

医 薬 審 第 3 2 9 号  
平成 1 2 年 2 月 2 2 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生省医薬安全局審査管理課長

「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」について

近年、優れた新医薬品の地球的規模での研究開発の促進と、患者への迅速な提供を図るため、承認審査資料の国際的ハーモナイゼーション推進の必要性が指摘されている。

このような要請に応えるため、日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議（ICH）が組織され、品質、安全性及び有効性の3分野でハーモナイゼーションの促進を図るための活動が行われている。

本ガイドラインは、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ついて、ICHにおける三極の合意事項に基づき、その標準的と思われる方法を示したものである。

貴管下関係業者に対し周知方よろしくご配慮願いたい。

# 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

## 目次

．緒言	1
．ウイルス汚染の可能性	2
A．マスター・セル・バンク（MCB）にウイルスが存在する可能性	2
B．医薬品製造過程で迷入する可能性	3
．細胞株適格性試験：ウイルス試験	3
A．マスター・セル・バンク（MCB）、ワーキング・セル・バンク（WCB）又は医薬品製造のために <i>in vitro</i> 細胞齢の上限にまで培養された細胞（CAL）におけるウイルス試験	3
1．マスター・セル・バンク	3
2．ワーキング・セル・バンク	3
3．医薬品製造のために <i>in vitro</i> 細胞齢の上限にまで培養された細胞（CAL）	4
B．ウイルス検出及び確認のために推奨される試験	4
1．レトロウイルス試験	4
2． <i>In vitro</i> 試験	5
3． <i>In vivo</i> 試験	5
4．抗体産生試験	5
C．ウイルスが検出された細胞株の使用について	5
．未加工 / 未精製バルクにおけるウイルス試験	5
．ウイルスクリアランス試験と精製バルクにおけるウイルス試験の意義、考え方及び実施要領	6
．ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析	9
A．ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析のためのウイルスの選択	10
1．「関連ウイルス」と「モデルウイルス」	10
2．その他の留意事項	11
B．ウイルスクリアランスの工程評価試験及び工程特性解析試験のデザインと実施要領	11
1．施設とスタッフ	11

2 . 製造システムのスケールダウン	..... 11
3 . ウイルス不活化 / 除去に関する製造段階毎の解析	..... 12
4 . 不活化と物理的除去の区別	..... 12
5 . 不活化に関する事前評価	..... 13
6 . カラムの機能と再利用	..... 13
7 . 特別な留意事項	..... 13
C . ウイルスクリアランス試験の解釈	..... 14
D . ウイルスクリアランス試験の限界	..... 16
E . 統計	..... 17
F . ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合	..... 17

.  まとめ	..... 17
--------	----------

用語解説	..... 19
------	----------

表 1 : 各細胞レベルで 1 度は実施すべきウイルス試験
表 2 : ウイルス試験に用いられるアッセイ法の例とその限界
表 3 : 抗体産生試験において検出されるウイルス
表 4 : ウイルスクリアランス工程評価と精製バルクにおけるウイルス試験に関する実施要領

付録 1 : 特性解析されたセル・バンクを <i>in vivo</i> で増殖することにより生産される製品
付録 2 : ウイルスクリアランス試験のためのウイルスの選択
表 A - 1 : ウイルスクリアランス試験に用いられたことのあるウイルスの例
付録 3 : ウイルス力価測定における統計学とその留意点
低濃度ウイルス液の検出確率
付録 4 : ウイルスクリアランス試験でのクリアランス指数の計算方法
付録 5 : 投与量当たりの推定ウイルス粒子数の計算方法

# 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

## ．緒言

本文書は、ヒトや動物（哺乳類、鳥類、昆虫類）由来の特性解析がなされた細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性にかかわる試験及び評価のあり方に関するものである。また、承認申請書に添付されるべきデータの概略を述べたものである。本文書において、ウイルスという用語には、ウシ海綿状脳症（BSE）やスクレーピーに関連する従来の特異な伝播因子は含まないものとする。BSEに関しては申請者が規制当局に個別に相談すること。

本文書の適用範囲は、特性解析されたセル・バンクを出発基材とした細胞培養により生産された医薬品とする。適用対象には、インターフェロン、モノクローナル抗体、組換えサブユニットワクチンを含む組換え DNA 技術応用医薬品など、*in vitro* 細胞培養から得られた医薬品が含まれる。また、ハイブリドーマを *in vivo* で増殖し、腹水から得られた医薬品なども含まれる。後者の場合、特別な考慮が必要である。細胞を *in vivo* で増殖して得た製品について検討する際の必要な情報は付録 1 に追加記載されている。不活化ワクチンや自己複製因子を含むすべての生ワクチン、遺伝子工学によって作られた生きたベクターは本文書の適用範囲から除外する。

製品へのウイルス汚染の危険性は、細胞株由来のバイオテクノロジー応用医薬品すべてに共通するものである。そのようなウイルス汚染が発生すれば、臨床的使用において深刻な事態を招く可能性がある。製品のウイルス汚染は、医薬品生産基材としての細胞株自身のウイルス汚染、あるいは製造過程における外部からのウイルスの迷入によりもたらされる可能性があるが、今日まで、細胞株由来のバイオテクノロジー応用医薬品によりウイルス感染が発生したという事例はない。しかし、ウイルス汚染に関するこれらの製品の安全性は、しかるべき方策によって合理的に保証することが望まれる。その方策とは、以下に述べるように、適切なウイルス試験プログラムを適用すること、並びに製造工程におけるウイルス不活化及び除去に関する評価を行うことである。

バイオテクノロジー応用医薬品において発生する可能性があるウイルス汚染を防ぐためには、以下の 3 つの主要な相補的アプローチがある。

- a) ヒトに対して感染性や病原性を示す可能性のあるウイルスの存在を否定するために、細胞株、その他培地成分を含む原材料を選択し、試験すること。
- b) 製造工程の感染性ウイルス不活化 / 除去能力を評価すること。

c) 製造工程の適切な段階において、製品の感染性ウイルス否定試験を行うこと。

ウイルス試験には、統計的理由により低濃度のウイルスを検出するときの感度がサンプルサイズに依存するなど、定量性の面で固有の限界がある。したがって、それだけで医薬品の安全性を確立するのに十分というアプローチはない。最終製品に感染性ウイルスが存在しないという、より確実な保証は、多くの場合、製品を直接試験して否定することのみでは得られず、その精製法のウイルス不活化/除去能力を併せて示すことによって得られる。

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、セル・バンクの特性解析と適格性確認の程度、検出されたすべてのウイルスの種類・性質、培地成分、培養方法、施設及び設備の仕様、細胞培養後のウイルス試験の結果、工程のウイルス不活化/除去能力、製品のタイプや臨床上の使用目的・用法等が含まれる。

本文書の目的は、ウイルス試験及びウイルスクリアランスの評価に必要な試験並びにそれらをどのようにデザインすればよいかについての方策を関係付け、包括的に示すことである。用語解説を末尾に、関連事項を付録に記載した。

製造業者は、それぞれの製品や製造工程について、ウイルスに対する安全性を保証するための総合戦略の中で採用したアプローチを説明し、その妥当性を示す必要がある。その際、本文書で推奨されているアプローチを、合理性がある限り適用すべきである。承認審査を迅速に行うため、詳細なデータに加えて、ウイルス安全性評価に関する総括を記載すること。この総括には、本文書に記載されているようなウイルス汚染を防ぐための方策とウイルス安全性に関する試験すべてを網羅した見解を簡潔に記述する必要がある。

