

医薬審発 0109 第 3 号
令和 7 年 1 月 9 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長
（ 公 印 省 略 ）

「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

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関わる試験及び評価のあり方については、「「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」（平成12年2月22日付医薬審発第329号厚生省医薬安全局審査管理課長通知。以下「本ガイドライン」という。）により示してきたところです。

今般、医薬品規制調和国際会議（以下「ICH」という。）における合意に基づき、本ガイドラインの一部を下記のとおり改正しましたので、貴管内関係業者に対し周知をお願いします。

なお、別添として改正後の「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」を添付します。また、本通知の写しについて、別記の業界団体及び独立行政法人医薬品医療機器総合機構宛てに連絡するので、念のため申し添えます。

記

- (1) 旧ガイドラインの適用範囲に遺伝子治療用製品を追加し、ガイドラインの名称について修正した。
- (2) 「3. 細胞株適格性試験：ウイルス試験」に、「3.1.3 バイオテクノロジー応用医薬品等の製造に用いられる in vitro 細胞齢の上限（LIVCA）の段階にある細胞」を追加した。
- (3) 「3.2 ウイルス検出及び確認のために推奨される試験」に、「3.2.4 特定のウイルスの試験」及び「3.2.5 分子生物学的手法」を追加した。
- (4) 「6. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析」に、「6.6 ウイルスクリアランスの評価に関する既に得られている知識（Prior Knowledge）の適用」を追加した。
- (5) 「7. 連続生産を行う場合に考慮すべき点」を追加した。
- (6) その他記載整備を行った。

以上

(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

一般社団法人日本医薬品添加剤協会

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

別添：

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

目次

1. 緒言	4
2. ウイルス汚染の可能性	5
2.1 マスター・セルバンク（MCB）にウイルスが存在する可能性	5
2.2 医薬品等の製造過程でウイルスが迷入する可能性	6
3. 細胞株適格性試験：ウイルス試験	6
3.1 マスター・セルバンク（MCB）、ワーキング・セルバンク（WCB）及びバイオテクノロジー応用医薬品等の製造に用いられる <i>in vitro</i> 細胞齢の上限（LIVCA）の段階にある細胞におけるウイルス試験	6
3.1.1 マスター・セルバンク（MCB）	6
3.1.2 ワーキング・セルバンク（WCB）	7
3.1.3 バイオテクノロジー応用医薬品等の製造に用いられる <i>in vitro</i> 細胞齢の上限（LIVCA）の段階にある細胞	7
3.2 ウイルス検出及び確認のために推奨される試験	7
3.2.1 レトロウイルス試験	7
3.2.2 In Vitro 試験	8
3.2.3 In Vivo 試験	9
3.2.4 特定のウイルスの試験	9
3.2.5 分子生物学的手法	10
3.3 ウイルスが検出された細胞株の使用について	12
4. 未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験	12
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	13
6. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析	16
6.1 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	16
6.1.1 「関連ウイルス」と「モデルウイルス」	17
6.1.2 その他の留意事項	17
6.2 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	18

6.2.1	施設とスタッフ	18
6.2.2	製造工程のスケールダウンモデル	18
6.2.3	ウイルスクリアランスに関する製造段階毎の解析	18
6.2.4	不活化と物理的除去の区別	19
6.2.5	不活性化に関する事前評価	19
6.2.6	カラムの機能と再利用	19
6.2.7	特別な留意事項	20
6.3	ウイルスクリアランス試験の解釈	21
6.4	ウイルスクリアランス試験の限界	22
6.5	統計	23
6.6	ウイルスクリアランスの評価に関する既に得られている知識 (Prior Knowledge) の適用	23
6.7	ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合	24
7.	連続生産を行う場合に考慮すべき点	24
7.1	連続生産におけるウイルス安全性	25
7.2	連続生産におけるウイルスクリアランスについての一般的な留意事項	25
7.3	連続生産におけるウイルスクリアランスに特有の留意事項	26
7.3.1	生産培養期間の延長に関連する潜在的リスク	26
7.3.2	ウイルスクリアランス試験 へのアプローチ	26
8.	まとめ	27
9.	用語解説	27
10.	参考資料	31
付録 1 :	ウイルスクリアランス試験のためのウイルスの選択	37
1.1	有用な「モデルウイルス」の例	37
1.2	ウイルスクリアランス試験に用いられるウイルスの例	37
付録 2 :	ウイルス及びウイルスクリアランス指数の評価に関する統計学とその留意点	39
付録 3 :	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	41
付録 4 :	投与量当たりの推定ウイルス粒子数の計算方法	42
付録 5 :	製品個別のバリデーションの削減における社内経験を含む既に得られている知識の適用の例	43
5.1	緒言	43
5.2	有機溶媒／界面活性剤又は界面活性剤単独による不活化	43
5.3	低 pH 条件下での保持	45
5.4	ウイルスろ過	46

付録 6 : 遺伝子組換えウイルスベクター及びウイルスベクター由来製品.....	49
6.1 緒言	49
6.2 ウイルス試験	49
6.3 ウイルスクリアランス	51

1. 緒言

本ガイドラインは、バイオテクノロジー応用医薬品及び遺伝子治療用製品（以下、バイオテクノロジー応用医薬品等と呼ぶ）のウイルスクリアランス及び試験法を含むウイルス安全性に関わる評価のあり方に関するものであり、これらのバイオテクノロジー応用医薬品等の製造販売承認申請資料に添付されるべきデータの概略を述べたものである。バイオテクノロジー応用医薬品等には、ヒト又は動物（哺乳類、鳥類、昆虫類等）由来細胞株から生産されたバイオ医薬品及び一部の生物起源由来医薬品が含まれる。本ガイドラインにおいて、「ウイルス」という用語には、哺乳類のプリオンに関連するような従来の範疇にはない伝播因子は含まないものとする（例：ウシ海綿状脳症（BSE）、スクレイピー）。伝染性海綿状脳症に関しては、本ガイドラインの適用範囲外であるので、申請者が規制当局に個別に相談すること。

本ガイドラインは、サイトカイン、モノクローナル抗体（mAb）及びサブユニットワクチン等、遺伝子組換え技術を用いて *in vitro* 細胞培養により製造される医薬品を対象とする。また、本ガイドラインは、製品の品質に負の影響を及ぼすことなくウイルスクリアランスが可能であれば、遺伝子組換えウイルスベクターやウイルスベクター由来製品（例：ウイルスベクターワクチン、遺伝子治療用製品）にも適用する。これらの製品には、一過性又は安定的にトランスフェクションされた細胞株を用いるか又は遺伝子組換えウイルスを用いた感染によって産生されるウイルスベクター、例えばアデノ随伴ウイルス（AAV）が含まれる。さらに、バキュロウイルス発現によるウイルス様粒子（VLP）、タンパク質サブユニット及びナノ粒子ベースのタンパク質ワクチンや治療薬等、ウイルスベクター由来製品も含まれる。さらに、単純ヘルペスウイルスやアデノウイルス等をヘルパーウイルスとして用いることにより製造される AAV 遺伝子治療用製品も適用範囲とする。遺伝子組換えウイルスベクター及びウイルスベクター由来製品に関する具体的なガイダンスは付録 6 に記載されている。

不活化ウイルスワクチンや自己複製因子を含む弱毒化ウイルス生ワクチンは本ガイドラインの適用範囲から除外する。ヒト及び動物細胞加工製品は本ガイドラインの適用範囲外であるが、（例えば、生物由来出発物質や生物由来原料には）本ガイドラインの原則を適用することができる。

腹水等 *in vivo* で増殖させたハイブリドーマ細胞から材料を製造することは、汚染リスクがあるだけでなく、動物を用いない代替法の利用、使用動物数の削減、及び苦痛の軽減のための国際的な取り組みからも、もはや推奨されない。このような状況が存在する場合には、*in vivo* 試験法の代替として次世代シーケンシング（NGS）を使用することを含め、本ガイドラインの原則に従うべきである。

製品へのウイルス汚染のリスクは、細胞株を用いて製造されるすべてのバイオテクノロジー応用医薬品等に共通する懸念である。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ことから、リスクを低減する必要がある。製品のウイルス汚染は、バイオテクノロジー応用医薬品等の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来性ウイルスの迷入によりもたらされる可能性がある。しかし、これまでに、細胞株由来のバイオテクノロジー応用医薬品等によりウイルス感染が発生したという事例は確認されていない。これらの製品のウイルス安全性は、以下に述べるしかるべき方策によって合理的に保証することができる。その方策とは、包括的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等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。

- 不要な感染性ウイルスの存在を否定するために、細胞株、培地成分を含むその他の

原材料を選択し、試験すること。

- 製造工程の外来性及び内在性ウイルスの不活化／除去能力を評価すること。
- 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。

遺伝子組換えウイルスベクターやウイルスベクター由来製品の製造の際に用いられるウイルスクリアランス工程は、遺伝子組換えタンパク質に対し用いられる工程ほど効果的でない場合もある。このような場合は、更なるリスク低減策を検討すべきである（例：原材料の処理、幅広いウイルス検出のための広範な試験）（付録6参照）。

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、単一のアプローチだけで製品のウイルス安全性が必ずしも確立されるわけではない。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、単に製品を直接試験して否定することのみでは得られず、製品の精製工程のウイルス不活化／除去能力を併せて示すことが必要である。

製造工程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ため、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、①細胞株の起源、②セルバンクの特性解析と試験の範囲、③検出されたすべてのウイルスの種類・性質、④培地成分、⑤培養方法、⑥施設及び設備の仕様、⑦細胞培養後のウイルス試験の結果、⑧製造工程のウイルス不活化／除去能力、⑨製品のタイプや臨床上的使用目的・用法等が含まれる。

ここに示す推奨事項は、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る。さらに、ウイルス安全性を保証するために使用するアプローチについて説明し、その妥当性を示す必要がある。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提示すること。この総括には、ウイルス汚染を防ぐための方策とウイルス安全性試験に関するすべての側面について簡潔に記述する必要がある。

2. ウイルス汚染の可能性

バイオテクノロジー応用医薬品等のウイルス汚染は、細胞株に起因するものと、製造用細胞株構築やセルバンク作製中及び製品の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。十分に特性解析されたセルバンクやウイルスシードを使用することによって、ウイルス汚染リスクを低減できる。マスターウイルスシード（MVS）又はワーキングウイルスシード（WVS）からの外来性ウイルスの迷入の可能性と管理については付録6で説明する。製品の製造に使用される付録6に記載されたウイルス（製造用ウイルス）は、製造工程由来不純物とみなされる。

2.1 マスター・セルバンク（MCB）にウイルスが存在する可能性

外来性ウイルスは、以下のような経路によりマスター・セルバンク（MCB）に迷入する可能性がある。（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に使用したウイルス、（3）汚染された生物由来の試薬（例：選別用抗体）や原材料（例：動物又はヒトの血清、ブタトリプシン）を細胞培養に使用、（4）細胞取扱い中やセルバンク調製工程時の操作に由来する汚染。

細胞には、一細胞世代から次の世代へと維持される内在性のレトロウイルスが存在する。内在性ウイルス由来の塩基配列は、恒常的に発現している場合もあれば、活性化されて感染性のあるウイルス粒子又は不完全なウイルス粒子が産生される場合もある。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）も存在している可能性がある。

2.2 医薬品等の製造過程でウイルスが迷入する可能性

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）細胞培養に使用する生物由来の原材料や動物血清成分のような試薬が汚染されている、（2）製造に使用するウイルスシードが汚染されている（付録 6 参照）、（3）下流の精製工程で使用する原材料や試薬（例えば、目的物質の選択や精製目的で使用する哺乳類由来抗体を固定化したアフィニティー樹脂等）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）非生物由来原材料の保存中や作業者による培養細胞及び培地の取扱い中等に環境から汚染を受ける。

細胞培養パラメータ（例：細胞増殖や生存率）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可能性がある。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（例：ヒト血清、ウシ血清、ブタトリプシン）の使用を避けるべきである。これが不可能な場合、ヒト及び動物由来の原材料の使用は、リスクのレベルや程度に応じて関連する文書又は材料の適格性評価により裏付けられるべきである。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種類等の情報を提供すべきである。なお、リスクアセスメントに従って必要であれば、ウイルス試験は可能な限り不活化前に実施すべきである。

可能であれば、動物やヒトの血清、ブタのトリプシン等、外来性ウイルスが迷入するリスクの高い生物由来原料は、電離放射線照射（ionizing irradiation）等のウイルス不活化処理を実施すべきである。追加的なウイルスリスク軽減策の例としては、例えば細胞培養培地や培地添加剤のウイルスろ過、高温短時間処理（high temperature short time processing）、深紫外線照射（ultraviolet C irradiation）等を挙げることができる。

3. 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等の製造に用いる細胞株の適格性試験において、適切なウイルス試験は重要な項目の 1 つである。

3.1 マスター・セルバンク（MCB）、ワーキング・セルバンク（WCB）及びバイオテクノロジー応用医薬品等の製造に用いられる *in vitro* 細胞齢の上限（LIVCA）の段階にある細胞におけるウイルス試験

表 1 に、MCB、WCB 及び LIVCA 細胞の各細胞レベルで一度は実施することが推奨されるウイルス試験の例を示す。

3.1.1 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による汚染の有無について広範なスクリーニングを実施する必要がある。例えば、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上のリスク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。

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異的ウイルスを検出する試験の両方を含めるべきである。広範な外来性ウイルスを検出するためには、NGS のような新しい分析法の導入が推奨される。迷入ウイルスを確実に検出するために、親細胞株の起源及び履歴、並びに製造用細胞の構築及び MCB の作製中にヒト又は

動物由来の物質に曝露される可能性を考慮したリスクアセスメントに基づいた試験法を用いること。もう1つのアプローチとして、MCBにおいて必要とされるすべての試験を WCB について実施し、MCBにおける試験の代わりとしてもよい。

3.1.2 ワーキング・セルバンク (WCB)

