

5.3 実験操作

日局における DNA 染色法の試験操作法を表6に示す。日局では 35mm 径の培養ディッシュを用いた操作法が示されているが、同等の容器（チャンバースライドなど）を用いてもよい。その場合、細胞密度が過剰になるとマイコプラズマ DNA の検出が難しくなることから、容器の大きさを考慮して細胞の接種数を調節する必要がある。JIS¹⁾には 35mm 径の培養ディッシュの他に、60mm 径シャーレと 15.5mm 径のマルチウェルプレートを用いる場合の接種細胞数が規定されており参考にできる。検体としては被検細胞ではなく細胞培養上清を用いるが、これは細胞を接種した場合、細胞密度が過剰となるためである。また、Vero 細胞の培養に用いる血清はマイコプラズマの存在をあらかじめ否定したものを使用する必要がある。DNA 染色に用いる蛍光色素はビスベンズイミダゾール（Hoechst 33258）又は同等の染色剤を用いる。JIS では DAPI（4'-ジアミノ-2-フェニルインドール・2 塩酸）が用いられる。

表6 日局 DNA 染色法の試験操作法

細胞培養～ 検体接種	①細胞培養用ディッシュ（直径 35mm）に滅菌したカバーグラスを無菌的に置く。 ② 10%ウシ胎児血清（マイコプラズマが検出されないもの）を含むイーグルの最少必須培地を用いて Vero 細胞懸濁液 1×10^4 細胞/ml を調製する。 ③カバーグラスを沈めた各培養ディッシュに Vero 細胞懸濁液 2 mL を接種し、5%炭酸ガスを含む空气中 36 ± 1 °C で 1 日培養し、細胞をカバーグラスに接着させる。 ④培地を新鮮な培地 2 mL と交換した後、試験検体（細胞培養上清）0.5mL を培養ディッシュ 2 枚以上に添加する。陰性対照（非接種）と 2 種類の陽性対照についても同じ操作を行う。 陽性対照： <i>M. hyorhinis</i> （ATCC29052, ATCC17981 又は同等の種又は株）及び <i>M. orale</i> （ATCC23714 又は同等の種又は株）100CFU 以下又は 100CCU 以下 ⑤ 5%炭酸ガスを含む空气中、 36 ± 1 °C で 3～6 日間培養する。
細胞固定～ 染色	⑥各ディッシュより培養液を除去し、固定液（メタノール：酢酸（3：1））2 mL を加え、5 分間おく。 ⑦各ディッシュより固定液を除去し、再度同量の固定液を加え 10 分間おく。 ⑧固定液を除去し、完全に風乾する。 ⑨各ディッシュにビスベンズアミド（bisbenzamide）蛍光染色液 2 mL を加え、室温で 30 分間おく。 ⑩染色液を除去し、蒸留水 2 mL で 3 回洗浄後、カバーグラスを取り出し乾燥する。 ⑪カバーグラスを封入液で封入する。
判定	⑫蛍光顕微鏡（400～600 倍又はそれ以上）で検鏡する。 ⑬検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較し、マイコプラズマ汚染の有無を判定する。 ⑭細胞核を囲むように微小な核外蛍光斑点を持つ細胞が 1000 個のうち 5 個（0.5%）以上あれば陽性と判定する。

6 PCR法 (NAT法)

6.1 原理・特徴

PCR/NAT (Nucleic Amplification Test; 核酸増幅検査) 法は、検体から抽出したマイコプラズマ DNA を、マイコプラズマに特異的なプライマーを用いて増幅することで高感度に検出する方法である。日局には、感度と特異性を増すための方法として2段 PCR 法 (ネステッド PCR 法) が例示されており、増幅した DNA はアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射により検出する。PCR 法は1, 2日程度の短時間で検出が可能であり、検出感度と特異性に優れた試験法としてウイルス等の感染性病原体の高感度検出に多用されている。マイコプラズマ否定試験としては比較的新しい方法で、日局と JIS に収載されているが、FDA/PTC にはない。EP には NAT 法が収載されている (6.4 項参照)。

PCR 法による検出の感度と特異性は使用するプライマーや DNA 抽出条件、PCR 反応条件に依存するため、多くの菌種を特異的に検出可能なプライマーの選択や反応条件の最適化が重要である。PCR 法によるマイコプラズマの検出は、精製したゲノムに対しては感度が高く 1-10 コピーを検出可能であることが報告されているが、PCR 反応にかけられるサンプル量が少ないこともあり、培養細胞中のマイコプラズマの検出感度は培養法や DNA 染色法と比べて必ずしも高いとはいえないようである¹⁵⁾。また、PCR 法は血清等に含まれるマイコプラズマの不活性菌 (死菌) やマイコプラズマのゲノム断片も検出されるため、必ずしも生きたマイコプラズマを検出するとは限らない。日局には、感染性のある生きたマイコプラズマの DNA を PCR で高精度に検出する方法として、Vero 細胞を用いて検体中のマイコプラズマを増殖させた後に PCR を実施する方法も例示されている。

