とされる精製工程でのウイルスクリアランス能については古くからの課題ではあるが、現時点でも特に基準があるわけではない。ただ、血液製剤におけるウイルスクリアランス指数(ウイル

表5 血液製剤のウイルス安全性に関する海外と日本のガイドラインの比較

	欧州 ¹⁰⁾	WHO ¹¹⁾	米国 ¹²⁾	日本 ^{13,14)}
製造工程に含めるべきウイルスの不活化/除去に「有効」*な工程の数	原則として、機序の異なるものを2工程	機序の異なるものを2工程(エンベロープウイルスに対して有効な工程)	機序の異なるものを2工程	原則として、機序の異なるものを2工程以上(ただし、「有効」の定義はなし)
	少なくとも1工程は、非エンベロープウイルスに有効なもの	少なくとも1工程は、非エンベロープウイルスに有効なもの	少なくとも1工程は、非エンベロープウイルスに有効なもの	—
	—	—	少なくとも1工程は不活化工程	—
総RF値の許容範囲	エンベロープウイルスに対して8以上 (「有効」*な工程×2)	エンベロープウイルスに対して8以上 (「有効」*な工程×2)	エンベロープウイルスに対して8以上 (「有効」*な工程×2)	—
	—	—	HIV, HBV モデルウイルスおよび HCV モデルウイルスに対して10以上	HIV, HBV, HCV 各モデルウイルスに対して9以上
	非エンベロープウイルスに対して4以上 (「有効」*な工程×1)	非エンベロープウイルスに対して4以上 (「有効」*な工程×1)	非エンベロープウイルスに対して6以上** (「有効」*な工程×1)	—
	原材料をはじめ、製造工程で混入しうると見積もられるウイルス量より明らかに大	原材料中に存在しうると見積もられるウイルス量よりかなり大きいことが原則	原材料中に最大存在し得ると見積もられるウイルス量の3~5Log以上であることが原則	原材料中に含まれる可能性のある全てのウイルスを念頭に置いて評価
ウイルスバリデーション評価に際して含めるべきウイルスの種類	<ul style="list-style-type: none"> ●エンベロープウイルス ・HIV-1 ・HCV モデルウイルス (例: Sindbis, Bovine diarrhoea virus (BVDV)) ・エンベロープ DNA ウイルス (HBV/HSV モデルウイルス) (例: Pseudorabies virus (PRV), Duck HBV (DHBV)) ●非エンベロープウイルス ・HAV ・B19 モデルウイルス (例: 動物パルボウイルス) ●ろ過工程評価用モデルウイルス 	<ul style="list-style-type: none"> ・HIV ・HCV モデルウイルス (例: Sindbis, BVDV) ・HAV ・B19 モデルウイルス (例: Porcine parvovirus, Canine parvovirus) ・HBV モデルウイルス (例: PRV, DHBV) 	<ul style="list-style-type: none"> ・HIV ・HBV モデルウイルス (例: PSV, DHBV) ・HCV モデルウイルス (例: BVDV, Sindbis) ・HAV ・B19 モデルウイルス (例: Porcine parvovirus, Canine parvovirus, MMV) 	DNA または RNA, エンベロープの有無, 粒子径の大小を考慮し, さらに物理的処理および化学的処理に対する抵抗性が高いものを選択. 3種類程度のモデルウイルスを組み合わせることが原則

*: RF に関しては4以上であること. **: personal communication.