各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こと。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、かつそのWCBに由来するLIVCA又はLIVCAを超えて培養された細胞で外来性ウイルスの試験が実施されている場合は、当該WCBでは同様の試験を省略してもよい。

3.1.3 バイオテクノロジー応用医薬品等の製造に用いられる in vitro 細胞齢の上限 (LIVCA) の段階にある細胞

バイオテクノロジー応用医薬品等の製造のための LIVCA 細胞は、実際の製造工程を反映したスケールダウンモデルを用いた小スケールで、もしくは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、バイオテクノロジー応用医薬品等製造のために提案された LIVCA まで又はそれを超えて培養された製造用細胞から得られたデータに基づいて設定すること。LIVCA 細胞は、WCB 又は MCB を増殖させることによって得られる。MCB や WCB 段階で検出されないウイルスもありうるので、LIVCA 段階で必ず一度は、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。生産に使用された LIVCA 細胞について、適切な試験（表1参照）を一度実施することで、製造工程により内在性ウイルスの発現誘導、潜伏ウイルスの再活性化、又は低濃度もしくは増殖の遅いウイルスの増幅を引き起こさないことをさらに保証することができる。この LIVCA 段階で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、汚染源を特定する必要がある。LIVCA 細胞は、製造終了時の細胞 (End of Production Cell、EOPC) とも呼ばれる。

3.2 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。試験法の例を表2に示す。これらは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ない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、適切な裏付け資料が提出されれば記載されたもの以外でもよい。ウイルス検出のために、細胞株の由来、継代培養の履歴、細胞株構築やセルバンクの樹立及び製造（例えば、ウイルス不活性化又は除去工程）に使用する原材料及び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立てること。この戦略には、リスクアセスメント結果に基づき、必要に応じて追加の分析法を含めること。例えば、ある特定のウイルスが存在する可能性が比較的高い場合には、妥当な理由がない限り、そのウイルスを検出するための特異的試験又は他のアプローチが必要であろう。試験法が十分な感度と特異性があること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。さらに、マトリックス干渉の可能性を考慮すること。

以下には、製品及び製造工程に特異的な（又は適切な）、包括的ウイルス試験の実施計画を製造業者が立案するために用いる一般的な枠組みについて概説する。試験戦略については、その妥当性に関する適切な説明が必要である。

3.2.1 レトロウイルス試験

細胞株は、レトロウイルスの存在の有無について分析する必要がある。レトロウイルス試験は、MCB 及びバイオテクノロジー応用医薬品等の製造のために LIVCA まで又は LIVCA を

超えて培養した細胞で実施すべきである。試験には、細胞培養上清の直接接種又は細胞の混合培養による感染性試験、細胞フリー培養上清を用いた逆転写酵素 (RT) 活性測定、透過型電子顕微鏡観察 (TEM) による細胞中のウイルス粒子の評価等が含まれる。TEM は他の因子の検出も可能であるため、一般的に、セルバンクの特性評価に推奨される。

(げっ歯類、昆虫類及び鳥類由来の一部の細胞株でみられるように) レトロウイルス粒子を産生する細胞株は、RT 活性を有すると考えられるため、PCR 法による RT 試験 (例: product-enhanced reverse transcriptase (PERT) assay) は不要と考えられる。TEM を実施して、存在するレトロウイルス粒子の種類 (例えば、A 型及び C 型) を調べるべきである。内在性レトロウイルス粒子が感染性か否かを判定するために、関連する感受性細胞 (例: 一般的なげっ歯類レトロウイルスを検出するには *Mus dunni* 細胞、エコトロピック (同種指向性) マウスレトロウイルスを検出するには SC-1 細胞) を用いて、レトロウイルス検出のための高感度な読み出しアッセイ (sensitive readout assay) (例: PERT 試験、S⁺L-フォーカスアッセイ、又は XC プラークアッセイ) による感染性試験を実施すること。

細胞株がレトロウイルス粒子を産生するかどうか不明な場合は、細胞に対しては TEM を実施し、清澄化した上清に対しては RT 試験 (例: PERT 試験) を実施すべきである。PCR 法による RT 試験は、レトロウイルスの RT 活性を高感度で検出できるため、特に有用である。ただし、RT 活性は感染性レトロウイルスにも非感染性のレトロウイルスにも関連する可能性がある。細胞内 DNA ポリメラーゼの中には RT 試験結果が陽性となる可能性があるため、RT 活性 (レトロウイルスの混入による) を確認した場合、又は TEM 結果が陽性の場合は、ヒト細胞株を含む感受性細胞を用いて感染性レトロウイルスの検出試験、及びレトロウイルス検出のための高感度な読み出しアッセイを行う必要がある。

レトロウイルス試験の結果は、入手可能なすべてのデータを考慮に入れて解釈すること。内在性レトロウイルス粒子を発現している細胞株であっても、第3.3章及び第5章で説明されているリスク評価に基づき、製造工程における使用が否定されるものではない。

化学的誘導試験 (chemical induction) は、内在性レトロウイルスについて十分に特性解析されている細胞株 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NS0 細胞、Sp2/0細胞、Vero細胞、又は既に得られている知識 (prior knowledge) に基づくその他の細胞株) については実施する必要がない。しかし、化学的誘導試験は、新規細胞基材における未知の内在性レトロウイルスの存在を評価する際に役立つ場合がある。また、潜在するDNAウイルス (例: ヒト細胞中のヘルペスウイルス) 及び潜在するRNAウイルス (例: 昆虫細胞中のノダウイルス) に対する誘導試験も、リスクアセスメントの結果によっては実施することが適切かもしれない。これらの試験は、新規の細胞基材を用いて製造される製品のウイルス試験及びクリアランス戦略に関する情報を得るのに役立つ場合がある。

3.2.2 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に、被検試料 (表 2 参照) を接種することにより実施する。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 (例: MRC-5 細胞) 及びサル腎細胞株 (例: Vero 細胞) を含めること。追加の細胞株を含めてもよい。試験に用いる細胞の選択は、試験対象の細胞基材の起源となる種を考慮したリスクアセスメントに基づいて行う。

感染性試験をどのような方法及び被検試料で実施するかは、細胞基材の由来やその調製過程に基づき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。各地域の現行の規制及びガイダンスに従って、指標細胞培養物における細胞変性ウイルス、血球吸着性ウイルス及び血球凝集性ウイルスを観察すること。MCB、WCB 及び LIVCA 細胞の適格性評価

では感受性細胞を用いて 28 日間の試験を実施するが、少なくとも 2 週間に 1 回継代培養を実施すること。

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ができる。これによって、*in vitro* 試験の一般的な限界（例えば、感染に対する細胞株の感受性）及び産生系に特異的な限界（例えば、被検試料による干渉や毒性）に対処できる可能性がある。

3.2.3 In Vivo 試験

In vivo 試験は、セルバンクの履歴や製造及び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ことができる。ただし、CHO、NS0、Sp2/0 細胞のような広く使用され、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。リスクに基づく考慮事項としては、トランスフェクションされていない親細胞株の過去の *in vivo* ウイルス試験又は NGS 試験、及び親細胞のセルバンクからの MCB 調製の管理等が挙げられる。MCB を樹立するために使用された方法を含め、同一の親細胞セルバンクに由来する他の MCB のウイルス安全性試験に関して既に得られている知識を考慮に入れる必要がある。WCB が規定された管理条件下で調製されたのであれば、通常、WCB を対象とした *in vivo* 試験は必要ない。LIVCA 細胞については、既に得られている知識及び他のリスクに基づく考察に基づき *in vivo* 試験が不要である場合もある。

残存リスクが存在する場合は、MCB の樹立時又は細胞を LIVCA 段階まで培養する間に混入した可能性のあるウイルスを検出するために、試験法を継続するか又は非標的 NGS への変更を検討することができる。

In vivo 試験法では、乳飲みマウス、成熟マウス、発育鶏卵への被検材料（表2参照）の接種等が行われる。被検動物の健康状態を観察し、異常が認められた場合は、その原因を調査すること。

標的非特異的 NGS は、幅広いウイルスが高感度で検出でき、一方で *in vivo* 試験には限界があることから、*in vivo* 試験の代替法として推奨される。さらに、本法の使用により動物実験代替法の活用、使用動物数の削減及び動物の苦痛の軽減という国際的な取り組みが推進される。

3.2.4 特定のウイルスの試験

試験すべき特定のウイルスのリストは、細胞の起源及びウイルスの潜在的汚染源（例えば生物由来原料、特にヒト又は動物由来の原材料）を考慮に入れたウイルス汚染リスク評価に基づいて設定される（ただし、これらに限定されない）。ヒト又は動物由来原材料（例：ウシ血清やブタトリプシン）に曝露された細胞株については、ヒト、ウシ及びブタのウイルスに対する試験を実施すべきである。げっ歯類由来の細胞株やげっ歯類由来材料への曝露があった場合は、種特異的ウイルスを検出するために核酸増幅法（NAT）又はマウス、ラットもしくはハムスターを用いた抗体産生試験が用いられる。これらの試験は、特定の動物種のウイルスに曝露される可能性がある場合に実施する。例えば、げっ歯類由来細胞株、又はげっ歯類自体を使用して樹立した細胞株、及びげっ歯類材料に由来する試薬を使用して樹立した可能性がある細胞株におけるウイルスの存在は、検体（表 2 参照）をマウス、ラット、ハムスターのような特定の病原体が感染していない（specific pathogen free）動物に接種した後、これらの特定のウイルスに対する抗体を測定することにより検出することができる。

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、これらの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。

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、表 3 に記載した動物試験の代替試験法として、動物試験法と直接比較することなく、使用することができる。

3.2.5 分子生物学的手法

NAT や NGS のような分子生物学的手法はウイルス検出に用いられる。NGS は、既知及び新規ウイルスの広範な（標的非特異的）検出に適している。NGS はシーケンス法又はバイオフィ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。標的非特異的 NGS は、分析法が意図した目的にかなっていることが実証されていれば、直接比較することなく、*in vivo* 試験の代替試験、及び *in vitro* 試験の補完試験又は代替試験として使用することができる。試験系のエンドポイントが異なること、及び既知及び未知のウイルスを幅広く検出する NGS の高い検出能力と比較して、*in vitro* 及び *in vivo* 試験では検出できるウイルスの種類に限界があることから、直接比較は推奨されない。*in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果は、特定のウイルスを標的として検出するのにウイルスの複製能と生物学的特性に依存しているために、検出範囲に限界がある。*In vivo* 試験を NGS に置き換えることは、動物を用いない代替試験法の活用、動物使用数の削減及び苦痛の軽減という適正な動物試験の国際的な目標の意図にも合致する。

ウイルスの特異的検出には、PCR 法のような NAT を使用してもよい。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、ウイルスの特異的検出のための多数の PCR 法と置き換えるために用いることができる。これはウイルス変異株の検出の限界を克服するのにも役立つ。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。

3.2.5.1 核酸増幅法

PCR 法のような NAT は一般に、既知のウイルス又は既知の近縁ウイルス科のウイルス遺伝子配列を検出するために、単独で又は複合的に用いられる。これらの分子生物学的手法は、細胞培養を伴う試験において干渉によって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。また、感染性試験では細胞培養でウイルスを容易に増殖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。NAT には、より広範囲のウイルス検出を行う方法もあるが（例：degenerate PCR 法）、その場合特異性が低下する可能性がある。特異性の高さから、一般的な生物学的試験の 1 試験において検出可能な範囲のウイルスを検出するために、ウイルス特異的 PCR 法の試験を複合的に実施することができる。NAT 分析法は、その使用目的に応じて適切にバリデーションを行うこと。このバリデーションには適宜、分析法バリデーション及びマトリックス特異的なベリフィケーションを含めること。

3.2.5.2 次世代シーケンシング

幅広いウイルス検出能力が実証されている NGS（ハイスループットシーケンシングとも呼ばれる）を用いることができる。NGS の際立った検出感度及び広範なウイルスが検出可能であることにより、動物の使用数や試験期間の削減が可能になる。標的非特異的 NGS は、未知又は予期しないウイルス種を検出するための *in vivo* 試験とは、直接比較（head-to-head comparison）なしに置き換えることができる。

標的非特異的 NGS はさらに、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使用できる。標的非特異的 NGS は、*in vitro* 試験の一般的な限界（例：感染に対する細胞株の感受性）及び産生系の特異

的な限界（例：被検試料による干渉や毒性）に対処し得ると考えられる。

NGS は、入手可能な既知のウイルス配列情報に基づき、既知ウイルスを標的特異的に検出することができる。あるいは、NGS データのバイオインフォマティクス解析により、特定のウイルスの検出に的を絞ることもできる。

NGS（標的特異的又は標的非特異的）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（第 3.2.4 章）の代替法となり得る。*In vivo* 試験を NGS に置き換えることは、動物を用いない代替試験法の活用、使用動物数の削減及び苦痛の軽減という国際的な目標の意図にも合致する。

NGS は、細胞株の特性解析、あるいはセルバンクやウイルスシード、未加工／未精製バルクハーベスト試験において使用可能と考えられる。これは、ウイルスベクターが効果的に中和されず分析法が干渉される場合（付録 6 参照）、あるいは製品又は培地成分による毒性がある場合は特に有用である。このような場合に NGS を適用することで、すべてのゲノムウイルス核酸（genomics）、ウイルス mRNA（transcriptomics）、又は粒子中に存在するウイルスゲノム（viromics）を解析することができる。細胞培養由来物質を分析する場合、ゲノム解析とトランスクリプトーム解析には細胞から調製された核酸が使用され、ウイルスゲノム解析には細胞培養上清又は無細胞ウイルス調製物が使用される。これらの異なる戦略を選択した根拠を示すこと。

