

タイトル：潜在的なウイルスおよび TSE の汚染管理

(cGMP バイオ医薬品施設のためのリスクに基づいたアプローチ)

著者: Anne Stokes, PhD

(Pharmaceutical Engineering, 2018, Vol38, No2, 63-68)

翻訳: 京都大学大学院医学研究科薬剤疫学分野 大学院生 名前: 新川神奈 (Kanna SHINKAWA)

哺乳類や微生物の細胞から製造されるバイオ医薬品は、2つの主要なエンティティタイプから、生得的に汚染のリスクがある

1つ目のタイプは、外来性または内因性のウイルスからなる。ウイルスは、複製のために宿主細胞を必要とする脂質のエンベロープの有無を問わず、蛋白質性のカプシドに囲まれる核酸ゲノムから構成される。外来性のウイルスは、無作為に製造プロセスに導入される；内因性ウイルスは、細胞株にすでに存在しており宿主ゲノムの一部かもしれない。

2つ目のタイプは、伝達性海綿状脳症 (transmissible spongiform encephalopathy; TSE またはプリオン病) の病原体で、これは汚染した反芻動物 (牛や羊) 材料によって製造プロセスに導入される。TSEs は遺伝子材料を含まない薬品によって引き起こされる、神経変性疾患である。TSEs は、ヒトや動物が感染する PrP またはプリオン蛋白として知られる異常なアイソフォームからなる細胞内のグリコプロテインの蓄積によって特徴づけられる。プリオンは、熱やイオン化、紫外線、マイクロ波、放射線照射、酸処理といった物理化学的な不活性化処置に高い耐性を持つ。TSE の感染リスクを低減することは、強塩基処理や、製造プロセスからの動物由来原料 (animal-derived raw materials; ADRMs) の除去といった厳しい方法に依拠する。

ウイルスと TSEs の両方が、製造施設全体にリスクをもたらす。

## ウイルス

ヒト、微生物、または動物由来の細胞株から作られたバイオ医薬品に対するウイルス安全性への保証は、ICH<sup>1</sup>、FDA<sup>2-3</sup>、および EMEA<sup>4</sup> の規制ガイドラインに記載されている 3 つのアプローチによって説明される (図 1)。主なウイルス安全性の構成要素は、

1. ウイルスが存在しないことを、細胞株および原材料 (培地成分を含む) を選択、評価、追跡、試験すること、及び ADRMs の使用を制限することであり；
2. 適切な製造段階においてウイルスが存在しないことについて製品の試験を行い；
3. 哺乳動物細胞について、感染性のウイルスを除去する製造プロセスの能力を評価することである。

## TSEs

牛海綿状脳症（および、1996年に英国で初めて同定された、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病<sup>6</sup>との関連）は、バイオ医薬品業界に大きな衝撃を与えた。その結果、ヨーロッパや米国、そして日本を含む国際研究機関は、医薬品を介する患者への曝露を最小限にするために、TSEの管理に適用できるガイドラインを発行した<sup>5,7,8</sup>。

哺乳動物細胞によるTSEの伝播のリスクは低い<sup>9</sup>、ADRM<sup>s</sup>を除去する方法は曝露の可能性を軽減するために規定されなければならない。もし、これが不可能なら、種や組織、生産国、そして原材料や成分<sup>5</sup>を作るために使われた製造プロセスに基づいた、包括的なリスク評価により、TSEの病原体による残りのリスクが無いことを提示するべきである。

### リスク管理プログラム

これらおよびその他の品質と規制への見込みは、包括的なウイルスおよびTSEのリスク管理プログラムと制御の戦略を通して管理される。例として、**current good manufacturing practice (cGMP)** 哲学の実施や、製造施設において行われるすべての作業を含む人材教育がある。

その他に検討されることには以下が含まれる。

- ISOのルーム規格; 暖房 (heating)、換気 (ventilation) およびエアークンディショニング (air-conditioning) (HVACシステム); ラミナーフローフードの使用; 閉鎖系処置; 工程の分離; 洗浄手順; 害虫の制御、などの施設管理
- 機器の使用とメンテナンス
- 機器の種類、単回使用 vs ステンレス製
- 職員、廃棄物そして材料のフロー戦略

ウイルスとTSEのリスクを管理するためのこの総合的なアプローチは、患者に供給される臨床材料に汚染のリスクが無いという信頼をもたらす。

---

## ウイルスとTSEsの両方が、製造施設全体のリスクとなる

---

### 制御のフレームワーク

製造施設におけるウイルス汚染のリスクもまた低い、それが起きた場合、その衝撃は大きい。文献に記録されている施設汚染の事例では<sup>10-12</sup>、事故の後、施設回復のため経済損失が持続し、薬の供給が失われる、または中断することにより引き起こされた患者の苦難を記述している。