## ・ウイルス汚染の可能性

バイオテクノロジー応用医薬品のウイルス汚染は、細胞株に起因するものと製造工程中におけるウイルスの迷入に起因するものがある。

### A. マスター・セル・バンク (MCB) にウイルスが存在する可能性

細胞には、潜伏感染又は持続感染状態のウイルス（例えばヘルペスウイルス）、あるいは内在的なレトロウイルスが存在している可能性がある。これは、ウイルスゲノムが細胞内に持続的に保持されているためである。これらのウイルスは1つの細胞世代から次の世代に垂直伝播することができ、細胞内に構成的に発現している、あるいは感染性ウイルスとして予期せぬ発現をしているものと考えられる。

ウイルスは次のような経緯により MCB に混入してくる可能性がある。1) 感染した

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

## B. 医薬品製造過程で迷入する可能性

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。

### . 細胞株適格性試験: ウイルス試験

バイオテクノロジー応用医薬品の製造に用いる細胞株の適格性試験において、ウイルス試験は重要な項目の1つである。

## A. マスター・セル・バンク(MCB)、ワーキング・セル・バンク(WCB)又は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(CAL)におけるウイルス試験

表1に MCB、WCB 又は CAL の各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験の例を示す。

### 1. マスター・セル・バンク

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ため、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。

### 2. ワーキング・セル・バンク

医薬品製造のための出発細胞基材としての各 WCB については、それ自体を対象に、又は WCB を培養した CAL の段階で、外来性ウイルスに関する試験を実施すること。適切な非内在性ウイルスの試験が、WCB のもとである MCB で実施され、かつその WCB に由来する CAL において外来性ウイルスの試験が実施されている場合、同様の試験は当該 WCB では不要である。抗体産生試験は、通常、WCB では不要である。もう1つのア

アプローチとして、WCB について、MCB において必要とされるすべての試験を実施し、MCB における試験の代わりとしてもよい。

### 3 . 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 (CAL)

医薬品製造に用いる際の細胞の *in vitro* 細胞齢の上限は、医薬品製造のために提案された *in vitro* 細胞齢又はそれを超えて、パイロットプラントスケール又は実生産スケールの条件で培養された製造細胞のデータに基づいて設定すること。この場合、製造細胞は WCB から調製されるのが一般的であるが、MCB から調製してもよい。

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。

なお、CAL について、適切なウイルス試験 (例えば *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験) を少なくとも 1 度は実施することによって、製造工程が外来性ウイルスに汚染されていないことがより一層確実になる。この段階で外来性ウイルスが認められた場合、原因を明らかにするため製造工程を厳密に調査し、対応策を講ずること。場合によっては工程を根本的に設計しなおす必要がある。

## B . ウイルス検出及び確認のために推奨される試験

内在性ウイルスや外来性ウイルスを検出するための試験には様々なものがある。代表的な試験の例を表 2 に示す。これらは現時点において推奨される方法ではあるが、必ずしもすべての試験法が網羅されているわけではない。また、これらを用いなければならぬと定めたものでもない。最も適切な技術は科学の進歩とともに変わると考えられるので、適切な資料が提出されれば記載されたもの以外でもよい。製造業者は新たに提案する技術について、当局と協議することを勧める。

表 2 に示された試験以外の特殊な試験が必要なケースもある。

試験を実施するには十分な感度と特異性を確認するための適切なコントロールを置く必要がある。

細胞基材の由来からみて、当該種に特異的に存在する可能性が高い特定のウイルスが予想される場合は、それに対応する試験及びアプローチが必要であろう。製造に用いられる細胞がヒト又はヒト以外の霊長類由来である場合、妥当な理由がない限り、免疫不全症や肝炎などの疾病を引き起こす可能性のあるヒトウイルスに関する試験を追加実施すべきである。NAT 法 (核酸増幅法) は、これらのヒトウイルスやその他のウイルスの存在の有無を塩基配列の面から検出するのに適切な方法である。以下には、製造業者が試験の実施計画を立案し、あるいは実施した試験を評価する際、その妥当性を総括し、また、理論的根拠を示す上で参考になる事項を概説する。

### 1 . レトロウイルス試験

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。なお、レトロウイルスを試験するための誘導試験 (induction) は、有用な方法ではないことが明らかになっ

てきている。

## 2 . *In vitro* 試験

*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。

## 3 . *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。

## 4 . 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。

## C . 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 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。

### ・ 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及び培養液の単一又は複数のプールからなる。未加工 / 未精製バルクが必ずしも細胞を含まず培養液からなる場合もあ

る。すなわち、中空系又は類似のシステムなどの例では、細胞がハーベストとして採取されにくい場合もある。

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。ただし、ごく一部工程を進めることによってウイルス試験がより高感度に行える場合には、この限りではない（例：未加工 / 未精製バルクがウイルス試験に用いる培養細胞に毒性を示すが、部分的に処理したバルクにおいては毒性を示さないようなケース）。培養槽から取り出されたそのままの細胞、破碎細胞及び培養上清からなる混合物を、処理を施すことなく試験することが、より適切な場合もある。

承認申請時には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールから得た未加工 / 未精製バルクの少なくとも 3 ロットのデータを申請資料の一部として提出する必要がある。

なお、以降の各製造バッチ中の外来性ウイルスについても、製造業者が引き続き評価するための計画を作成することが望まれる。この未加工 / 未精製バルクにおけるウイルス試験の範囲、程度及び頻度を決定するにあたっては、以下のような諸点を考慮する必要がある。例えば、目的産物を生産するために用いられる細胞株の種類・性質、細胞株の適格性試験のため実施されたウイルス試験の程度と試験結果、培養方法、原材料の起源とウイルスクリアランス試験の結果などである。未加工 / 未精製バルクにおける試験として一般に用いられているのは、1 種又は数種の細胞株を用いる *in vitro* スクリーニング試験である。なお、適宜、NAT 法その他の適切な試験法を用いるとよい。

一般に、外来性ウイルスが検出されたハーベストは、医薬品等を製造するために用いるべきではない。もしこの段階で何らかの外来性ウイルスが検出されたならば、その汚染の原因を突きとめるために製造工程を注意深く点検し、適切な対応をとるべきである。

## V . ウイルスクリアランス試験と精製バルクにおけるウイルス試験の意義、考え方及び実施要領

MCB から医薬品製造の様々な段階を経て最終製品に至る間において、それぞれに最も適切で合理的なウイルス試験、及び未加工 / 未精製バルクからのウイルスクリアランスの評価試験・特性解析試験を実施するためのプロトコールを設定することは重要である。

このうち、ウイルスクリアランス評価試験と特性解析試験は、特に中心的な役割を果たす。プロトコールの設定にあたっては、製品がウイルスに汚染されていないことを最も確実に、かつ合理的に保証することを目標とするべきである。

クリアランス試験に用いるウイルスを選定するにあたって、存在することが知られているウイルスを除去する能力について製造工程を評価する必要がある場合と、「非特異的モデルウイルス」（後述）を用い製造工程のウイルスクリアランスに関する特性を解析する

ことにより工程のもつクリアランス能力 (robustness) を評価したい場合とを区別して考えた方がよい。「関連 (relevant) ウイルス」、「特異的 (specific) モデルウイルス」及び「非特異的 (non-specific) モデルウイルス」の定義については、用語解説を参照のこと。ウイルスクリアランスの工程評価にあたっては、未加工 / 未精製バルク等の製造工程中にウイルスがどれだけの量存在するか、製造工程でウイルスがどの程度不活化 / 除去され、生産物の安全性を評価できるか、に関する知見が必要である。不活化工程の効果を保証するために、不活化の時間依存性を調べることは有用である。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。ウイルスクリアランス工程特性解析試験をどの程度まで行うかは、細胞株及び未加工 / 未精製バルクに関するウイルス試験結果により判断されなければならない。これらの試験は後述 (第 4 章) のごとく実施されるべきである。