既知又は新規ウイルスの高感度かつ広範な検出に NGS を適用する場合、NGS ワークフロー中に以下の考慮すべきいくつかの重要なステップがある。（1）検体試料の種類に基づいてウイルス検出を最大化する試料前処理（実施する場合）及びウイルス濃縮ステップ、（2）ウイルス核酸抽出（エンベロープ及び非エンベロープ粒子を含む）とライブラリー調製（DNA 及び RNA ウイルス）の効率、（3）ウイルスを高感度で検出するための適切な配列決定プラットフォームの選択、及び（4）広範なウイルス検出のための戦略を用いて、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に、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。

分析法の適格性評価及びバリデーションでは、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、適切な標準物質を使用すること。これには、NGS ワークフロー全体又は特定のステップの性能を評価するための、性質の異なる物理的特性（サイズ、エンベロープ及び非エンベロープ）、化学的特性（低、中、高耐性）、及びゲノム特性（DNA、RNA、二本鎖及び一本鎖、直鎖、環状）を有するウイルスを含む現在利用可能な参照ウイルス試薬／パネルの使用が含まれる。広範なウイルス検出のために、多様なウイルス配列が登録されている包括的なウイルスデータベースを使用すること。さらに、特定の技術的評価及びバイオインフォマティクス評価のために、他の種類の標準物質を使用することもできる。

使用されるいかなる NGS 法についても、その意図した目的にかなっていることを裏付けるバリデーション／適格性評価が提供されなければならない。これには、代替法として使用する場合、分析法バリデーションとマトリックス特異的なベリフィケーションが含まれる。補完試験として使用する場合、分析法の適格性評価とマトリックス特異的なベリフィケーションが含まれる。分析法バリデーションでは、事前に規定された性能基準が要求されるが、分析法の適格性評価では、分析法の性能特性のみが評価される。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／適格性評価における分析法の性能（特異性／検出幅、感度）は ICH Q2 の原則を考慮する必要がある。

3.3 ウイルスが検出された細胞株の使用について

バイオテクノロジー応用医薬品等の製造に用いる細胞株には、内在性レトロウイルス、その他のウイルス、あるいは感染性ウイルスとして再活性化する可能性のあるウイルス由来の塩基配列を含むものがある。そのような場合に製造において推奨される対応策が本文書の第5章に記載されている。内在性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、管轄の規制当局が個別に検討することになるが、その際、製品のベネフィットや予定される臨床上の用途、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）、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等に基づくリスク・ベネフィットのバランスを勘案し、判断することになる。

4. 未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験

製造業者は生産バッチにおいて外来性ウイルスを定期的に評価するプログラムを開発するべきである。この未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験の範囲及び程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、原材料及び試薬の起源、ウイルスクリアランス試験の結果等である。遺伝子組換えウイルスベクター及びウイルスベクター由来製品の未加工／未精製バルクの試験については付録6を参照のこと。

バッチ生産工程では、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。一方、細胞培養から連続的に目的物質をハーベストする工程では、連続的に排出される培養液からプールされた中間体又は未加工／未精製バルクのサンプルを採取することができる。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。したがって、未加工／未精製バルクに対して適切なウイルス試験を実施すること。細胞分離技術がバイオリアクター中の細胞随伴性ウイルス（cell-associated virus）の検出に及ぼす潜在的な影響を考慮すること。未加工／未精製バルクが細胞培養試験によるウイルス検出において毒性を示す、又は干渉の原因となる場合は、最小限のサンプル希釈又はNGSなどの代替試験法を検討してもよい（第3.2章参照）。細胞随伴性ウイルスを検出するには、培養槽から取り出されたそのままの細胞と細胞溶解物（破碎細胞及び培養上清）からなる混合物を試験するべきである。灌流又は連続生産（CM）工程では、容易に細胞が採取できない場合がある（例えば、中空糸又は類似の精密ろ過システムを使用するため）。そのような場合には、細胞培養液から採取した細胞を含まないハーベスト産物を使用することができる。細胞培養から目的物質の連続的なハーベストを含む工程については、外来性ウイルスや内在性ウイルスの粒子のレベルが細胞培養期間に変動する可能性があるため、サンプリング戦略（サンプリング周期やサンプルの組成を含む）の妥当性を示す必要がある（第7章参照）。

外来性ウイルス試験は、定期的に各未加工／未精製バルクに対して実施すること。外来性ウイルス試験には複数の指標細胞株を用いた *in vitro* 試験や標的非特異的 NGS を含めてもよい（第3.2章参照）。指標細胞の培養観察期間は、2週間に少なくとも1回の継代培養を含め28日間とすること。リスクアセスメント（細胞基材、製造培養期間、動物由来原材料又は試薬の使用、工程のウイルスクリアランスの程度を考慮する）に基づき妥当性があれば、試験期間は14日間に短縮することができる。さらに、汚染物質が迷入する可能性に対するリスクアセスメントに基づき、特定のウイルス（マウス微小ウイルス等）又は特定のウイルス科の検出には、NAT 又は標的特異的 NGS 等の試験法が適切な場合がある。このような迅速試験によりリアルタイムでの決定を下すことができる。

未加工／未精製バルクの段階で外来性ウイルスが検出された場合は、妥当な理由がない限り、当該細胞培養からのハーベストを製品の製造に使用しないこと（ハーベストに外来性ウイルスが検出された場合の原料の使用に関するガイダンスについては、第 5 章を参照すること）。汚染の根本原因及び範囲を突きとめるために製造工程を注意深く点検し、適切な対応をとること。連続生産（CM）工程では、バッチの最終出荷時には、当該バッチの製造工程で培養液を回収する期間中にウイルス汚染がなかったことを文書化する必要がある。外来性ウイルスが検出された場合には、広範囲の生産への影響を軽減するために、汚染されている可能性のある物質を隔離する手順を検討すること。

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

MCB から医薬品等の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未加工／未精製バルクからのウイルススクリアランスの評価試験・特性解析試験を含むウイルス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、ウイルススクリアランスの評価試験と特性解析試験は、特に中心的な役割を果たす。その目的は製品がウイルスに汚染されていないことを保証することである。

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スクリアランスに関する特性を解析することによりクリアランス工程の頑健性（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。製品の安全性を評価するために、ウイルスリスクの評価にあたっては、①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、②製造工程でウイルスがどの程度不活化／除去されるか、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必要である。ウイルスのクリアランスを評価する場合には、必要に応じて、不活化の時間依存性に関する詳細な検討、不活化又は除去の再現性の実証、及びプロセスパラメータの評価を実施すること。「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頑健性を特性解析する場合には、試験デザインの際に、特に非エンベロープウイルスの使用を考慮することが必要である（「モデルウイルス」の説明は、第 6.1.1 章を参照のこと）。どの程度までウイルススクリアランス試験を行うかは、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することができる。これらの試験は以下（第 6 章を参照）の記載に従い実施すること。

細胞又は未加工／未精製バルクについてのウイルス試験の結果を受けて実施する対策の例を表 4 に示す。この対策には、ウイルススクリアランス工程の評価及び特性解析、並びに精製バルクに対するウイルス試験が含まれる。表 4 に示した様々なケースについて詳細を以下に記載した。すべてのケースにおいて「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。最も一般的なケースは、ケース A、ケース B 及びケース F 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、バイオテクノロジー応用医薬品等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バイオテクノロジー応用医薬品等の製造を行おうとする場合で、使用理由を十分に説明できるという場合は、その使用について管轄の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及び／又は／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／未精製バルク中に原薬（ウイルスベクター粒子等）以外のウイルス、ウイルス様粒子（VLP）又はレトロウイルス様粒子（RVLP）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／除去試験は「非特異的モデルウイルス」を用いて実施すること。RVLP が検出されなかった場合、及び PERT 試験

が陰性の場合、一投与量あたりの推定レトロウイルス粒子数の算出を必要としない。

ケース B：げっ歯類由来細胞株中に、げっ歯動物のレトロウイルス（げっ歯動物の A 型、C 型及び R 型粒子等）のみが存在するケースである。本ケースでは、ケース A の非特異的ウイルスクリアランスモデルに追加して、「特異的モデルウイルス」（例：マウス白血病ウイルス（Murine Leukemia Virus、MLV））を用いた工程評価試験を実施すべきである。承認申請の際には通常、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 3 ロット以上の精製バルクに関する RVLP 定量データを提出すること。CHO 細胞、C127 細胞、BHK 細胞、及びマウスのハイブリドーマ細胞株（NS0 細胞や Sp2/0 細胞等）のような十分に特性解析されている細胞株が細胞基材として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、精製バルク又は原薬についての内在性レトロウイルス様粒子の試験は、通常は推奨されない。このアプローチは、十分に特性解析された細胞株（Sf9 昆虫細胞株等）にも適用できる可能性がある。

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（例：Sf9 ラブドウイルス）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。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。承認申請の際には通常、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 3 バッチ以上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：細胞又は未加工／未精製バルク中にヒトへの感染性があるウイルス（表 3、脚注 a に示したウイルス等）が同定された場合、それらの使用は例外的な状況においてのみ許容されることがある。このような場合は、同定されたウイルスをウイルス不活化／除去の評価試験に用いること。また、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使用すること。同定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。下流工程において当該ウイルスが不活化及び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て試験すること。承認申請の際には通常、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 3 バッチ以上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、そのウイルスに病原性がある可能性があるため、その生産物は、通常、認められないと考えられる。希なケースとして、そのような細胞株を用いて医薬品等の製造を行おうとする場合で、使用理由を十分に説明できるという場合であっても、開発を進める前に管轄の規制当局と協議するべきである。

ケース F：バイオテクノロジー応用医薬品等の製造において製造用ウイルス（遺伝子組換えタンパク質や VLP を発現させるためのヘルパーウイルス又はウイルスベクター等）を使用する場合は、製造用ウイルス又は「特異的モデルウイルス」（例：バキュロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス）を用いてウイルスクリアランスを実証すること。頑健かつ必要な程度を上まわる（excess）クリアランス（第 6.3 章）により妥当性が示されない限り、精

ICH Q5A (R2) ガイドライン

製バルクごとに製造用ウイルス否定試験を実施する必要がある。この場合、少なくとも3バッチの精製バルクの試験により、残存する製造用ウイルスの否定を確認すべきである。

6. ウイルスクリアランスの工程評価及び工程特性解析

ウイルス不活化又は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等の安全性を確立するために重要である。ウイルス汚染の過去の事例は、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原料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、ウイルススクリアランスに関する評価を行っておくことにより、未知・不測の有害ウイルスを除去できることへの一定限の信頼性が強化される。ウイルス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。

細胞基質中に内在することが知られているウイルス、あるいは製造用ウイルスを使用した結果として存在することがわかっているウイルスのスクリアランスを実証するため、また、検出できなかったり、製造工程に迷入する可能性のある外来性ウイルスがスクリアランスされることを保証するために、ウイルススクリアランス工程の特性解析／評価を実施する。ウイルススクリアランス試験の目的は、(1) 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、(2) 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で得られる工程中間体に、しかるべき量のウイルスを意図的に添加（すなわちスパイク）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ス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、ウイルスの不活化又は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考慮しておくべきである。製造業者は、ウイルス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。必要があれば、精製工程に投入されるウイルス粒子の量を測定するために、3つの細胞培養ロット／バッチについて定量試験を実施する必要がある。このデータは、製造販売承認申請資料の一部として提出すること。

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 6.2.5 章参照）。

上記のような、細胞等に存在が知られたウイルスを対象とするウイルス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除去又は不活化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。多様な生化学的及び生物物理学的特性を有するウイルスを用いる試験の目的は、特定のウイルスの不活化又は除去の目標を達成するためではなく、未知又は予測できないウイルスを不活化／除去する手法の頑健性を特性解析することである。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 6.3 章を参照）。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、ス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。

6.1 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

ス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、本ガイドラインに示された工程評価試験及び工程特性解析試験の目的に従って、ウイルスの選択の妥当性を説明する必要がある。

6.1.1 「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(1)「関連ウイルス」、(2)「特異的モデルウイルス」及び(3)「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に関する工程評価試験に用いられるものである。下流工程がこれら「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近縁のウイルス、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又は RVLP 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。このようなげっ歯類由来の細胞株から得られた生産物からげっ歯類レトロウイルスを不活化／除去する能力を製造工程が有していることを明らかにしておく必要がある。そのためには、げっ歯類由来の細胞の場合、マウス白血病ウイルス(Murine Leukemia Virus)を「特異的モデルウイルス」として用いることができる。

CHO細胞由来製品については、CHO細胞由来の内在性ウイルス粒子もウイルスクリアランス試験に用いることができる。これらの粒子に対して感染性試験は実施できないため、検出試験(例：分子生物学的手法や生化学的手法)を使用する際は、使用目的に対する適格性を評価すること。エプスタインバーウイルス(Epstein-Barr Virus)によりBリンパ球を不死化することで得られた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、クリアランス工程の頑健性(robustness)を評価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。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。物理的处理や化学的处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、細胞株の品質と特性解析、及びどのような製造工程であるかに依存する。一般に、特性の異なる少なくとも3種類のウイルスを用いて工程のウイルスクリアランス能を評価すべきである。

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1及び表A-1に示す。

6.1.2 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。

- 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。
- 使用するそれぞれのウイルスの検出に関して、評価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。
- 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。

6.2 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

6.2.1 施設とスタッフ

製造施設に意図しない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モデルの設計と準備に関与し、特定の工程に経験を有する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。

6.2.2 製造工程のスケールダウンモデル

スケールダウンモデルの妥当性は実証されるべきであり、実際の製造工程をできる限り反映したものとすべきである。スケールダウンモデルはまた、ウイルススクリアランスの頑健性（すなわち、負の影響なしに原料のばらつきや工程変更を許容する工程又は工程ステップの能力）も考慮すべきである。このような観点から、関連するパラメータのワーストケース条件下でウイルススクリアランス試験を実施することが望ましい。また、ウイルススクリアランスの頑健性を証明し、潜在的な製造変更に備える目的で、条件を操作範囲外にすることがあっても許容できる。スケールダウンモデルの性能が製造工程の性能に相当するものであることを示す必要がある（例：収率及び純度が同等）。クロマトグラフィー工程については、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）、緩衝液やカラム樹脂の種類、pH、温度、導電率、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、クロマトグラムも同様のものが得られなければならない。その他の手法にも同様な考え方を適用すること。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。