ス力価の対数減少値 RF)については、日米欧で一定の基準が示されており(表5)、参考にはなると思われる。

3. ウイルス安全性確保における最近の国際動向

ICH Q5A ガイドライン策定後、バイオ医薬品の中でも数多くの抗体医薬品の開発が進展するに従い、ウイルス安全性確保には新たな考え方が生まれつつある。ウイルスクリアランス評価におけ

表6 ウイルスろ過膜の種類

フィルター名	Grade	ポアサイズ	材質	ろ過機構	完全性試験
Viresolve (ミリポア)	70/180 NFP	30nm 20nm	PVDF	膜	金粒子
Planova (旭化成)	15N 35N	15nm 35nm	再生セルロース	デプス	liquid 液圧力
Ultipore VF (Pall)	DV20 DV50	20nm 50nm	PVDF	膜	forward-flow

る新たな考え方や手法について概説するとともに、どのような点に注意すべきかについても解説する。

1) 抗体医薬品のプラットフォーム技術と製造法の改良

それは、抗体医薬品製造におけるプラットフォーム技術の考え方であり、構造的に共通する抗体医薬品は精製工程において図2で示したような共通する工程を採用することが可能であるとする考え方である。プラットフォーム技術を採用することにより、ウイルスクリアランス工程の評価において、より合理的な手法を用いることが可能であり、試験法そのもののバリデーションデータを他の製品にも適用できる可能性が高い。

また、この間に無血清製造工程の最適化が進み、製造に用いる試薬等の安全性が極めて高くなった点である。このことによりバルクハーベストで高い純度の製品が得られ、精製工程において不純物の除去が容易になり、精製工程が単純化できるようになった。しかし一方で、精製工程の単純化は評価可能なウイルスクリアランス工程の減少を意味する。そのために、大きく発展したのはウイルスろ過工程である。当初と比較してウイルスろ過膜の性能は飛躍的に向上し、最も小さいマウス微小ウイルス minute virus of mice (MMV) などでも十分なクリアランス能が得られるようになった。現在、ウイルスろ過工程に用いられるろ過膜としては、表6に挙げる3種の製品が多用されている。各製品のウイルスろ過原理はかなり異なっており、工程評価を行う際にはそれぞれの特徴を十分考慮する必要がある。

2) ウイルスろ過工程

ウイルスろ過工程は、粒子の大きさに依存することが明らかであることから、工程全体のウイルスクリアランスの評価にあたっては、MMVやパルボウイルスなどの最も小さいウイルスのクリアランスデータを他のウイルスのクリアランスに外挿することも可能とされている。ただし、ファージなどをモデルウイルスとして採用するにはいまだコンセンサスができていないように思われる。

3) PCR技術の適用

ICH Q5Aガイドラインでは、ウイルスクリアランス評価はウイルスの感染性を指標とすることを前提としていた。もちろんPCR等のウイルスゲノム量を指標としてクリアランス能を評価可能であるとはしていたが、そのためには感染性のないウイルスゲノムを測定することによるクリアランス能の過大評価や過小評価を行わないことについて十分な配慮が必要とされていた。

近年、PCR等のNATによるウイルスゲノムの定量技術が進むとともに、ウイルスの完全性を確認する手法の進展もあり、ウイルス除去工程の評価にNATが多用されるようになってきている。例えば抗体医薬品のアフィニティークロマトグラフィー工程において、カラムによる除去工程をNATによって評価し、カラムからの溶出とその後の酸処理による不活性化工程を感染性試験によって評価することが行われている。NATは感染性試験よりも簡便で定量性に優れていることから今後もその利用は進むと考えられる。

一方で、ウイルス否定試験としてもNATの重要性が増している。NATによる試験では、プライマー・プローブの設計により、必ずしも目的ウイルスが確実に検出できるわけではない。特に変異の多いウイルスに関しては、検出感度や検出能が十分あることを示すことが困難な場合が多い。一方で、ウイルスゲノム解析の進展によりウイルスサブタイプやジェノタイプの解析が進み、*in silico*による検出能の評価が可能になりつつある。さらに、PCR関連技術の飛躍的な進歩もあり、ウイルス検出の確実性が向上してきている。今後、セルバンクやバルクハーベスト等におけるウイルス検出試験としてNATの重要性はさらに増していくと考えられる。