表 4 は、細胞及び未加工 / 未精製バルクについてのウイルス試験の結果に対応したウイルスクリアランス工程評価試験、ウイルスクリアランス工程特性解析試験及び精製バルクにおけるウイルス試験に関する実施要領を示している。様々なケースが想定されるが、以下のすべてのケース (A、B、C、D、E) において、「非特異的モデルウイルス」を用いたクリアランスの特性解析を実施するべきである。最も一般的なケースは、ケース A とケース B である。げっ歯類のレトロウイルス以外のウイルスに汚染されたケースは、通常、医薬品の製造方法としては使用しない。ケース C、D 又は E にあたる細胞株を用いて医薬品製造を行おうとする場合で、その必要性が認められ、かつ理由を十分に説明できるという場合は、その使用について規制当局と協議すべきである。ケース C、D 及び E の場合、当該ウイルスを有効に不活化 / 除去することが検証された工程を、製造工程中に有していることが重要である。

**ケース A :** 細胞又は未加工 / 未精製バルク中にウイルス、ウイルス様粒子又はレトロウイルス様粒子のいずれの存在も認められないケースである。本ケースでは前述のごとく、ウイルスの不活化 / 除去の検討は「非特異的モデルウイルス」を用いて実施すること。

**ケース B :** げっ歯動物のレトロウイルス (又は、げっ歯動物の A 型粒子及び R 型粒子のような非病原性であるとされているレトロウイルス様粒子) のみが細胞又は未加工 / 未精製バルク中に存在するケースである。本ケースでは、マウス白血病ウイルス (Murine Leukemia Virus) 等の「特異的モデルウイルス」を用いた工程評価試験が実施されるべきである。

精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する適切な検出方法を用いて試験すること。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも 3 ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出すること。CHO、C127、BHK 等の細胞株、及びネズミのハイブリドーマ細胞株は医薬品製造にしばしば用いられているが、ウイルス汚染に起因する安全上の問題は報告

されていない。これらの細胞株の内在性レトロウイルス様粒子は十分に解析されており、クリアランスも示されていることから、精製バルクでの内在性レトロウイルス様粒子に関する試験は、通常、不要である。ケースAに述べたような「非特異的モデルウイルス」を用いた検討は、実施する必要がある。

ケースC：細胞又は未加工／未精製バルク中に、げっ歯類のレトロウイルス以外のウイルスが存在しているが、ヒトへの感染性は知られていないケースである（表3、脚注2で特定されているもの等で、げっ歯動物のレトロウイルス（ケースB）以外のもの）。本ケースでウイルスの不活化／除去の工程評価試験を行う際には、存在しているウイルスそのものを用いること。そのウイルスを用いることが不可能な場合、「関連ウイルス」又は「特異的モデルウイルス」を使用し、クリアランスの程度が受け入れられるに足るものであることを示すこと。工程評価試験には、これらのウイルスの不活化試験が含まれるべきであり、そのうちの特に重要な不活化工程においては、同定されたウイルス（又は「関連／特異的モデルウイルス」）の不活化の時間依存性に関してデータを得ること。

精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する検出方法を用いた試験を実施すること。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも3ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出すること。

ケースD：ヒトへの病原性が知られているウイルス（表3、脚注1などに示されたもの）が細胞又は未加工／未精製バルク中に検出され、同定されたケースである。本ケースからの製品は、例外的な場合のみ認められることになる。この場合、検出されたウイルスそのものをウイルス不活化／除去の評価試験に用いること、及び当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する検出方法を用いることを推奨する。検出されたウイルスそのものを使用することができない場合は、「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を使用すること。精製工程及び不活化工程において当該ウイルスが不活化／除去されることを証明すること。工程評価試験には当該ウイルスの不活化工程を含み、そのうちの特に重要な不活化工程においては、不活化の時間依存性に関してデータを得ること。

精製バルクについては、当該ウイルスに対する高い特異性と感度を有する適切な検出方法を用いた試験を実施すること。承認申請の際には、パイロットプラントスケール又は実生産スケールで製造された少なくとも3ロットの精製バルクに関するウイルス試験データを提出すること。

ケースE：現在適用可能な方法によっては分類することができないウイルスが細胞又は未加工／未精製バルクに検出された場合、そのウイルスに関して病原性が示されることもありうるので、その生産物は、通常、認められないと考えられる。極めて希なケースとして、そのような細胞株を用いた医薬品製造を行おうとする場合で、その必要性が認められ、かつ理由を十分に説明できるという場合であっても、開発を進める前に規制当局と協議するべきである。

## ・ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析

ウイルス不活化や除去に関する工程評価と工程特性解析は、バイオテクノロジー応用医薬品の安全性を確立するために重要である。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。ウイルスクリアランス試験の実施にあたっては、試験の計画、経過、結果及び評価を文書化するとともに、試験の管理を十分に行う必要がある。

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。もし、いくつかのステップにより十分なクリアランスが示されるのであれば、必ずしも製造工程のすべての工程について工程評価又は工程特性解析する必要はない。しかし、評価対象以外のステップが、ウイルスの不活化/除去に関する結果に、間接的に影響を与える可能性についても留意しておくべきである。製造業者は、ウイルスクリアランス試験に用いたアプローチについて説明し、その妥当性を明らかにする必要がある。

ウイルス量（ウイルス感染性）は、ウイルス粒子の除去又はウイルス感染性の不活化により減少する。ウイルスクリアランスに関して評価の対象とした各製造工程については、ウイルス量減少のメカニズムが不活化によるのか除去によるのかに関して推定し、記載すること。不活化を評価しようとする工程における試験に際しては、時間を変えて検体をサンプリングし、不活化曲線が描けるように計画すべきである（第 章、B.5 参照）。

ウイルスクリアランス工程評価試験は、MCB に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証明するために実施される。これに加えて、検出を免れた外来性ウイルス、又は製造工程中に迷入する可能性がある外来性ウイルスのクリアランスに関しても、ある程度の保証を与えるために実施される。減少度は、通常、対数で表わされる。したがって、残存ウイルス量がゼロにまで減少することはない一方で、残存ウイルス量が数学的にみると大きめに減少することもありうる。

上記のような、細胞などに存在が知られたウイルスを対象とするウイルスクリアランス工程評価試験に加えて、それ以外のウイルスを不活化/除去する能力に関する工程の特性を評価する試験を行うべきである。この工程特性解析試験では、細胞などに存在が知られていないか又は存在が予測されていないウイルスで、かつ広範な生化学的・生物物理的性

質を有するウイルスを用いる。その目的は、特定のウイルスの不活化／除去を達成するという目的のものとは異なり、対象とする工程のもつクリアランス能力の特性を解析することにある。どの製造工程がどの程度のウイルス不活化／除去能力を有するのかを明らかにすることが望ましい（第 章、C 参照）。これらの試験は、特定のウイルスによるリスクに対する安全性を評価するために行うわけではない。したがって、クリアランスに関して特定の数値目標が達成される必要はない。

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

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。製造業者は、工程評価試験及び工程特性解析試験の目的並びに本ガイドラインに示されたガイダンスに従って、ウイルスの選択の妥当性を説明する必要がある。

### 1．「関連ウイルス」と「モデルウイルス」

ウイルスクリアランス試験を実施する上での重要な点は、どのようなウイルスを使用するか決定することである。使用するウイルスは「関連ウイルス」、「特異的モデルウイルス」及び「非特異的モデルウイルス」の3つのカテゴリーに分けられる。

