

癌細胞上に発現する
山田佳太、木下充弘、中家修一、早川堯夫、掛樋一晃
第 129 回日本薬学会年会
培養癌細胞中の O 結合型糖鎖の網羅解析
山田佳太、渡辺沙木絵、木下充弘、中家修一、早川堯夫、掛樋一晃
第 29 回日本糖質学会年会
エボラウィルス表面糖タンパク質中の N・及び O-結合型糖鎖解析
山田佳太、宇佐美克明、早川堯夫、掛樋一晃、入村達郎
第 29 回日本糖質学会年会
加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化・加齢マーカーとしての糖鎖の可能性
能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃
第 29 回日本糖質学会年会
ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylactosamine-Carrier Protein のグリコプロテオーム解析
田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃
第 59 回日本薬学会近畿支部大会
加齢により変動する血清糖タンパク質糖鎖の解析と加齢マーカーとしての可能性の検証
木下充弘、能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、早川堯夫、掛樋一晃
第 59 回日本薬学会近畿支部大会
キャピラリー電気泳動を用いたヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylactosamine-Carrier Protein のグリコプロテオーム解析
田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早

川堯夫、掛樋一晃
フコシル化を回復させた HCT116 細胞上に観察される糖タンパク質糖鎖
第 82 回日本生化学会大会
梶直孝、山田佳太、田中佑樹、岩本竜昇、木下充弘、三善英知、森脇健太、早川堯夫、掛樋一晃
第 82 回日本生化学会大会
加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化
能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃
第 82 回日本生化学会大会

Table 1 Mucin-type O-glycans observed in HCT116 cell.

M1		M4	
504	Gal-GalNAc-2AA	1815	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 { NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA
546	GlcNAc-GalNAc-2AA	1969	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO₃
625	GlcNAc-GalNAc-2AA + SO₃	2180	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 { NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA
706	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA	2335	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO₃
786	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + SO₃	2546	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 { NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_4$ β 1-6} GalNAc-2AA
868	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA	M5	
949	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + SO₃	1450	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 (NeuAc α 2-6Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA
1234	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA	1815	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 { NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA
M2		M6	
1158	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	1085	NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-2AA
1361	Gal β 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	1238	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc + SO₃
1523	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1440	Gal β 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc + SO₃
1888	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1450	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 (NeuAc α 2-6Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA
2253	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1604	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO₃
2618	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1684	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + 2SO₃
M3		1764	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + 3SO₃
633	NeuAc α 2-6GalNAc-2AA	2260	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 { NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA + SO₃
795	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc-2AA	2626	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 { NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_4$ β 1-6} GalNAc-2AA + SO₃
998	NeuAc α 2-3Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA	2106	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 { NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc
1160	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	2471	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 { NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc

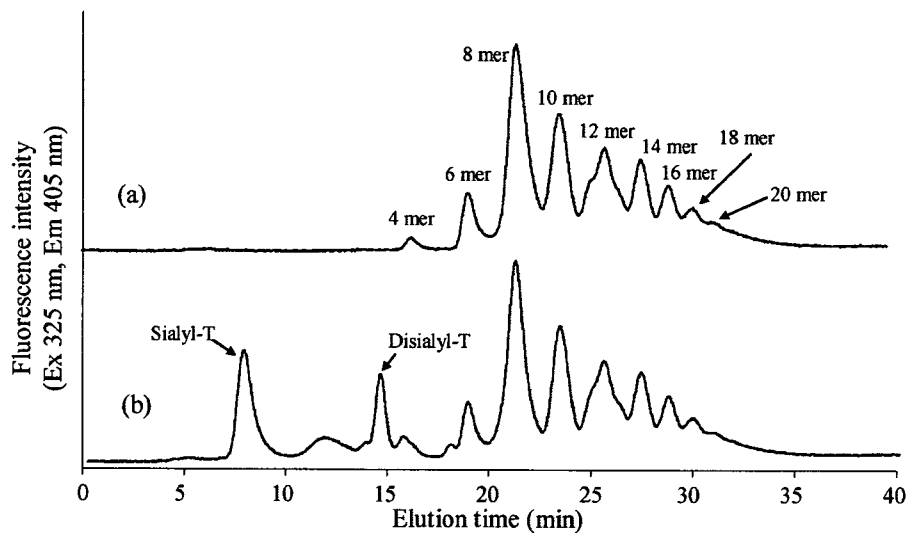


Fig.1 Serotonin affinity chromatography of HA oligosaccharides and mucin-type O-glycans. (a) 2AA-labeled HA oligosaccharides (4-20 mer) and (b) a mixture of mucin-type O-glycans from bovine fetuin and HA oligosaccharides. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-75 % solvent B) from 2 to 45 min and 75% solvent B from 37 to 45 min.