4) 非エンベロープウイルスのクリアランス

抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品の精製工程において、エンベロープウイルスについては非常に高いウイルスクリアランス能のある工程が設計可能になっている。一方で、非エンベロープウイルスに関しては、必ずしも十分なクリアランス能が示されているわけではない。多くの非エンベロープウイルスが酸処理に対して抵抗性を示すため、評価可能なクリアランス工程としてはカラム工程での除去とウイルスろ過工程のみである。また、Genzyme社においてファブラザイム等の精製工程に非エンベロープウイルスの汚染が発生し、供給が停止したことも記憶に新しい。この事実は、非エンベロープウイルスの汚染のリスクの高さと、細胞変性効果 cytopathic effect (CPE) を起こさない汚染が起こった場合の汚染の検出の難しさを示している。非エンベロープウイルスのクリアランスは、バイオ医薬品のウイルス安全性の大きな課題と考えられる。

4. 臨床開発初期のバイオ医薬品に対するウイルス安全性の国際動向

ICH Q5A や生物由来原料基準等のガイドラインや指針は、承認時に提出すべきウイルス安全性に関するデータや市販後の安全対策について触れている。一方、抗体医薬品などのバイオ医薬品の開発では、臨床治験開始後であっても生産性の改善や不純物除去のためにバンクの変更や精製法の変更などが行われることが多く、また製法等の最適化が繰り返し実施されるケースもみられる。したがって、治験時において承認申請時と同等のウイルス安全性データを求めることはあまり合理的といえず、患者の安全性を最大限担保しつつ、治験を安全に実施するための要件を明らかにすることが必要であろう。治験開始時におけるバイオ医薬品のウイルス安全性に特化した指針は我が国には存在しないが、欧州医薬品庁 European Medicines Agency (EMA) は、バイオ治験薬のウイルス安全性評価ガイドライン¹⁵⁾を発出し、バイオ医薬品の治験実施前および治験実施中に実施すべきウイルス安全性評価に関する要件を示している(表7)。本ガイドラインでは、臨床開発初期のバイオ治験薬に対してもICH Q5Aの基本原則が適用できるが、承認申請時に求められるICH

表7 バイオ治験薬のウイルス安全性評価指針(文献15より)

ICH Q5A に基づいたウイルスバリデーション試験			
フェーズⅠ, Ⅱに用いられる治験薬 フェーズⅢに用いられる治験薬	削減可能 必要		
	未精製バルクで実施すべきウイルス試験		
	<i>in vitro</i> 試験*	感染性レトロウイルス試験	<i>in vivo</i> 試験
CHO 細胞 NS0, Sp2/0 細胞 その他の細胞株	必要(全バルク) 必要(全バルク) 必要(全バルク)	必要なし 必要(1回のみ) 必要(1回のみ)	必要なし 必要なし 必要(1回のみ)

*: 広汎なウイルスを検出可能な細胞を用いること (Vero 細胞, MRC-5 等).

Q5A のフルパッケージを最初から揃える必要はなく、段階的にデータを揃えればよいとの考え方である。多くのバイオ医薬品の製造に用いられている ICH Q5A のケース A, B に該当する細胞株の場合、①製造終了後の細胞/未精製バルクの複数のロットについてのウイルス試験、②ウイルスクリアランスのバリデーション、の2つに試験を削減することが可能としている。EMA の治験薬ウイルス安全性の考え方は、抗体医薬品のプラットホーム技術の考え方とも整合しており非常に合理的に考えられていることもあり、我が国においても適用可能な部分が多いと思われるので、その詳細を紹介しながら、治験薬のウイルス安全性について概説する。

EMA のガイドラインでは、細胞株のウイルス試験としては、MCB については Phase I 開始までに実施する必要があるとしているが、WCB はその時点では樹立されている必要はなく、樹立後に初代 WCB について ICH Q5A に準じた試験を実施すればよい。また未精製バルクについて試験を実施すれば、CAL での試験を実施する必要はない。