「関連ウイルス」とは、製造工程で使用される細胞基材、その他の試薬類や各種物質に混在することが知られているか、あるいは存在の可能性のあるウイルス類と同一又は同種のウイルスで、ウイルスクリアランスに関する工程評価試験に用いられるものである。精製工程や不活化工程がこれら「関連ウイルス」を不活化／除去する能力があることを示す必要がある。この「関連ウイルス」の入手が困難であったり、ウイルスクリアランスに関する工程評価試験にうまく適用できない（例えば、*in vitro* で十分に高力価になるまで培養できない）場合には、代替として「特異的モデルウイルス」を用いることになる。適切な「特異的モデルウイルス」とは、存在が知られている、あるいは存在が疑われるウイルスに密接に関連しているウイルス、すなわち同一の属もしくは科のもので、検出されたウイルスあるいは存在が疑われるウイルスと類似した物理的・化学的性質を有するものである。

げっ歯類由来の細胞株には、通常、内在性レトロウイルス粒子又はレトロウイルス様粒子が存在しており、それらには感染性のもの（C 型粒子）又は非感染性のもの（細胞質 A 型又は R 型粒子）がある。それらの細胞由来の生産物については、その製造工程がげっ歯類レトロウイルスを不活化／除去する能力を有していることを明らかにしておく必要がある。このためには、ネズミ由来の細胞の場合、マウス白血病ウイルス（Murine Leukemia Virus）を「特異的モデルウイルス」として用いるとよい。エプスタイン・バーウイルス（Epstein-Barr Virus、EBV）により B リンパ球を不死化することで得られたモノクローナル抗体を分泌するヒト細胞株の場合は、その製造工程が（何らかの）ヘルペスウイルスを不活化／除去する能力を有することを明らかにしておくべきである。仮性

狂犬病ウイルス（Pseudorabies Virus）も「特異的モデルウイルス」として使用できる。

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るべきである。それらのウイルスにより得られた結果は、製造工程のウイルス不活化／除去能力に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。

## 2．その他の留意事項

その他の留意点は以下のとおりである。

- a) 高力価の材料が調製できるウイルスが望ましい。ただし、これがいつも可能であるとは限らない。
- b) 使用するそれぞれのウイルスの検出に関して、試験対象の各製造工程において、効果的で信頼性の高いアッセイ法が確立されている必要がある。
- c) ウイルスの選択にあたっては、クリアランス試験従事者に健康被害をもたらす可能性を考慮するべきである。

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

### 1．施設とスタッフ

製造施設にウイルスを持ち込むことは、GMP上からみて適切ではない。したがって、ウイルスクリアランス試験は、ウイルスを取り扱う上で適切な設備を備えた別の実験施設で行われるべきである。また、精製工程のスケールダウンを設計し、準備に関与した製造担当者とウイルスの専門知識を有する者が共同して試験を実施するべきである。

### 2．製造システムのスケールダウン

スケールダウンの妥当性を明らかにすること。スケールダウンした精製工程の各要素は、実際の製造工程をできるかぎり反映したものとすべきである。クロマトグラフ装置については、カラムベッド高、線流速、ベッド容量に対する流速の比率（すなわち接触

時間)、緩衝液やカラム充填材の種類、pH、温度、タンパク濃度、塩濃度及び目的物質濃度のすべてに関して、実生産スケールにおける製造のそれに相応していることを示す必要がある。また、溶出のプロフィールも同様のものが得られなければならない。同様な考え方をその他の工程についても適用すること。やむを得ない事情により実際の製造工程を反映させることができない場合には、それが結果へどのような影響を及ぼすかを考察しておくべきである。

### 3. ウイルス不活化 / 除去に関する製造段階毎の解析

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。各工程での効果を適切に評価するために、試験に供する各工程段階の試料には十分な量のウイルスを添加するべきである。通常は、試験対象となる各段階の出発物質（前段階から得られた工程内各中間製品）にウイルスを添加する。場合によっては、未加工 / 未精製バルクに高力価のウイルスを添加し、工程間のウイルス濃度を試験することで十分である。ウイルス除去が分離操作による場合で、適切かつ可能な場合には、ウイルスがどのように分離・分画されたのかを検討することが望ましい。殺ウイルス能を有するような緩衝液を製造工程中で 2 つ以上の段階にわたって用い、スパイク試験を行うような場合、並行して殺ウイルス能の低い緩衝液を用いてスパイク試験を行うというような方策をとり、これを総合評価の一部に加えてもよい。試験対象である各工程段階を経る前と経た後で、ウイルスの力価を測定すること。感染性を定量するためのアッセイは十分な感度と再現性を有する必要がある。その結果に関して統計的に適切で妥当な処理が行えるよう、十分な測定サンプル数で実施すること。感染性を指標としない定量試験も、その妥当性を明らかにした上で使用してもよい。感染性試験を行う際には常に、感度を保証するために、適切なウイルスコントロールを含むべきである。また、低濃度のウイルス試料（例えば、ウイルス粒子数が 1L 当たり 1~1000）を取り扱う場合、ウイルス試料のサンプリングの仕方によって生じる統計学上の問題を考慮に入れるべきである（付録 3 参照）。

### 4. 不活化と物理的除去の区別

ウイルスの感染性はウイルスの不活化又は除去によって低減する。評価対象の各工程におけるウイルス感染性低減の機序が不活化によるのか、除去によるのかを推測し、記述すべきである。もし、ウイルスクリアランスが製品の安全性確保にとって重要な因子と考えられるにもかかわらず、（既存の）製造工程では感染性に関するクリアランスが少ししか達成されない場合には、状況に応じて特別な不活化 / 除去工程あるいは付加的な不活化 / 除去工程を導入するべきである。

特定の工程に関して、除去と不活化を区別する必要がある場合もある。例として、複数のクリアランス工程で使用される緩衝液が、各工程の不活化に寄与する可能性が挙げられる。この場合、これらのクロマトグラフィー工程において共通に使用される緩衝液による不活化への寄与分と、クロマトグラフィー工程の各々によって達成される除去と

は区別されるべきである。

## 5．不活化に関する事前評価

ウイルスの不活化を評価するためには、未加工／未精製の原材料（未加工／未精製バルク）あるいは中間製品に感染性のウイルスをスパイクし、減少度を計算すべきである。ウイルスの不活化は単純な1次反応でなく、通常、速い「第1相」と遅い「第2相」から構成される複雑な反応であることに留意すべきである。それゆえ、試験に際しては、時間を変えて検体をサンプリングし、不活化曲線が描けるように計画すべきである。不活化試験においては、最短曝露時間でのポイントに加えて、曝露ゼロ時より長く、かつ最短曝露時間よりも短い時間でのポイントを少なくとも1点はとることを勧める。

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

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

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

試験対象の工程条件下では不活化があまりにも速く、不活化曲線を作成することができない場合、実際に不活化により感染性が失われていることを、適切な試験系により示す必要がある。

## 6．カラムの機能と再利用

精製工程に使用するクロマトグラフ用カラムとその他の装置のウイルスを除去する能力は、経時的に、あるいは繰り返し使用した後に変化する可能性がある。カラムを数回使用した後にウイルスクリアランスに関する性能を示す指標が変化しないことを測定することによって、カラムのこのような繰り返し使用ができるかどうかの判断材料が提供される。これらの再使用にあたっては、保持される可能性のあるウイルスは、すべて適切に破壊あるいは除去されていることを保証しておくべきである。例えば、洗浄手順や再生手順でウイルスが不活化／除去されることを証明することによって、そのような保証としてよい。

