

事務連絡

令和 8 年 1 月 22 日

(別記) 御中

独立行政法人医薬品医療機器総合機構  
審査センター

「従来のウイルス否定試験を次世代シーケンシング (NGS) により代替する場合の考え方」について (Early Consideration)

日頃より、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（総合機構）の審査等業務に対し、ご理解とご協力を賜り厚く御礼申し上げます。

この度、総合機構の審査センター品質領域バイオ部門、再生医療等審査部及びワクチン等審査部では、「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等のウイルス安全性評価に関するガイドライン」の第二改定 (ICH Q5A(R2)、令和 7 年 1 月 9 日付け医薬品審発 0109 第 3 号) の発出に伴い、本ガイドラインで示された従来のウイルス否定試験を次世代シーケンシング (NGS) により代替する場合について、近年の総合機構での経験、国内研究班による情報、国際的研究グループによる議論、海外規制当局でのガイドライン、論文等に基づき、別添のとおり考え方をまとめましたので、お知らせします。

なお、Early consideration とは、科学的知見や情報等が必ずしも十分に集積されていない段階ではあるものの、新たな技術等のイノベーションの実用化と革新的な医薬品等の開発を促進するための参考情報として、その時点における考え方を示したものであり、今後、新たに得られる知見や科学の進歩等により、変わり得るものであることにご留意ください。

(別記)

日本製薬団体連合会

日本製薬工業協会

米国研究製薬工業協会在日執行委員会

一般社団法人欧州製薬団体連合会

再生医療イノベーションフォーラム

(別添)

従来のウイルス否定試験を次世代シーケンシング (NGS) により代替する場合の考え方

## 1. はじめに

従来、ヒトや動物の遺伝子情報を解析するにはサンガー法と呼ばれるゲノム核酸の塩基配列決定技術が用いられてきた<sup>1)</sup>。今般、次世代シーケンシング技術 (Next Generation Sequencing、以下、「NGS 技術」) が開発され<sup>2)</sup>、サンガー法では 10 年かかったヒトゲノム計画が 1 日以内に完了可能なほど塩基配列決定技術が進歩した。Next generation はサンガー法に対しての「次世代」を意味し、特定の原理を指さない。つまり、NGS 技術の塩基配列の解析方法は開発機器メーカーごとに原理が異なり、その試験法は統一されていない。NGS 技術は、数十塩基から数百塩基程度の短い塩基配列の解析を並行して実施し、コンピュータ上で解析情報を結合して全塩基配列を獲得する技術 (以下、「ショートリード型」) が一般的であったが、近年では、数千塩基の長い塩基配列を解析可能な技術 (以下、「ロングリード型」) も用いられ始めている。

NGS 技術は非常に強力な塩基配列解析技術であり、その処理能力の高さからハイスループットシーケンシング (high-throughput sequencing (HTS)) とも呼ばれる。このことから、ヒトや動物の細胞に迷入した外来性ウイルスの検出に応用可能であると考えられていたが、NGS 技術の初期段階においてはコスト等の課題があった。今般 NGS 技術の発展によるコストの削減等により、ウイルス検出への応用が現実的となってきたことから、「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等のウイルス安全性評価に関するガイドライン」の第二改定 (令和 7 年 1 月 9 日付け医薬薬審発 0109 第 3 号、以下、「ICH Q5A(R2)」)<sup>3)</sup>では、NGS 技術を用いたウイルス否定試験 (以下、「NGS 法」) 及び NGS 法を従来のウイルス否定試験の代替として使用することを想定した内容が追記された。しかしながら、ICH Q5A(R2)における当該記載は、実験動物削減等の目的を踏まえ新技術への変更を推奨する方針を示す意図であり、NGS 法を従来のウイルス否定試験の代替として使用すること自体については、代替する試験に応じた更なる検討が必要である。現時点で、従来のウイルス否定試験の代替として用いるための、世界的にコンセンサスが得られた NGS 法の手順や分析法バリデーション評価はなく、国際的な共同研究グループや国内外の研究チームによって、適切な方法や評価が模索されているところである。

本文書の目的は、上記に示した状況において NGS 法をウイルス否定試験の代替として使用することを検討している開発者や製造販売業者に対し、近年の総合機構での経験、国際的研究グループによる議論、海外規制当局でのガイドラインや論文等に基づき、現時点における規制上の考え方を提示することである。なお、本文書に示す留意事項は、これまでに得られている知見に基づいて検討したものであり、国内外の研究グループの進捗や今後得られる新たな知見等により変わり得ることに留意すること。