6.2.3 ウイルスクリアランスに関する製造段階毎の解析

ウイルス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の評価の実施を考慮すること。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検討する必要がある。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工程中間体にウイルスを添加する。場合によっては、開始前の工程中間体に高力価のウイルスを添加し、その後の工程間のウイルス濃度を試験することで妥当性が得られることがある。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。ウイルス不活性化能を有するような緩衝液を製造工程中で使用している場合、並行してウイルス不活性化能の低い緩衝液（例：pH 調整緩衝液）を用いてスパイク試験を行うというような代替的な方策をとり、これを総合評価の一部に加えてもよい。緩衝液そのもののウイルス不活性化能の評価は、別のスパイク試験として実施しても良い。ウイルス粒子の分離・分画を測定する目的であれば、感染性を指標としない定量試験を適用してもよい。評価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：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（付録2参照）

一般原則として、ウイルスクリアランスの再現性は、既に得られている知識（第6.6章参照）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回の独立した試験で確認されなければならない。2回の独立した試験は、同じ場所で同じ試験設定により同一ロットの工程内材料を用いて実施することができるかもしれないが、この2回の独立した試験が全く同じように実施されることは期待されない。

6.2.4 不活化と物理的除去の区別

感染性ウイルス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メカニズムが不活化によるのか除去によるのかを推定し、記載すること。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ある場合（すなわち、いくつかのクロマトグラフィー工程で共通して使用される緩衝液が不活性化に寄与する場合）、それぞれのクロマトグラフィー工程で達成されるクリアランスとは区別すべきである。

6.2.5 不活性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、工程中間体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。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点は取ることを勧める。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RVLP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、通常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（例えば、より低濃度の不活性化剤を用いた検体）により示す必要がある。

6.2.6 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ィー用樹脂と膜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。クロマトグラフィー担体／樹脂の耐用期間を示し、ウイルスクリアランスに影響を及ぼす可能性のある潜在的パラメータを規定すること。担体／樹脂の再利用を裏付けるウイルスクリアランス試験を実施すること。

プロテイン A アフィニティーキャプチャークロマトグラフィーについては、ウイルス除去効果はクロマトグラフィー担体／樹脂が使用済み（例：樹脂寿命末期）であっても影響を受け

ないか、わずかに増加することが既に得られている知識により確認されている。そのため、使用済み樹脂を用いて製品個別の試験を実施する必要はない。既に得られている知識は、ウイルスクリアランスに関わる他の種類のクロマトグラフィー（例：陰イオン交換又は陽イオン交換クロマトグラフィー）にも適用できる。したがって、他のクロマトグラフィータイプで樹脂の再利用を裏付けるのに、寿命末期の樹脂を用いた製品個別のウイルスクリアランス試験を必要としないと考えられる場合は、社内経験を含む同等の既に得られている知識及び詳細な妥当性の説明を提出すること（第 6.6 章）。

クロマトグラフィー担体／樹脂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がすべて適切に不活性化又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、ウイルスクリアランス評価中に、洗浄手順や再生手順でウイルスが不活化／除去されることを示すことによって、そのような保証としてよい。この保証は、既に得られている知識によって補強されることがある。

6.2.7 特別な留意事項

以下の具体的な留意事項を考慮に入れること。

- 高純度で濃縮されたウイルス保存液をスパイクに使用することは、工程中間体の希釈を最小限に抑えるだけでなく、工程の性能に影響を及ぼす可能性のある実際の工程を反映していない不純物の混入を減らすためにも有用である。ただし、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るために、実際の製造での状況を反映しなくなる可能性が生ずる。
- 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。
- 測定に至るまでの試料の希釈、濃縮、ろ過あるいは保管等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、試験においては並行した対照コントロール実験を含むべきである。
- 添加（スパイク）するウイルスは、製品の特性を変えたり希釈することがないように少ない容量で製品に添加されるべきである。
- 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影響を及ぼす可能性についても留意すべきである。
- ウイルスの不活化は時間に依存するため、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滞留する時間の長さは、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。
- 緩衝液や目的産物は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。緩衝液が指標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かもしれないし、又は第 6.6 章で述べたように、既に得られている知識が適用できる可能性もある。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。例えば、透析、保存等、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。
- ウイルスゲノムの定量に分子生物学的手法を使用する場合、カプシドに包まれていない核酸の影響を考慮する必要がある。特定の工程で除去される完全なウイルス粒子とは異なる可能性があるからである。

- 多くの精製工程は、同じ又は類似の緩衝液又はカラムを複数の精製段階で使用する。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、このような求め方の妥当性を示す必要がある。例えば、特定の工程によるウイルス排除の効果は、その方法が使用される製造段階や、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って変化する可能性がある。
- 総ウイルスクリアランス指数は、製造条件や緩衝液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過大評価又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当な試験計画のために過大評価される場合もある。

6.3 ウイルスクリアランス試験の解釈

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 F のようにウイルス汚染がみられる場合、当該ウイルスが除去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、最終製品のウイルス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あるいは不活化されたウイルスの量は、下流工程に持ち込まれる可能性のあるウイルス量と比較されるべきである。

この比較をする上で、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 TEM や同等の定量的 NAT 法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回る量のウイルスを排除することができるはずである。ウイルスクリアランス指数の計算に関しては付録 3 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 4 を参照すること。製造業者は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。

- 試験で評価されたウイルスの適切さ
- クリアランス試験のデザイン
- 達成されたウイルスクリアランス指数
- ウイルス不活化の時間依存性
- 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
- ウイルスアッセイ法の感度
- ある不活化／除去工程が特定の種類のウイルスに特に有効である可能性、選択性

潜在的なウイルス（潜在的な外来性ウイルスによる汚染、内在性ウイルスや製造用ウイルス）を幅広く除去する下流工程を設計することが推奨される。またその際は、実施が可能であり製品に負の影響を及ぼさない限りは、それぞれの作用機序を補完する 2 つの異なるウイルスクリアランス工程ステップを設定し、そのうちの 1 つの工程ステップでは、非エンベロープウイルスを効果的に除去するものであることが望ましい。有効なウイルスクリアランス工程は、通常、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 $4 \log_{10}$ 以上の再現性のある低減を示す。しかし、 $1 \sim 3 \log_{10}$ の再現性のある低減を達成する工程は、ウイルス安全性に寄与しているため、全体的なウイルスクリアランスの評価において考慮に入れて

もよい。有機溶媒／界面活性剤処理、界面活性剤単独による処理、又は低 pH 条件下での保持といったウイルス不活化／除去に特化した工程ステップは、広範囲のエンベロープウイルスの除去に非常に有効である。また、ウイルスろ過はウイルスのサイズに基づいてウイルスを除去する。パルボウイルス又はポリオマウイルスのような小型ウイルスに対しては、小型ウイルスの除去用に設計されたウイルスフィルターによるろ過も有効なウイルスクリアランス工程ステップである。最後に、mAb を精製するためのプロテイン A キャプチャークロマトグラフィー工程後に低 pH 条件下で保持することにより、MLV 及び仮性狂犬病ウイルスが効率的に不活化されることがこれまでの経験から示されている。

許容可能な全体的なウイルスクリアランスは、例えば、相互補完的な不活化工程が 2 段階以上ある場合、相互補完的な除去（分離）工程が複数ある場合、あるいは不活化と除去工程が複数組み合わせられたような場合に達成される。ウイルスの除去法は、個々のウイルスが持つ極めて特異的な物理化学的特性に大きく依存する場合がある。このような特性がクロマトグラフィーの固定相（樹脂や膜クロマトグラフィー用膜等）との相互作用や沈降特性に影響するためである。そのため、「モデルウイルス」が「関連ウイルス」とは異なる機序により分離される可能性がある。除去に影響する製造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。こうした変動要因にもかかわらず、相互補完的な除去工程の組み合わせ、あるいは不活化工程と除去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、ろ過工程及び抽出工程等のような除去工程で、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。

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、ウイルス量の除去が $1 \log_{10}$ 未満であれば無視できると考えられ、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 つ又は複数の特定の不活化／除去工程不活化／除去工程を追加導入すべきである。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。結果を評価する際には、上記の要因を考慮すること。

6.4 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関わる様々な要因が、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。

- 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、特定の細胞を培養することにより製造される。製造工程におけるこのようなスパイクされたウイルスの挙動は、細胞培養培地中の生物原料由来のウイルス汚染物質の挙動や製造細胞中での複製における本来のウイルスの挙動とは異なる可能性がある。例えば、スパイクに使用されるウイルスの粒子と、各工程中間体からの本来のウイルスでは純度や凝集の程度が異なる場合等が考えられる。
- 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。最初の不活性化工程で不活化を免れたウイルスは、次の不活性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場合、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。

- 工程全体のウイルスの除去又は不活化能力は、対数で表された各精製段階での減少度の総和で示される。しかし有意な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ため、加算しないこと。また、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。さらに、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を加算する場合は、合理的な理由を示すこと。
- 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、1 mL 当たり $8 \log_{10}$ 感染単位を含む標品の感染性が $8 \log_{10}$ 低減したとしても、試験の検出限界をも考慮すれば、1 mL 当たり $0 \log_{10}$ 、すなわち 1 感染単位を残していることになる。
- 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、スケールダウン工程で実施したウイルスクリアランスのバリデーション試験の際の処理は、実生産スケールでの処理と違いが生じる可能性がある。

6.5 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 2 参照）。

6.6 ウイルスクリアランスの評価に関する既に得られている知識（Prior Knowledge）の適用

一般的な原則として、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製品固有の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により（すなわち、同一のプラットフォーム技術を用いて）類似の製品を開発している場合は、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、同一の処理工程を用いた新規製品の製造に適用できる場合がある。しかし、他製品の工程のデータを利用するためには、その処理工程について十分に理解していなければならない。そのため、特定の処理工程についての既に得られている知識を他製品の製造に適用することの妥当性を明確に示す必要がある。社外及び社内での経験に基づく既に得られている知識を適用する際は、以下に概説する要点を全て満たすこと。

- ウイルスクリアランスの機序を理解していること。
- ウイルスクリアランスに影響を及ぼす可能性のある工程パラメータを包括的に理解していること。
- ウイルスと製品との相互作用がウイルスクリアランスに影響を及ぼさないことを明確にすること。ウイルスと製品の相互作用がウイルスクリアランスに影響を及ぼす潜在的リスクがある場合、他の製品の製造から既に得られている知識を適用するには、妥当性を示すこと。特定の工程について複数の製品のデータが入手可能な場合、ウイルス減少の有効性はそれぞれのケースで同等であるべきである。
- 特定の工程中間体の組成は、ウイルスクリアランスに影響を及ぼす可能性がある。工程によっては、例えば緩衝液、培地、試薬及び不純物プロファイル等のわずかな差異であっても、ウイルスクリアランスに影響を及ぼす場合がある。そのため、工程中間体の組成について、既に得られている知識を他製品の製造に適用することの妥当性を明確に示すこと。新規及び既存製品における特定の段階の前の工程処理は、工程中間体の組成に関してウイルスクリアランスの頑健性を示す既に得られている

知識がない限り、同様の戦略に従うこと。

- 特定の製品に既に得られている知識を適用する場合には、第 6.4 章に概説するウイルスクリアランス試験についての一般的な制限事項を考慮に入れること。

社外の既に得られている知識（公表データを含む）から、ウイルスの不活化／除去工程の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の重要工程パラメータを規定する際、また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を設定する際にも用いることができる。ワーストケース条件下でウイルスクリアランス試験を実施することは、製品個別の試験の数を減らすことに繋がる。しかし、公表されているウイルスクリアランス指数を特定の製品に適用する場合には、関与する異なる製品の製造について工程の類似性、工程中間体の類似性、及び製品固有の特性がウイルス低減に影響を及ぼさないことを保証することなどの既に得られている知識としての裏付けが必要である。したがって、公表されているデータについては、慎重に評価し、所定のプラットフォームに関する組織内部の経験（組織内の既に得られている知識）で補完すること。

製品個別の試験を行わずにウイルスクリアランスデータが許容できるかどうかの判断は、細胞基材及び原料の性質及び特性、包括的なウイルスクリアランス戦略を含むバイオテクノロジー応用医薬品等の全体的なウイルス安全性戦略を考慮しながら、ケースバイケースで行う。データパッケージにより既に得られている知識の妥当性が十分に裏付けられない場合は、製品個別のウイルスクリアランス試験を実施すること。

既に得られている知識を使用してクリアランス指数を想定する場合は、関連するプラットフォームデータから得られたすべてのクリアランス指数を考慮して、主張の妥当性を示す必要がある。工程のウイルスクリアランス能を過大評価するリスクを避けるために、慎重なクリアランス指数の主張が推奨される。

付録 5 に、現行の工程知識に従い、他製品におけるウイルス減少データに関する組織内経験を含む既に得られている知識を、同一の製造プラットフォームで製造する新製品のクリアランス指数を主張するために使用できる場合を示す。

6.7 ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合

上流製造工程又は下流製造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評価する必要がある。例えば、上流製造工程の変更により、細胞株が産生す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、処理工程を変更すると、ウイルスクリアランスの程度が変わる可能性がある。

製品ライフサイクルマネジメントにおける、ウイルスクリアランスの有効性に影響を与える可能性のある製造工程の変更は、組織内部の知識及びプラットフォームの基準となる考え方をを用いて評価することができる。他製品についての内部の知識（組織内での経験）を特定の製品に外挿できない場合や、プラットフォームの考え方を適用できない場合は、製品個別のウイルスクリアランス試験を実施すること。