## 7．特別な留意事項

a) 高力価のウイルスを調製する場合には、凝集を避けるよう注意を払うべきである。さもなくば、物理的除去が過大に評価されたり、不活化が過小に評価され、実際の製造での状況を反映しなくなる可能性が生ずる。

b) 評価に値するウイルスアッセイ結果が得られるような最小ウイルス量に留意すべき

である。

- c) 力価を測定するにあたっては、測定に至るまでの試料の希釈、濃縮、濾過あるいは保管などによりウイルス感染性が減少するかどうかを評価するため、並行したコントロール実験を含むべきである。
- d) 添加（スパイク）するウイルスは、製品の変性を変えたり希釈することがないような少ない容量で製品に添加されるべきである。希釈された試験試料中のタンパク質は、実生産スケールで得られる製品中のそれと全く同一とはいえないからである。
- e) 例えば、緩衝液、培地あるいは試薬類におけるわずかな相違が、ウイルスクリアランスに大きな影響を及ぼす可能性についても留意すべきである。
- f) ウイルスの不活化は時間に依存するので、スパイクされた試料が特定の緩衝液あるいは特定のクロマトグラフ用カラム内に存在する時間の長さは、商業生産スケールの工程条件を反映したものであるべきである。
- g) 緩衝液や製品は指示細胞に望ましくない影響を及ぼす可能性がある。したがって、これらのウイルス力価測定法に対する毒性作用又は干渉作用をそれぞれ個別に評価して、測定に支障のないような対策を講ずるべきである。緩衝液が指示細胞に対して毒性を有する場合は、希釈、pHの調整、あるいはスパイクウイルスを含む緩衝液の透析等を試みるとよい。製品そのものが抗ウイルス活性を持っている場合、疑似的なアプローチ（mock run）、すなわち製品そのものは含まない条件下でのクリアランス試験を実施する必要がある。しかし、製造工程によっては、製品を除去すること又は抗ウイルス活性を持たない類似タンパク質で代替することがウイルスの挙動に影響することもありうる。また、例えば、透析、保存など、測定試料調製の手順による影響をみるために、同様な調製手順を経るコントロール試験も実施する必要がある。
- h) 同様な緩衝液又はカラムを複数の精製工程で繰り返し使用するケースでは、データを解析する際に、この繰り返し使用の影響を考慮すべきである。ウイルス除去の効果は、その方法が使用される製造工程の段階により変化する可能性があることに留意する必要がある。
- i) 総ウイルスクリアランス指数は、製造条件が非常に強い殺ウイルス性を有している場合、あるいは緩衝液などが指示細胞に対し非常に強い毒性や殺ウイルス性を有している場合には過小評価される可能性があるため、ケースバイケースの考え方に立脚して議論されるべきである。逆に、総ウイルスクリアランス指数は、ウイルスクリアランス試験に固有の限界ないしは不適當な試験計画のために過大評価される場合もあることに留意する必要がある。

## C. ウイルスクリアランス試験の解釈

## 試験の適格性（試験結果の妥当性評価）

ウイルスの不活化／除去に関する評価の目的は、ウイルス不活化や除去に有効であると考えられる工程について工程評価及び工程特性解析すること、並びにそれらの各工程を併せて、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。ケースBからEのようにウイルス汚染がみられる場合、当該ウイルスが排除あるいは不活化されたということのみでなく、ウイルスクリアランスに関して必要な程度を上まわる能力が精製工程に組み込まれていて、最終製品の安全性が適切なレベルに確保されていることを示すことが重要である。製造工程により除去され、あるいは不活化されたウイルスの量は、未加工／未精製バルク中に存在が推定されるウイルス量と比較されるべきである。

比較をする上で、未加工／未精製バルク中のウイルス量を測定することが重要である。この測定値は、感染性の測定あるいはその他の方法、例えば電子顕微鏡（TEM）により、得られるべきである。精製工程全体を通して評価した場合、1回の臨床投与量に相当する未加工／未精製バルク中に存在すると推定されるウイルス量をはるかに上まわる量のウイルスを、排除することができなければならない。ウイルスクリアランス指数の計算に関しては付録4を参照すること。また、投与量当たりの推定粒子数の計算に関しては付録5を参照すること。

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

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

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

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

分離工程においては、個々のウイルスが持つ際だって特異的な物理的・化学的特性がゲルマトリクスとの相互作用や沈降特性にどのように影響するのかに大きく依存する場合がある。そのため、モデルウイルスが目的ウイルスとは異なる機序により分離される可能性がある。

分離に影響するパラメータにはどのようなものがあるかを明らかにして、これらを適切に管理する必要がある。

糖鎖付加のようなウイルスの表面特性の変化によって、分離状況に違いが生ずる可能

性がある。

しかしながら、こうした変動要因にもかかわらず、相互補完的分離工程の組み合わせ、あるいは不活化工程と分離工程との組み合わせにより、効果的なクリアランスが達成される。したがって、クロマトグラフィー工程、濾過工程及び抽出工程等のような分離工程で、十分に吟味してデザインしたものは、適切にコントロールされた条件下で操作を行った場合、効果的なウイルス除去工程となりうる。ウイルスクリアランス工程として有効であることを示すためには、少なくとも 2 回以上の独立した試験により添加ウイルス量の低減に再現性があることを立証する必要がある。

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

ウイルスクリアランスが製品の安全性確保にとって重要な因子と考えられるにもかかわらず、製造工程による感染性に関するクリアランスの達成度が不十分である場合には、1 つ又は複数の特別な不活化 / 除去工程あるいは追加的な不活化 / 除去工程を新たに導入すべきである。製造業者は、得られたクリアランス指数が受け入れ可能かどうかについて、関係するすべてのウイルスを念頭において評価し、その妥当性を示すべきである。その際、得られた結果の評価は、以上に述べられた要因に基づいて行うことになる。

#### D . ウイルスクリアランス試験の限界

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

- 1 . 製造工程のクリアランス試験に使用されるウイルス標品は、通常、組織培養で製造される。製造工程中において、組織培養ウイルスの挙動は、自然界に存在するウイルスの挙動とは異なっている可能性がある。例えば、自然界に存在するウイルスと培養ウイルスとでは純度や凝集の程度が異なっている場合がある。
- 2 . ウイルス感染性の不活化は、しばしば急速な初期相とそれに続く遅い相からなる 2 相性の曲線を示す。そのような工程で不活化を免れたウイルスは、次の不活化工程でより強い抵抗力を示す可能性がある。例えば、抵抗性画分が凝集形態をとるとすれば、各種化学的処理や熱処理に対しても抵抗力を示す可能性がある。
- 3 . 総クリアランス指数は、対数で表された各精製段階での減少度を加算することにより算出される。しかし複数の工程、特にほとんど減少を伴わない工程（例えば  $1 \log_{10}$  以下の工程）の減少度を加算すると、工程全体を通してのウイルス除去能力を過大評価してしまう可能性がある。なお、同一又は近似した方法を繰り返して達成されたクリアランス指数は、合理的な理由がない限り加算するべきでない。

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

## E．統計

ウイルスクリアランス試験における結果の評価にあたっては統計学的手法を活用してデータを解析する必要がある。また、得られた結論が支持されるためには、試験結果の妥当性が統計学的に検証されたものである必要がある（付録 3 参照）。

## F．ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合

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

## ．まとめ

このガイドラインは、ウイルス汚染の危険性を評価し、製品からウイルスを排除し、もってヒト又は動物細胞由来の安全なバイオテクノロジー応用医薬品を製造するためにどのようなアプローチをすればよいかを示唆している。また、そのうち特に重要な方策を以下に示す。

- A．出発素材である細胞基材につき徹底的な解析とスクリーニングを行い、どのようなウイルス混入があるかを確認すること。
- B．汚染ウイルスが、どの程度ヒトへの有害性が高いかを決定すること。
- C．未加工 / 未精製バルクにおいて外来性ウイルスを検出するための適切な試験計画を設定すること。