ウイルスは、チャイニーズハムスター卵巣細胞<sup>13</sup>およびNS0細胞（非分泌性マウス骨髄腫由来）のような哺乳動物の産生細胞に感染することができる。*Escherichia coli* 由来のバ

イオ医薬品もまた、内因性<sup>14</sup>および外来のバクテリオファージ<sup>15</sup>によるリスクがある。酵母のウィルスは、Ty1<sup>16</sup>のようなレトロウィルス様の成分と2本鎖RNAウィルスの両方が、接合の間に伝達されうるが、細胞外経路を介して感染性のある分子は産生しないようだ。

リスクの制御は、TSEとウィルス汚染の可能性があるエリアに適応されるICH Q9ガイドライン<sup>17</sup>によって規定されている(図2)。これらのエリアには、原材料および成分の調達、輸送および受け取り; バッファーと培地の作成; GMP製造作業が含まれる。ウィルスおよびTSEの制御のための要件は、規制当局と、施設の監査を含む内部の方針や手順、制御の要件によっても概説される。

ウィルスとTSEのリスク評価において、各々の製造ステップは、職員、材料や環境資源からの汚染のリスクについて、評価される。可能性と発生のリスク値が、軽減処置がとられる前後両方で割り当てられる。分離戦略と一般的なリスクの軽減ステップも評価される。

## 原材料と成分

ウィルスの汚染リスクの主な原因は、ADRM<sub>s</sub>や動物由来原料(animal-derived ingredients; ADI<sub>s</sub>)である。TSE汚染は、細胞バンクや医薬品を調整するために使用される、動物(主に反芻動物)の組織や分泌物から生じるかもしれない。最初のADI<sub>s</sub>やADRM<sub>s</sub>には、活性成分、賦活剤やアジュバント(牛の胎児の血清、羊毛由来のコレステロールや乳由来のガラクトース)として含まれるかもしれない。第2または第3のADI<sub>s</sub>は、反芻動物の材料(乳など)を含む培地で製造された組み換えタンパク(例えば、インスリン)を含む、かつ/またはバイオ医薬品の製造培地の添加物として使用される。

製品に接触する材料(成分、消耗品、および機器)の中の反芻動物の物質(例えば、脂)は、種や組織源、原産国、製造中の処理方法(アルカリ加水分解および/または加熱)を同定することによって管理されなければならない。

すべての材料は、原材料の証明書や、欧州医薬品品質部門認定書(European Directorate for the Quality of Medicines Certificate of Suitability)などの、支援しているベンダーの書類をつけなければならない。これは、細胞バンク、GMP細胞バンク、および製品のライフサイクルを通して使用される、製品に接触する原材料の製造に先立って、細胞株において使われる材料に適用される。

ベンダーからの製造場所への輸送は、考慮しなければならないまた別の要素のリスクを提供する。倉庫からGMPコアの中に移動する材料は、殺菌剤; 材料、職員そして機器の流れの分離; ISOによるルーム規格; 作業者の健康方策を含む厳しい手順によって管理されなければならない。細胞バンクは、TSEとウィルスのリスク評価、適切なウィルス検査および書面報告による承認後においてのみ、製造について発表されるべきである。

これらの各ステップは、細胞株の作成およびバイオ医薬品の製造に使用されたすべての動物由来の材料および出発物質の原料が調査され、そしてTSEまたはウィルスの病原体からの汚染リスクの可能性が十分に定義、評価されたことを、保証するのに役立つ。

---

## ウイルス汚染に対する主要なリスク原因は ADRMs または ADIs である

---

### 製造施設の管理

製造施設の管理には、規制ガイドラインとともに施設運用に関連する GMP 省令と手順が組み込まれている。HVAC システムは、エリア間の分離を維持するために末端の高効率粒子 (HEPA) のフィルターを通過する気流を運搬し、分類された部屋 (ISO-5、ISO-7、ISO-8) に応じた換気必要数を提供するため流れと差圧を作ることにより、ウイルスの制御を助けている。HVAC システムはまた、粒子材料が加工エリアの間を移動し、部屋内で循環または集積するのを防ぐ。微生物学な微粒子のモニタリングは、制御された環境とエリアの分類要件が合っていることを実証する。

