生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件 〈*G3-13-191*〉

次のように改める.

本参考情報は，哺乳類などの生体組織や体液に由来する生物薬品，及び，ヒト又は動物由来細胞株から生産されたタンパク質医薬品を含む生物薬品のウイルス安全性確保の基本的要件について記載する.

1. 生物薬品のウイルスに対する安全性確保のための基本方策

製品へのウイルス汚染のリスクは，ヒト又は動物を起源とする生物薬品及びヒト又は動物由来細胞株から生産されたタンパク質医薬品に共通する安全性上の極めて重要な懸念事項である. ウイルス汚染が発生すれば臨床使用において深刻な事態を招く可能性があることから，そのリスクを十分に低減する方策を講じる必要がある．生物薬品の場合，その起源の選択と適格性評価，製造工程の妥当性評価とその恒常性維持がウイルス安全性確保上のキーポイントとなり，それを踏まえた管理戦略の構築が求められる．生物薬品のウイルスに対する安全性確保は，ウイルス汚染の可能性(汚染源)について熟知した上で，①原材料及び細胞基材の適格性の評価，②製造工程のウイルス不活化／除去能力の評価，③製造工程の適切な段階におけるウイルス試験の実施という3つの相補的な基本方策により合理的に保証することができる．ウイルス試験には，例えば低濃度のウイルスを検出するときの感度が統計的理由からサンプルサイズに依存するなどの固有の限界がある．したがって，最終製品に感染性ウイルスが存在しないことの信頼性は，多くの場合は，最終製品を直接試験することのみでは得られず，包括的なウイルス試験プログラムの適用と製造工程におけるウイルス除去及び不活化工程の評価によって合理的に保証されるべきである．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管理戦略の中で採用した方策を説明し，その妥当性を示す必要がある.

ウイルス安全性の確保は全ての生物薬品における前提事項であるため各条の製造要件には記載されていないが，本参考情報に示す基本的な考え方や留意事項に従って適切な方策が講じられるべきである．生物起源由来物質でもアミノ酸，糖類，グリセリンなどのような比較的低分子の化合物や，高分子化合物であって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の迷入の可能性が考えられないケースが多く，また，タンパク質には適用できないような強力なウイルス不活化／除去操作を適用することが可能であるが，本情報に盛り込まれた事項のうち合理的に適用できる部分があれば参考にできる.

ヒト又は動物由来細胞株から産生されたタンパク質医薬品のウイルス安全性については，ICH国際合意文書を受けた国内版通知「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日付医薬薬審発0109第3号厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長通知)(以下，ICH Q5Aガイドライン)があり，本参考情報は，ICHガイドラインに盛り込まれた事項を参考にしながら，ウイルス安全性確保に必要な一般的留意事項及び各論を盛り込んでいる．血漿分画製剤については，生物学的製剤基準に収載され，「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の一部改正について」(令和6年3月29日付医薬発第0329第16号厚生労働省医薬局長通知)が適用されるが，本参考情報の基本的な考え方は参考になる．本参考情報は，日局に収載されている生物薬品はもとより，日局に収載されていない生物薬品や将来収載される可能性のある全ての生物薬品のウイルス安全性確保に必要な一般的留意事項及び各論について記載している.

2. 生物薬品がウイルスに汚染される可能性

生物薬品のウイルス汚染は，ヒト又は動物に由来する原材料及び細胞基材のウイルス汚染，あるいは，製造工程におけるウイルスの迷入によってもたらされる可能性がある．ヒト又は動物の生体組織や体液に由来する生物薬品については，原材料及びその起源であるヒトや動物が，ヒトに対して病原性を有するウイルスによって汚染されている可能性を考慮する必要がある.

ヒト由来で病原性を持つ感染性ウイルスで，原材料等に混入する可能性があり，注意すべきものには，ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1/2)，A型肝炎ウイルス(HAV)，B型肝炎ウイルス(HBV)，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，サイトメガロウイルス(CMV)などがある．ヒト又は動物由来の組織，体液などを原材料とする生物薬品には，常にこのようなヒトに対して病原性が知られているウイルスによる汚染やその他のウイルス潜在の可能性があり，安全対策は徹底して実施する必要がある.

ヒト又は動物由来細胞株から生産されるタンパク質医薬品の場合，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)又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．また，(1)感染した動物からの細胞株の樹立，(2)細胞株を樹立するためのウイルスの使用，(3)細胞培養における汚染された生物由来の試薬の使用，(4)細胞取扱中やセルバンク調製工程における汚染などにより，細胞株がウイルス汚染される可能性がある．医薬品製造過程では，(1)培養などに使用する血清成分のような生物由来の原材料や試薬の汚染，(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)下流の精製工程で使用する試薬(例えば，精製に用いるアフィニティーカラム)の汚染，(4)製剤化に使用する添加剤の汚染，(5)細胞及び培養液の取扱い中における汚染などの原因により外来性ウイルスが最終製品に迷入する可能性がある．細胞培養パラメーターをモニターすることで外来性ウイルスの汚染を早期発見することができる場合もある．製造業者は可能な限り製造工程におけるヒト及び動物由来の原材料の使用を避けるべきであり，これが不可能な場合，その使用はリスクに応じた文書又は適格性評価により裏付けられるべきである(例えば，当該原料の原産国，由来組織,製造工程に適用されるウイルスの不活化又は除去処理工程，原料に対して実施されたウイルス試験の情報).