D．周到なウイルスクリアランス試験計画を立てること。ウイルスクリアランスを最大限達成するために、製造工程中にウイルスの除去／不活化に関する各種の方法を用いること。

E．ウイルス不活化及び除去を評価する試験を実施すること。

## 用語解説

### *In vitro* 細胞齢 ( *In vitro* Cell Age )

マスター・セル・バンク ( MCB ) の融解時より、製造容器から培養細胞 ( 又は培養液 ) をハーベストするときまでの時間的尺度で、培養期間、細胞数倍加レベル ( PDL )、又は培養細胞液を一定の倍数で希釈して継代する場合の細胞継代数で示される。

### ウイルス ( Virus )

病原性を示す可能性があり、単一のタイプの核酸 ( RNA もしくは DNA のいずれか ) を有し、成長も 2 分裂もせず、それらの遺伝物質が細胞内で複製する感染単位。

### 外来性ウイルス ( Adventitious Virus )

意図に反して迷入したウイルス。

### 関連ウイルス ( Relevant Virus )

製造工程で使用される細胞基材、その他の試薬類や各種物質に混在することが知られているか、あるいは存在の可能性があるウイルス類と同一又は同種のウイルスで、ウイルスクリアランス工程評価試験に用いられるもの。

### 特異的モデルウイルス ( Specific Model Virus )

存在が知られている、あるいは存在が疑われるウイルスに、密接に関連しているウイルス。すなわち、同一の属もしくは科のもので、検出されたウイルスあるいは存在が疑われるウイルスと類似した物理的・化学的性質を有するもの。

### 内在性ウイルス ( Endogenous Virus )

本来は、ゲノムが細胞株と同一の生物種のジャームライン ( 生殖系列の遺伝子 ) の一部であり、親細胞株の起源動物のゲノム中に共有結合的に組み込まれたウイルス。本文中では、細胞基材を不死化するために用いられたエプスタイン - バーウイルス ( Epstein-Barr Virus、EBV ) のように意図的に導入され、宿主ゲノムには組み込まれていないウイルス、及びウシパピローマウイルス ( Bovine Papilloma Virus ) もこの範疇に当てはめる。

### 非特異的モデルウイルス ( Non-specific Model Virus )

製造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目的、すなわち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 ) を解析する目的で行うウイルスクリアランス工程特性解析試験に使用されるウイルス。

### 非内在性ウイルス ( Non-endogenous Virus )

MCB に存在する外来性ウイルス。

#### ウイルスクリアランス ( Viral Clearance )

対象ウイルスを、ウイルス粒子の除去又はウイルス感染性の不活化により排除すること。

#### ウイルスクリアランス工程特性解析試験 ( Process Characterization of Viral Clearance )

製造工程がウイルスの不活化 / 除去能力を確実に発揮するという面での特性 ( robustness ) を解析することを目的に、「非特異的モデルウイルス」を用いて行われるウイルスクリアランス試験。

#### ウイルスクリアランス工程評価試験 ( Process Evaluation Studies of Viral Clearance )

存在が知られているか予測されるウイルスに関して製造工程が有する不活化 / 除去能力を解析することを目的に、「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を用いて行われるウイルスクリアランス試験。

#### ウイルス除去 ( Virus Removal )

目的とする製品からのウイルス粒子の物理的分離。

#### ウイルス様粒子 ( Virus-like Particles )

電子顕微鏡下で形態的に既知ウイルスとの関連性がうかがわれる構造体。

#### 外来性ウイルス ( Adventitious Virus )

「ウイルス」をみよ。

#### 最短曝露時間 ( Minimum Exposure Time )

不活化処理段階における時間設定の根拠となった最大限の不活化に必要な最短時間。実際の製造工程における曝露時間は、最短曝露時間を十分超えた時間として設定される。

#### 細胞基材 ( Cell Substrate )

医薬品製造のために用いられる細胞。

#### 製造用細胞 ( Production Cells )

医薬品を製造するために用いられている細胞基材。

#### 内在性ウイルス ( Endogenous Virus )

「ウイルス」をみよ。

#### 非内在性ウイルス ( Non-endogenous Virus )

「ウイルス」をみよ。

#### 不活化 ( Inactivation )

化学的又は物理的修飾によって引き起こされるウイルス感染性の減少。

### **マスター・セル・バンク ( MCB ) ( Master Cell Bank )**

単一の細胞プールからの分注液で、一般的には、選択されたクローン細胞株から一定の方法で調製され、複数の容器 ( アンプルやバイアル ) に分注され、一定の条件下で保存される。MCB は WCB を調製するのに用いられる。新たに調製された MCB ( 前回用いたクローン細胞株、MCB 又は WCB から調製される ) について実施される試験は、特に合理的な理由がない限り元の MCB について実施された試験と同じである必要がある。

### **未加工 / 未精製バルク ( Unprocessed Bulk )**

生産培養後にハーベストされた細胞及び培養液の単一又は複数のプール。未加工 / 未精製バルクは、必ずしも細胞を含むとは限らず、培養液のみからなる場合もある。

### **ワーキング・セル・バンク ( WCB ) ( Working Cell Bank )**

WCB は、MCB から一定の条件で培養して得られる均一な細胞懸濁液を分注して調製される。

表 1 . 各細胞レベルで1度は実施すべきウイルス試験

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

a . 第 章、A.2 参照。

b . 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 (第 章、A.3 参照)。

c . 他の因子も検出可能。

d . レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要。

e . 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。

f . 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* 試験及び *in vivo* 試験をそれぞれ 1 種類ずつ実施すること。

g . 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。

h . 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2．ウイルス試験に用いられるアッセイ法の例とその限界

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

a．加えて、指標細胞から試験検体を識別することが困難。

表 3 . 抗体産生試験において検出されるウイルス

MAP	HAP	RAP
エクトメリアウイルス ( Ectromelia Virus ) <sup>2,3</sup>	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス ( Lymphocytic Choriomeningitis Virus、 LCM ) <sup>1,3</sup>	ハンタンウイルス ( Hantaan Virus ) <sup>1,3</sup>
ハンタンウイルス ( Hantaan Virus ) <sup>1,3</sup>	マウス肺炎ウイルス ( Pneumonia Virus of Mice、 PVM ) <sup>2,3</sup>	キルハムラットウイルス ( Kilham Rat Virus、 KRV ) <sup>2,3</sup>
K ウイルス ( K Virus ) <sup>2</sup>	レオウイルス 3 型 ( Reovirus Type 3、 Reo3 ) <sup>1,3</sup>	マウス脳脊髄炎ウイルス ( Mouse Encephalomyelitis Virus ) ( Theiler's、 GDVII ) <sup>2</sup>
乳酸脱水素酵素ウイルス ( Lactic Dehydrogenase Virus、 LDH ) <sup>1,3</sup>	センダイウイルス ( Sendai Virus ) <sup>1,3</sup>	マウス肺炎ウイルス ( Pneumonia Virus of Mice、 PVM ) <sup>2,3</sup>
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス ( Lymphocytic Choriomeningitis Virus、 LCM ) <sup>1,3</sup>	SV5	ラットコロナウイルス ( Rat Coronavirus、 RCV ) <sup>2</sup>
マウスマイニュートウイルス ( Minute Virus of Mice ) <sup>2,3</sup>		レオウイルス 3 型 ( Reovirus Type 3、 Reo3 ) <sup>1,3</sup>
マウスアデノウイルス ( Mouse Adenovirus、 MAV ) <sup>2,3</sup>		センダイウイルス ( Sendai Virus ) <sup>1,3</sup>
マウスサイトメガロウイルス ( Mouse Cytomegalovirus、 MCMV ) <sup>2,3</sup>		唾液腺腺炎ウイルス ( Sialoacryoadenitis Virus、 SDAV ) <sup>2</sup>
マウス脳脊髄炎ウイルス ( Mouse Encephalomyelitis Virus ) ( Theiler's、 GDVII ) <sup>2</sup>		トールンウイルス ( Toolan Virus ) ( HI ) <sup>2,3</sup>
マウス肝炎ウイルス ( Mouse Hepatitis Virus、 MHV ) <sup>2</sup>		
マウスロタウイルス ( Mouse Rotavirus ) ( EDIM ) <sup>2,3</sup>		
マウス肺炎ウイルス ( Pneumonia Virus of Mice、 PVM ) <sup>2,3</sup>		
ポリオーマウイルス ( Polyoma Virus ) <sup>2</sup>		
レオウイルス 3 型 ( Reovirus Type 3、 Reo3 ) <sup>1,3</sup>		
センダイウイルス ( Sendai Virus ) <sup>1,3</sup>		
胸腺ウイルス ( Thymic Virus ) <sup>2</sup>		