## 2. 適用範囲

本文書は、ICH Q5A(R2)が適用される医薬品又は再生医療等製品において、核酸増幅検査（以下、「NAT 法」）、抗体産生試験（HAP、MAP 及び RAP）、*in vivo* ウイルス否定試験又は *in vitro* ウイルス否定試験について NGS 法により代替する場合を適用範囲とする。ICH Q5A(R2)が適用されない医薬品又は再生医療等製品については適用しないが、本質的な考え方は共通する要素もある。また、製品特有の論点があり、特定の試験の代替としてではなく、総合的なウイルス管理戦略の一環として NGS 法を用いる場合は、その妥当性について所掌の審査部と個別に相談することが可能である。

## 3. NGS 法の分析法バリデーションについて

NGS 法の分析法バリデーションについては 4 項で述べるように、NGS 法をどの試験の代替として用いるかを踏まえ、期待される性能基準を満たす能力を有していることが説明可能な手段をとる必要がある。本項では ICH Q5A(R2)に述べられた分析法バリデーションの各ポイントについて論点を述べる。NGS 法は ICH Q5A(R2)において「分析法バリデーションに関するガイドライン」の第二改定（令和 7 年 10 月 9 日付け医薬薬審発 1009 第 1 号、以下、「ICH Q2(R2)」）<sup>4)</sup>の限度試験に該当するとされているため、分析法バリデーションの実施項目は ICH Q2(R2)を踏まえて設定すること。

なお、技術の発展や理解の促進により ICH Q5A(R2)で述べられた点以外の要素が分析法バリデーションにおいて重要となる可能性もある。開発者はここに示した要素以外にも分析法バリデーションに必要な要素がないか、慎重に検討すること。

### 3.1 標準物質となるウイルスの選択について

分析法バリデーションでは標的となるウイルスの検出限界、特異性及び範囲（ウイルスの種類等）を示す必要がある。そのためには標準物質として適切なウイルス（以下、「標準ウイルス」）を選択する必要がある。NGS 法において、標的となるウイルスの物理的特性、化学的特性及びゲノム特性は、後述する核酸の抽出やライブラリの作成効率に影響を及ぼす可能性がある。

NGS 法により特定のウイルス（群）を検出することを目的とする場合は、当該ウイルス又は同様の物理的特性、化学的特性及びゲノム特性を有するウイルスを標準ウイルスとして使用する必要がある。一方で、不特定のウイルスを網羅的に検出することを目的とする場合は、物理的特性、化学的特性及びゲノム特性が異なる複数の標準ウイルスを網羅的に選択する必要がある。

WHO のレポート<sup>5)</sup>や FDA が主導する Advanced Virus Detection Technologies Working Group（2022 年に Advanced Virus Detection Technologies Interest Group より改称、以下、「AVDTWG」）<sup>6-7)</sup>では 7 種類の標準ウイルス候補が提示されており、現時点ではこれらが最も一般的な標準ウイルスと考えられる。しかしながら、これらの標準ウイルスは 2020 年から 2024 年の

間で2種類のウイルスが追加された<sup>5),8)</sup>ように、今後も変わりうるものである。したがって、開発者はこれらの標準ウイルスを用いる場合であっても、その試験目的に応じて適切性を説明する必要がある。

### 3.2 検体の選択について

NGS 法に用いる試験検体は標的となるウイルスの性質から慎重に選択する必要がある。ICH Q5A(R2)に示された通り一般的な試験検体として、主に細胞のすべての核酸を抽出したゲノム核酸 (genomics)、細胞から抽出してきた mRNA (transcriptomics)、培養上清等に由来する核酸 (viromics) が想定されるが、それぞれの方法で検出可能なウイルスは必ずしも同じではない。mRNA を解析するトランスクリプトーム解析は mRNA が増幅しているウイルスの検出に適しているが、潜伏状態のウイルスの検出力は劣る可能性がある。また培養上清等の核酸を解析するヴァイローム解析はウイルスが培養上清に放出している場合の検出力に優れるが、潜伏状態のウイルス又は細胞間感染を起こしウイルス粒子があまり培養上清に放出されない種類のウイルスの場合には検出力の低下が懸念される。ゲノム核酸を解析するゲノム解析はこのようなリスクが低い一方で、染色体中のウイルス様配列等をウイルスと誤認する恐れが考えられる。開発者はこれらの利点及び問題点を考慮した上で試験検体の適切性を説明する必要がある。