3. 原材料や細胞基材の適格性評価

生物薬品のウイルス安全性を確保するため，原材料及び細胞基材，並びにその起源であるヒトや動物の適格性を評価する. 医薬品の製造に使用する原材料や細胞基材のうち，ヒト又はその他の生物に由来するものは，「生物由来原料基準」(平成15年5月20日付厚生労働省告示第210号)又はそれと同等以上の妥当性を確認することにより，医薬品の品質と安全性を確保しなければならない．起源であるヒトを含む動物については，健康な個体であることが原則であり，その要件については参考情報

「日本薬局方の通則等に規定する動物由来医薬品起源 としての動物に求められる要件〈G3-15-141〉」に記載されている．適格性評価にあたっては，動物種並びに採取部位に応じてそれぞれに特有に存在する可能性のあるウイルスのリスクについて考慮する必要がある．なお，伝達性海綿状脳症(TSEs)に対する考慮も必要となるであろうが，これらの病原体に対する方策は本参考情報では対象範囲外とする．

3.1. ヒト由来の生物薬品

ヒト由来生物薬品の原材料を得るソースとしては，血漿，胎盤，尿などが用いられている．原材料の提供者ごとに問診や検査による診断を行い，得られた原材料について試験を実施して，その適格性を評価する必要がある．適切なプロトコールに従った問診と，特異性や感度，真度及び精度が十分に評価された試験法(血清学的検査，核酸増幅法(NAT))により，少なくともHBV，HCV及びHIVの存在が否定されなければならない．

一方，ヒト尿のように，個人単位での健康診断以上の十分な検査が困難あるいは個別検査が合理的ではない原材料の場合は，プールした原材料について，特異性・感度・真度・精度が十分に評価された試験法を用いて，少なくともHBV，HCV及びHIVの存在を否定すべきである．

3.2. ヒト以外の動物由来の生物薬品

生物薬品の製造に用いる動物は，適切な健康管理が行われ，各種検査により健康であることが確認されていなければならない．また，飼育群全体が適切に管理された環境下にあり，異常個体が発生していないことも要件である．さらに，ヒトに感染症や疾病をもたらすことが知られている動物特有のウイルスについては，それらを否定できる情報や科学的根拠を示すか，血清学的又はNATなどの試験により存在を否定しておくべきである．個々のケースにおいて，どのようなウイルスを対象にどのような検討を行えば合理的であるかについて十分に吟味し，その根拠を明らかにすることが重要である．

3.3. ヒト又は動物由来細胞株から産生されたタンパク質医薬品

ヒト又は動物由来細胞株から産生されたタンパク質医薬品については，クローン化された細胞株から調製された細胞バンク(マスター・セルバンク(MCB)，ワーキング・セルバンク(WCB))及び*in vitro*細胞齢の上限(LIVCA)の段階にある細胞について，ICH Q5Aガイドラインに記載された要領に従い，適格性を評価する．

3.3.1. マスター・セルバンク(MCB)

MCBにおいては，内在性及び外来性ウイルスの汚染の有無について広範にスクリーニングする必要がある．特に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安全性上のリスクとなりうるため，これらの細胞を用いる場合に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．外来性ウイルス試験には表1に示すように広範な種類のウイルスを検出する試験と特定のウイルスを検出する試験の両方を含めるべきである．広範なウイルスの検出には次世代シーケンシング(NGS)のような先進的な分析技術の活用が推奨される．迷入ウイルスを確実に検出するため，MCBの作製に用いた親細胞株の起源と履歴，細胞株の樹立過程におけるヒト又は動物由来物質への暴露の可能性を考慮したリスクアセスメントに基づいて試験を実施する．MCBにおいて必要とされる全ての試験をWCBについて実施して代替とするアプローチも許容される．

3.3.2. ワーキング・セルバンク(WCB)

WCBについては，表1に示す外来性ウイルス試験を実施する必要がある．適切な外来性ウイルスの試験がMCB に対して実施されており，かつ，当該WCBに由来するLIVCA又はそれを超えて培養された細胞でも試験が実施されている場合には，WCBに対する同様の試験を省略することができる．

3.3.3. *In vitro*細胞齢の上限(LIVCA)の段階にある細胞

実際の製造工程を反映したスケールダウンモデル，パイロットプラントスケール，又は実生産スケールにおいて，LIVCAまで又はそれを超えて培養された製造用細胞のデータに基づいて試験対象を設定する．LIVCA細胞は，WCB又はMCBを培養することによって得られる．MCBやWCBでは検出されないウイルスが存在する可能性があるため，LIVCA段階では少なくとも一度は外来性ウイルスの有無について試験を実施し，評価する必要がある．生産に使用したLIVCA細胞に対して表1に示す試験を実施することで，製造工程における内在性ウイルスの発現誘導，潜伏ウイルスの再活性化，低濃度あるいは増殖の遅いウイルスの増幅が引き起こされないことを更に保証することができる．外来性ウイルスが検出された場合は，MCB及びWCBを含む製造工程を厳密に調査し汚染源を特定する．なお，LIVCA細胞は製造終了時の細胞(EOPC)とも呼ばれる．

3.3.4. 細胞株のウイルス検出及び確認のために推奨される試験

細胞株における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．細胞株の由来，継代培養の履歴，細胞株の樹立や製造に使用する原材料及び試薬等を考慮したリスクアセスメントに従って包括的な試験戦略をたてるべきである．推奨される試験法の例，及び，レトロウイルス試験及び内在性ウイルス試験，並びに，外来性ウイルス試験(*in vitro*試験，*in vivo*試験，特定のウイルスに対する試験)の一般的な考え方については，ICH Q5Aガイドラインで解説されておりウイルス試験の実施計画をたてる上で参考になる．

4. 製造工程におけるウイルス安全性確保とウイルス試験

ウイルス安全性が高い生物薬品を製造するには，2.で述べたようなウイルスの汚染の可能性に配慮しつつ，原材料となる組織や体液など又は細胞基材からのウイルス汚染の可能性を排除すると共に，製造工程や製品取扱い中の汚染，製造従事者や製造施設環境からのウイルスなど汚染の可能性を極力低減させるため，適切な製造条件及び技術の採用，製造環境の整備などを行う必要がある．