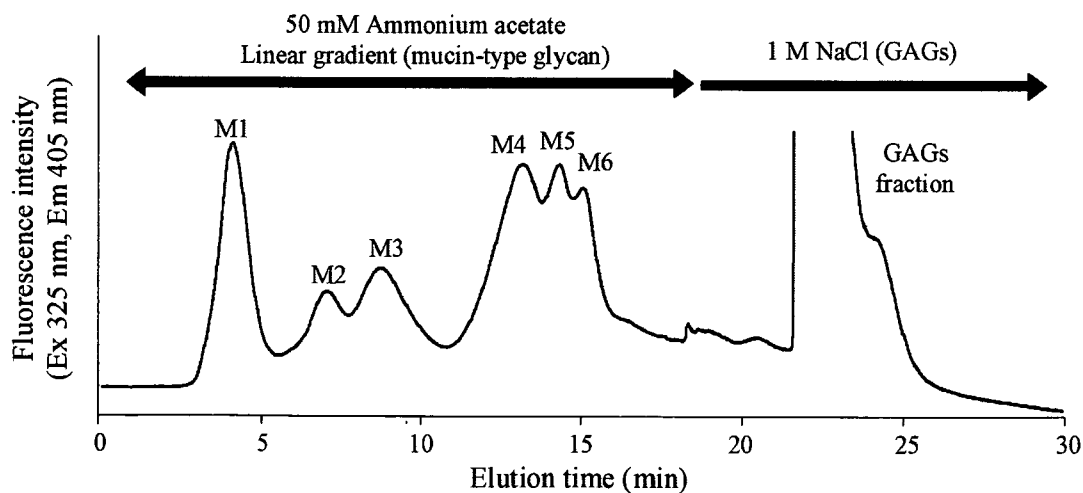


Fig.2 Serotonin affinity chromatography of O-linked glycans derived from HCT116 cell. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from 2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.

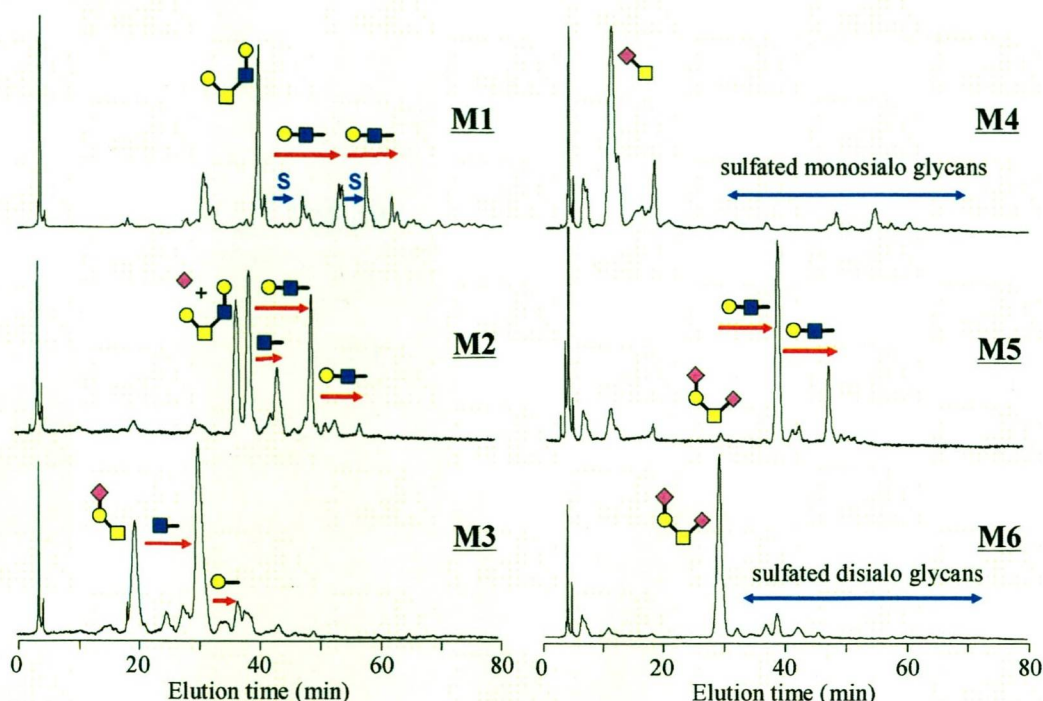


Fig.3 NP-HPLC analysis of mucin-type O-glycans from HCT116 cell. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH₃COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH₃COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.