試験検体中には、細胞基材に由来する核酸が多く含まれ、その中には内在性のウイルス様配列が混在している。また、製造にウイルスベクターを用いる場合や有効成分がウイルスベクター又はウイルスの場合は、これらのウイルスベクター等からもウイルス様の核酸が多く供給されることになる。NGS 法はこれらの雑多な核酸の中から真のウイルス配列を検出する能力が必要であるため、分析法バリデーションには実際の製造工程から採取した試験検体に標準ウイルスを添加する等の方法が適切である可能性が高い。

### 3.3 核酸の抽出法及びライブラリの作成方法について

核酸の抽出方法は極めて重要である。特に、抽出効率は検体の種類やウイルスの特性による影響を大きく受けるため、標的となるウイルスを適切に抽出可能な系を構築する必要がある。一般的にはカラム、磁気ビーズ等を用いた核酸抽出キットが使用されると考えられるが、カラム、磁気ビーズ等に対する検体や核酸の量、キャリア核酸の添加の有無、最終的な溶出量等は標的となる核酸の抽出効率に影響を与える可能性があるため、キットの使用方法を含め慎重に検討する必要がある。

ライブラリの作成方法は NGS 法で用いる NGS 技術の原理によって異なる。原理を踏まえた検討が必要となるが、ライブラリの品質は標準ウイルスの検出能力を踏まえ、包括的に評価することになると考えられる。

### 3.4 NGS 技術の原理の選択について

NGS 技術の原理は複数存在しており、現時点ではどの原理がウイルス検出に適しているかということは明確ではない。NGS 技術の分類として、ショートリード型とロングリード型があり、これらの特性は大きく異なることが想定される。ショートリード型は短い塩基を統合して配列決定する技術であるため、塩基配列の正確性が高いと考えられるが、繰り返し配列など特定の配列の決定能力に課題があり、配列を決定できない領域が出てくる可能性がある。一方で、ロングリード型はショートリード型の苦手な繰り返し配列などを正確に決定することが可能であるが、長い塩基を読む性質から、読み間違いが発生する可能性がある。開発者はこれらの特性を理解し、標的となるウイルスの検出においてどのような影響を与えうるかを想定した上で原理を決定するべきである。

### 3.5 データベース及びインフォマティク解析のソフトウェアの選択について

NGS 法の性能を評価するにあたっては、データベースの網羅性及びインフォマティク解析のソフトウェアの性能の評価が極めて重要である。また、ソフトウェア上における各種パラメータの値（リード数等）についても慎重に決定する必要がある。

データベースとしては、FDA/CBER が公開している、ウイルスを広く網羅した **Reference Viral Database (RVDB)**<sup>9)</sup>等を使用することが一般的である。一方で、このようなウイルスを広く網羅したデータベースはヒトへの感染が報告されていないウイルスや古代のウイルスの残骸である可能性があるウイルス様配列も多く含まれており、検出において多くのノイズが発生し、真に検出すべきウイルスの検出力が低下するという懸念もある。このような懸念を払しょくするためには、**Virus-Host DB**<sup>10)</sup>の「**Human viruses**」のようなヒトへの感染性を有するウイルスのみが含まれるデータベースを用いることも考えられる。いずれのデータベースを選択する場合にも、開発者は試験の目的に合致する性能を示すことを評価できたデータベースを選択する必要がある。

データベースや解析ソフトウェアのバージョン管理も重要である。これらのバージョンについては分析法バリデーション評価に用いたバージョンを使い続けることが望ましいが、データベースの定期的な更新、技術の発展等による古いバージョンのソフトウェアの廃止等の可能性も想定される。開発者はこれらのバージョンが変わることによる影響を評価し、必要に応じて再度分析法バリデーション評価を行うことが必要である。

## 4. 従来のウイルス否定試験の代替について

NGS 技術はあくまで技術であり、それをどのような目的で用いるかによって分析法バリデーション評価の方針は異なる。従来のウイルス否定試験を NGS 法で代替する際は、「分析法の開発に関するガイドライン」（令和 7 年 10 月 9 日付け医薬薬審発 1009 第 2 号、以下、「ICH Q14」）<sup>11)</sup>が参考となる。試験目的に応じて、ICH Q14 で示された目標分析プロファイル（ATP）を把握した上で、慎重に分析法バリデーション評価の方針を決定すべきである。