6.2 プライマーの選択と PCR 反応条件

プライマーはマイコプラズマに特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマに良く保存されている領域を対象にしたものを用いる必要がある。マイコプラズマのゲノムは異種間で良く保存されている rRNA オペロンを共有していることが知られている。そのため、比較的多くのマイコプラズマを検出する領域として rRNA オペロン内の 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子間のスペーサー領域^{2, 16)}、あるいは 16S rRNA 遺伝子領域^{15, 17)} から、広範囲のマイコプラズマ種に相同性のある領域を選択したプライマーが使用される。日局には、16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子間のスペーサー領域を増幅する 2段 PCR 用プライマーが例示されている。表 7 に日局例示のプライマー配列と、このプライマーを用いて代表的なマイコプラズマから検出される増幅断片のサイズを示す。マイコプラズマの菌種により 2段 PCR で得られる増幅断片のサイズは異なる。

表 7 日局例示の 2 段 PCR 法プライマーと代表的なマイコプラズマ菌種より検出される PCR 増幅断片^{7, 16)}

アウタープライマー

F1 : 5'-ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT-3'

R1 : 5'-CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAGGCAT-3'

インナープライマー

F2 : 5'-GTG(G/C)GG(A/C)TGGATCACCTCCT-3'

R2 : 5'-GCATCCACCA(A/T)A(A/T)AC(C/T)CTT-3'

菌 種 名	2 段 PCR による増幅断片のサイズ
<i>M. arginini</i>	236bp
<i>A. laidlawii</i>	430bp, 223bp
<i>M. orale</i>	290bp
<i>M. fermentans</i>	365bp
<i>M. hyorhinae</i>	315bp
<i>M. salivarium</i>	269bp
<i>M. hominis</i>	236bp
<i>M. pirum</i>	323bp

り、さらに制限酵素消化を行うと細胞を汚染したマイコプラズマ菌種を推定することが可能である²⁾。日局例示の 2 段 PCR 用プライマーは培養細胞への汚染が知られているマイコプラズマの 95% 以上を検出できること、他の一般細菌とは交差反応しないことが確認されており、日本の公的細胞バンクの検査でも使用されている。JIS¹⁾ も同様に 16S-23S rRNA 遺伝子間スペーサー領域のプライマーを用いた 2 段 PCR 法を規定しているが、局方と JIS では F2 プライマーが異なるため、得られる増幅断片のサイズは異なる。また、JIS はマイコプラズマ用とは別にアコレプラズマ用のプライマーセットも規定している。一方、16S rRNA 遺伝子領域を標的としたプライマーセットを用いた 1 段 PCR により、培養細胞を汚染するマイコプラズマを十分高感度に検出可能であるとの報告もある^{12, 15)}。

日局の 2 段 PCR 法の試験操作例を表 8 に示す。方法は、プライマーも含めて一例を示したものである。試薬や反応条件については、適切であることが確認されていれば、例示に限らずそれを使用してもよい。検体としては細胞懸濁液を用いる。テンプレート DNA の抽出はフェノール法が例示されているが、細胞からの DNA 抽出が可能な方法であれば市販の DNA 抽出キットを利用することも可能であろう。また、用いた方法の妥当性が立証され、感度と特異性など方法の詳細が示されれば、他のプライマーを用いることや、2 段 PCR ではなく 1 段 PCR とすることも可能である。PCR 法によるマイコプラズマ測定用のキットも市販されているが、妥当性が検証

表8 日局2段PCR法の試験操作法例

テンプレートの調製	<p>①被験細胞懸濁液 600 μL をチューブにとり、細胞を 0.1% SDS 等で溶かし、同量の TE 緩衝液飽和フェノールを加え、混合する。</p> <p>②室温で 15000rpm, 5 分間遠心する。</p> <p>③上清 400 μL を別のチューブに移し、3 mol/L 酢酸ナトリウム 10 μL, 95% エタノール 1 mL を加え、十分に攪拌する。</p> <p>④15 分間氷冷後、4 $^{\circ}$C で 15000rpm, 10 分間遠心する。</p> <p>⑤上清を除去し、沈殿を 80% エタノール 200~300 μL で 1~2 回洗浄する。</p> <p>⑥4 $^{\circ}$C で 15000rpm, 10 分間遠心後、上清を完全に除去し、沈殿を乾燥する。</p> <p>⑦沈殿を精製水 40 μL に溶解する。</p> <p>⑧陽性対照、陰性対照についても同様の処理を行う。</p>
1 段目 PCR	<p>⑨一段目の PCR 反応液を混合し、1 本のチューブに 90 μL ずつ分注する。</p> <p>⑩調製したテンプレート 10 μL をとり、⑨のチューブ 1 本ずつに加える。</p> <p>⑪94 $^{\circ}$C で 30 秒間の変性、55 $^{\circ}$C で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返して DNA 増幅を行う。</p>
2 段目 PCR	<p>⑫2 段目の PCR 反応液を混合し、1 本のチューブに 99 μL ずつ分注する。</p> <p>⑬1 段目の PCR を終了したチューブから、それぞれの生成物 1 μL をとり、⑫のチューブ 1 本ずつに加える。</p> <p>⑭94 $^{\circ}$C で 30 秒間の変性、55 $^{\circ}$C で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返して DNA 増幅を行う。</p>
アガロースゲル電気泳動	<p>⑮1 段目及び 2 段目の PCR 生成物 10 μL を、泳動用色素液 2 μL と混合し、1% アガロースゲルで電気泳動を行う。</p> <p>⑯ゲルをエチジウムブロマイド染色し、紫外線照射条件下で写真撮影する。</p> <p>⑰DNA バンドが検出された場合、陽性と判定する。</p>