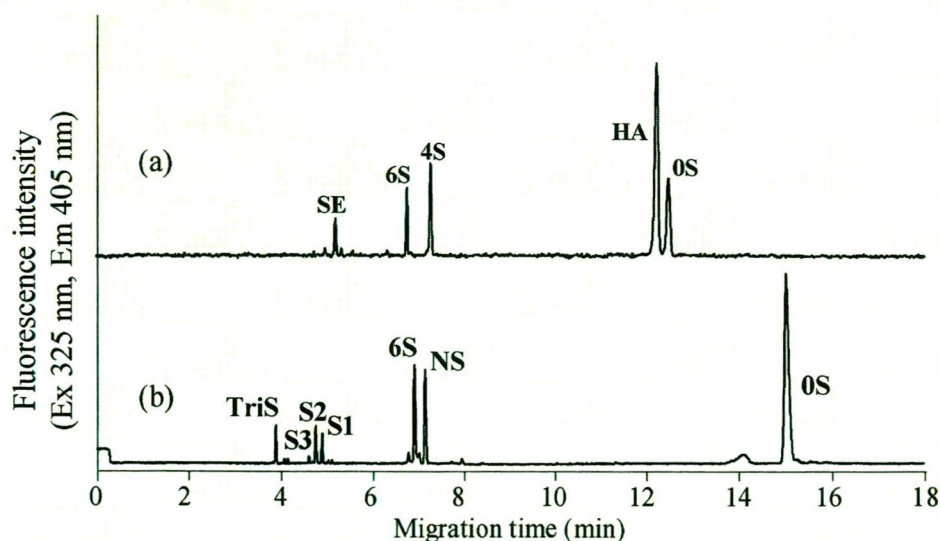
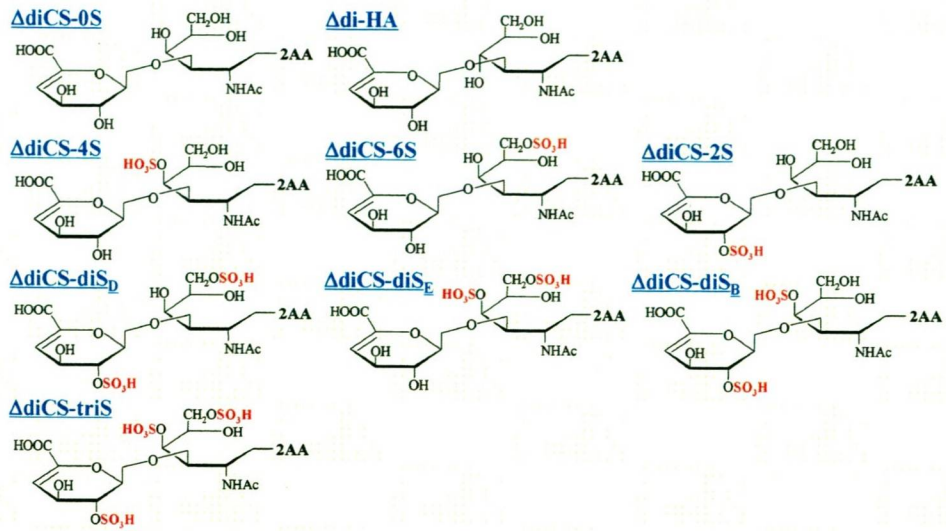


Fig.4 CE analysis of unsaturated disaccharides from HCT116 cell. Analytical conditions; Capillary, fused silica (40 cm x 50 μ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

CS and HA unsaturated disaccharides



HS unsaturated disaccharides

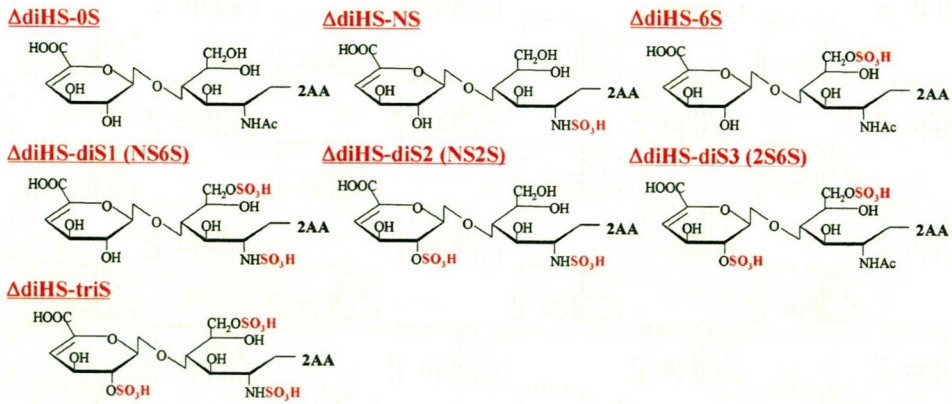


Fig.5 Structures of unsaturated disaccharides from CS and HS.

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版 地	出版 年	頁
内田恵理子	第8章 細胞基材の マイコプラズマ試験	山口照英	先端バイオ医薬品の 評価技術	シーエム シー出版	東京	2010	151 -167
内田恵理子	20. バイオテクノロ ジー応用医薬品/生 物起源由来医薬品の 製造に用いる細胞基 材に対するマイコプ ラズマ否定試験	(財) 日本公定 書協会	日本薬局方技術情報 2010 追補 (JPTI2010)第15 改正第一追補/第二 追補対応	(株) じほう	東京	2010	85 -91
川崎ナナ, 石井明子, 荒戸照世, 山口照英	抗体医薬品の構造及 び品質特性解析 抗 体医薬品製造の留意 点～承認申請をふま えて～		抗体医薬品における 規格試験法・製造と 承認申請 ～規格試 験・申請・培養・精 製・不純物除去・特 性解析～	サイエン ス&テク ノロジー 社	東京	2009	119 -132
Tanabe S, Sato Y, Suzuki K.	Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers.	R.M. Mohan	Research Advances in Biochemistry.	Global Research Network	Kerala India	2009	1-8