未精製バルクについては、開発段階にかかわらず各バッチについて ICH Q5A に準じたウイルス試験を実施する必要があるが、細胞株の種類によって要求される試験項目は異なる(表7)。例えば、製造に用いるのが CHO 細胞の場合であれば、細胞を含む未精製バルクについて *in vitro* ウイルス試験(*in vitro* 感染性試験および PCR)を実施する必要があるが、感染性レトロウイルス試験や *in vivo* 試験を実施する必要はない。NS0 細胞や Sp2/0 細胞を用いて製造する場合は、感染性レトロウイルス試験は一度実施すればよい。ただし、製造スケールの変更など培養法を大きく変更する場合には、再度試験を実施する必要がある。その他の細胞を製造に用いた場合は、感染性レトロウイルス試験と *in vivo* 試験も一度は実施すべきである。また、用いる細胞株が MMV に感染性を示す場合には、試験ウイルスに MMV を入れる必要がある。ヒトや動物など生物起源由来の試薬を用いた場合はさらに追加の試験が必要となる。

また、ウイルスクリアランスのバリデーションも ICH Q5A に準じて治験開始前に実施する必要があるが、試験の頑健性(工程パラメータの影響)については後でもよい。試験にはエンベロープウイルスと小型の非エンベロープウイルス(パルボウイルスが望ましい)を加えるべきであり、特にバルクハーベストに存在が知られているウイルスについては製造工程で効果的に除去・不活化されることを示す必要がある。内在性レトロウイルス、レトロウイルス様粒子を含むことが知られている細胞(ICH Q5A のケース B)を用いる場合は、レトロウイルスを使用してバルクハーベストに存在するレトロウイルス粒子が完全にクリアランスされることを示す必要がある。

おわりに

ICH Q5A ガイドラインの策定から約 10 年が経過し、バイオ医薬品製造技術の飛躍的な進歩もあり、ウイルス安全性についても様々な技術革新がみられる。このような最新のウイルス安全性技術を用いることにより、高いウイルス安全性を確保しつつ、合理的な対応がとられることが望まれる。特に開発段階でのウイルス安全性については、抗体医薬品のプラットホーム技術を利用することにより、被験者の安全性を確保しつつ迅速な開発が可能になると考えられる。

(内田恵理子)

文 献

- 1) ICH : Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin (Q5A). 1999.9.23 (厚生省医薬安全局審査管理課長：ヒト又は動物細胞を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価) について、医薬審第 329 号，2000 年 2 月 22 日)
- 2) 厚生労働省：生物由来原料基準。平成 15 年厚生労働省告示第 210 号 2003 年 5 月 20 日制定，平成 17 年厚生労働省告示第 177 号 2005 年 3 月 31 日改正
- 3) Sinacore MS, Drapeau D, Adamson SR : Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Mol Biotechnol* 15 : 249-257, 2000
- 4) Carson KL : Flexibility—the guiding principle for antibody manufacturing. *Nature Biotechnol* 23 : 1054-1058, 2005
- 5) Wurm FM : Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnol* 22 : 1393-1398, 2004
- 6) Walsh G : Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature Biotechnol* 28 : 917-924, 2010
- 7) Hung F, Deng L, Ravnikar P et al : mRNA stability and antibody production in CHO cells : Improvement through gene optimization. *Biotechnol J* 5 : 393-401, 2010
- 8) Brown SW, Mehtali M : The avian EB66[®] cell line, application to vaccines, and therapeutic protein production. *PDA J Pharm Sci Technol* 64 : 419-425, 2010
- 9) Chartrain M, Chu L : Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in mammalian cell expression systems : An overview of the current upstream technologies. *Current Pharmaceutical Biotechnol* 9 : 447-467, 2008
- 10) European Medicines Agency CHMP : Guideline on plasma-derived medicinal products (Draft). CPMP/BWP/269/95 rev.4, 2009.2.19
- 11) World Health Organization : Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. WHO Technical Report 924 : 150-224, 2004
- 12) FDA CBER : Transmissible Spongiform Encephalopathies Advisory Committee, 2002.6.26, 2003.2.20 & Blood Product Advisory Committee, 2003.9.18
- 13) 厚生省医薬安全局長：血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて。医薬発第 1047 号，1999 年 8 月 30 日
- 14) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長，同安全対策課長，同監視指導・麻薬対策課長，同血液対策課長：血漿分画製剤のウイルス安全対策について。薬食審査発第 1107001 号，薬食安発第 1107001 号，薬食監発第 1107001 号，薬食血発第 1107001 号，2003 年 11 月 7 日
- 15) European Medicines Agency CHMP/BWP : Guideline on virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products. EMEA/CHMP/BWP/398498/2005, 2008.7.24