7. 連続生産を行う場合に考慮すべき点

連続生産（CM）では、一連の連結された複数の単位操作からなる製造工程への投入原料の連続供給、工程内での変換及び工程からの生産物（すなわち、製品）の連続的な排出を伴う。連続生産（CM）は製造工程の一部又はすべての単位操作に適用できる。各単位操作に

加え、統合された工程及びその動的特性（dynamics）を理解することは、ウイルス安全性に対するリスクを特定し、軽減するために不可欠である。タンパク質医薬品の製造のための連続生産（CM）工程モードの説明は、ICH Q13（付録 III）に示されている。

ウイルス安全性に関して、連続生産（CM）の技術的側面は、例えばウイルスの検出及び除去のアプローチ、原料のトレーサビリティ、工程の動的特性、工程のスタートアップ／シャットダウンにおけるモニタリング頻度等の点で、バッチ生産工程で遭遇する技術的側面とは異なる可能性がある。

しかし、工程理解に基づく基本原則及び期待事項（科学及びリスクに基づくアプローチ並びにウイルス汚染リスクを管理するためのそれらの実施等）は、バッチ生産の場合と同じである。これには汚染防止戦略も含まれる（第 2.2 章参照）。例えば、バッチ生産工程の経験又は既に得られている知識に基づくウイルスを不活化又は除去するための物理的、化学的条件は、連続生産（CM）工程においても適用できる可能性がある（第 6.6 章参照）。

7.1 連続生産におけるウイルス安全性

連続生産（CM）工程におけるウイルス安全性戦略は、潜在的な汚染源（出発物質、原材料及び長期間の細胞培養等）、製造工程のウイルス除去能及びウイルスが否定できることを保証できる試験能力についてのリスクアセスメントに基づき設定すること。第 3 章及び第 4 章に記載された試験に関するガイダンスも連続生産（CM）に適用可能と考えられる。リスクアセスメントに基づき、製造中に汚染がないことを示すために実施する外来性ウイルス試験の種類及び頻度を含めた戦略を策定すること。

7.2 連続生産におけるウイルスクリアランスについての一般的な留意事項

製造工程及びウイルスクリアランス試験の設計の際には、以下の点を考慮に入れること。

- 製造工程は部分的に統合（連結）、又は連続モードで行う場合があり、適切な場合は、バッチ生産工程から得られたウイルスクリアランス性能の科学的理解を単位操作の評価に使用することができる（第 7.3.2 章参照）。
- ウイルスクリアランス能への影響を検討し対処するために、各単位操作及び装置間の接続（例：流速の差異や投入材料の不均一性を低減するための、単位操作間でのサージタンクや混合タンクの使用）の潜在的リスクを評価すること。
- a) プロセス外乱（例：ウイルスクリアランスに影響を及ぼす圧力／送液遮断）及び b) 外来性ウイルス汚染を検出するために、適切なプロセスモニタリングを実施すること。外乱による最終的な影響は、事象の種類によって異なる可能性があり、ケースバイケースで対処すべきである。

リアルタイムの意思決定を実施する場合は、a) 外乱がウイルスクリアランスに及ぼす影響、又は b) 汚染が工程から排出された生産物の品質及び製品に及ぼす影響を判断する手順を含める必要がある。これらの留意事項に基づいて、生産物の流れから不適合の恐れのある物質を系外排出又は処分することを考慮すること（第 4 章）。

- ウイルスクリアランス試験を設計する際は、該当する場合、以下の潜在的影響を考慮に入れること。
 - 投入原料の特性の変動（例：タンパク質又は不純物の濃度及び均一性、凝集の程度）
 - 滞留時間

- 計画されたイベント（例：工程のスタートアップ、シャットダウン及び一時停止）及び計画されていない一時的イベント（例：外乱）
- 稼働中の試料負荷能力
- マルチカラムサイクルやシリアルローディング等の新しいローディング戦略
- ウイルス管理戦略

7.3 連続生産におけるウイルスクリアランスに特有の留意事項

連続生産（CM）には、ウイルス安全性に関して以下に述べるような考慮すべき特有の側面もある。

7.3.1 生産培養期間の延長に関連する潜在的リスク

内在性レトロウイルス濃度は生産培養において経時的に変動する可能性があるため、製剤の投与量当たりのリスクファクターの算出に影響を及ぼさないように適切なサンプリング戦略を策定して評価すべきである（細胞株の適格性については、第 4 章及び第 3 章の留意事項を参照）。

7.3.2 ウイルスクリアランス試験 へのアプローチ

連続生産（CM）工程では管理できた状態（State of Control）を維持することが期待されるが、製造工程には、スタートアップ、終了時及び外乱の際に工程生産物が変動する可能性がある期間が含まれる（例：ウイルス汚染の場合、短時間にウイルス負荷が高くなる可能性）。このような期間のリスクは本ガイドラインの他の箇所で取り上げられている（第 6.2 章）。

さらに、装置設計とシステム統合によっては、2 つ以上の連結された単位操作の同時バリデーションもオプションとなりうる。

CM に特有の留意事項は以下の通りである。

- クロマトグラフィー
 - 繰り返し実施されるサイクル（例：マルチカラム処理）では、十分に妥当性が示された目標工程条件（例：流速、樹脂充てん量に対するオーバーロード、樹脂の洗浄性）においてバッチ生産工程をスケールダウンモデルとして使用することができる。第 6.2.2 章のスケールダウンについてのガイダンスも参照のこと。
 - 接続された 2 つ以上のクロマトグラフィーステップのバリデーションを考慮することもできる（例：陽イオン交換クロマトグラフィーの吸着及び溶出モードと陰イオン交換クロマトグラフィーのフロースルーモード）。連結された単位操作において、投入する物質に関して実生産製造時の操作条件が十分に反映されていれば、オプションとして、従来のバッチ生産工程のスケールダウンモデルを用いてウイルスクリアランスを評価してもよい。
- ウイルス不活化
 - 妥当性が十分に説明された目標工程条件においては、バッチ生産工程としてのバリデーションを行うことができる。
 - ウイルス不活化（例：pH 処理及び有機溶媒／界面活性剤による処理）につ

いては、関連する動的工程パラメータの管理を確実に行う必要がある（例：pH、有機溶媒／界面活性剤濃度、均一性及び混合、温度、滞留時間分布）。

- スケールダウンモデルを動的工程におけるウイルス不活化に適用する場合は、工程の動的特性（例：滞留時間分布）及び管理戦略に及ぼすスケールの影響の評価／妥当性の立証は慎重に行うこと。
- ウイルスろ過
 - ウイルスクリアランスに影響を及ぼすパラメータの設定がウイルススクリアランス試験で試験された範囲を超えて変動しない場合（例：ワーストケースの設定値）、バッチ生産工程としてのバリデーションが適切である場合がある。
 - ウイルスクリアランス能を継続しながら、フィルターの交換やフィルター使用後の完全性試験を可能にするための工程管理を規定する必要がある。

8. まとめ

本ガイドラインは、製品のウイルス汚染リスクの評価、潜在的なウイルス汚染源の管理、及びウイルススクリアランスに対する製造工程の適格性評価に関して、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等を製造するために推奨されるアプローチを示す。このような管理及びスクリアランスのアプローチには以下のようなものがある。

- 出発素材である細胞基材につき徹底的な解析と試験を行い、どのようなウイルス混入があるかを確認すること。
- ヒト細胞指向性の判定又はヒトへの感染についての知見によりウイルス汚染の潜在的リスクを評価すること。
- 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。
- 適切なウイルススクリアランスプログラムを設定すること。
- 同一の製造工程中に使用する各種のウイルス除去／不活化の異なる方法について周到なウイルススクリアランス試験の計画を立てて、試験を実施すること。

9. 用語解説

外来性ウイルス (Adventitious Virus)

意図せずに迷入した汚染ウイルス。「ウイルス」を参照すること。

細胞基材 (Cell Substrate)

バイオテクノロジー応用医薬品等の製造のために用いられる細胞。

対照細胞 (Control Cells)

ウイルス／ウイルスベクターのシードを接種することなく、ウイルス又はウイルスベクターの生産と並行して培養される細胞。対照細胞は、同じバッチの培地の使用や培地の交換

を含め、製造用細胞の培養に使用される条件と本質的に同等の条件で維持される。

製造終了時の細胞 (EOPC) (End of Production Cells)

MCB 又は WCB から（製造で使用するものと同等の条件で）製造終了時の継代レベル又は細胞数倍加レベルと同等又はそれを超えるレベルまで培養したもの。状況によっては、培養期間も測定される。EOPC はエクステンディッド・セルバンク (Extended Cell Bank、ECB) と呼ばれ、EOPC と ECB の用語は LIVCA 細胞と同じ意味で使われる。

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生殖細胞系列の一部であり、親細胞株の起源動物のゲノム中に安定的に組み込まれたレトロウイルス。本文書中では、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) 又はウシ乳頭腫ウイルス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もこの範疇に当てはめる。

エクステンディッド・セルバンク (ECB) (Extended Cell Bank)

MCB 又は WCB から培養された細胞で、計画した製造に使用される *in vitro* 細胞齢まで又はそれ以上増殖させたもの。EOPC と呼ばれる。

In Vitro 細胞齢 (In Vitro Cell Age)

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 (population doubling level)、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。

In Vitro 細胞齢の上限 (LIVCA) 細胞 (Limit of In Vitro Cell Age (LIVCA) Cells)

LIVCA 細胞は、MCB 又は WCB を増殖させることにより、計画した製造に使用される *in vitro* 細胞齢まで又はそれを超えて培養された製造用細胞から得られる。LIVCA 細胞は EOPC 又はエクステンディッド・セルバンク (ECB) と呼ばれることもあり、これらの用語は互換的に使用することができる。

不活化 (Inactivation)

化学的又は物理的处理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、細胞基材又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、複数の容器に分注され、適切な条件下で保存される。

マスターウイルスシード (MVS) (Master Virus Seed)

MVS (ストック、ロット又はバンク) は、ベクターウイルス、ウイルスベクター又は製造用ウイルス（すなわち、ヘルパーウイルス又はウイルスタンパク質発現ベクター）の調製品で、直接又は WVS を経て将来の製造の全ての起源となる。単一の培養工程に由来する均一な組成（ただし、クローン性である必要はない）の生きたウイルスの調製品であり、適切な保存容器に分注され、適切な条件下で保存される。

最短曝露時間 (Minimum Exposure Time)

ある処理ステップが維持される最短時間。

次世代シーケンシング (NGS) (Next Generation Sequencing)

ハイスループットシーケンシング、超並列シーケンシング、又はディープシーケンシングとも呼ばれる、既知及び未知の外来性ウイルスを標的・非特異的に (non-targeted/agnostic) 検出するのに広範な能力を有する複数の段階からなる核酸解析技術。場合によっては、シーケンシング戦略又はバイオインフォマティクス解析により既知のウイルスの標的・特異的検出に NGS を使用することができる。

プラットフォーム製造 (Platform Manufacturing) (ICH Q11)

同一の申請者が同じタイプの他の医薬品等を製造するために使用したことがある、同様の製造工程からなる新医薬品等の製造戦略に関する開発の方法論 (例えば、あらかじめ確立されている宿主細胞、細胞培養、及び精製工程を利用した、すでに十分な経験のある mAb の製造)。

プラットフォームバリデーション (Platform Validation)

本ガイドラインでは、ウイルスクリアランスについて実施する工程プラットフォームのバリデーションのことを指す。また本文書ではプラットフォームバリデーションとは、現行の工程知識に従い、他製品から得られたウイルス減少データ等社内経験を含む既に得られている知識を使用して新規の類似製品のウイルスクリアランスを主張することと定義される。

既に得られている知識 (Prior Knowledge)

既に得られている知識とは、これまでに得られた既存の知識を指し、組織内部の知識 (例：開発や製造の経験)、社外知識 (例：供給元から提供されるデータ、文献、査読つき論文を含む科学技術出版物) 又は立証された科学的原則 (例：化学、物理学、工学原理) の適用等が含まれる。

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

「非特異的モデルウイルス」を用いて、ウイルスの不活化／除去を行う製造工程の頑健性を評価検討す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)

「関連ウイルス」や「特異的モデルウイルス」を用いて、製造工程のウイルス不活化／除去能力を測定す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の頑健性 (Process Robustness of Viral Clearance)

「頑健性」という用語は、ウイルスクリアランス工程の2つの異なる特性の内の1つ又は両方の特性を説明するために用いられる。1つ目の特性は、ウイルスクリアランスに負の影響を及ぼすことなく、材料の変動や工程の変更に耐えられる能力である。2つ目の特性は、広範囲の特異的及び非特異的モデルウイルスを排除する能力である。

製造用細胞 (Production Cells)

バイオテクノロジー応用医薬品等を製造するために用いられる細胞基材。

精製バルク (Purified Bulk)

精製バルクという用語は、精製工程の最終段階にある物質を指す。ほとんどの場合、これは原薬を意味するが、試験法への干渉を避けるため、賦形剤を含まない精製物を代わりに使

用することもある。

製造用ウイルス (Production Virus)

製造用ウイルスとは、工程関連ウイルスで、ヘルパーウイルスやタンパク質発現ウイルスベクターを含むことがある。

ヘルパーウイルス (Helper Virus)

共感染により複製不全のウイルスの複製を可能にするヘルパー機能を提供するウイルス。

タンパク質発現ウイルスベクター (Viral Vector for Protein Expression)

バキュロウイルスのような遺伝子組換えウイルスで、遺伝子組換えタンパク質又はウイルス様粒子を発現させるため、あるいはウイルスベクターを製造するために使用できる。

補完試験法 (Supplementary Test Method)

従来の試験法を補強する目的で追加データを提供するために用いる試験方法。

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、バイオリアクターからの培養液のみからなる場合もある。

ウイルスクリアランス (Viral Clearance)

ウイルス粒子の除去又はウイルス感染性の不活性化。

ウイルスベクター (Viral Vector)

バイオテクノロジー応用医薬品等として *in vivo* で使用される、又はその他の先進的な治療用途のために *ex vivo* で使用される遺伝子組換えウイルス。