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
内田恵理子, 山口照英	医薬品のウイルス安全性確保：核酸増幅検査（NAT）によるC型肝炎ウイルス検出の評価とNATによる高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発	<i>YAKUGAKU ZASSHI</i>	130 (2)	163-169	2010
宮田直樹, 川崎ナナ, 内田恵理子, 蜂須賀暁子	平成19年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告：日本薬局方の名称関連項目の科学的整備に関する研究	<i>医薬品研究</i>	40	587-598	2009
山口照英, 内田恵理子	核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保	<i>Pharmstage</i>	9 (2)	1-5	2009
Watanabe T, Tanaka G, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Nakajima M, Furihata C.	Dose-dependent alterations in gene expression in mouse liver induced by diethylnitrosamine and ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR.	<i>Mutat Res.</i>	673	9-20	2009
Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y.	Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow.	<i>Am J Physiol Cell Physiol.</i>	298	C140-C1 48	2010

Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Nakajima Y, Harazono A, Kawanishi T, Yamaguchi T.	Identification of glycoproteins carrying a target glycan motif by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry. Identification of Lewis x-glycoproteins in mouse kidney.	<i>J Proteome Res.</i>	8	3415-34 29	2009
Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Takakura D, Qin Y, Xiaoyu H, Yamaguchi T.	The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals.	<i>Biol Pharm Bull.</i>	32 (5)	796-800	2009
Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T.	Alteration of N-glycosylation in the kidney of systemic lupus erythematosus model mouse. Relative quantification of N-glycans by using isotope tagging method.	<i>Immunology</i>	126(3)	336-45	2009
川崎ナナ	糖鎖関連医薬品の開発と分析化学	ぶんせき	421(1)	17-22	2010
Tashiro K, Inamura M, Kawabata K, Sakurai F, Yamanishi K, Mizuguchi H.	Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction.	<i>Stem Cells</i>	27	1802-18 11	2009

Tashiro K, Kondo A, Kawabata K, Sakurai H, Sakurai F, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H.	Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	379	127-132	2009
Nishida M, Suda R, Nagamatsu Y, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Shibata T, Uchida K, Sumimoto H, Sato Y, Kurose H.	Pertussis toxin upregulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation.	<i>J Biol Chem.</i>			印刷中
Sakamoto K, Hiraiwa M, Saito M, Nakahara T, Sato Y, Nagao T, Ishii K.	Protective effect of all-trans retinoic acid on NMDA-induced neuronal cell death in rat retina.	<i>Eur J Pharmacol.</i>			印刷中
Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R, Kurose H.	Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition.	<i>J Biol Chem.</i>			印刷中
佐藤陽治	ヒト幹細胞からの肝細胞分化誘導とその創薬非臨床試験への応用	<i>実験医学 (増刊)</i>	28	334-338	2010

西田基宏, 佐藤陽治, 仲矢道雄, 黒瀬等	G タンパク質共役型受容体 -TRPC チャネルタンパク複 合体形成による心肥大シグ ナル制御	日本薬理学雑誌	134	131-136	2009
Fujishita K, Ozawa T, Shibata K, Tanabe S, Sato Y, Okuda T, Maeda S, Koizumi S.	Grape seed extract (GSE) acting on astrocytes reveals neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms.	<i>Cell Mol Neurobiol.</i>	29	1121-11 29	2009
佐藤陽治	ヒト細胞・組織加工医薬品 などの安全性確保	医学のあゆみ	229	893-896	
Suzuki T, Ishii-Watabe A, Tada M, Kobayashi T, Kanayasu-Toy oda T, Kawanishi T, Yamaguchi T.	Importance of FcRn in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: A comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human FcRn.	<i>J.Immunol.</i>	184(4)	1968-19 76	2010
山口照英, 石井明子	早期臨床開発段階でのバイ オ医薬品の品質・安全性確 保	臨床評価	36	611-627	2009
Kakoi N, Kinoshita M, Kawasaki N, Yamaguchi T, Hayakawa T, Takehi K.	Capillary electrophoresis analysis of contaminants in heparin sodium for the Japanese pharmacopoeia purity test.	<i>Yakugaku Zasshi.</i>	129(10)	1255-12 64.	2009

Yamada K, Watanabe S, Kita S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.	Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis.	<i>Anal Biochem.</i>	396(1)	161-163	2010
Kinoshita M, Ohta H, Higaki K, Kojima Y, Urashima T, Nakajima K, Suzuki M, Kovacs KM, Lydersen C, Hayakawa T, Kakehi K.	Structural characterization of multibranched oligosaccharides from seal milk by a combination of off-line high-performance liquid chromatography-matrix assisted laser desorption / ionization-time-of-flight mass spectrometry and sequential exoglycosidase digestion.	<i>Anal Biochem.</i>	388(2)	242-253	2009
Yamada K, Kinoshita M, Hayakawa T, Nakaya S, Kakehi K.	Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines.	<i>J Proteome Res.</i>	8(2)	521-537	2009

先端バイオ医薬品の評価技術

Evaluation Strategy and New Technologies in
Development of Advanced Biotechnology Products

監修：山口照英

Supervisor : Teruhide Yamaguchi

シーエムシー出版

第8章 細胞基材のマイコプラズマ試験

内田恵理子*

1 はじめに

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、細菌の1/10程度の大きさの自己増殖能を持つ最小の微生物である。細胞培養の過程で細胞がマイコプラズマに汚染しても不顕性感染となるため見逃されやすい。しかし、マイコプラズマに感染した細胞は増殖性や形態の変化、サイトカインの産生など、細胞の本来の機能や性質が様々な影響を受けることが知られており、汚染細胞を用いて医薬品が製造されると重大な事態を招く可能性がある^{1, 2)}。一度汚染された細胞からマイコプラズマを除去することは困難である。したがって、バイオ医薬品の製造に用いる細胞基材については、適切な方法でマイコプラズマ試験を実施し、その存在を否定することが求められる。一方、遺伝子治療用医薬品³⁾や、細胞そのものを医薬品として用いるヒト自己及び同種由来細胞・組織加工医薬品^{4, 5)}では、医薬品の製造に細胞の培養工程が入ることから、最終製品について適切なマイコプラズマ否定試験の実施が各指針により求められている。