講座

こうすればできる 日本薬局方 微生物試験⁷

日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件

内田恵理子

はじめに

ヒトや動物の生体組織・体液から得られる生物起源由来医薬品や、ヒトや動物由来培養細胞を用いて製造されるバイオ医薬品の安全性確保において、重要な懸念の一つにウイルス汚染のリスクが挙げられる。「日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件」は、日局収載生物薬品及び将来収載される可能性のあるすべての生物薬品のウイルスに対する総合的な安全性確保のための基本的方策を示したものであり、日本薬局方に参考情報として収載されている。参考情報とは、新医薬品の開発や品質評価に必要な試験法を積極的に収載することにより有用な医薬品の開発を支援し、また医薬品の安全性や品質を担保するという目的を持ち、試験を実施する上で参考になると考えられる情報を示したものであり、公定書としての規制的要件を記載したものではない。また、本参考情報は、生物薬品のウイルス安全性確保のために製造工程のどの段階でどのような試験、安全対策が必要かについての一般的留意事項を示しているが、必ずしも個々のウイルス試験の具体的な方法を示すものではない。本稿では、本参考情報の内容を概説するとともに、生物薬品のウイルス安全性確保に用いられるウイルス試験について紹介する。

1. 対象となる品目の種類

対象となる生物薬品は、国内で使用されるヒトや動物の血液や尿、組織に由来する生物薬品、及びヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質性医薬品（遺伝子組換え医薬品や細胞培養由来医薬品などのバイオ医薬品）である。ヒトの血液に由来する血漿分画製剤は局方ではなく生物学的製剤基準に収載されており、「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」¹⁾が適用されるので対象外とされている。また、生物起源由来物質であってもアミノ酸、糖類、グリセリンなどの比較的低分子の化合物や、高分子化合物でもゼラチンのようなものは、その製法や精製法からウイルス迷入の可能性が考えられないケースが多く、またタンパク質性医薬品であれば変性してしまうような加熱処理や強酸・強アルカリ、有機溶媒を用いてウイルス不活化が可能であることから、本参考情報の適用対象外である。

2. 生物薬品のウイルス安全性確保の基本的考え方

生物薬品の一般的な製造工程とウイルス安全対策の例を図1に示す。生物薬品のウイルス汚染源としては、原材料の起源となるヒトや動物、医薬品製造基材となる培養細胞がウイルスに汚染されている可能性と、製造工程で使用する酵素や血清、