精製作業の間、建築設計や閉鎖システムによる分離は、ウイルスの除去工程前後において重要である。エアロックのシステムは、部屋とエリアへの出入りの際の相互汚染を防ぐ。通過することで清潔とごみがないことを保つ。すべての細胞株は、ウイルス検査と TSE リスクの評価を受け、標準的な操作手順によって必要に応じて使用する前に処分される。施設の汚染や害虫が侵入した場合には、手順に応じた管理が適切である。軽減作業は、外来性および/または内因性のウイルス検査の陽性 (または擬陽性) によって引き起こされうる。

### 機器の検討

この業界が閉鎖系の加工の方向へ動いていくにつれて、単回使用のバイオリアクターと化学的に定義された培地 (ADIs はあってはならない) も、TSE およびウイルス制御において、リスクを低減させるステップである。

単回使用のバイオリアクター (Single-use bioreactors; SUBs) は、完全閉鎖処理を可能にし、使い捨てであり、汚染のイベントを大幅に軽減することができる区画化を提供する。SUBs の実装を成功させるための管理の枠組みには、コンテナ閉鎖系の完全性の重要な性質に対処することを含む。in situ での圧力減衰バック試験では、使用前に 300 マイクロメートル ( $\mu\text{m}$ ) 以上の漏れを検出することができる。可動性の格納システムのもう一つの重大な懸念は、微生物の進入であり、これは  $10\text{-}22\ \mu\text{m}$  ほどの小さな漏れで起こり得る。これを防ぐために、SUB は室内に対して陽圧に維持される。

ステンレス製のバイオリアクター、機器および配管は、汚染を軽減するための切り換えと洗浄を必要とする。下流の製造プラットフォームの工程を閉鎖系にすることも、作業の柔軟性を高め、切り替えを単純化し、ウイルスの汚染を低減する。既存のステンレス製のクロマトグラフィーおよびタンジェント流る過盤を単回使用の相互接続によって閉鎖系にすることによって、ステンレス製の使い捨てのハイブリッドソリューションが構築される。そうすれば、多くの構成部品は、単回使用のガンマ線照射のチューブ部品やフィルターお

よびバッグとなる。

### 職員、材料、そして廃棄物の流れ

職員、材料そして、廃棄物の流れは、施設のプロアプランと部屋の分離を介して管理される。GMP エリアへのアクセスは、主要スタッフに限られ、厳格に監視される。操作を含む GMP の更衣と製造作業は、ウィルスの導入（または再導入）を防止する。加工エリアに入るすべての職員は指定された更衣室を通り、その部屋の要件を守らなければならない。病気が明らかな者は、彼らの状況が正しくなるか、製品の安全性を危うくしないと判断されるまで、原材料、加工中間物、梱包剤、そして製品との接触から外される。

### 施設の清掃と消毒

ステンレス製の機器は使用の間に清掃され、製品の切り替え時に検査される。土壌または汚染物質に特異的な洗浄方法は、検証または確認されなければならない。施設に導入されたすべての機器と消耗品は、リスクの評価を受け、必要な除去および不活性化の性質を持つ消毒剤と洗浄剤にさらされるべきである。他の推奨される汚染物質に特異的な洗浄剤に加えて、レトロウイルス<sup>18</sup>に対して殺ウイルス活性を持つことが示された 70%イソプロピルアルコールは、ハンドスプレーと機器のふき取りに日常的に使用される。部品の洗浄のために、腐食洗浄剤と高温の組み合わせが、有効な不活性化をもたらす。厳格なげっ歯動物と害虫の管理策もまた、施さなければならない。

水酸化ナトリウム (NaOH) は、カラム樹脂<sup>19</sup>の消毒液として使用される。イヌパルボウイルスや SV40 などの高耐性のエンベロープのないウイルスでさえ、NaOH により不活化され、エンベロープのあるウイルス（インフルエンザなど）も効果的に除去される。

---

ウイルスと TSE のリスク管理におけるこの総合的なアプローチは患者に供給される臨床材料に汚染のリスクが無いという信頼を提供する

---

### ウイルス安全性のトライアングル

#### 検査

ウイルス検査は、バイオ医薬品の製造と品質管理試験の、標準的かつ日常的な一部分である。ICH Q5A によると<sup>1</sup>、ウイルスの適切な検査は、マスターセルバンク (MCB) 上で行われなければならない、*in vitro* および *in vivo* 両方の試験を含まなければならない。*in vitro* の試験はバッチベースで行われる。より拡張した検査が、*in vitro* 細胞年齢の限界の細胞上で行われ、これは MCB およびワーキングセルバンクにおいて検出されなかったかもしれない内因性ウイルスのために、評価されるべきである。*in vivo* の検査はげっ歯動物および孵