本章では、細胞基材のマイコプラズマ否定試験について、公定書に記載されている試験法を中心に、各試験法の特徴と試験の実施上の留意事項、試験法の選択について概説する。

2 培養細胞を汚染するマイコプラズマの特徴

マイコプラズマ類は動植物界に広く分布しており、これまでに120種類以上の菌種が報告されている。人や動物では口腔咽頭、鼻腔、尿生殖器等に生息し、自然界では種特異性が強く固有のマイコプラズマが感染する。しかし、培養細胞では種を超えて感染することが知られ、一度感染が成立すると持続感染状態になる。マイコプラズマが培養細胞に感染しても、多くの場合、細胞膜に付着して細胞と共存して増殖し、ウイルス感染のような細胞変性を伴わず、また一般の細菌感染で認められるような培養液の混濁も起こらないため、汚染には気づかないことが多い。マイコプラズマは細胞壁を持たないためペニシリン系薬剤は無効であり、可塑性を示すため0.22 μm のろ過滅菌フィルターを通過する。カナマイシン、ゲンタマイシンなどには耐性を持つものもあ

* Eriko Uchida 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第一室 室長

表1 培養細胞を汚染する代表的なマイコプラズマ菌種と自然宿主^{1, 2)}

菌種名	自然宿主
<i>Mycoplasma arginini</i>	ウシ, ヤギ
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	ウシ
<i>Mycoplasma orale</i>	ヒト
<i>Mycoplasma fermentans</i>	ヒト
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	ブタ
<i>Mycoplasma salivarium</i>	ヒト
<i>Mycoplasma hominis</i>	ヒト
<i>Mycoplasma pirum</i>	不明

るといふ。これらの特徴から、培養細胞のマイコプラズマ汚染は実験室レベルでは高頻度に認められている⁶⁾。

マイコプラズマには非常に多くの種類があるが、培養細胞の汚染が報告されているマイコプラズマは数が限られており、表1に示す8種類の菌種で培養細胞のマイコプラズマ汚染の95%以上を占めるといふ^{1, 2)}。培養細胞を汚染しているマイコプラズマの自然宿主はウシ、ブタ、ヒトであり、培養に用いる血清や動物由来の試薬類（トリプシン等）、培養作業の従事者が汚染源になっていることが推定される。細胞の汚染を防ぐには、マイコプラズマが検出されない血清や試薬類を培養に用いることが重要である。

3 公定書に記載されているマイコプラズマ否定試験

医薬品の製造に用いる細胞基材や最終製品に対して、現時点で適切と考えられるマイコプラズマ否定試験は、①培養法、②指標細胞を用いたDNA染色法、③ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法／核酸増幅検査（NAT）である。これらの試験法は日本薬局方（日局）⁷⁾、欧州薬局方（EP）⁸⁾、FDA Points to consider in characterization of cell lines used to produce biologicals（FDA/PTC）⁹⁾などに記載されている（表2）。マイコプラズマ否定試験は国内では日局参考情報の他に生物学的製剤基準¹⁰⁾、日本工業規格（JIS）¹¹⁾にも記載されている。日局はバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材、すなわちマスター・セル・バンク（MCB）、ワーキング・セル・バンク（WCB）及び医薬品製造工程中の培養細胞を適用対象としているのに対し、生物学的製剤基準は基準に記載されているウイルスワクチン類を対象としたものである。一方、JISには、バイオ製品の原材料や培養細胞などのバイオ中間産物の品質管理の

第8章 細胞基材のマイコプラズマ試験

表2 国内外の公定書に記載されているマイコプラズマ否定試験法

	JP (日局 15 第 2 追補 (2009))	JIS (2003)	生物学的 製剤基準 (2009)	EP 6.1 (2008)	FDA/PTC (1993)
適用対象	バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材で細胞バンクを基にするもの(MCB, WCB, 製造工程中の培養細胞)	培養細胞, 細胞培養に用いる試薬類, 細胞培養によって生産された製品	ウイルスワクチン(ろ過前, 不活化前)	MCB, WCB, コントロール細胞, ウイルスシードロット, ウイルスハーベスト, バルクワクチン, 最終ロット	MCB, 細胞基材, ワーキングセルストック, ウイルスシード, 製品ハーベスト濃縮液
	試験法				
①培養法	○	○	○	○	○
②DNA 染色法	○	○	—	○	○
③PCR 法/NAT	2 段 PCR を例示	2 段 PCR	—	NAT (概論とバリデーション法のみ)	—
実施すべき試験法の組合せ	①と② ②のみ陽性の場合, ③で否定できる	①又は②と③	①	①と②* ③は適切なバリデーションを実施すれば①又は②を代替できる	①と②