ウイルスベクター由来製品 (Viral Vector Derived Product)

バキュロウイルスなどの、製造用ウイルスベクターと呼ばれる遺伝子組換えウイルスによってコードされ、発現される製品。

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 または DNA のいずれか) を有し、成長も分裂もせず、それらの遺伝物質が細胞内で複製する感染単位。

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 (すなわち下流工程の頑健性 (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。

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。

複製可能ウイルス (RCV) (Replication Competent Virus)

ウイルスベクターとトランス相補的ウイルス配列との遺伝子組換えにより、複製可能ウイルスを作成する。

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近縁のウイルス。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。

ウイルス様粒子 (Virus-Like Particles)

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。ウイルスゲノムを含んでいるものもあれば、含んでいないものもある。

ワーキング・セルバンク (WCB) (Working Cell Bank)

WCB は、規定された条件下で MCB を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。

ワーキングウイルスシード (WVS) (Working Virus Seed)

WVS (ストック、ロット又はバンク) は MVS から作製する。

10. 参考資料

ICH Q2(R2)/Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation

ICH Q11: Development and Manufacture of Drug Substances

ICH Q13: Continuous Manufacturing of Drug Substances and Drug Products

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 ^a	+	-	+
レトロウイルス以外の内在性ウイルス試験 ^b	適宜実施 ^b	-	適宜実施 ^b
外来性ウイルス試験			
<i>In vitro</i> 試験又は NGS ^e	+	+ ^c	+ ^c
<i>In vivo</i> 試験又は NGS ^e	+ ^d	-	+ ^d
特定のウイルスの試験 ^f	適宜実施 ^f	-	-

a. 詳細は第 3.2.1 章を参照のこと。

b. 細胞株がこのような因子を含有していることが知られている場合に適宜実施。

c. *In vitro* ウイルス試験は、WCB を直接用いて、又は WCB から直接作製された LIVCA の細胞を用いて実施する。

d. *In vivo* 試験はリスクアセスメントに基づいて実施される場合がある。残存リスクが存在する場合には、MCB 樹立時や LIVCA 細胞培養時に迷入した可能性のあるウイルスを検出するために、検査の継続や標的非依存的 NGS への代替を検討することもできる。詳細は第 3.2.3 章を参照のこと。

e. 標的非特異的 NGS は、*in vivo* 試験の代替試験（第 3.2.3 章）、及び *in vitro* 試験の補完試験又は代替試験（第 3.2.2 章）として用いることができる。

f. 試験は、細胞基材の起源と履歴、ヒト又は動物由来の原材料への潜在的な曝露を含むリスク評価に基づいて行われる。培養細胞を用いる感染性試験、抗体産生検査（MAP、HAP、RAP）、ウイルス特異的 NAT、又は、例えば NGS 等の他の分子生物学的手法を用いることができる。詳細は第 3.2.4 章を参照のこと。この試験には種特異的なウイルス試験、例えば、昆虫細胞のアルボウイルス、血清やトリプシンを使用する場合はウシやブタウイルス等が含まれる。生産に使用される細胞基材中のウイルス検出のために取るべき措置については、表 4（ケース B、C、E）を参照のこと。

表 2. ウイルス試験に用いられる試験法の例とその限界

試験方法	試験検体	検出可能な検体	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。
<i>In vivo</i> ウイルス試験	溶解処理後の細胞／培養液	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。
<i>In vitro</i> 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。
1. セルバンクの試験	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. 製造工程中での試験	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		
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。
1. セルバンクの試験	1. 生細胞		ウイルス粒子の定性的評価
2. 製造工程中での試験	2. 細胞フリー材料		定量的評価（ウイルスクリアランス評価）
逆転写酵素活性（RT）試験（PERT 法等）	細胞フリー培養上清	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がある。
1. セルバンクの試験			
2. 製造工程中での試験			
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	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. 感染性による場合			1. 「レトロウイルス（RV）感染性試験」を参照
2. TEM による場合			2. 「電子顕微鏡観察（TEM）」を参照 ^a
3. RT による場合			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	特異的ウイルス塩基配列	プライマーの配列と対応する配列の

ICH Q5A (R2) ガイドライン

1. セルバンクの試験 材料
2. 製造工程中での試験

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。

NGS

細胞、培養液及びその他の 広範なウイルス塩基配列材料

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。

- a. 加えて、指標細胞から試験検体を識別することが困難な場合がある。

表 3. 抗体産生試験において検出されるウイルス^d

MAP	HAP	RAP
エクトメリアウイルス (Ectromelia Virus) ^{b,c}	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic Choriomeningitis Virus, LCM) ^{a,c}	ハンタウイルス (Hantaan Virus) ^{a,c}
ハンタンウイルス (Hantaan Virus) ^{a,c}	マウス肺炎ウイルス (Pneumonia Virus of Mice, PVM) ^{b,c}	キルハムラットウイルス (Kilham Rat Virus, KRV) ^{b,c}
K ウイルス (K Virus) ^b	レオウイルス 3 型 (Reovirus Type 3, Reo3) ^{a,c}	マウス脳脊髄炎ウイルス (Mouse Encephalomyelitis Virus) (Theilers, GDVII) ^b
乳酸脱水素酵素ウイルス (Lactic Dehydrogenase Virus, LDM) ^{a,c}	センダイウイルス (Sendai Virus, SV) ^{a,c}	マウス肺炎ウイルス (Pneumonia Virus of Mice, PVM) ^{b,c}
		ラットコロナウイルス (Rat Coronavirus) ^b
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic Choriomeningitis Virus, LCM) ^{a,c}	SV5 ^{a,c}	レオウイルス 3 型 (Reovirus Type 3, Reo3) ^{a,c}
マウス微小ウイルス (Minute Virus of Mice) ^{b,c}		センダイウイルス (Sendai Virus) ^{a,c}
マウスアデノウイルス (Mouse Adenovirus, MAV) ^{b,c}		唾液腺涙腺炎ウイルス (Sialodacryoadenitis Virus, SDAV) ^b
マウスサイトメガロウイルス (Mouse Cytomegalovirus, MCMV) ^{b,c}		トーラン H-1 ウイルス (Toolan's H-1 Virus) ^{b,c}
マウス脳脊髄炎ウイルス (Mouse Encephalomyelitis Virus) (Theilers, GDVII) ^b		
マウス肝炎ウイルス (Mouse Hepatitis Virus, MHV) ^b		
マウスロタウイルス (Mouse Rotavirus, EDIM) ^{b,c}		
マウス肺炎ウイルス (Pneumonia Virus of Mice, PVM) ^{b,c}		
ポリオーマウイルス (Polyoma Virus) ^b		
レオウイルス 3 型 (Reovirus Type 3, Reo3) ^{a,c}		
センダイウイルス (Sendai Virus) ^{a,c}		
胸腺ウイルス (Thymic Virus) ^{b,e}		

- a. ヒト又は霊長類への感染性が知られているウイルス。
- b. ヒトへの感染性が知られていないウイルス。
- c. 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。
- d. PCR 等の NAT 法、標的特定の／標的非特定の NGS、又は他の分子生物学的方法を代わりに用いることができる。
- e. ネズミヘルペスウイルス 3 型 (murid herpesvirus 3) とも呼ばれる。

表 4. 細胞又は未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験結果に対して推奨される実施要領

	ケース A	ケース B	ケース C ^b	ケース D ^b	ケース E ^b	ケース F
[細胞や未加工／未精製バルクでのウイルス試験結果]						
外来性ウイルスの存在 ^a	-	-	+	+	+ ^c	-
ウイルス様粒子の存在 ^a	-	-	-	-	+ ^c	-
レトロウイルス様粒子の存在 ^a	-	+	-	-	+ ^c	-
ウイルスの同定	適用外	+	+	+	-	+
ヒト感染性ウイルス	適用外	- ^d	- ^d	+	未知	+ ⁱ
製造用ウイルスの存在	-	-	-	-	-	+
[必要とする対応]						
「非特異的モデルウイルス」を用いたウイルスクリアランス工程特性解析試験	必要 ^e	必要 ^e	必要 ^e	必要 ^e	必要 ^e	必要 ^e
「関連ウイルス」又は「特異的モデルウイルス」を用いたウイルスクリアランス工程評価試験	不要	必要 ^f	必要 ^f	必要 ^f	必要 ^g	必要 ⁱ
精製バルクでのウイルス否定試験	適用外	不要 ^j	必要 ^h	必要 ^h	必要 ^h	必要 ⁱ

- a. 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。通常、製造に用いる細胞培養物がウイルスに汚染されている場合は、特異的なウイルスクリアランス及びリスクアセスメントにより妥当性が示されない限り、使用すべきではない。ただし、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。
- b. ヒトにおいて感染性および／または病原性を有することが知られているウイルスに汚染された原料物質は、特異的なウイルスクリアランス及びリスクアセスメントを実施した上で、例外的な状況でのみ使用するべきである。
- c. 直接法あるいは間接法でウイルスを検出。
- d. 非病原性とされているケース。
- e. 「非特異的モデルウイルス」を用いたウイルスクリアランス工程特性解析試験を実施すること。
- f. 「関連ウイルス」又は「特異的モデルウイルス」を用いたウイルスクリアランス工程評価試験を実施すること。
- g. 本文中のケース E の項を参照すること。
- h. 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 ロット又は 3 バッチ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。
- i. ウイルスはヒトに感染する場合と感染しない場合がある。そのため製造用ウイルスについての工程評価を実施すること。製造用ウイルスの使用が不可能な場合は、特異的モデルウイルスを使用すること。製造用ウイルスを使用する場合は、少なくとも 3 ロット／バッチの細胞培養を用いて、未加工／未精製バルクの段階で製造用ウイルスを定量し、ウイルスクリアランスの目標値を決定すること。精製バルクにおいては、検出可能な製造用ウイルスが存在しないことを、「関連感受性細胞株」を用いて高感度ウイルス検出に適した感染性試験により確認する。あるいは、分子生物学的手法を用いてもよい。頑健なクリアランスにより妥当性が示されなければ、各精製バルクについて、残存製造用ウイルスの否定試験を実施すること（第 6.3 章）。
- j. ケース B の説明については、第 5 章を参照のこと。

付録 1： ウイルスクリアランス試験のためのウイルスの選択

1.1 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
 - ポリオーマウイルス (SV40 等)、動物パルボウイルス又はその他の物理的・化学的処理に対して抵抗性のある小型の非エンベロープウイルス。
 - 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～大型のエンベロープ RNA ウイルス。あるいは、非エンベロープウイルスの範囲を広げるために、レオウイルス (Reovirus)、SV40 又はピコルナウイルス (Picornavirus) のような別の非エンベロープウイルスを用いてもよい。
 - ヘルペスウイルス (例：単純ヘルペスウイルス (Herpes Simplex Virus-1)、仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies Virus))、その他の中～大型の DNA ウイルスなど。

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。

2. レトロウイルス様粒子を産生する細胞基材の場合には、マウスレトロウイルス類は「特異的モデルウイルス」として、通常、使用されている。また、マウス又はその他のげっ歯類の内在性レトロウイルス粒子を使用することもできる。

1.2 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 に示す。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、3 種類以上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。

ICH Q5A (R2) ガイドライン

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 (Virus)	科	属	宿主	ゲノム	外被	サイズ(nm)	形状	抵抗性 ^a
水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus、VSV) ^b	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) 又はオルトレオウイルス属 (Orthorubulavirus)	多種	RNA	有	100-200+	多様/球形	低
マウス白血病ウイルス (Murine Leukaemia Virus、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)	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) ^c	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) ^c	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
アデノウイルス2型又は5型 (Adenovirus Type 2 or Type 5) ^c	アデノウイルス科 (Adeno)	マストアデノウイルス属 (Mastadenovirus)	ヒト	DNA	無	70-90	正 20 面体	中
ベジウイルス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
脳筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis Virus、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 (Bovine Enterovirus、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
SV40	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	非常に高い
パルボウイルス (イヌ、マウス、ブタ) ^d	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	非常に高い

- 物理的・化学的処理に対する抵抗性（過去の製造工程研究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。
- 昆虫細胞で発見されたラブドウイルスの特異的モデルウイルス。
- ヘルパーウイルス又はウイルスベクターの製造において用いられるウイルスタンパク質発現ベクターの特異的モデルウイルス又は関連ウイルス。
- ウイルスフィルターのバリデーションでは、大型の球形/正 20 面体ウイルス及びエンベロープウイルスの単一のワーストケースのモデルウイルスとして使用することができる。

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 2: ウイルス及びウイルスクリアランス指数の評価に関す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、ばらつきが大きい問題がある。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、測定された感染力価はウイルス量に応じて連続的に変化する。定量法には分子生物学的手法やプラーク法などが含まれる。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、 $\pm 0.5 \log_{10}$ 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 $0.5 \log_{10}$ 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。工程開始前の試料のウイルス測定値の 95%信頼限界が $\pm s$ で、工程終了後の試料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%信頼限界は以下の通りである。

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

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、1 L 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。

$V \gg v$ 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 1 L 当たりの感染性粒子数とする。

又は、 $c = \ln p / -v$

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

c	1010	100	1000
p	0.99	0.90	0.37

このことは、1 L 当たりウイルス粒子が 1000 の場合、1 mL 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 3: 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

各除去段階あるいは不活化段階のウイルススクリアランス指数は次のように定義される。処理前の試料のウイルス負荷量と次の工程段階に供される処理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

処理前の試料:

体積 v' ; 力価 $10^{a'}$;

ウイルス含有量: $(v') \times (10^{a'})$

処理後の試料:

体積 v'' ; 力価 $10^{a''}$;

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、処理工程の開始時及び終了後の力価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 4： 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：

1. 仮説

精製工程に投入されるウイルス濃度（例えば、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 L (10^3 mL)