製造工程ではウイルス安全性が確保された原材料や試薬を用いることによりウイルスの迷入のリスクを適切に管理する．ウイルス不活化／除去については，原理の異なる二つ以上の工程を採用することが望ましい．代表的な不活化／除去工程としては，①加熱(例えば，液状60℃で10時間処理，80℃で72時間の乾燥加熱処理など)，②有機溶媒・界面活性剤処理(S／D処理)，③膜ろ過(15～50 nm)処理，④酸性処理，⑤放射線処理(γ線照射など)，⑥カラムクロマトグラフィー処理(例えば，アフィニティークロマトグラフィー，イオン交換クロマトグラフィー)，⑦分画処理(例えば有機溶媒分画，硫酸アンモニウム分画処理)，⑧抽出処理，などがある．

ウイルス安全性の高い生物薬品を製造するため，製造工程の適切な段階において外来性ウイルスの否定試験を実施する．実施するウイルス試験の範囲及び程度は，原材料や細胞基材の種

類・性質，これらの適格性評価のために実施したウイルス試験，製造方法，ウイルスクリアランス試験の結果等を総合的に考慮した上で決定する必要がある．

4.1. 精製工程前のウイルス試験

4.1.1. ヒト由来生物薬品

精製工程前のウイルス試験の試験試料として想定されるのは，多くの場合，原材料として得られた個人の体液や組織，又はこれらをプールしたり，抽出物としたものである．これらのケースでは，既に3.1.で述べたように，特異性や感度，真度及び精度が十分に評価された試験法を用いて少なくともHBV，HCV及びHIVの存在を否定しておく必要がある．精製工程前の未精製バルクがより下流にある場合でも，原材料の段階で適切なウイルス試験がなされ，ウイルスの存在が否定されていれば，生物起源由来の試薬などを用いて調製される特別なケースなどを除いて，精製工程前ウイルス試験を重複して実施する必要は必ずしもないと思われる．

4.1.2. ヒト以外の動物由来の生物薬品

4.1.1.と同様に精製工程前のウイルス試験の試験試料として想定されるのは，多くの場合，原材料として得られた動物の体液や組織，又はこれらをプールしたり，抽出物としたものである．これらのケースでは，製造に用いられる動物に存在することが知られており，ヒトに感染症や疾病をもたらすことが明らかな又はその可能性が高いウイルスについて，既に3.2.で述べたように存在を否定できる情報を示すか，特異性や感度，精度が十分に評価された血清学的検査あるいはNATなどを用いてその存在を否定しておく必要がある．精製工程前の未精製バルクがより下流にある場合の考え方は，4.1.1.の場合と同様である．

4.1.3. ヒト又は動物由来細胞株から産生されたタンパク質医薬品

一般に，細胞培養後に回収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／未精製バルクがウイルス試験の対象となる．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後，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一つであり,ウイルス試験は未加工／未精製バルクの段階で適切に実施すべきである．未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験について考慮すべき事項についてはICH Q5Aガイドラインに記載されている．外来性ウイルス試験としては，複数の指標細胞を用いた*in vitro*試験や標的非特異的NGSのほか，特定のウイルスの検出にはNATや標的特異的NGS等の試験法が用いられる場合もある．外来性ウイルスが検出された未加工／未精製バルクは，医薬品など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．

4.2. 中間原料としての受け入れ検査としてのウイルス試験

ヒト又は動物由来の組織，体液などから生物薬品を製造する場合，原材料として部分的に加工された中間原料を他の製造業者より購入し製造に用いる場合もある．この場合は，原材料の製造業者により実施されているウイルス試験に関する情報に基づき，受入れ試験としてどのようなウイルス試験を実施すれば適切かについて検討し，試験の実施の有無，実施する試験の内容を含めてその合理的根拠を明らかにしておく必要がある．

5. ウイルスクリアランスに関する工程評価

5.1. ウイルスクリアランスの工程評価の目的と留意事項

ウイルス不活化や除去に関する工程評価は生物薬品の安全性を確立するために重要である．ウイルスクリアランスに関する評価は，原材料などに存在する可能性がある，若しくは不測の事態により迷入する可能性があるウイルスを除去できるということの保証となる．ウイルスクリアランス試験は，綿密な試験のデザインの下，適切な方法により実施し，合理的に評価される必要がある．

ウイルスクリアランス試験の目的は，ウイルスの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，それらの各工程を合わ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，製造・精製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し，添加されたウイルスが以降の工程を経る間にどの程度除去又は不活化されるかを示す必要がある．その際，必ずしも製造工程の全ての工程について評価する必要はなく，十分なクリアランスが示される幾つかの工程について試験し，評価することでよい．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．なお，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できるようにしておく必要がある．

ウイルス量(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，ウイルス量の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ておく必要がある．不活化工程の評価においては，不活化の時間依存性を示すため，時間を変えて検体をサンプリングし，不活化曲線を描けるように計画すべきである．

ウイルスクリアランス試験に関する考え方や実施要領はICH Q5Aガイドラインが参考になる．

5.2. ウイルスの選択

ウイルスクリアランス試験に使用されるモデルウイルスとしては，①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(関連ウイルス又は特異的モデルウイルス)，及び，②一般的にウイルスを除去・不活化するための製造工程の能力を評価する目的に適う物理的・化学的に広範な特性を持つウイルス(非特異的モデルウイルス)を選択すべきである． ①として原材料に存在する可能性のあるウイルス類と同一又は同種のウイルス(関連ウイルス)の使用が困難である場合には，これらと近縁のウイルス(同一の属又は科)で類似した物理的・化学的性質を有するモデルウイルス(特異的モデルウイルス)を代替として用いる．②として異なる特性(DNAウイルス又はRNAウイルス，エンベロープの有無，粒子径の大小など)を有する非特異的モデルウイルスを選択する上では，製造工程における物理的・化学的処理に対して特に抵抗性の強いウイルスを優先する．一般に，少なくとも3種類以上の特性の異なるウイルスを用いてクリアランス試験を実施すべきである．