*細胞基材の場合

ためのバイオプロセスの標準規格としてのマイコプラズマ検出法が制定されている。なお、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」¹¹⁾によると、マイコプラズマの存在を否定するための試験は、MCB及びWCBで行うべきであり、一般的には、容器1本分の細胞を用いた試験で十分と考えられている。

日局には、①培養法、②指標細胞を用いたDNA染色法、③PCR法の試験の詳細とその利用の仕方が示されている。各試験法の概要と特徴を表3に示す。以下に、各試験法の原理と試験の実施法を日局の方法を中心に解説する。なお、日局には第13改正第2追補(1999年)からマイコプラズマ否定試験が参考情報として記載されているが、第15改正第2追補(2009年)でその内容が改訂されている。日局の参考情報は、医薬品の安全性や品質を担保するという目的で記載され、試験を実施する上で参考になると考えられる情報を例示したものであるが、必ずしも記載に従って実施しなければならないというものではない。

表3 マイコプラズマ否定試験法の比較

試験法	特徴	長所	短所
①培養法	人工培地（液体培地，寒天培地）に検体を接種してマイコプラズマを培養し，マイコプラズマ特有のコロニーを検出する 所要日数：28日以上 検出感度：1~10cfu/ml	・マイコプラズマの直接培養法	・判定まで非常に時間がかかる ・培養細胞を汚染するマイコプラズマは人工培地では増殖しないものもある
②指標細胞を用いたDNA染色法	指標細胞（Vero細胞）に検体を接種し，細胞に依存して増殖したマイコプラズマをDNA特異的蛍光色素で染色して細胞核外の微小なDNA蛍光斑点として検出する間接検出法 所要日数：4~7日 検出感度：10~100cfu/ml	・培養細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖しやすいため，培養法で検出されないマイコプラズマも検出できる	・DNAを蛍光染色する間接検出法であり，マイコプラズマDNAを特異的に検出するわけではない ・細胞由来DNAも染色されるため判定に熟練を要する
③PCR法	検体からDNAを抽出し，マイコプラズマ特異的プライマーを用いて増幅して検出する方法 所要日数：1~2日 検出感度：1~10 copy/reaction	・迅速に判定できる ・検出感度，特異性に優れている	・マイコプラズマの不活性菌，DNA断片も検出され，感染性のあるマイコプラズマを検出するとは限らない ・プライマーに依存して検出されるマイコプラズマ種が規定される ・キャリアオーバーによる偽陽性が出やすい

4 培養法

4.1 原理・特徴

培養法とはマイコプラズマを人工培地で培養し，マイコプラズマのコロニー形成の有無を観察することにより判定する，マイコプラズマの直接検出法である。EP⁸⁾ やFDA/PTC⁹⁾ でも従来より実績のある方法として採用されている。陽性の判定が得られた場合には，最も確実な証明といえる。また，理論的には1mlあたり1~10コロニー形成単位（CFU）という低濃度のマイコプラズマも検出が可能である。しかし，試験には長期間の培養が必要であり，日局の方法では判定まで28日間以上かかる。また，細胞基材を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖する性質があり，*M. hyorhinitis* のように培養細胞での汚染頻度は高いが人工培地では増殖しにくい菌種も存在するため，必ずしも細胞を汚染する全てのマイコプラズマを検出できるわけではないところが欠点である。

第8章 細胞基材のマイコプラズマ試験

4.2 使用培地・陽性対照

培地はカンテン平板培地と液体培地の両方を使用する。抗生物質はマイコプラズマの増殖を阻害するため、培地にはペニシリン以外の抗生物質を用いてはならない。使用する培地はロット毎にマイコプラズマの発育性能試験を実施する必要がある。日局の場合、培地組成は生物学的製剤基準を参考にすることとあるが、培地の性能試験に適合すれば他の培地も使用できる（表4）。

培地の性能試験には、陽性対照としてデキストロース分解マイコプラズマ (*M. pneumoniae* ATCC15531 又は同等の種又は株) とアルギニン分解マイコプラズマ (*M. orale* ATCC23714 又は同等の種又は株) を 100CFU 以下又は 100 色調変化単位 (CCU) 以下接種し、検出できることを確認する。マイコプラズマは長期間の継代培養により性質が変化し、同じ菌株でも継代数や保存条件、供給元によっては試験に適さない可能性があるため、陽性対照となるマイコプラズマは公的又は適切と認められた機関より入手後、適切に管理された継代数の低いものを使用する必要がある。日局 15 第二追補の改訂により、指標菌株は ATCC のコード番号で表示されるようになり、適切な機関からの入手が容易になった。EP や FDA/PTC では、陽性対照マイコプラズマは野生から分離後 15 継代以内のものを使用し、 -20°C 以下または凍結乾燥して保存することが求められる。

表4 培養法の培地組成 (生物学的製剤基準¹⁰⁾ による)