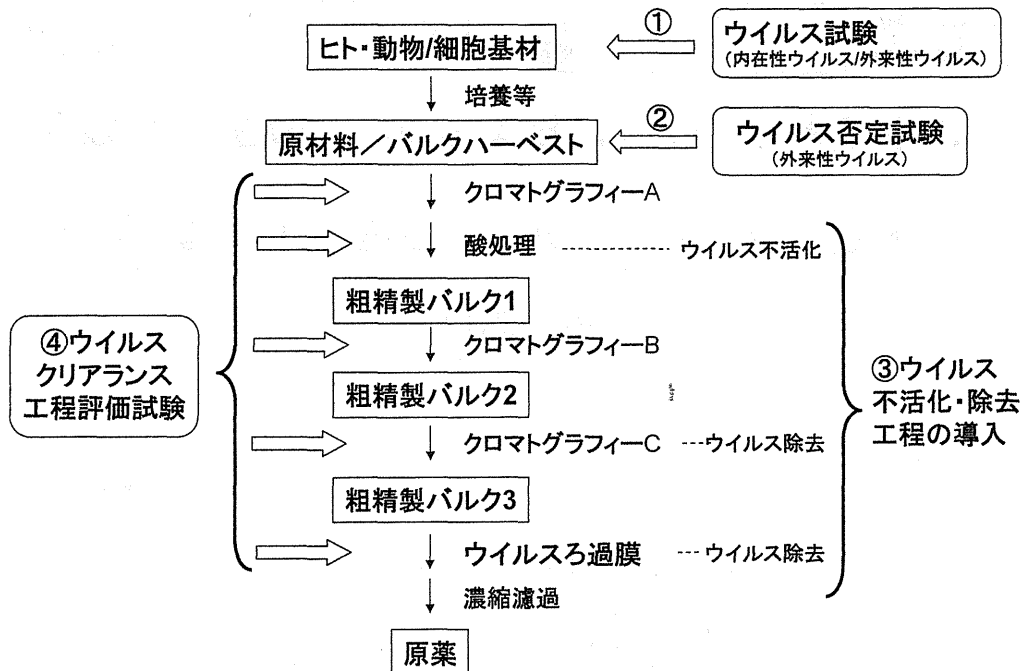


図1. 生物薬品の製造工程とウイルス安全対策の例

トリプシン、アルブミンなどの生物起源由来の試薬や添加物、精製工程中の迷入ウイルスなどが原因となる可能性が考えられる。生物薬品のウイルス安全性確保には、①適切な原材料や細胞基材、医薬品製造基材を選択し、徹底したウイルス試験を行うことはもちろんであるが、これだけでは十分ではない。製造過程でのウイルス迷入の可能性もあることから、②バルクハーベストなどの適切な製造段階でウイルス否定試験を実施することが必要となる。さらに、ウイルス試験には限界があり、たとえ高感度の試験で検出限界以下となってもウイルスがゼロであるとはいえないことや、用いる試料が採用したウイルス試験では感度、特異性において必ずしも適切ではなく検出できない場合などもある。そこで、ウイルス否定試験の実施に加えて、③製造工程に複数の適切なウイルス除去・不活化工程を導入すること、および④製造工程がどの程度のウイルス除去・不活化の能力をもつのかについてウイルスクリアランス試験を実施して工程評価を行うことにより、たとえウイルスが混入しても製造工程により十分にクリアランスできることを示す必要がある。生物薬品のウイルス安全性はこのように複数のウイルス安全対策を相互補完的にとることにより達成される。

3. 原材料・医薬品製造基材のウイルス安全性確保のためのウイルス試験

3.1. ヒト由来生物薬品のウイルス試験

ヒト由来生物薬品の原材料には血液や尿が用いられている。ヒト由来医薬品原料は「生物由来原料基準」²⁾に準拠する必要がある。ヒト由来医薬品原料に混入する可能性があり、注意すべきウイルスにはヒト免疫不全ウイルス (HIV)、A型肝炎ウイルス (HAV)、B型肝炎ウイルス (HBV) (図2)、C型肝炎ウイルス (HCV)、E型肝炎ウイルス (HEV)、ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1,2)、ヒトパルボウイルス B19 (図3)、サイトメガロウイルスなどがある。原材料は健康な人から得たもので、可能な場合は個人毎に問診を行うとともに、少なくともHBV、HCV、HIVについては特異性と感度、精度が十分に評価された血清学的検査及び核酸増幅検査 (NAT) を実施し、これらウイルスの存在を否定する必要がある。原材料が尿などの場合は、プールされた原材料に対して特異性と感度、精度が十分に評価されたNATにより、少なくともHBV、HCV、HIVの存在を否定することが求められる。血液を原料とする場合、血清学的検査として