本項では従来のウイルス否定試験の代替試験として NGS 法を用いることを前提に、評価において重要と考えられる点を述べる。

なお、NGS 法を含む分子生物学的手法はウイルス由来の核酸の存在を確認する試験であり、ウイルス由来の核酸の検出は必ずしも感染性を維持したウイルスの存在を意味しない。したがって、ウイルス由来の核酸が検出されたときの取扱い（追加検討を待たずウイルス陽性とみなす、追加検討を慎重に行って最終判断まで保留する等）は試験の位置づけを踏まえて事前に決定しておく必要がある。ウイルス由来の核酸が検出された場合に一般的に行われる追加検討として、感染性試験、NGS 法により検出された核酸の長さ、ウイルス核酸の全長に対しての検出された核酸の補完率、ウイルスの核酸の種類（DNA 又は RNA）、NGS 法の試験原理、ウイルス核酸の混入経路の究明等が考えられる。追加検討の結果を踏まえて判断する場合は、これらを総合的に勘案して、感染性を維持したウイルスの存在の有無を慎重に評価することが必要である。

#### 4.1 NAT 法の代替を行う場合について

一般的に NAT 法をウイルス否定試験として用いる場合は、懸念される特定のウイルスを検出することを目的とする。したがって、NAT 法の代替としての NGS 法においては、標的となる特定のウイルスを検出可能であることを示すことが重要となる。NAT 法と NGS 法は原理的な共通点はあるものの同じ原理ではないため検出感度の直接比較（head-to-head comparison）には大きな意義はない。開発者は NGS 法が、NAT 法の代替として同様のウイルス検出能力が見込まれること及び NGS 法が懸念される特定のウイルスの存在を十分な感度をもって検出できるという期待される性能基準を満たす能力を有していることを説明できるように情報を収集する必要がある。

#### 4.2 抗体産生試験の代替を行う場合について

抗体産生試験は、げっ歯類の細胞基材を製造に用いた場合に実施する、あらかじめ限定された特定のウイルス群の検出を目的とした動物試験である。ICH Q5A(R2)で示されているとおり、動物愛護等の理由から抗体産生試験は NGS 法や NAT 法のような分子生物学的手法への切替えが推奨される。

抗体産生試験では一般的には ICH Q5A(R2)の表 3 で示されたウイルスに対する血中抗体価の上昇について抗原抗体反応を利用した試験系により検出する。したがって、抗体産生試験を NGS 法（又は NAT 法）で代替する場合には、これらのウイルス群を検出可能であることを示す必要がある。抗体産生試験と NGS 法（又は NAT 法）は完全に原理が異なるため直接比較を行う必要はない。開発者は NGS 法（又は NAT 法）が懸念されるウイルス群を十分な感度をもって検出できるという期待される性能基準を満たす能力を有していることを説明できるように情報を収集する必要がある。

#### 4.3 *In vivo* ウイルス否定試験の代替を行う場合について

*In vivo* ウイルス否定試験は不特定の迷入ウイルスを検出することを目的とする動物試験である。ICH Q5A(R2)で示されているとおり、抗体産生試験と同様に、動物愛護等の理由から *in vivo* ウイルス否定試験は NGS 法や NAT 法のような分子生物学的手法への切替えが推奨される。また、十分に特性解析された (well-characterized) げっ歯類の細胞 (CHO 細胞等) については *in vivo* ウイルス否定試験の実施の必要はないとされているため、このような細胞基材の場合に *in vivo* ウイルス否定試験を NGS 法で代替する意義は低い。

*In vivo* ウイルス否定試験と NGS 法は完全に原理が異なる上に、不特定のウイルスを検出するという試験目的から直接比較を行うことは現実的ではない。*In vivo* ウイルス否定試験は *in vitro* ウイルス否定試験の補完的役割を果たしてきたことから、*in vitro* ウイルス否定試験を実施することを前提として、*in vivo* ウイルス否定試験の代替として NGS 法を行う場合、*in vitro* ウイルス否定試験の補完的な役割が期待できるレベルの網羅性を満たす能力を有していることが説明可能であれば代替試験として認められる可能性がある。