ウイルスの選択に際しての留意事項は，ICH Q5Aガイドラインを適宜参考にするとよい．試験に用いるウイルスとしては，高力価の材料が調製できるウイルスが望ましい．さらに，使用するそれぞれのウイルスの検出法に関しては，試験対象の各製

造工程段階における試料の状態などによって検出感度が影響される可能性もあるため，それぞれの段階において効果的で信頼性の高いアッセイができるようなウイルスを選択する必要がある．なお，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も考慮するべきである．

バイオ医薬品のウイルスクリアランス試験に用いられるウイルスを表2に示した．これはICH Q5Aガイドラインを参照したものである．ただし，ICH Q5Aガイドラインはヒト又は動物細胞株由来の製品のウイルス安全性を対象としているので，生物薬品の起源・原料によっては，より適切なモデルウイルスを選択する必要があると思われる．

5.3 ウイルスクリアランス試験の設計

ウイルスクリアランス試験の計画を立案する際，検討することが望ましい留意点を以下に示す．

（1） 高力価の材料が調製できるウイルスを選択することが望ましいが，その場合には凝集を避けるよう注意を払うべきである．凝集が起これば，物理的除去が過大に評価される一方，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じる．

（2） 使用するそれぞれのウイルスの検出法は，ウイルスクリアランス指数の算定に大きく影響するので，可能な限り検出感度の高い方法を用い，事前に，用いる方法の検出感度を把握しておく必要がある．それぞれの製造工程段階において十分な感度と再現性を有し，信頼性の高い結果が得られるアッセイ法である必要がある．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必要がある．感染性試験を行う際には，感度保証のために適切なウイルスコントロールを含むべきである．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．また，低濃度のウイルス試料(例えばウイルス粒子数が1 L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．

（3） ウイルスクリアランス試験は，製造業者が当該生物薬品の製造工程の規模を縮小した試験系(スケールダウンモデル)で実施する．GMP上，製造に用いないウイルスを製造施設に持ち込むことはできないため，ウイルスクリアランス試験は，製造設備とは別のウイルス試験設備で行わなければならない．このため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のある別の実験施設において，精製工程のスケールダウンの設計と準備に関与した製造技術者とウイルスの専門家とが協同で行う必要がある．

（4） スケールダウンモデルで行うウイルスクリアランス試験における工程の各要素は，実生産規模での製造工程のそれを可能な限り反映したものとし，その妥当性を明らかにする必要がある．また，スケールダウンモデルではウイルスクリアランスの頑健性も考慮すべきであり，関連する工程パラメーターのワーストケース条件下で実施することが望ましい．クロマトグラフィー装置については，例えば，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，カラム充填剤の種類，pH，温度，導電率及び目的物質濃度に関して，全て実生産スケールの製造に相応していることを示す必要がある．また，溶出のプロファイ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．

（5） 製造工程のうち，ウイルス不活化／除去に関して原理が異なると考えられる二つ以上の工程を選択し，検討することが望ましい．

（6） 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，そのクリアランス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，又は不活化／除去いずれにも関与するのか慎重に検討し，試験を計画すべきである．一般にウイルスクリアランス試験では，試験対象となる各段階でウイルスを添加し，当該工程を経た後の感染性の減少度を評価するが，ある工程段階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場合もある．ウイルス除去が分離・分画操作による場合，可能な範囲で，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．

（7） ウイルスの不活化を評価するためには，試験対象とする工程前の試料に感染性のウイルスをスパイクし，工程を経る間における減少度を計算すべきである．その際，ウイルスの不活化は単純な一次反応でなく，通常，速い初期相とそれに続く遅い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．したがって試験に際しては，時間を変えて検体をサンプリングし，不活化曲線を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点はとることが望ましい．少なくとも2回の独立した試験を実施して不活化において再現性があることを示す必要がある．ヒトへの病原性が知られているウイルスが迷入する可能性がある場合には，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，可能な範囲で当該ウイルス(若しくは同種又は密接に関連しているウイルス)を試験対象として更に詳しいデータ(より多数のポイント)をとることが，特に重要である．ウイルス負荷量は，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が，これが困難な場合には，スパイクに用いた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，不活化により事実上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．

（8） 工程前の試料中にウイルスに対する抗体が存在する場合には，ウイルス除去及び不活化工程におけるウイルスの挙動に影響を及ぼす可能性があるので，このことを考慮に入れた上でクリアランス試験を実施する必要がある．

（9） 工程前の試料中に添加するウイルス量は，その製造工程のウイルス除去及び不活化能力を評価するのに十分な量とする．ただし，添加するウイルスが製品の特性を変えたり希釈による製品中のタンパク質の挙動を変えたりすることがないよう，工程前の試料の容量に対してできるだけ少量とするのが望ましい．

（10） 被験試料中のウイルスは，可能な限り超遠心分離，透析，保存などの操作を行わずに定量することが望ましい．しかし，阻害物質や毒性物質の除去のための操作，又は全ての試料を同時に定量するために一定期間保存することなど，定量前に何らかの処理をすることが避けられない場合もある．希釈，濃縮，ろ過，透析，保存など，測定試料調製のための操作を伴う場合は，それによるウイルス感染性における変化を評価するために，

同様な調製手順を経るコントロール試験を並行して行う必要がある．

(11)　緩衝液又は製品(に含まれる目的タンパク質やその他の成分)が指標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．仮に，緩衝液がウイルス試験に用いる指標細胞に対して毒性を有する場合は，希釈，pHの調整，又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(目的タンパク質など)が抗ウイルス活性を持っている場合，クリアランス試験を疑似工程(mock run)，すなわち目的タンパク質など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，目的タンパク質などを除くことや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得る．