化卵で実施される。

## 検出

分子ウイルス学と関連する方法論について急速に拡大した分野は、ウイルスの存在に関して製造プロセスのすべての点で材料を分析するための広範なツールを開発してきた。広範囲なポリマーゼ連鎖反応ならびに、質量分析、マイクロアレイ、そして大規模並列シーケンシング（次世代シーケンシングとも呼ばれる）を含むこれらの新しい方法は、既知および未知の広範囲のウイルスを検出することができる<sup>20</sup>。これらの新しい方法の利点と欠点、およびウイルス検出の日常的な方法を補完する能力が、業界と規制当局の間の継続的な対話の基盤を作る。質問には、核酸の検出が完全なゲノムを示しているか、もしくは、より重要なことであるが、生きているウイルスかどうか、が含まれる。

施設汚染の場合、これらの方法が汚染物質の同定において明らかな利点を提供することに疑う余地はない。新規の分子手法はまた、生物安全性試験において、生存する動物を減らし、改良をしたり、置き換えたりするのを助ける。さらに、これらの新しい方法はかなりの期間にわたり患者に安全な製品を届けてきた、ウイルスの安全性（すなわち、ウイルス安全性のトライアングル）に関する3つアプローチを支持するように、ますます使用されている。

## ウイルスの除去の検証

ウイルス安全性のトライアングルの第3の手法は、ウイルス除去の検証（virus clearance validation; VCV）である。一般に、臨床材料の製造プロセスの一部として行われるが、VCVは2つのモデルウイルスの除去の証明を必要とする。除去のメカニズムには、分配または不活性化を含み、ログの減少値は加算的である。バイオロジックスライセンスの申請もしくはマーケティング承認申請において、2つの追加モデルウイルスが使用される。この目的は、臨床および商用の材料両方において、薬の $10^6$ 用量に、ウイルス様粒子が $<1$ のクリアランス係数を得ることである。培養槽採取において、ウイルス数を使用し下流の負荷を決定するための計算が行われる。培養槽採取中に存在するレトロウイルスの量は、理想的には3つのバッチから測定される。

## リスク管理サイクル

TSEとウイルスの制御は、継続的な改善サイクルを必要とする。第1に、現在の状況が測定され；プロセスのマッピング分析はズレを同定しリスク管理システムを介して必要な緩和策を示す。流通と業界の動向をチェックするための軽減方策の年次評価は、ベストプラクティスを定義し、継続的な制御を提供することを手助けする（図3）。

## 結論

この記事は、ウイルスと TSE の病原体がバイオ医薬品の製造にもたらすリスクについて概説し、患者に安全な医薬品を提供することを進める総合的な制御戦略について説明するものである。これらの病原体はその物理化学的な性質が著しく異なるため、独自の課題が存在し、リスク軽減には異なったアプローチが必要となる<sup>1,5</sup>。原材料、成分の調達、ベンダーの監視、および認証管理が重要だが、ウイルスリスクの減少は、新規かつ日常的な検出方法およびウイルス除去の検証にも依存する。

TSE の制御は、原材料の調達、ADIs の除去、獣脂派生物を含む製品に接する材料へのアルカリ加水分解および極高熱などの効果的な製造管理を含む、文書化されたリスク評価に依存する。TSE の除去および検出手法は利用可能だが、これらは、そもそも発生源においてリスクのある反芻動物材料を管理するためのバイオ医薬品の製造プロセスに、ルーチンで適応するものではない。

ここで説明した制御のフレームワークは、適切な製造施設の設計; HVAC システム管理; ISO のルーム規格; 建築上の分離; 適切な機器のタイプ (ステンレス、単回使用またはハイブリッド); 廃棄物、材料および職員の流れ; 洗浄と消毒; 害虫管理; 作業者の健康方策を含む。内部および第 3 者による管理は、品質保証担当者が監視するローカルポリシーおよび手順に加えて、規制ガイドラインによって運営される。

ウイルスおよび TSE のリスクの管理は、ギャップ分析、改良の実践、および制御の方法を含む継続的なプロセスである。新しい制御方法は、製薬業界によって、開発および実施され続けている。業界のベストプラクティスと品質保証とコンプライアンス担当者による作業の日常的な監視を採用することで、ギャップは埋めることができる。ウイルスの制御および TSE のリスク評価プロセスに関する 3 つの戦略を使用する、この総合的なアプローチは、患者に供給される材料が、安全で、ウイルスおよび TSE の汚染が無いという信頼を提供する。

本文以上

<図表の説明>

図 1 ウィルス安全性のトライアングル

図 2 バイオ医薬品と潜在的な TSE とウィルスのリスク管理

図 3 TSE およびウィルスのリスク制御に対する継続的な改良概念図