- 1 . ヒト又は霊長類への感染性が知られているウイルス。
- 2 . ヒトへの感染性が知られていないウイルス。
- 3 . ヒト又は霊長類由来の細胞において *in vitro* で複製できるウイルス。

表 4 . ウイルスクリアランス工程評価と精製バルクにおけるウイルス試験に関する実施要領

	ケース A	ケース B	ケース C <sup>2</sup>	ケース D <sup>2</sup>	ケース E <sup>2</sup>
<b>[ 細胞や未精製バルクでのウイルス試験結果 ]</b>					
ウイルスの存在 <sup>1</sup>	-	-	+	+	(+) <sup>3</sup>
ウイルス様粒子の存在 <sup>1</sup>	-	-	-	-	(+) <sup>3</sup>
レトロウイルス様粒子の存在 <sup>1</sup>	-	+	-	-	(+) <sup>3</sup>
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	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	+	未知
<b>[ 必要とする対応 ]</b>					
「非特異的モデルウイルス」を用いたウイルススクリアランス工程特性解析試験	必要 <sup>5</sup>	必要 <sup>5</sup>	必要 <sup>5</sup>	必要 <sup>5</sup>	必要 <sup>7</sup>
「関連ウイルス」又は「特異的モデルウイルス」を用いたウイルススクリアランス工程評価試験	不要	必要 <sup>6</sup>	必要 <sup>6</sup>	必要 <sup>6</sup>	必要 <sup>7</sup>
精製目的産物でのウイルス否定試験	適用外	必要 <sup>8</sup>	必要 <sup>8</sup>	必要 <sup>8</sup>	必要 <sup>8</sup>

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

## 付録 1

### 特性解析されたセル・バンクを *in vivo* で増殖することにより生産される製品

特性解析されたセル・バンク由来の細胞を接種した動物から採取した液体原料由来の製品については、動物に関する追加情報を提供する必要がある。

バイオテクノロジー応用医薬品 / 生物起源由来医薬品の製造に使用する動物は、可能な限り、適切に規定された特定病原体感染防止条件（SPF：Specific Pathogen-Free）に適合したコロニーから入手する必要がある。これらに対して、表 3 に挙げたようなウイルスのうち適当と考えられるものについて、適切な試験を実施するべきである。新しく入荷した動物や病的状態を示す動物に対する検疫方法についての情報を提供する必要がある。また、施設内で行われているすべての封じ込め、洗浄及び除染方法が、迷入因子の伝播の封じ込めに適切であると保証されている必要がある。この目的を達成するには、しかるべき監視プログラムを利用するとよい。プログラムには試験の実施対象とする迷入因子をリストアップしておくことも必要である。施設内で直接獣医学的な対応が可能かあるいは容易に対応できる状態にしておく必要がある。他の製造施設エリアから動物舎までどの程度隔離されているかについても示されるべきである。職員の業務内容は安全性保証面から適切なものでなければならない。

動物の飼育維持の方法についての詳細な情報を提供する必要がある。これには次のような事項が含まれる。1) 食餌、清掃及び給餌スケジュール、2) 定期的な獣医学的なケアを計画している場合には、その内容、3) ハイブリドーマ等を移植された動物の取扱いにあたって特別なことを必要とする場合には、その内容の詳細。また、動物の前処理法、移植用細胞の調製方法、移植部位及び移植経路も明らかにする必要がある。

動物から直接採取した物は、バイオリクターから採取した未加工 / 未精製バルクに相応する製造段階のものであると考えられる。したがって、この文書の第 4 章に記述してある試験についての考え方がそのまま適用されるべきである。加えて、製造業者は動物から採取した未加工 / 未精製バルクの細菌・真菌汚染について評価し、またマイコプラズマに汚染されていないことを確認し、さらに成熟マウス及び乳飲みマウスを用いた *in vivo* 試験及び種特異的ウイルス試験を実施すべきである。

## 付録 2

### ウイルスクリアランス試験のためのウイルスの選択

#### A．有用なモデルウイルスの例

- 1．「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

これらのウイルスは単なる例であり、使用を強制するものではない。

- 2．げっ歯動物の細胞基材の場合には、ネズミ科レトロウイルス類が「特異的モデルウイルス」として、通常、使用されている。

#### B．ウイルスクリアランス試験に用いられるウイルスの例

ウイルスクリアランス試験において使用されてきたウイルスを表 A - 1 に示している。しかし、これらは単なる例であり、使用を強制するものではない。製造業者は、その他のウイルスの使用を考慮してもよい。特に、個々の製品の製造工程を評価するのに、より適切なウイルスを使用するよう考慮すること。通常、異なる性質を持つ、少なくとも 3 種の異なるウイルスをクリアランスする能力について、製造工程を評価するべきである。

表 A - 1 . ウイルスクリアランス試験に用いられたことのあるウイルスの例

ウイルス	科	属	宿主	ゲノム	外被	サイズ(nm)	形状	抵抗性*
水疱性口内炎ウイルス ( Vesicular Stomatitis Virus )	ラブドウイルス科 ( Rhabdo )	ベジクロウイルス属 ( Vesiculovirus )	ウマ ウシ	RNA	有	70 × 150	弾丸形	低
パラインフルエンザウイルス ( Parainfluenza Virus )	パラミクソウイルス科 ( Paramyxo )	パラミクソウイルス属 ( Paramyxovirus )	多種	RNA	有	100 ~ 200 超	多様 / 球形	低
マウス白血病ウイルス ( MuLV )	レトロウイルス科 ( Retro )	C 型オンコウイルス属 ( Type C Oncovirus )	マウス	RNA	有	80 ~ 110	球形	低
シンドビスウイルス ( Sindbis Virus )	トガウイルス科 ( Toga )	アルファウイルス属 ( Alphavirus )	ヒト	RNA	有	60 ~ 70	球形	低
ウシ下痢症ウイルス ( BVDV )	フラビウイルス科 ( Flavi )	ペスチウイルス属 ( Pestivirus )	ウシ	RNA	有	50 ~ 70	多様 / 球形	低
仮性狂犬病ウイルス ( Pseudorabies Virus )	ヘルペスウイルス科 ( Herpes )		ブタ	DNA	有	120 ~ 200	球形	中
ポリオウイルス Sabin 1 型 ( Poliovirus Sabin Type 1 )	ピコルナウイルス科 ( Picorna )	エンテロウイルス属 ( Enterovirus )	ヒト	RNA	無	25 ~ 30	正 20 面体	中
脳心筋炎ウイルス ( Encephalomyocarditis Virus、EMC )	ピコルナウイルス科 ( Picorna )	カルジオウイルス属 ( Cardiovirus )	マウス	RNA	無	25 ~ 30	正 20 面体	中
レオウイルス 3 型 ( Reovirus 3 )	レオウイルス科 ( Reo )	オルトレオウイルス属 ( Orthoreovirus )	多種	RNA	無	60 ~ 80	球形	中
SV40	パポーバウイルス科 ( Papova )	ポリオーマウイルス属 ( Polyomavirus )	サル	DNA	無	40 ~ 50	正 20 面体	高
パルボウイルス ( Parvoviruses ) ( イヌ、ブタ )	パルボウイルス科 ( Parvo )	パルボウイルス属 ( Parvovirus )	イヌ ブタ	DNA	無	18 ~ 24	正 20 面体	高