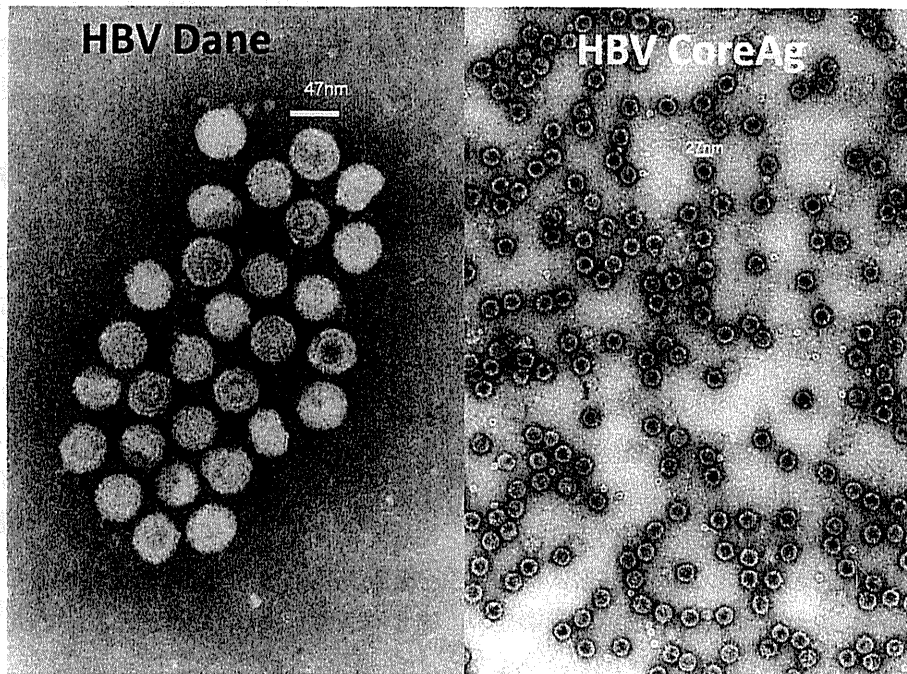


図2. HBVの電子顕微鏡写真

直径約47nmの球形ウイルス（左図）で、エンベロープで包まれた内部に、ウイルスDNAをヌクレオカプシドが包む直径約27nmのコア粒子（右図）が存在する二層構造をとる（左図）。遺伝子を持つ粒子はDane粒子と呼ばれる。HBV粒子のエンベロープタンパク質がHBs抗原、コア粒子の表面を構成するタンパク質がHBc抗原。（写真提供：東京女子医大 田中建志先生）

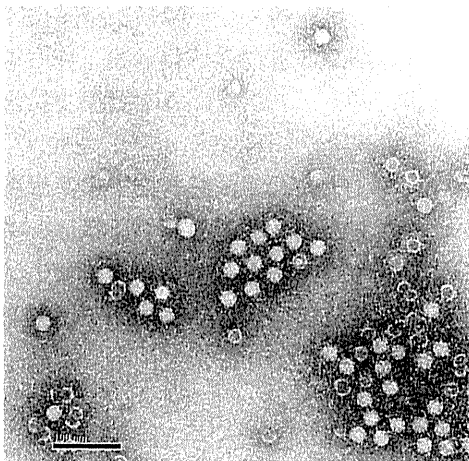


図3. ヒトパルボウイルスB19の電子顕微鏡写真

直径約20nmの正二十面体構造を形成する小型ウイルスでエンベロープを持たない。自然界に存在するウイルスの中で最も小さい部類に入る。（写真提供：東京女子医大 田中建志先生）