2. 1 投与量当たりの推定ウイルス粒子の計算方法

$(10^6 \text{ ウイルス単位}/\text{mL}) \times (10^3 \text{ mL}/\text{投与量})$

クリアランス指数 $>10^{15}$

$= 10^9 \text{ 粒子}/\text{投与量}$

クリアランス指数 $>10^{15}$

$= <10^{-6} \text{ 粒子}/\text{投与量}$

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。

上記のケースは、げっ歯類細胞からのモノクローナル抗体 (mAb) 又は他の遺伝子組換えタンパク質を製造する際に内在性レトロウイルスが減少する典型例である (ケース B)。特定のウイルスに対する包括的なリスクアセスメントでは、ウイルスの宿主域、ウイルスの感染性と病原性、汚染防止措置、試験方法、投与経路及びヒトへの感染量などの追加要因を考慮すべきである。

CHO 細胞についてのケース B のシナリオでは、内在性レトロウイルスは非感染性であると広く特性解析されていることから、試験で感染性レトロウイルスの存在が確認されなかった場合、mAb 又は他の遺伝子組換えタンパク質のレトロウイルス様粒子については、 $\leq 10^4$ 粒子/投与量が許容できると考えられる。

付録 5： 製品個別のバリデーションの削減における社内経験を含む既に得られている知識の適用の例

5.1 緒言

プラットフォームバリデーションのアプローチの一般原則に従い、同一プラットフォームから製造した製品全体について頑健なウイルスクリアランス工程が実施されていることを実証すること。また、ウイルスクリアランス工程は確立され十分に特性解析された条件下で実施すること。また、工程中間体の組成については、既に得られている知識により工程中間体の組成に関するウイルスクリアランス工程の頑健性が示されない限り、ウイルスクリアランス試験で用いられる中間体と同等／同質であることを示す必要がある。

また本文書では、プラットフォームバリデーションを、製品個別のプロセスバリデーションとは対照的に、他製品から得られたウイルスクリアランスに関する組織内経験（申請者が所有するデータ）を含む既に得られている知識を使用して新規の類似製品のウイルス除去率を主張することと定義する。一般に、組織内経験を含む既に得られている知識に基づき新製品のウイルスクリアランスを主張する場合は、利用可能なすべての関連プラットフォームデータの考察及びプラットフォームバリデーションのアプローチの適用を裏付ける根拠を示す必要がある（第 6.6 章参照）。製品個別のバリデーションを低減するために用いた既に得られている知識及び組織内データの一部は、新製品及びその製造工程と、その他の組織内製品、関連する工程条件及び工程中間体との比較データとして提出することができる。

ウイルスクリアランスに特化した工程ステップ（例えば、界面活性剤及び低 pH 処理による不活化、ウイルスろ過による除去）は、プラットフォームバリデーションのアプローチが適用可能である。

そのため、界面活性剤による異種指向性マウス白血病ウイルス（XMLV）の不活化、低 pH 条件下での保持、並びにウイルスろ過によるウイルス除去のための既に得られている知識の適用例を以下に示す。

これらの例は説明を目的として提示したものであり、プラットフォームバリデーションのアプローチをどのように適用できるかを示すものに過ぎず、テンプレートとして使用したり、規制当局への提出の唯一の根拠として使用してはならない。

表 A-2～A-4 に、製薬業界で適用されている広範な工程条件についての現在の理解に基づいた、個々の工程段階の工程パラメータ及びそれらの潜在的重要性についての要旨を示した。工程パラメータ及び中間体がウイルスクリアランスに及ぼす実際の影響は、既に得られている知識及び組織内経験により評価すること。

今後工程理解が深まれば、更なる工程段階を含めたプラットフォームバリデーションを考慮することができる。

5.2 有機溶媒／界面活性剤又は界面活性剤単独による不活化

作用機序の観点から、有機溶媒／界面活性剤（Solvent/Detergent、SD）又は界面活性剤単独による不活化の際の界面活性剤濃度は重要な工程パラメータである。

また、脂質、細胞の破片などの疎水性不純物、あるいは消泡剤などの細胞培養培地の成分は、ウイルスの脂質エンベロープを可溶化する際に界面活性剤や SD 混合物に競合することにより、ウイルス不活化に影響を及ぼす可能性があるため、評価すべきである。

現在のところ、ウイルスと特定の治療用タンパク質との相互作用が界面活性剤による不活

化に影響を及ぼすことは示唆されていない。しかし、凝集体（細胞破片や凝集ウイルス粒子など）は、ウイルス粒子を捉え、界面活性剤から保護する可能性がある。そのため、製造時には界面活性剤による不活化の前に、公称孔径が 0.2 µm 以下のフィルターを用いたろ過ステップなどを行い、工程中間体（例：ハーベストした細胞培養液（Harvested Cell Culture Fluid、HCCF））から細胞／細胞破片を取り除くこと。

以下の段落では、例として、SD 又は Triton X-100 を用いた XMLV の不活化についてのプラットフォームバリデーションアプローチの適用方法を説明する。このアプローチは、頑健で効率的な XMLV の不活化をもたらすことが示されている代替界面活性剤にも適用可能である。

Triton X-100 は、膜研究において脂質二重層を可溶化するために一般的に使用されている非イオン界面活性剤である。この界面活性剤は脂質エンベロープを可溶化することによってエンベロープウイルスを不活化するため、ウイルスは非感染性となる。Triton X-100 は、血漿由来製品の製造工程でのウイルス不活化の際に長年広く使用され、また HCCF に付加する mAb のプラットフォーム精製工程においても広く使用されている。

欧州化学品庁（ECHA）は、分解化合物が環境中でホルモン様活性を有するとして、承認リスト（付属書 XIV）に Triton X-100 を記載した。そのため、Triton X-100 は広く使用されているものの、製薬業界は代替界面活性剤の使用を検討している。同様の物理化学的特性を有する他の界面活性剤が市販されており、効率的な XMLV 不活化が達成されている。Triton X-100 による不活性化は、十分に特性解析されており、有効性に関する十分な知見が存在するため、本ガイドラインでは例として取り上げている。

Triton X-100 は非イオン性であるため、その有効性は pH、イオン強度、あるいは HCCF 中の対イオンの性質に影響されない。過去の経験から、0.2% の Triton X-100 濃度で、15°C で 60 分間インキュベートすることにより、HCCF 中の代表的な脂質及び総タンパク質含量の範囲を網羅するプラットフォーム工程において複数の製品横断的に、HCCF 中の XMLV を効果的に不活化できることが示されている。しかし、以下に示すように、製品個別の試験を省略する場合は、有効かつ信頼性の高い不活化を保証するために、0.5% の Triton X-100 濃度を適用することが推奨される。

表 A-2 に、例として、Triton X-100 又は SD 試薬及び MLV を用いたときの脂質エンベロープウイルスの界面活性剤を中心とした不活化工程の工程パラメータとその潜在的な重要性について要約を記載した。

表 A-2：界面活性剤による不活性化又は SD 処理の工程パラメータ・工程因子及びその潜在的影響の要約

工程パラメータ又は工程因子	潜在的影響	評価理由
SD 又は Triton X-100 の濃度	高	不活化剤であるため
保持時間	高	不活化の機序は時間依存性であるため
温度	高	不活化速度へ影響するため
≤ 0.2 µm 孔径フィルターによる前処理	高	ウイルス粒子を捕捉し界面活性剤から保護する可能性のある凝集体を出発中間体から除去することは重要であるため
HCCF 中の総脂質含量又は代理 (surrogate) パラメータ	低	ワーストケース条件下の HCCF において認められる影響は小さいため

製品のタイプ	低	mAb、ハーフ抗体、融合タンパク質及び組換えタンパク質について、不活化に対する影響は認められないため
総タンパク質含量	低	認められる影響は小さいため
pH 値	低	Triton X-100 は非イオン界面活性剤であるため
イオン強度	低	Triton X-100 は非イオン界面活性剤であるため
HCCF 中の緩衝塩	低	Triton X-100 は非イオン界面活性剤であるため
ウイルス粒子と製品の相互作用の可能性	低	不活化に対する影響は認められず、脂質エンベロープの破壊により、製品との相互作用の可能性が低下するため

つまり現行の工程知識の通り、清澄化した HCCF を 15°C 以上で 60 分間以上、濃度 0.5% 以上の Triton X-100 を用いて処理することにより、複数の細胞培養由来製品中の XMLV は効果的に不活化される。SD 試薬を使用する場合、1% Triton X-100 及び 0.3% トリ-n-ブチルフォスフェート (TNBP) で 30 分以上処理するか、1% ポリソルベート 80 及び 0.3% TNBP で 23°C 以上で 6 時間以上処理すると、レトロウイルスが効果的に不活化される。現行の工程知識に従い、SD 処理又は Triton X-100 の単独処理により XMLV を不活化する際には、プラットフォームバリデーションのアプローチを適用してもよい。

5.3 低 pH 条件下での保持

低 pH 処理では、ウイルスのエンベロープに存在するタンパク質を変性させることによってエンベロープウイルスを不活化することにより、細胞への吸着と感染を防ぐ。キャプチャクロマトグラフィーによる製品回収液の低 pH 処理は mAb 等の細胞培養由来製品の製造工程におけるレトロウイルスの不活化に広く使用されている。

不活化効率は、pH として測定される不活化剤としての水素イオン濃度、保持時間や温度、及び緩衝液マトリックスに依存する。イオン強度が極めて高い場合も、不活化効率に影響する可能性がある。

低 pH 処理による XMLV 不活化の工程パラメータ及びその潜在的影響の要約を表 A-3 に示す。

表 A-3：低 pH 処理による XMLV 不活化の工程パラメータ・工程因子及びその潜在的影響の要約

工程パラメータ又は工程因子	潜在的影響	評価理由
pH	高	不活性化剤であるため
保持時間	高	不活化の機序は時間依存性であるため
温度	高	不活化速度に影響するため
緩衝液マトリックス	高	利用可能なデータから、不活化の頑健性が緩衝液マトリックスに依存することが示されているため
製品濃度	低	下記に示す条件下では不活化に対する影響は認められないため
タンパク質凝集体の形成	低	下記に示す条件下では不活化に対する影響は認められないため
製品のタイプ	低	mAb、ハーフ抗体、二重特異性抗体、融合タンパク質及び組換えタンパク質について、不活化に対する影響は認められないため
塩化ナトリウムの濃度 ^a	低	塩化ナトリウムの濃度が ≤500 mmol/L の場合は影響が認められないため
ウイルス粒子と製品の相互作用の可能性	低	不活化への影響は認められないため

a. 現在のところ、他の緩衝液のイオン強度の影響に関するデータは限られている。

現行の工程知識の通り、pH 3.6 以下、15°C 以上で 30 分以上、塩化ナトリウム濃度 500 mmol/L 以下で低 pH 処理を行う場合、XMLV は効果的に不活化される。酢酸及びクエン酸緩衝液が最も一般的に使用されており、頑健な XMLV の不活化が可能である。

現行の工程知識に従い、低 pH 処理による XMLV の不活化の際にプラットフォームバリデーションのアプローチを適用することができる。

5.4 ウィルスろ過

ウィルスろ過の主な作用機序は、サイズに基づく粒子の除去である。一般に、工程中間体の容積処理量やフィルターをフラッシングする際の緩衝液の容積処理量、及び圧力／送液の遮断を含む圧力は、ウィルスろ過工程における潜在的に重要なパラメータであると考えられる。

ウィルス粒子径がフィルター孔径の分布よりもはるかに大きい場合は、ウィルス粒子と製品との潜在的な相互作用は重要ではない。しかし、ウィルス粒子径とフィルター孔径が同程度の大きさである場合は、この潜在的相互作用がフィルターのウィルス除去性能に及ぼす影響は完全には解明されていない。

以下本項では、他製品のウィルスろ過工程により既に得られている知識及び組織内経験を活用することにより、小型及び大型のウィルス用除去フィルターを用いて大型ウィルスの除去を行うことの妥当性について取り上げる。既に得られている知識は、大型ウィルス用除去フィルターにも小型ウィルス用除去フィルターにも使用できるが、ここでは、より一般的に使用されている小型ウィルス用除去フィルターに重点を置く。

小型ウイルス除去フィルターによる効率的なレトロウイルス除去に影響を及ぼすことがよく知られている因子としては、例えばフィルターの種類（モデル、特性）、流量又は圧力制御ろ過モード、タンジェンシャルフローろ過方式かデッドエンドろ過方式か、及び圧力遮断などの工程パラメータの変動が挙げられる。ウイルス除去の予測可能性及び頑健性に基づき、この工程段階はプラットフォームバリデーションのアプローチに適していると考えられる。

小型ウイルスフィルターを用いたウイルス除去におけるオプションの1つは、パルボウイルスのクリアランス指数をより大型の球形／正20面体ウイルス及びエンベロープウイルスに適用することによって、大型ウイルスを用いたバリデーション試験を実施する必要性を回避することができる。ただし、パルボウイルスがフィルターを通過することにより、結果的にウイルスクリアランス能（大型ウイルスのクリアランス能など）が過小評価される場合がある。ウイルス除去の機序がウイルスの粒子サイズに基づくこと、及び小型ウイルス用フィルターを用いて頑健かつ完全にレトロウイルスが除去できるという業界の経験を考慮すると、製薬企業はパルボウイルス及び大型ウイルス除去に関する組織内データに基づき、一般的に使用される小型ウイルス用除去フィルターを用いてプラットフォームである大型ウイルスのクリアランスを行う主張を構築することができる。

機序がサイズに基づく除去であるため、大型ウイルスよりも小型ウイルスの方が、小型ウイルス用除去フィルターを通過する理論的リスクは高い。

圧力／送液遮断の影響、並びに製造条件を反映した容積処理量やろ過後のフィルターをフラッシングする際の緩衝液の容積処理量を徹底的に理解する必要がある。低圧／低流量又は圧力／流量の遮断が、特定の種類のウイルスフィルターに与える限定的だが負の影響があることを考慮すべきである。