\* : 物理的・化学的処理に対する抵抗性 ( 過去の製造工程試験の経験に基づいた目安である )。こうした抵抗性は、特定の処理毎に相対的に変わりうるものである。内容的には、製造工程の種類・特性とウイルスの生物学とを勘案して、抵抗性の目安としている。実際の結果は処理毎に変わりうるものである。

なお、ここに掲げたウイルスは単なる例示であり、これらの使用を強制するものではない。

## 付録 3

### ウイルス力価測定における統計学とその留意点

ウイルスの力価測定は、他の生物活性の測定と同様、ばらつきが大きい。ウイルスクリアランス試験を信頼性のあるものとするため、ウイルス力価測定の正確さとその測定値から得られるクリアランス指数の正確さ、並びに試験方法の妥当性を評価する必要がある。統計学的評価の目的は、実施したウイルスクリアランス試験がウイルス学的に適切な水準で実施されていることを裏付けることである。

1. 試験方法は半定量法 (quantal method) の場合と定量法 (quantitative method) の場合がある。半定量法は、動物を用いた感染性試験や TCID 法 (組織培養感染性試験: Tissue-Culture-Infectious-Dose assays) で、動物や培養細胞の感染の有無をスコアする方法である。感染価は、感染した動物や培養細胞の割合で決められる。定量法においては、ウイルス量と測定される感染性は直線的な関係にある。定量法としてはプラーク法などがある。プラーク法では 1 プラークが 1 感染単位に相当する。半定量法、定量法ともに、統計学的評価の対象となる。
2. 試験の変動は、希釈誤差、統計的な要因、及び測定法に固有な未知又は制御不能な要因に由来するばらつきにより生じる。通常、独立して実施した試験間のばらつき (試験間変動) は、1 試験内で得られた結果のばらつき (試験内変動) より大きい。
3. 試験内変動の 95% 信頼限界を求めるとき、通常、平均値  $\pm 0.5 \log$  のレベルに収まるようにすること。試験内変動は一般教科書的な方法で計算する。試験間変動は試験にウイルス標品を用いることでモニターできるが、この際のウイルス標品の力価の実測値は、別途、当該試験法を用いて研究室で測定・確立しておいた試験結果の平均値の、およそ  $0.5 \log$  以内であるべきである。妥当な理由があれば、より低い精度の試験も採用できる場合がある。
4. 「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を用いたクリアランス試験におけるクリアランス指数の 95% 信頼限界も、可能な限り、算出する必要がある。出発材料中のウイルス測定値の 95% 信頼限界が  $\pm s$  で、工程後のウイルス測定値の 95% 信頼限界が  $\pm a$  の場合、クリアランス指数の 95% 信頼限界は  $\pm (s^2 + a^2)$  である。

### 低濃度ウイルス液の検出確率

低いウイルス濃度の場合 (例えば、1L 当たりの感染性粒子が 10 ~ 1000 の範囲の場合)、数 mL のサンプルでは感染性粒子が含まれない可能性があることは明らかである。このサンプルが感染性粒子を含まない可能性  $p$  は

$$p = ((V - v) / V)^n$$

ここで  $V(L)$  は試験対象液の全容量、 $v(L)$  はサンプルの容量、 $n$  は  $V$  の中に統計的に分布する感染性粒子の総数とする。

$V = v$  の場合、この式はポアソン分布により近似される。

$$p = e^{-cv}$$

ここで  $c$  は 1L 当たりの感染性粒子数とする。

又は、 $c = \ln p / -v$

例えば、1mL のサンプルを試験する場合、ウイルス濃度が 1L 当たり 10 から 1000 感染性粒子のときの  $p$  値は、以下ようになる。

$c$	10	100	1000
$p$	0.99	0.90	0.37

このことは、1L 当たりウイルス粒子が 1000 の場合、1mL ずつサンプリングしたうち 37% ではウイルス粒子が存在しないことを示している。

サンプルの一部について試験を行い、ウイルスが検出されないときは、サンプル中にどの程度のウイルス量が存在していればポジティブな結果が得られるかについて計算しておくべきである。その値は、クリアランス指数を計算するときに考慮に入れるべきである。信頼限界は 95% であることが望ましい。しかし、これは、サンプルにおける様々な制限のため、実際的とはいえない場合もある。

## 付録 4

### ウイルスクリアランス試験でのクリアランス指数の計算方法

各精製段階あるいは不活化段階のウイルスクリアランス指数は次のように定義される。精製前の試料のウイルス負荷量と次の工程段階に供される精製後の試料のウイルス含有量との比率の常用対数 ( $\log_{10}$ )。以下の略号を使用した場合

出発試料：容量  $V'$ 、タイター  $10^{a'}$  のとき

ウイルス負荷量： $(V') \times (10^{a'})$

最終試料：容量  $V''$ 、タイター  $10^{a''}$  のとき

ウイルス含有量： $(V'') \times (10^{a''})$

各々のクリアランス指数  $R_i$  は次式によって計算される。

$$10^{R_i} = ((V') \times (10^{a'})) / ((V'') \times (10^{a''}))$$

この計算式には、精製工程の開始時及び終了後のタイターと容量が考慮されている。

ウイルスの力価測定は元来、精度が低いため、総クリアランス指数を計算する際には 1 より大きい個々のクリアランス指数を用いるべきである。

製造工程全体にわたる指数としての総クリアランス指数は、個々の製造段階のクリアランス指数の合計である。これは、クリアランス工程の開始段階に負荷されたウイルスと工程クリアランス最終段階におけるウイルス量との比率の常用対数に相当する。クリアランス指数は、通常、対数スケールで表される。この意味するところは、残存するウイルス感染性がゼロになることはないものの、数学的には極めて小さくなるということである。

## 付録 5

### 投与量当たりの推定ウイルス粒子数の計算方法

本計算方法は、出発材料に存在するウイルス量を推定できる場合、例えば内在性レトロウイルスに応用できる。

例：

・ 仮説

細胞培養ハーベスト液中のウイルス濃度の測定値又は推定値 =  $10^6 / \text{mL}$

算出されたウイルスクリアランス指数 =  $> 10^{15}$

1 投与量の目的産物を得るために必要な培養ハーベスト液の量 =  $1\text{L} (10^3 \text{mL})$

・ 1 投与量当たりの推定ウイルス粒子の計算方法

$$\begin{aligned} & \frac{(10^6 \text{ ウイルス粒子} / \text{mL}) \times (10^3 \text{ mL} / \text{投与量})}{\text{クリアランス指数} (> 10^{15})} \\ = & \frac{10^9 \text{ 粒子} / \text{投与量}}{\text{クリアランス指数} (> 10^{15})} \\ = & < 10^{-6} \text{ 粒子} / \text{投与量} \end{aligned}$$

したがって、 $10^6$  投与量当たり 1 ウイルス粒子未満と予想される。