HBV 検査 (HBs 抗原, HBs 抗体, HBc 抗体),
HCV 検査 (HCV 抗体), HIV 検査 (HIV-1/2 抗体),
HTLV-1 検査 (HTLV-1 抗体), パルボウイルス B19 検査 (B19 抗原), NATとして HBV

DNA, HCV RNA, HIV RNA などの検査が行われている。

核酸増幅検査 (NAT)

NATはウイルス核酸を増幅して検出する方法で、定量的PCR (Polymerase Chain Reaction) 法が良く用いられているが、他にもNASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) 法, TMA (Transcription Mediated Amplification) 法, LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法など様々な核酸増幅法がある。NATは血清学的検査よりも感度が高く、ウイルス感染初期のウィンドウ期を大幅に短縮可能であるが、用いるプライマーに対応するウイルスしか検出できず、プライマーの選択によってはすべてのサブタイプが検出されるとは限らないこと、高感度ではあっても検出限界が存在すること、偽陽性も出やすいことなどを認識する必要がある。測定には必ず陰性対照と陽性対照を含め、標準品や参照パネルを用いて測定法の検出

感度や特異性を確認することが必要である。NATによる測定 of 留意事項は「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドラインについて」³⁾に示されている。

3.2. ヒト以外の動物を用いて製造される生物薬品

動物由来の生物薬品は、ウシ、ブタ、ウマなどの血液や各種組織からヘパリンや性腺刺激ホルモンなどが製造されている。動物由来医薬品原料は「生物由来原料基準」²⁾に準拠する必要がある。製造には適切に管理された健康な動物を使用する。また、各動物種には特有のウイルスが知られ、特に人に感染性や疾病をもたらす人獣共通感染症の原因となるウイルス (表1) については、ウイルスが存在しないことを証明する当該国の certifi-

cate や WHO の資料等, その存在が否定できる科学的根拠を示すか, 血清学的検査や NAT によりウイルスの存在を否定する必要がある。

3.3. ヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質性医薬品

ヒト又は動物起源細胞株由来のバイオ医薬品では、細胞株が医薬品製造基材となる。医薬品製造用にクローン化された細胞株から調製されたマスター・セル・バンク (MCB) やワーキング・セル・バンク (WCB) に関しては、ICH Q5A ガイドライン⁴⁾に従い、内在性ウイルス及び非内在性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。Q5A には各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験が示されている (表2)。

表1. 生物薬品の由来となる動物への感染が知られている人獣共通感染症ウイルスの例

ウイルス名	ウシ	ブタ	ウマ
牛痘ウイルス	○		
偽牛痘ウイルス	○	○	
マレーバレー脳炎ウイルス	○	○	
羊跳躍病ウイルス	○	○	
口蹄疫ウイルス	○	○	
日本脳炎ウイルス		○	
水胞性口炎ウイルス	○	○	○
ボルナ病ウイルス			○
狂犬病ウイルス	○	○	○
インフルエンザウイルス		○	
E型肝炎ウイルス		○	
脳心筋炎ウイルス	○	○	
ロタウイルス	○		
東部ウマ脳炎ウイルス, 西部ウマ脳炎ウイルス,			○
ベネズエラウマ脳炎ウイルス			
ウマモービリウイルス			○
ヘンドラウイルス		○	
ニパウイルス		○	○
伝染性胃腸炎ウイルス		○	
ブタ呼吸器コロナウイルス		○	
ブタ流行性下痢症ウイルス		○	
血球凝集性脳髄膜炎ウイルス		○	
ブタ繁殖呼吸器病症候群ウイルス		○	
ブタコレラウイルス		○	
パラインフルエンザ3型ウイルス		○	
エンテロウイルス1型		○	
レオウイルス		○	
内在性レトロウイルス		○	
ブタアデノウイルス1~4型		○	
ブタサーコウイルス		○	
ブタバルボウイルス		○	
ブタボックスウイルス		○	
ブタサイトメガロウイルス		○	
トロウイルス	○		