(12)　同じ又は類似の緩衝液又はカラムを複数の精製工程で繰り返し使用し，製造工程全体の総クリアランス指数がそのような各精製工程のクリアランス指数の総和に基づいて求められる場合，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，その方法が製造工程のどの段階で使用されるか，また，ウイルス減少能力に明らかに影響を与える付随タンパク質及び他の不純物の存在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．

(13)　非常に強い殺ウイルス性を有する製造条件を用いている場合又は緩衝液などが指標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，総ウイルスクリアランス指数は過大評価又は過小評価される可能性があるので，ケース・バイ・ケースの考え方に立脚して考えるべきである．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切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．

(14)　ある特定のウイルス除去／不活化工程のクリアランス能はウイルスの種類によって異なることを考慮する必要がある．ウイルス除去／不活化工程のうち，特異的な作用原理・機構によりウイルスクリアランスを発揮する工程は，その作用機構に当てはまるウイルス類に対しては極めて有効であるが，それ以外のウイルスに対しては有効でない可能性がある．例えば，S／D処理は，一般に脂質膜を有するウイルスに対しては有効であるが，脂質膜を有しないウイルスに対しては有効でない．また，HAVなど，ウイルスによっては加熱処理への抵抗性が高いものもある．このようなウイルスに対してクリアランスを期待する場合は，条件を更に強くするか，作用原理・機構が異なる工程の導入を考慮する必要がある．S／D処理や加熱処理とは原理が異なるウイルス除去膜処理工程は，膜の特性上，これを通過できないサイズを持つ広範囲のウイルスに対して有効である．一方，目的タンパク質を特異的に吸着させるアフィニティークロマトグラフィー工程は，目的タンパク質以外のウイルスなどを洗い流すことも可能なので，ウイルス除去に一般に有効である．イオン交換クロマトグラフィーやエタノール分画処理工程などにおいては，製品中の目的タンパク質と各種ウイルス類との分離・分画状況は様々な様相を呈するが，これらの工程が他の処理工程で十分に不活化・除去できないウイルスのクリアランスに有効であるケースも少なくない．

(15)　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，又は不活化及び分離工程が複数組み合わさ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，個々のウイルスの物理的・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大きく影響し，ウイルスごとに分離状況に違いが生じる可能性がある．しかし，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合せや，又は不活化工程と分離工程との組合せにより，効果的なクリアランスが達成される．また，クロマトグラフィー工程，ろ過工程及び抽出工程などの分離工程で，目的ウイルスとモデルウイルスの分離に影響する項目などをふまえて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得る．

(16)　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，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できるよう試験計画を立てる必要がある．

(17)　クロマトグラフィー用カラムなどのウイルスを除去する能力が，繰り返し使用した後又は経時的に低下する可能性がある．カラムなどの繰り返し使用ができるかどうかは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を測定することにより評価できる．

(18)　その他，ウイルスクリアランス試験の設計に関してはICH Q5Aガイドラインを適宜参考にすること．

5.4 ウイルスクリアランス試験結果の解釈

5.4.1.　ウイルスクリアランス指数の評価

ウイルスクリアランス指数は，製造工程においてクリアランス試験の対象とした各製造段階を経る間のウイルス量(ウイルス感染性：力価)の減少度を対数で表したものである．製造工程全体における総ウイルスクリアランス指数は，これら各製造段階でのウイルスクリアランス指数のうち適切に評価できるものを加算することにより得られる．

齧歯類の細胞基材由来のバイオ医薬品のケースのように何らかのウイルス粒子の存在が認められる場合，当該ウイルスが排除又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，必要な程度を上回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，又は不活化されたウイルスの量は，原材料など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，原材料や未加工／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，感染性の測定又はその他の方法，例えば透過型電子顕微鏡観察(TEM)や定量的NATなど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原材料や未加工／未精製バルク中に存在すると推定されるウイルス量よりはるかに上回るウイルス量を排除することができなければならない．原材料などにウイルスの存在が推定されるというケースは，齧歯類の細胞基材由来のバイオ医薬品における内在性レトロウイルスを除いては極めてまれであると考えられる．当該医薬品が他の製法では得られず，臨床上も不可欠であり，存在するウイルス粒子に関する感染性を含む情報が明らかであるなどの特別な場合を除いて，そのような原材料などは，原則として医薬品生産には使用できない．

通常は，生物薬品の原材料では，何らかの試験・検査により

ウイルスの存在は否定されている．そのような場合，可能性が現実的に考えられる特定のウイルスをモデルとすることもありうるが，一般的には，5.2.で述べたように，広範囲なウイルスに関する工程のクリアランス能を示すことができる適切なモデルウイルス類の組合せを選択し，クリアランス試験をすることになる．このような場合には，ウイルスクリアランスに関する一般的な数値目標は特に設定できない．工程のウイルスクリアランス指数の妥当性は，ウイルス汚染の現実的可能性をめぐる各種の情報やウイルス試験の検出感度，その他文献的事例などを勘案しながら考察することになる．

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，目的に特に適うと考えられる不活化／除去機構を特徴とする工程を新規に導入するか，既存の工程と相互補完できるような不活化／除去工程を追加導入すべきである．得られた各ウイルスクリアランス指数及び総ウイルスクリアランス指数が受入れ可能かどうかについて，原材料への混入や製造過程での迷入の可能性が現実的に考えられる全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．

5.4.2.　ウイルスクリアランス指数の計算法

ウイルス除去及び不活化工程のウイルスクリアランス指数Rは，次式で示される．

R＝log [(V1 × T1)／(V2 × T2)]

ここで，R＝対数で表される減少度であり，V1＝工程処理前の試料の容量，T1＝工程処理前のウイルス量(力価)，V2＝工程処理後の試料の容量，T2＝工程処理後の試料のウイルス量(力価)である．

ウイルスクリアランス指数を算出する場合には可能な限り，試料に添加したウイルス力価でなく，添加後の工程処理前の試料中に検出されるウイルス力価に基づき算出する．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．

