



チャイニーズハムスター
卵巣 (CHO) 細胞
セルバンク安全性試験
と特性解析

Simplifying Progress

SARTORIUS

チャイニーズハムスター 卵巣 (CHO) 細胞セルバンク 安全性試験と特性解析

CHO細胞は製薬業界で最も広く使用されている生産細胞株で、安全性プロファイルも20年以上にわたって確立されてきています。CHO生産細胞株の安全性と特性解析に関するガイドラインは、医薬品規制調和国際会議 (ICH) Q5 (R1) 「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」と、ICH Q5D 「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品 | 生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」に調和されました。

2007年以降、ザルトリウスは200件以上のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞セルバンクの安全性及び特性解析試験を実施してきました。当社研究者は豊富な知識と経験を有しており、化学や規制上の要件に適合する最適かつ費用対効果の高い試験戦略についてのアドバイスを提供していきます。バンク製造時に使用される細胞株と原材料の履歴も考慮し、テストパッケージをご提案いたします。

ザルトリウスはMHRAライセンスを取得したFDA査察完了施設において、ICH Q5 (R1) 及びICH Q5Dに対応したGMP製造用CHO生産セルバンクのリリースをサポートするための、包括的なGMP、GLP適合アッセイ一式を提供しています。

試験	MCB	WCP	EoPC
同一性	+	+	+
マイコプラズマ	+	+	+
無菌性	+	+	+
In vitroアッセイ	+	+	+
In vivoアッセイ	+	-	+
抗体試験	+	-	-
レトロウイルス感染性	+	-	+
逆転写酵素	-	-	-
電子顕微鏡	+	-	+
種特異的試験	+	-	-

表1: GMP、GLP試験要件概要

🌐 詳細は www.sartorius.com をご覧ください。

マスターセルバンク (MCB) テストとエンドオブ プロダクションセルバンク (EoPC) テスト

GMP適合製品の製造には、まずマスターセルバンク (MCB) を作製しなければなりません。MCBはクローン細胞集団から均一に増殖された細胞株で、凍結用チューブに均質に分注され、細胞株の最初の拡大培養を担い広範囲に及ぶ特性解析を必要とします。すべてのワーキングセルバンク (WCB) は完成したMCBから作製されます。外因性ウイルス、内在性ウイルスによる汚染の有無を問う広範なスクリーニングに加え、微生物汚染の有無を調べるテストも実施する必要があります。

MCBテストは1回実施します。エンドオブプロダクションセルバンク (EoPC) では、細胞が原細胞から変化していないかを判断し、MCBに存在はしていても検出されない可能性のある低レベルの汚染を検出するため、ほぼ同様で若干種類の少ないテストパッケージが繰り返されます。また、EoPCを検査することで、潜伏感染や製造工程で混入した汚染物質も検出することができます。生産に使用されたEoPCテストは製品許可申請 (PLA) の提出前に実施する必要があります。MCBとEoPCに要求されるテスト概要を表2に示します。

アッセイ内容	アッセイ期間 (週)	サンプルの要件
微生物汚染 (テクニカルノートT1)		
EP USP JPに従う直接摂取による無菌性試験、バリデーションおよび試験基盤	4	テスト用にセルバンクの1% (最低2バイアル) とクオリフィケーション用に1.5%
EP USPに従うマイコプラズマテスト (寒天培地と指標細胞)	6	1バイアル
同一性		
細胞株同一性に関するDNAバーコーディングアッセイ	3	1バイアル
外来ウイルス因子微生物汚染		
外来ウイルス因子検出のための28日間のin vitroアッセイ (Vero細胞、MRC-5及びCHO検出細胞株)	6	細胞を増殖させ調製 (又は3バイアル+70 mL上澄液使用)
In vivo外来ウイルス因子アッセイ: 成体マウス、乳のみマウス、及び発育鶏卵を使用したICHトピックQ5A(R1)に従うバイオテクノロジー医薬品のウイルス安全性評価	8	細胞を増殖させ調製 (又は1 × 10 ⁷ cells/mLの23 mL上澄液使用)
レトロウイルス (テクニカルノートT2)		
Mus dunni 細胞との共培養とその後のMiCl S+L-アッセイによる異種指向性マウスのレトロウイルス検出	6	細胞を増殖させて得た生細胞
透過型電子顕微鏡 (TEM) による200細胞プロファイル試験	4	細胞を増殖させて得た生細胞
種特異的ウイルス		
5ウイルスとマウス抗体作製テスト (MAP)、16ウイルス (EoPCには不要)	10	細胞を増殖させ調製 (又は、1 × 10 ⁷ cells/mLの8 mLの培養上清)
リアルタイムPCRによるウシ、ブタウイルススクリーニング	2	1バイアル
リアルタイムPCRによるMVM検出	2	1バイアル
リアルタイムPCRによるベシウイルスの検出	2	1バイアル

表2: MCBとEoPCテスト。テクニカルノート1-6を参照のこと。

ワーキングセルバンク (WCB) テスト

MCBに関する特性解析が広範囲に行われているため、WCBには限定的に試験を実施すべきです。

一方で、MCBの代替として、WCBに対して包括的な試験を実施する場合があります。WCBに推奨されるテストの概要を図3に示しています。

アッセイ内容	アッセイ期間 (週)	サンプルの要件
微生物汚染 (テクニカルノートT1) 直接接種による無菌性試験 (欧州薬局方最新版2.6.1無菌性、米国薬局方<71>)	4	セルバンクの1% (最低2バイアル) *
マイコプラズマテスト (欧州薬局方最新版2.6.7. マイコプラズマ及び USP - NFマイコプラズマテスト、USP<63>最新版)	6	1バイアル
同一性 細胞株同一性に関するDNAバーコーディングアッセイ	2	最低 1×10^7 細胞を含む 1バイアル
外来ウイルス因子 外来ウイルス因子検出のため28日間のin vitroアッセイ (Vero細胞、MRC-5及びCHO検出細胞株)	6	細胞を増殖させ調製 (又は3バイアル+70mLの培養上清)