	液体培地 I	液体培地 II	カンテン平板培地
基礎培地	ウシ心筋浸出液 (pH7.8~8.0) 75mL ブドウ糖 0.3g 0.5w/v% フェノールレッド 溶液 0.5mL	ウシ心筋浸出液 (pH7.8~8.0) 75mL 塩酸アルギニン 0.3g 0.5w/v% フェノールレッド 溶液 0.5mL	ウシ心筋浸出液 (pH7.8~8.0) 75mL カンテン 1.2g
添加物	ウマ血清 15mL 25% 新鮮酵母エキス (pH7.3~7.5) 10mL ペニシリン G カリウム 5万 単位	ウマ血清 15mL 25% 新鮮酵母エキス (pH7.3~7.5) 10mL ペニシリン G カリウム 5万 単位	ウマ血清 15mL 25% 新鮮酵母エキス (pH7.3~7.5) 10mL ペニシリン G カリウム 5万 単位
pH	7.6~7.8	7.0~7.2	

ウシ心筋浸出液及び新鮮酵母エキスは、適当な品質の製品を用いてもよい。

ウマ血清は 56°C で 30 分間、加熱処理したものを用いる。

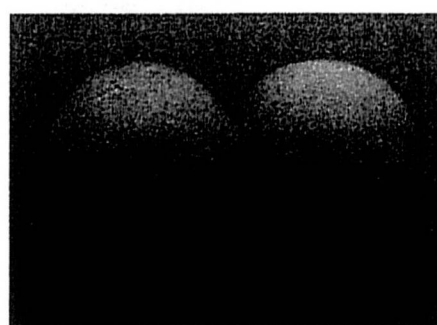
液体培地 I には、*M. pneumoniae* を、液体培地 II には、*M. orale* をそれぞれ 100CFU 未満接種して、 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ で培養するとき、7 日以内に培地が明らかに変色しなければならない。

4.3 実験操作

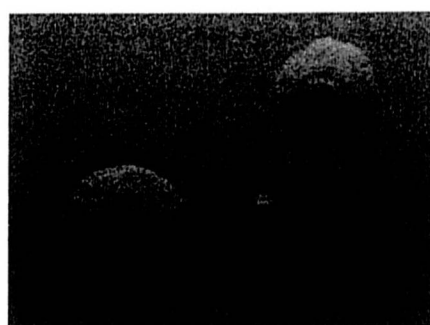
日局における培養法の試験操作法を表5に示す。判定はマイコプラズマのコロニー形成の有無

表5 日局培養法の試験操作法

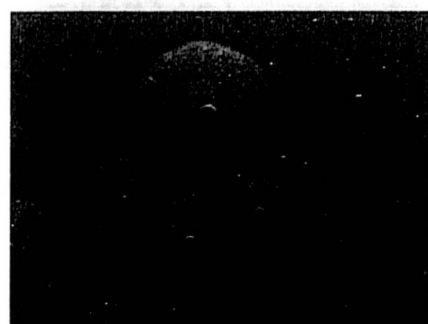
カンテン平板培地	① 検体（細胞懸濁液）0.2ml 以上を一検体あたりカンテン平板培地のプレート2枚以上に接種する。 ② 5~10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中（微好气的条件）で、適切な湿度のもと $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で14日間以上培養する。
液体培地	① 一検体あたり100mlの液体培地を入れた容器1本以上に検体（細胞懸濁液）10ml以上を接種する。 ② $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養後、3日目、7日目及び14日目に液体培地1本から0.2mlずつを採取し、カンテン平板培地2枚以上に移植する。 ③ 移植したカンテン平板培地は微好气的条件で、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で14日間以上培養する。
判定法	培養したカンテン平板培地全てについて、100倍以上の倍率の顕微鏡で観察し、マイコプラズマの集落（目玉焼き状のコロニー）の有無を判定する。



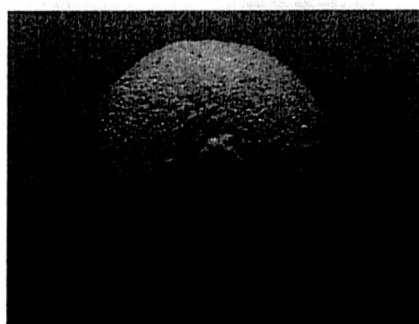
M. hyorhinis NBRC 14858



M. orale NBRC 14477



M. fermentans NBRC 14854



A. laidlawii NBRC 14400

Bar = 100 μm

図1 マイコプラズマのコロニー形態
 (写真提供：(株)製品評価技術基盤機構・特許微生物寄託センター 佐藤真則先生)

を顕微鏡で観察することで行う。菌種によってコロニーの形態は少し異なるが、いずれもマイコプラズマに特有の目玉焼き状のコロニーが観察される（図1）。

日局のマイコプラズマの培養条件は、従来はカンテン平板培地、液体培地とも嫌気（微好気）

培養と好気培養を半数ずつ行うことが求められていた。しかし、大部分のマイコプラズマ菌種は通性嫌気性であり嫌気、好気の両方の条件で増殖できること、カンテン平板培地での発育は微好気培養が好気培養よりも優れていること、さらにEPやFDA/PTCの培養条件も考慮して、日局15第2追補よりカンテン平板培地の培養は微好気培養のみに変更され、液体培地の培養は気相条件の規定が削除された。