5.4.3.　結果の解釈及び評価上留意すべき事項

ウイルス不活化／除去工程の有効性に関するデータを解釈，評価する際には，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工程のウイルス不活化／除去に影響する要素・項目，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など，様々な要因を組み合わせて考察する必要がある．さらに補足的事項を以下に示した．

これら様々な要因が結果に影響することをふまえて，適正な解釈，評価に導くようにする必要がある．

（1） 試験に使用したウイルスの挙動

ウイルスクリアランス試験の結果を解釈するにあたって，クリアランスの機構は試験に使用した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しておく必要がある．また，使用されるウイルスは，通常細胞培養で製造されるが，製造工程中において，スパイクされた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．また，分離工程の特性によっては，糖鎖付加のようなウイルスの表面特性の変化が，分離状況に影響する可能性がある．これらの点を念頭に置き，結果を解釈する必要がある場合も考えられる．

（2） 試験の設計

製造工程の変動要因，規模縮小における変動要因などを考慮に入れてウイルスクリアランス試験は設定されているはずであるが，実生産スケールそのものではないのでやむを得ず差異が生じている可能性もある．データの解釈上，こうした差異を考慮したり，試験に限界があることに留意する必要がある場合も考えられる．

（3） ウイルス減少度データの取捨選択

総ウイルスクリアランス指数は，対数で表された各製造段階での減少度を加算することによって算出される．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)の減少率を加算すると，工程全体を通してのウイルス除去／不活化能力を過大評価してしまう可能性がある．したがって，1 $\log_{10}$以下のウイルス力価における除去／不活化は正当な理由がない限り通常計算に入れるべきではない．なお，同一又は近似した方法を繰り返して達成されたウイルス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はない．

（4） 不活化の時間依存性

ウイルス感染性の不活化は，急速な初期相とそれに続く遅い相からなる2相性の曲線を示すことも多い．そのような不活化工程で不活化を免れたウイルスは次の不活化工程で抵抗力がより強くなる可能性がある．例えば，不活化を免れたウイルス(抵抗性画分)が凝集形態をとった場合，各種化学処理や熱処理に対しても抵抗性を示す可能性がある．

（5） 対数で表されるウイルス減少度の評価

ウイルス力価の減少度を対数で表してウイルス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せるが，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8 $\log_{10}$のファクターで感染性の低減があっても，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．

（6） 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見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，上述のような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や結果の解釈如何が製造工程のウイルス感染性除去能力について必ずしも適正ではない評価に導く可能性もあることに留意する必要がある．

6.　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データを統計学的手法を用いて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．

6.1.　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. ウイルス力価測定法には半定量法(quantal method)と定量法(quantitative method)があるが，半定量法，定量法共に，統計学的評価の対象となる．

2. 試験結果の変動は，希釈誤差，統計的な要因，及び測定法に固有で不可避的な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，一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±0.5 $\log_{10}$のレベルに収まるようにするべきである．試験内変動は一般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 $\log_{10}$以内であるべきである．より低い精度の試験を採用するにはそれなりの妥当な理由が必要である．

6.2. ウイルスクリアランス試験の再現性，信頼限界

ウイルス不活化／除去工程として有効であることを示すためには，既に得られている知識により試験回数を減らすことが正当化されない限り，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．

クリアランス試験におけるクリアランス指数の95%信頼限界は，可能な範囲で算出することが望ましい．処理工程前の材料中のウイルス測定値の95%信頼限界が±sで，工程処理後のウイルス測定値の95%信頼限界が±aの場合，ウイルスクリアランス指数の95%信頼限界は

$$\pm\sqrt{(s^2 + a^2)}$$

である．

7. ウイルスクリアランスの評価における既に得られている知識(prior knowledge)の適用

原則としてウイルスクリアランスは，各製品の各工程段階から得られた工程中間体にウイルスをスパイクする試験によって評価する．製造業者が，確立され，十分に特性解析された工程を用いて(すなわち，同一のプラットフォーム技術を用いて)類似の製品を開発する場合は，他の製品について得られたウイルスクリアランスデータを適用できる場合がある．他製品の工程のデータを利用するためには，当該処理工程に関する十分な理解が必要であり，特定の処理工程について既に得られている知識を適用することの妥当性を明確に示す必要がある．また，公表データを含む外部で既に得られている知識から，ウイルスクリアランスに関わる工程能力の裏付けや関連する機序についての知見が得られる場合がある．このようなデータはウイルスクリアランスに関わる重要工程パラメーターの規定や特定のウイルスクリアランス工程の試験でのワーストケースの限度値の設定に用いることができる．公表されているクリアランス指数を特定の製品に適用するにあたっては，異なる製品間の製造工程および工程中間体の類似性，及び，製品固有の特性がウイルスクリアランスに影響を及ぼさないことを保証することなどの裏付けのため，公表データを慎重に評価し，プラットフォームに関する製造業者自身の経験(すなわち製造業者の内部で既に得られている知識)で補完することが必要である．ウイルスクリアランスの評価において既に得られている知識を適用する際の留意点や適用可能な工程の例についてはICH Q5Aガイドラインが参考になる．

8. 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，その変更がウイルスクリアランス能力に関して，直接的又は間接的に影響しないかを考え，必要に応じて変更した工程を含む全体のウイルスクリアランス能力を再度検証する必要がある．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．

9. ウイルス試験に用いられる試験法

一般にウイルスの検出及び確認のために用いられる試験法の例を表3に示した．これらの試験法はICH Q5Aガイドラインに記載されたものであり，ヒト又は動物由来細胞株から産生されたタンパク質医薬品のウイルス試験として推奨される方法ではあるが，必ずしも全てが網羅されているわけではなく，また，これらを必ず用いらなければならないと定めたものではない．最も適切な技術は科学の進歩とともに変わりうるため，適切な裏付け資料が示されればここに記載された以外の試験法を用いてもよい．ウイルス検出のためには，原材料の起源のほか製造工程で使用する試薬等を考慮に入れた徹底的なリスクアセスメントに従った包括的な試験戦略をたてる必要がある．以下では，ヒト又は動物由来細胞株から産生されたタンパク質医薬品の包括的ウイルス試験計画を立案するための一般的な枠組みについて概説する．これらの詳細についてはICH Q5Aガイドラインに記載されており参考になる．