#### 4.4 *In vitro* ウイルス否定試験の代替を行う場合について

*In vitro* ウイルス否定試験は不特定の迷入ウイルスを検出することを目的とする培養細胞を用いた試験である。ICH Q5A(R2)で示されているとおり、NGS 法は *in vitro* ウイルス否定試験の代替試験となりうる可能性がある。一方で、*in vitro* ウイルス否定試験はこれまでバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス迷入の検出において大きな役割を果たしてきたものであり、この試験性能を NGS 法により完全に代替する場合のバリデーション評価については、現時点では国際的なコンセンサスが得られていない。WHO<sup>5)</sup>や AVDTWG<sup>6,7)</sup>では国際的なコンセンサスを得ることを目的とし、日本の国立研究所を含めた国際共同試験<sup>5)</sup>等により検討を続けているところである。当面はこれらの国際活動に注視し、情報収集に努めることが重要である。したがって、現時点では NGS 法を *in vitro* ウイルス否定試験の代替試験として用いることは時期尚早と考える。なお、NGS 法を *in vitro* ウイルス否定試験の代替試験としてではなく、製造工程全体を踏まえた総合的なウイルス管理戦略の一環として用いる場合については、品目固有の判断が行われるため、別途所掌の審査部と相談すること。

### 5. 謝辞

本文書の作成にあたっては、AMED 課題番号 JP25ak0101250 及び JP25bk0104193 の支援を受けました。また、作成に当たって多大な助言をいただいた、AMED 創薬基盤推進研究事業「エクソソーム製剤のウイルス安全性評価法の開発」及び AMED 再生医療等実用化研究事業「遺伝子治療用製品、細胞加工製品のための NGS を利用した新規のウイルス安全性評価法の国際的な標準化」研究班の皆様に感謝申し上げます。



6. 引用文献

- 1) F Sanger, S Nicklen, and A R Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1977 Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- 2) BE Slatko, AF Gardner, FM Ausube, Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. **Curr Protoc Mol Biol**. 2018 Apr;122(1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59.
- 3) 「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等のウイルス安全性評価に関するガイドライン」の一部改正について 令和7年1月9日付け厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長通知 医薬薬審発 0109 第3号  
<https://www.pmda.go.jp/files/000273018.pdf>
- 4) 分析法バリデーションに関するガイドラインについて 令和7年10月9日付け厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長通知 医薬薬審発 1009 第1号  
<https://www.pmda.go.jp/files/000277471.pdf>
- 5) AS Khan, PJ Chin, SM Fuentes, JH Tsou, and Study Group, A Collaborative Study to Evaluate the Proposed First WHO International Reference Panel for Adventitious Virus Detection in Biological Products by High-throughput Sequencing (HTS) Technologies. **EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION** Geneva, 11 to 14 March 2024, WHO/BS/2024.2471
- 6) AS Khan, L Mallet, J Blümel, N Deneyer, SCJ Keersmaecker, B Saint-Vis, I Knezevic, C Logvinoff, M Murphy, SHS Ng, Y Sato, M Wall, A Goios, P Neels. Report of the fourth conference on next-generation sequencing (NGS) for adventitious virus detection in biologics for humans and animals: Validation and implementation of NGS, **Biologicals**. 2025 Sep 12:92:101859. doi: 10.1016/j.biologicals.2025.101859.
- 7) AS Khan, DA Vacante, JP Cassart, SHS Ng, C Lambert, RL Charlebois, KE King, Advanced Virus Detection Technologies Interest Group (AVDTIG): Efforts on High Throughput Sequencing (HTS) for Virus Detection. **PDA J Pharm Sci Technol**. 2016;70(6):591-5. doi: 10.5731/pdajpst.2016.007161.
- 8) AS Khan and Study Group, Proposed 1<sup>st</sup> International Virus Reference Standards for Adventitious Virus Detection in Biological Products by Next-Generation Sequencing (NGS) Technologies (CBER-5). **EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION** Geneva, 19 to 23 October 2020, WHO/BS/2020.2394
- 9) Reference Viral Database (RVDB)., <https://rvdb.dbi.udel.edu/>
- 10) Virus-Host DB., <https://www.genome.jp/virushostdb/>
- 11) 分析法の開発に関するガイドラインについて 令和7年10月9日付け厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長通知 医薬薬審発 1009 第2号  
<https://www.pmda.go.jp/files/000277472.pdf>

以上