表3: WCBテスト
*又はMCBに適合性認証されている最小量

遺伝的特性アッセイ

ICHガイドラインでは、適正なタンパク質の安定生産のためには挿入配列の安定性と完全性について特性解析を行うことが必要であると記載されています。

ザルトリウスは以下の遺伝的安定性アッセイを提供しており、お使いの製品に最もふさわしいアプローチについてアドバイスすることができます。

お客様の製品ライフサイクルの適切な時点で、MCB、WCB、EoPCの同等性評価を遺伝子特性評価アッセイと並行して行うことが推奨されています。

アッセイ内容	アッセイ期間 (週)	サンプルの要件
遺伝子解析 mRNAシーケンシングによる導入遺伝子配列 (コード領域) 確認	6	1バイアル
DNAシーケンシングによる導入遺伝子近接領域確認	6	1バイアル
設計とバリデーション - リアルタイムPCRによる挿入遺伝子コピー数測定	5	-
テスト - リアルタイムPCRによる挿入遺伝子コピー数測定	2	1バイアル
サザンブロットによる制限酵素解析	6	1バイアル

表4: 遺伝的特性アッセイ
テクニカルノートT7を参照。



統合型サービスの提供

包括的ソリューションのための統合型サービスの一環として、以下に関する総合的なソリューションを提供しています。

- 細胞株開発
- CHO GMPセルバンキング
- CHO製品のテストと特性解析
- バイオシミラーと新規のバイオ医薬品(NBE)の分析と特性解析
- カスタムアッセイ設計

テクニカルノート

T1.

マイコプラズマと無菌性の検査におけるセルバンクサンプルのクオリフィケーションが、MCBでは1度要求されます。無菌性試験については、最終的な凍結製剤に抗生物質が含まれている場合は別の膜ろ過法を行うことができます。

T2.

CHO細胞株には、内在性かつ欠損性の非感染性レトロウイルスが含まれています。レトロウイルステストを行う際は多くのアプローチを取り得ることができますが、すべての手順を実施する必要はありません。

- a. 電子顕微鏡はレトロウイルス性粒子（出芽C型粒子、R型粒子、及び囊内A型粒子等）を視覚化する強力なツールです。
- b. PERTアッセイは酵素活性を検出するのに使用されています（ハムスター細胞が内在性かつ欠損性の非感染性レトロウイルスを含んでいるため、結果は陽性となるはずです）。
- c. 検出用の細胞ベースの感染性アッセイは、検出されたウイルスが感染性であるかどうかを判断します。感染性のウイルスが検出されると、細胞はヒト細胞株と共培養を行いヒト細胞への感染可能性を判断します。標準的にTEMと感染性アッセイはCHOテストで実施されるものです。TEMでは結果が陽性となり感染性アッセイでは陰性となることが予想されます。この場合はPERTは要求されません。TEMでレトロウイルス様粒子が観察されなかった場合、PERTテストを行うこともできます。内在性ウイルスが存在するため、PERTテストでは結果が陽性となる可能性が高くなります。

T3.

HAPテストは以下のウイルスを検出します。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、マウス肺炎ウイルス (PVM)、レオウイルス3型、センダイウイルス、シミアンウイルス5型 (SV5)。

詳細情報は各サービスのカタログをご覧ください。

🌐 詳細は www.sartorius.com をご覧ください。

T4.

MAPテストは以下のウイルスを検出します。エクトロメリアウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ハンタウイルス、マウス肺炎ウイルス (PVM)、レオウイルス3型、マウス脳脊髄炎ウイルス、乳酸脱水素酵素ウイルス、センダイウイルス、マウス微小ウイルス (MVM)、マウスアデノウイルス、マウスサイトメガロウイルス、マウス肝炎ウイルス、マウスロタウイルス、ポリオーマウイルス、胸腺ウイルス、Kウイルス。

T5.

作製又は開発時のいずれかの時期において親細胞がウシの血清又はブタのトリブシンに触れた場合、様々なウシおよびブタ特異的ウイルスの網羅的な試験を実施する必要があります。

T6.

細胞増殖は、BioOutsourceで利用可能な手順および機器を用いた標準条件で培養可能であるという前提のもと、実施することが可能です。特殊な要件がある場合はザルトリウスまでご相談ください。

T7.

アッセイ法の設計はその医薬品が単一の導入遺伝子から構成されているのか、あるいは複数のインサート（抗体の重鎖と軽鎖等）から構成されているかによって異なります。

参考

- (1) ICH Q5A(R1)「ヒト又は動物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」
- (2) ICH Q5D「生物医薬品（バイオテクノロジー応用医薬品 | 生物起源由来医薬品）製造用基剤の由来、調製及び特性解析」

世界に広がる施設



お問い合わせ先

詳細については、www.sartorius.comをご覧ください。

ザルトリウス・ステディム・ジャパン株式会社

営業部

Phone : 03 6478 5201 | Fax : 03 6478 5495

www.sartorius.com

〒140-0001 東京都品川区北品川1-8-11 Daiwa品川Northビル4階

※製品仕様は予告なく変更される場合があります。