9.1 レトロウイルス試験

レトロウイルス試験は，ヒト又は動物由来細胞株から産生されたタンパク質医薬品のMCB及びLIVCA又はLIVCAを超えて培養した細胞で実施すべきである．試験には，*in vitro*感染性試験，逆転写酵素(RT)活性測定試験，TEMによるウイルス粒子の評価等が含まれる．

レトロウイルス粒子を産生する細胞株については，RT活性を有すると考えられるため，PCR法によるRT試験は不要であり，TEMを実施して存在するウイルス粒子の種類を調べるべきである．内在性レトロウイルス粒子の感染性の有無を判定するため，関連する感受性細胞を用いて，高感度な読み出しアッセイ(sensitive readout assay)による感染性試験を実施する．

レトロウイルス粒子の産生が不明な細胞株については，細胞に対するTEM，及び，培養上清に対するRT試験を実施する．これらの試験結果が陽性の場合には，ヒト細胞株を含む感受性細胞を用いた感染性レトロウイルスの検出試験，及び，高感度なレトロウイルス検出の高感度な読み出しアッセイを実施して感染性の有無を判定する．

9.2 *In vitro*試験

*In vitro*試験は，広範囲のヒトウイルス及び関連する動物ウイルスを検出することができる各種指標細胞を用いて実施する．指標細胞パネルには，細胞基材の起源となる種の細胞株，ヒト二倍体細胞株(例えばMRC-5細胞)及びサル腎臓由来細胞株(例えばVero細胞)を含めるべきであり．これに加えて追加の細胞株を含めてもよい．試験に用いる細胞を含め，感染性試験をどのような方法及び試料で実施するかにについては，細胞基材の由来やその調製過程に基づい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．*In vitro*試験には，当該試験系では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，また，被検試料による干渉や毒性の影響といった限界があり，NGS又は他の分子生物学的手法を*in vitro*試験の補完試験や代

替試験として用いることで，それらに対処できる可能性がある．

9.3 *In vivo*試験

*In vivo*試験は，セルバンクの履歴や製造及びウイルス試験戦略を考慮したリスクアセスメントに基づいて実施する．CHO，NS0，Sp2/0細胞のように，広く使用されて十分に特性解析された細胞株については，既に得られている知識に基づいて，*in vivo*試験を必要としない．考慮すべき事項としては，セルバンクの構築に用いた親細胞株の過去のウイルス試験又はNGSの結果，親細胞株からのMCB調製の管理等が挙げられる．同一の親細胞株に由来する他のMCBのウイルス安全性試験について既に得られている知識を考慮する必要がある．WCBが規定された管理条件下で調製されたのであればWCBを対象とした*in vivo*試験は不要であり，LIVCA段階の細胞については既に得られている知識と他のリスクに基づく考察により*in vivo*試験が不要である場合もある．

*In vivo*試験法では，乳飲みマウス，成熟マウス，発育鶏卵に検体を接種して被検動物の健康状態を観察し，異常が認められた場合にはその原因を調査する．*In vivo*試験には当該試験系では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という限界があり，幅広いウイルスを高感度に検出できる標的非特異的NGSが代替法として推奨される．これにより，動物実験代替法の活用，動物実験削減という国際的な取り組みが推進される．

9.4 特定のウイルスの試験

細胞の起源及びウイルスの潜在的な汚染源(例えばヒト又は動物由来原材料)を考慮したリスク評価に基づいて試験すべき特定のウイルスのリストを設定する．製造工程において特定の動物種のウイルスに暴露される可能性がある場合には，種特異的ウイルスの検出のため，NAT，又はマウス，ラット又はハムスターを用いた抗体産生試験を実施する．抗体産生試験では，検体を特定の病原体が感染していない動物(SPF動物)に接種した後，特定のウイルスに対する抗体を測定することによりウイルスの存在を検出する．抗体産生試験には，動物体内で複製・抗体産生されないウイルスは検出できず，また，すべてのウイルス感染が測定可能な抗体産生を誘導するわけではないという限界がある．PCR法のようなNAT，標的特異的又は標的非特異的NGS，又は他の分子生物学的手法は，抗体産生試験の代替試験法として，動物試験と直接比較することなく使用することができる．

9.5 分子生物学的手法

分子生物学的手法としてNATやNGSがウイルス検出に用いられる．これらの分子生物学的手法によるウイルス試験はウイルス由来の核酸を検出対象とするため，結果が陽性の場合，検出された核酸が感染性ウイルスに関連しているか否かを調べる必要がある．

9.5.1 核酸増幅法(NAT)

NATによる検査は一般に，既知のウイルス又は既知の近縁ウイルスの遺伝子配列を検出するために，単独又は複合的に用いられる．細胞培養を伴う*in vitro*試験において干渉により試験に制限がある場合に当該試験の補完試験として用いることができるほか，細胞培養でウイルスを容易に増幅できない場合に特異的ウイルスを検出するための有効な手段である．ウイルス特異的PCR法を組み合わせることで，1回の試験で複数のウイルスを同時に検出することができる．NATを導入する場合には，その使用目的に応じて分析法バリデーション及びマトリックス特異的な検証を含む適切なバリデーションを実施する．

9.5.2 次世代シーケンシング(NGS)