他の製品から既に得られている知識及び組織内経験によりパルボウイルスの除去を主張する場合は、ワーストケース条件を考慮して、パルボウイルスを用いた製品個別の確認バリデーションを少なくとも1回実施すること。（表 A-4 参照）。ウイルス除去フィルターのブランド／モデルは、ウイルスクリアランス能及びウイルスクリアランス工程パラメータの影響に関する頑健性に及ぼすため重要であり、プラットフォームデータを設計する際に考慮すべきである。

表 A-4 に、小型ウイルス除去フィルターを用いたときのパルボウイルス除去に影響を及ぼす可能性のある工程パラメータの要約を示す。

表 A-4. 小型ウイルス除去フィルターを用いたパルボウイルスのクリアランスについての工程パラメータ・工程因子及びその潜在的影響の要約

工程パラメータ又は工程因子	潜在的影響	評価理由
ウイルスフィルターに工程中間体を負荷する際の容積処理量	高	過度な容積／タンパク質処理量は、膜の種類によっては効果が異なるワーストケースと考えられるため
フィルターのフラッシングに使用される緩衝液の容積処理量	高	過度な処理量は、膜の種類によっては効果が異なるワーストケースと考えられるため
圧力／送液	高	圧力／送液量はフィルター操作の上限を超えないこと。ただし、フィルター膜の種類によっては、圧力／送液量が低いとクリアランスの結果が悪化する場合がある。圧力／送液遮断（ろ過中又は製品中間体のろ過からフィルターフラッシュへの切り替え時に発生する場合）を考慮すること。
製品のタイプ	低	mAb、ハーフ抗体、二重特異性抗体、融合タンパク質又は組換えタンパク質について、ウイルスクリアランスに対する影響は認められないため
製品濃度	低	ウイルスクリアランスに対する負の影響は認められないため
pH	低	サイズに基づく除去によるウイルスクリアランスに対する負の影響は認められないため。低 pH 値 (<pH 5) では限定的な負の影響があり、膜の種類によっては効果が変わる可能性がある。
イオン強度	低	ウイルスクリアランスに対する影響は限定的であるため
緩衝液マトリックス	低	ウイルスクリアランスに対する影響は限定的であるため
ウイルス粒子と製品の相互作用の可能性	低	ウイルスと抗体の特異的相互作用は、ウイルス保持（除去能）を強化する可能性があるため

付録 6： 遺伝子組換えウイルスベクター及びウイルスベクター由来製品

6.1 緒言

バイオテクノロジーの進歩により、ヒト又は動物（鳥類、哺乳類又は昆虫）由来の特性解析されたセルバンクを用いて製造される、新たなタイプの製品を発現するための新しく高度な生産プラットフォームが出現した。付録 6 の適用範囲には、ヘルパーウイルス及びウイルスベクター（「製造用ウイルス」と総称）、又は安定的あるいは一過的に形質転換した細胞株を用いて製造できる遺伝子組換えウイルスベクターやウイルスベクター由来の製品等が含まれる。ここで対象となる製品は、製品の物理化学的特性に基づいてウイルスクリアランスが適用可能な製品である。これらの製品の例として、バキュロウイルス／昆虫細胞を用いて製造する VLP 及びタンパク質サブユニット、ナノ粒子ベースのワクチン及び AAV などのウイルスベクター製品が挙げられる。これらのベクターは *in vivo* で投与又は *ex vivo* で適用される可能性がある。

ヘルパーウイルス非依存性製品は、安定的に形質転換した又は一過的に形質転換した細胞株、あるいは組換えタンパク質又は VLP（例：遺伝子組み換えバキュロウイルス）を発現するウイルスベクターを感染させることによって製造することができる。また、ヘルパーウイルス依存性製品の製造には、製品の発現又はウイルスベクターの複製を可能にするヘルパーウイルスが必要である（例：AAV はヘルパーウイルスとして単純ヘルペスウイルス又はアデノウイルスを必要とする）。

バイオテクノロジー応用医薬品等におけるウイルス汚染の潜在的な原因は、ガイドライン本文の第 2 章に記載されている。発現系による汚染や、複製可能ウイルスによる汚染の可能性など、その他の追加のウイルス汚染リスクについても考慮する必要がある。製品製造中の外因性ウイルスによる汚染の可能性を評価する際には、細胞基材の外來性ウイルスに対する感受性を慎重に検討すべきである。十分に特性解析がなされたセルバンク及びウイルスシードを用いることにより、ウイルス汚染のリスクを低減することができる。製造用ウイルスは、製造工程由来不純物とみなされる。

新しい製品タイプのウイルス安全性及び汚染管理は、原料の調達、製造工程の適切な段階におけるウイルス試験、製造工程による外來性ウイルス及び製造用ウイルスの除去／不活化を含む包括的なプログラムを適用することによって担保すること。ウイルスクリアランスが限定的である場合、原材料と試薬、また製造工程の試験及び管理に重点を置いてウイルス安全性を担保すべきである。

したがって、製品のウイルス安全性を実証するために、リスクに基づくアプローチを適用する必要がある。

6.2 ウイルス試験

製品の全体的な安全性を裏付けるために、内在性ウイルス及び外來性ウイルスの両方について広範な試験及び特性解析を製造の適切な段階で実施すること。製品のタイプ及び関連するリスク因子に基づき、試験計画は製品のライフサイクルにわたって適用することが望ましい。製造工程の様々な段階において実施する試験の概要を以下の表 A-5 に示す。表にはウイルスシード、未加工／未精製バルクハーベスト、及び精製バルク／原薬について実施する試験を記載している。ウイルスベクターの製造に用いる細胞基材に対する試験及び特性解析の手法は、ガイドライン本文の表 1 を参照のこと。これらの製品のタイプに適用される追加の留意事項を下記の表 A-5 に記載する。製造用細胞が製造工程で生存できない場合、LIVCA はトランスフェクトされていない細胞に適用される。

ICH Q5A (R2) ガイドライン

試験の種類及び範囲は、細胞基材及び製造工程に関連する固有の危険因子を考慮したリスクアセスメントに基づき決定する。考慮することが望ましい因子には、細胞基材又はウイルスシード／ベクターの起源、継代履歴及び特性、使用した原材料と試薬の供給源と製造、使用される細胞培養方法、製造用ウイルスの使用、製造工程のウイルス不活化又は除去能力などがある。

表 A-5：該当する段階で実施すべきウイルス試験

試験方法	MCB、WCB、 LIVCA 細胞	ウイルスシード ⁱ	未加工／未精製バルク (ハーベスト)	原薬 (精製バルク)
外来性ウイルスに関する試験				
<i>In vitro</i> 試験又は NGS ^{a,b}	ガイドライン本文の表 1 を参照	+g	+g	-
<i>In vivo</i> 試験又は NGS ^b		+g	-g, j	-
特異的ウイルスの 試験 ^c		+h	+	-
レトロウイルス、内在性ウイルス、製造用ウイルス及び複製可能ウイルスに関する試験（該当する場合）				
レトロウイルス及び 内在性ウイルス	ガイドライン本文の表 1 を参照	+	-d, j	-
製造用ウイルス	-	-	+ ^e	+ ^e
複製可能ウイルス	-	+ ^f	+ ^f	+ ^f

- MCB、WCB、LIVCA 細胞、MVS 及び WVS の感受性細胞による 28 日間試験では、少なくとも 2 週間後に 1 回の継代培養を実施すること。未加工／未精製バルクについては、製品のリスクアセスメント（細胞基材、製造のための培養期間、動物由来の原材料又は試薬の使用、工程のウイルスクリアランスレベルを考慮）に基づき妥当性が示されれば、試験を 14 日間に短縮することができる。指標細胞の培養物は、各地域の現行の規制及びガイダンスに従って、細胞変性ウイルス、血球吸着性ウイルス及び血球凝集性ウイルスについて観察すること。昆虫細胞株を用いて製造される製品については、試験にはアルボウイルスに対する感受性細胞株（例：BHK 細胞）を含めること。NGS は代替法として使用でき、ウイルスベクターやウイルスベクター由来製品を中和できない場合に特に有用である。試験は、ウイルスシード及び未加工／未精製バルクハーベストについて実施すること。場合によっては、未加工／未精製バルクのハーベストが原薬と同一のことがある。
- 標的非特異的 NGS を *in vivo* 試験の代替試験（第 3.2.3 章）、及び *in vitro* 試験の補完試験又は代替試験（第 3.2.2 章）として使用することができる。
- 試験は、細胞基材の起源や履歴、ウイルスシードの由来、ヒトや動物由来の原材料への潜在的な曝露を含むリスク評価に基づいて行われる。細胞培養感染性試験、抗体産生試験（MAP、HAP、RAP）、ウイルス特異的 NAT、NGS などのその他の分子生物学的手法を用いることができる。詳細は第 3.2.4 章を参照のこと。試験には、例えば昆虫細胞におけるアルボウイルスや、血清やトリプシンを使用する場合にはそれぞれウシやブタのウイルスなど、種特異的ウイルスの試験も含まれる可能性がある。
- MCB 又はウイルスシードのいずれかがレトロウイルス陽性であった場合、ウイルスクリアランスの目標レベルを決定するために、追跡調査として、少なくとも 3 つのロット／バッチから得られた未加工／未精製バルクハーベスト中の潜在的レトロウイルス粒子について定量試験を実施すること。MVS については、残存リスクがある場合、未加工／未精製のバルクハーベストの試験を検討することができる。
- 製造用ウイルスの定量は、少なくとも 3 つの細胞培養ロット／バッチを用いて、未加工／未精製バルクの段階で実施し、ウイルスクリアランスの目標値を決定する。高感度なウイルス検出のためには「関連する」感受性細胞株を用いた感染性試験を用いて、原薬（精製バルク）中に製造用ウイルスが存在しないことを証明すべきである。あるいは、試験に分子生物学的方法を用いることもできる。頑健かつ必要な程度を上まわるクリアランスにより妥当性が示されない限り、精製バルクごとに残存製造用ウイルス否定試験を実施すること（ケース F、表 4）。
- 複製可能ウイルス（RCV）は製造工程のいずれの段階でも発現する可能性がある。推奨事項には、製造の複数の段階における RCV 試験が含まれる。RCV 試験は、ウイルス検出を最大化するために、ウイルスシード／バンク、各未加工／未精製バルクハーベスト、又は原薬や製剤ごとに適宜実施する。
- In vitro* 又は *in vivo* 試験で干渉が生じる可能性がある場合、並行して培養した対照細胞をウイルスシードや未加工／未精製バルクのハーベスト段階で試験する。ウイルスシード及び未加工／未精製バルクの試験に NGS

を使用する場合、対照細胞培養物の試験は不要である。

- h. セルバンクの試験を実施していない場合は、ウイルスシードについて試験を実施すること。
- i. ウイルスシードに対して試験を適用すること。ウイルスシードは、製品のタイプに応じて、ワクチンウイルス、ウイルスベクター又はヘルパーウイルスの製造に使用される。ウイルスシードは樹立細胞株から作製される。リスクに基づくアプローチに従い、ウイルス試験では、外来性ウイルスが存在しないこと及び複製可能ウイルスが存在しないことを保証するために、ウイルスシードの調製に使用された細胞株及び原材料及び試薬の起源を考慮すべきである。WVSはMVSから直接由来するため、一部の外来性ウイルス試験はリスクアセスメントに基づいて適用される。もう1つのアプローチとして、MVSに対し必要とされるすべての試験をそれぞれのWVSについて実施し、MVSにおける試験の代わりとしてもよい。
- j. リスクアセスメントに基づく試験。

6.3 ウイルスクリアランス

外来性ウイルス、内在性ウイルス及び残存製造用ウイルスによる汚染リスクは、本ガイドラインの一般原則に従い可能な限り軽減すること。AAVのような一部のウイルスベクター製品は、ウイルススクリアランス工程が適用可能であり、外来性及び製造用ウイルスのクリアランス（不活化又は除去）が保証できる。

ウイルススクリアランス工程は、実際の製造工程を反映した適格なスケールダウンモデルを用いて評価すること。下流工程内でどのようにウイルススクリアランスを行うかは、ウイルスベクター及びウイルスベクター由来製品の物理化学的特性によって決まる。ウイルススクリアランス試験では、製造用ウイルス自体又は「特異的モデルウイルス」（例：バキュロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス）、並びに外来性及び内在性ウイルスを代表する「モデルウイルス」を含めること（表 A-1 参照）。表 4 に記載された特異的及び非特異的モデルウイルスの選択に関する実施要領については、第 5 章と第 6 章を参照すること。製造工程はタンパク質発現用ウイルスベクターやヘルパーウイルスに対し頑健なクリアランス能を有する必要がある。エンベロップを持たないウイルスベクターなど、製品の特性によっては、界面活性剤単独又は有機溶媒／界面活性剤による処理など、一般的なウイルス不活化工程が適する場合がある。あるいは、AAV のような小型のウイルスベクターやナノ粒子ベースのワクチンのように、サイズに基づいてウイルスを除去が可能な場合には、ウイルスろ過がより適している場合もある。クロマトグラフィー工程では、ウイルスベクターとは異なる表面特性を持つウイルスのクリアランスが可能である。必要に応じて、ウイルススクリアランス試験を実施し、関連する製造工程ステップのウイルススクリアランス指数を求めること。例えば、バキュロウイルス／昆虫細胞を用いて産生され、精製が可能で、製造工程を通してウイルススクリアランスが達成できるサブユニットタンパク質や VLP の製造が挙げられる。

これらの製品のウイルス安全性を担保するため、閉鎖系における処理や、試験及びその他の予防的管理措置を必要とする可能性もある（第 2.2 章、第 3 章及び第 4 章を参照）。これらの製品の製造工程のウイルススクリアランス工程では、遺伝子組換えタンパク質の場合と同様の頑健性を実現できない可能性があるために、リスクアセスメントにより製品のウイルス安全性を裏付ける必要がある。