培養法は、検体に抗生物質などのマイコプラズマ発育阻止因子が含まれると正確な結果が得られない。そこで、培養法を実施する前に、マイコプラズマ発育阻止因子の有無をあらかじめ試験し、発育阻止因子を有する場合には、遠心処理や細胞の継代などの適切な方法により発育阻止因子を除去あるいは中和しておく必要がある。マイコプラズマ発育阻止因子の測定は、生物学的製剤基準¹⁰⁾に記載があるマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる。検体の培養細胞は、試験の前に抗生物質を除いた培地で2、3継代した後に測定する¹²⁾。また、マイコプラズマは一般に細胞表面で増殖するため、細胞をトリプシン処理するとマイコプラズマが検出不能となるので、接着細胞を接種する場合、検体の細胞懸濁液はスクレイパーなどで剥離したものをを用いる¹³⁾。

5 DNA 染色法（指標細胞培養法）

5.1 原理・特徴

DNA 染色法（指標細胞培養法）は、カバーガラス上に培養した指標細胞（Vero 細胞）に検体（細胞培養上清）を接種して数日間培養し、細胞表面でマイコプラズマを増殖させた後、DNA 特異的蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡を用いてマイコプラズマを細胞核外の微小な DNA 蛍光斑点として間接的に検出する方法である。試験は陰性対照及び2種類のマイコプラズマ陽性対照と比較することにより判定を行う（図2）。DNA 染色法はマイコプラズマに特異的な検出法ではな

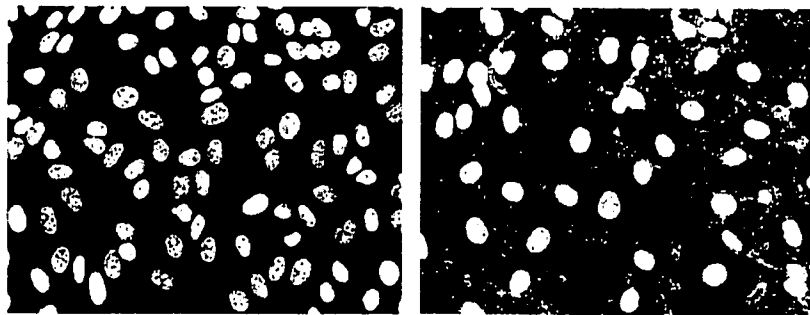


図2 マイコプラズマの DNA 染色法による判定

（写真提供：独医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンク）

左：マイコプラズマ陰性 Vero 細胞，細胞核のみ蛍光染色されている

右：マイコプラズマ陽性 Vero 細胞，細胞核外にマイコプラズマ DNA が検出される

く、断片化した細胞由来 DNA や細菌の DNA も染色されるため、結果の判定には熟練を要するとされる。また、培養法と比べると検出感度は低い。しかし、細胞基材を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖する特性を有することが多く、培養法では増殖しにくいマイコプラズマでも検出できるという利点があり、国内外の公定書で採用されている。

5.2 指標細胞・陽性対照

指標細胞としては、比較的多くのマイコプラズマを積極的に増殖させて検出感度を高めることが可能な Vero 細胞を用いる。被検細胞が単層培養細胞の場合、その細胞を直接培養して DNA 染色を行うことも可能であるが、細胞の種類によってはマイコプラズマが感染していてもあまり増殖しない場合があるので注意が必要である。Vero 細胞と同等以上の検出感度があることを示せば、Vero 細胞以外の細胞を指標細胞として用いてもよい。Vero 細胞はマイコプラズマ混入を避けて注意深く培養し、多数の種ストックを作製して、マイコプラズマの混入を否定した後、凍結保存する。試験にはこのストックを解凍し、6 継代以内のものを使用しなければならない。また、試験の前には抗生物質を除いた培地で継代しておく。

DNA 染色法の検出感度は、陽性対照として 2 種類のマイコプラズマ、*M. hyorhina* (ATCC 29052, ATCC17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC23714 又は同等の種又は株) を 100CFU 以下又は 100CCU 以下接種したものを検出できることが必要とされる。これら陽性対照のうち、*M. hyorhina* は培養細胞を高頻度に汚染していることから陽性対照とされているが、とりわけ DBS1050 株 (ATCC29052) は細胞への依存性が高く人工培地でのコロニー形成が難しいことが知られ、コロニー形成に基づく「100CFU 以下」という指標菌の接種量の設定が困難なことがあるかもしれない¹²⁾。ATCC29052 のインフォメーションシートには DBS1050 株を培養可能な培地を記載した論文¹⁴⁾ が示されているので、これに従って培養すれば、陽性対照としての接種量の設定も可能であろう。また、日局 15 第 2 追補の改正により、同じ *M. hyorhina* でも DBS 1050 株とは異なりカンテン平板培地で増殖しやすい BTS-7 株 (ATCC17981) が陽性対照の例に追加されたので、BTS-7 を陽性対照として用いることもできる。もう一種類の陽性対照である *M. orale* (ATCC23714 又は同等の種又は株) は *M. hyorhina* と異なり細胞吸着性が弱く、100CFU を接種しても陽性反応を示さないことがあるかもしれない¹²⁾。これは継代を繰り返して人工培地に順化しすぎたことが一因と考えられる。培養法の項でも述べたように、マイコプラズマは長期間の継代培養により性質が変化し、同じ菌株でも継代数や保存条件、供給元によっては試験に適さない可能性があるため、DNA 染色法の陽性対照となるマイコプラズマは公的又は適切と認められた機関より入手後、適切に管理された継代数の低いものを使用する必要がある。