NGSは既知のウイルス及び未知のウイルスや予期せぬウイルスを含む広範囲のウイルスを標的非特異的に高感度に検出することが可能である．標的非特異的NGSは，未知又は予期しないウイルスを検出するための*in vivo*試験とは直接比較なしに置き換えることができる．また，既知及び未知又は予期しないウイルスを検出するための*in vitro*試験とも直接比較なしに，その補完試験又は代替試験として用いることができる．NGSはシーケンス法又はバイオインフォマティクス解析によるウイルスの標的特異的な検出にも使用できる．標的特異的又は標的非特異的NGSは，直接比較することなくウイルス特異的PCR法及びげっ歯類抗体産生試験の代替法となり得る．

NGSを既知又は新規ウイルスの高感度かつ広範な検出に適用する場合には考慮すべきいくつかの重要なステップがある．(1)ウイルス検出を最大化する試料前処理及びウイルス濃縮ステップ，(2)ウイルス核酸抽出とライブラリー調製の効率，(3)適切な配列決定プラットフォームの選択，及び(4)異なるウイルス科の多様なウイルス配列のデータベースに照らし合わせるバイオインフォマティクス解析である．データベースに存在する可能性のある非ウイルス配列と区別するため，ウイルス特異的シグナルの検出を確認するフォローアップ戦略が必要となる場合もある．これらのNGSワークフロー中の様々な段階の性能を評価し，ウイルス検出の感度，特異性及び範囲を証明するために適切な標準物質を用いた分析法の適格性評価及びバリデーションを実施する．NGSは限度試験として使用されるため，分析法バリデーションにおける分析法の性能はICH Q2ガイドラインの原則を考慮する必要がある．

10. おわりに

本参考情報では，生物薬品のウイルス安全性確保の基本的要件について示した．製品のウイルス汚染のリスクを最小限に抑えるためには，科学の進歩と経験の蓄積を反映し，ウイルス安全性に関する最新の科学技術と考え方を積極的に取り入れることが必要である．ここで述べられた考え方や推奨事項は，個別の製品とその製造工程に応じて調整されるべきであり，製造業者はウイルス安全性を保証するための方策の妥当性を示す必要がある．個々の生物薬品については，その起源，由来，種類，製造方法，特性，臨床上の用法，過去の実績等を勘案しながら，ケース・バイ・ケースの原則で最も合理的に対処していく必要があると考えられる．

表 1.　細胞基材の特性解析のために実施することが推奨されるウイルス試験

	MCB	WCB	LIVCA 細胞
レトロウイルス及び内在性ウイルス試験			
レトロウイルス試験	+	-	+
レトロウイルス以外の内在性ウイルス試験	適宜実施	-	適宜実施
外来性ウイルス試験			
*In vitro*試験又はNGS	+	+	+
*In vivo*試験又はNGS	+	-	+
特定のウイルスの試験	適宜実施	-	-

表2　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	エンベロープ	サイズ (nm)	形状	耐性
水疱性口内炎ウイルス (VSV)	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)	レスピロウイルス属 (Respirovirus)又は オルトルブラウイルス属（Orthorubulavirus）	多種	RNA	有	100 ～ 200＋	多様 / 球形	低
マウス白血病ウイルス (MLV)	レトロウイルス科 (Retro)	ガンマレトロウイルス属 (Gammaretrovirus)	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
ウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV)	ペスチウイルス科 (Pesti)注	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)	バリセロウイルス属 (Varicellovirus)	ブタ	DNA	有	120 ～ 200	球形	中
オートグラファ・カリフォルニカ核多角体病ウイルス (Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus)	バキュロウイルス科 (Baculo)	アルファバキュロウイルス属 (Alphabaculovirus)	昆虫	DNA	有	250～ 300	多面体	中
ベジウイルス2117 (Vesivirus 2117)	カリシウイルス科 (Calici)	ベジウイルス属 (Vesivirus)	不明	RNA	無	27 ～ 40	正 20 面体	中
脳心筋炎ウイルス (EMCV)	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
ウシエンテロウイルス（BEV)	ピコルナウイルス科 (Picorna)	エンテロウイルス属 (Enterovirus)	ウシ	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
シミアンウイルス40 (SV 40)	ポリオーマウイルス科 (Polyoma)	ベータポリオーマウイルス属 (Betapolyomavirus)	サル	DNA	無	40 ～ 50	正 20 面体	高
パルボウイルス(イヌ，マウス，ブタ) (Parvovirus：canine，mouse，porcine)	パルボウイルス科 (Parvo)	プロトパルボウイルス属(Protoparvovirus)	イヌ マウス ブタ	DNA	無	18 ～ 24	正 20 面体	高

注：国際ウイルス分類委員会の分類では、フラビウイルス科(Flavi)ペスチウイルス属である.

表3　ウイルス試験に用いられる試験法の例

試験方法	検出可能な検体	試験方法としての限界
抗体産生試験	特異的ウイルス抗原	動物体内で複製や抗体産生ができないウイルスは検出できない。すべてのウイルス感染が測定可能な抗体反応をもたらすわけではない。
*In vivo*ウイルス試験	限定的な範囲のウイルス	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。干渉物質の影響を受ける。
*In vitro*ウイルス試験	広範なウイルス	当該試験系で複製しない又は感染の徴候を示さないウイルスは検出できない。干渉物質の影響を受ける。
電子顕微鏡観察(TEM)	ウイルス及びウイルス様(内在性レトロウイルスも含む)	低感度、ウイルスの感染性の有無は示されない。
逆転写酵素(RT)試験(PERT法等)	レトロウイルス粒子及びRT活性	レトロウイルスのRT活性を細胞内ポリメラーゼと区別する必要あり。
レトロウイルス(RV)感染性試験	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	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。
核酸増幅法(NAT)	特異的ウイルス塩基配列	プライマーの配列と呼応する配列の存在が必要。ウイルスの感染性の有無は示されない。
次世代シーケンシング(NGS)	広範なウイルス塩基配列	結果が陽性であってもウイルスの感染性の有無を示すものではないため、さらなる調査が必要となる可能性がある。