PCR 反応液

	[1 段目]	[2 段目]
dNTP 溶液 (各 1.25mol)	16 μ L	16 μ L
Forward プライマー (10pmol/ μ L)	F1 2 μ L	F2 2 μ L
Reverse プライマー (10pmol/ μ L)	R1 2 μ L	R2 2 μ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (1U/ μ L)	2 μ L	2 μ L
反応緩衝液		
25mmol/L 塩化マグネシウム	8 μ L	8 μ L
10 倍緩衝液*	10 μ L	10 μ L
滅菌精製水	50 μ L	59 μ L

* 10 倍緩衝液の組成

2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol/HCl (pH8.4)	100mmol/L
塩化カリウム	500mmol/L
塩化マグネシウム	20mmol/L
ゼラチン	0.1g/L

されていればこれらのキットを利用することも可能であろう。使用方法の妥当性の検証、検出感度の検討にあたっては、マイコプラズマゲノム DNA の検出感度だけでなく、DNA 抽出効率等も含めて検体（細胞懸濁液）中のマイコプラズマの検出感度として検討する必要がある。

6.3 PCR 法による検出の注意点

PCR 法は非常に高感度な方法で数コピーから数十コピーの遺伝子を検出できるため、増幅産物による汚染等には細心の注意を払う必要がある。汚染を避けるため、DNA の抽出、試薬の保管・調製、PCR 増幅、増幅産物の検出は可能な限り独立した施設・設備を用い、増幅前の試料を取り扱う部屋と増幅産物を取り扱う部屋を区別することが望ましい。また試料に含まれる PCR 反応の阻害物質により偽陰性となる可能性にも注意が必要である。従って試験には必ず陰性対照と陽性対照を用いる。PCR 法の実施に当たっての一般的な注意点や PCR 法の妥当性の検証は、「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン」¹⁸⁾ や EP の NAT ガイドライン⁸⁾ を参考にできる。

6.4 EP のマイコプラズマ否定試験 NAT 法と NAT ガイドライン

EP には、培養法と DNA 染色法に加えて、2007 年に発行された Ver5.8 から NAT が新たにマイコプラズマ否定試験として追加された。NAT には様々な方法があるが、EP は NAT の具体的な試験法を規定する代わりに、マイコプラズマ検出のための NAT のバリデーション法に関するガイドラインを取載しており、用いる NAT はこのガイドラインに従って適切にバリデートされたものでなければならないとしている。NAT は細胞毒性のある試料の試験や工程管理試験として使用することができる。また、ガイドラインに従って適切なバリデーションが実施され、比較試験を行った方法であれば、培養法又は DNA 染色法の代替法として用いることも可能としている。

NAT のバリデーションでは、以下の点がポイントとなる。

- ① 特異性：NAT 検出の特異性はプライマー、プローブの選択に依存する。用いるプライマー、プローブが広範なマイコプラズマを検出し、マイコプラズマ以外の細菌類は検出しないことを示すことが求められる。特に、系統発生上マイコプラズマと近縁にあたる *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* を検出しないことを示す必要がある。
- ② 検出限界：マイコプラズマ標準品を用いて検出限界（陽性カットオフ値）を求める。培養細胞での汚染の出現頻度と系統発生上の観点から、検出限界のバリデーションに用いる最適な菌種の組み合わせを表 9 に示す。これらを用いて、10 倍希釈列を独立して 3 回以上作成し、各希釈段階について 24 回以上の試験を実施して、95% 以上の確率で陽性となるマイコ

表9 EPにおけるNATのバリデーションに用いるマイコプラズマ種の組合せ

- <i>A. laidlawii</i>
- <i>M. fermentans</i>
- <i>M. hyorhinae</i>
- <i>M. orale</i>
- <i>M. pneumoniae</i> 又は <i>M. gallisepticum</i>
- <i>M. arginini</i>
- <i>M. synoviae</i> (製造工程で鳥類由来製品の利用, 接触がある場合)
- <i>Spiroplasma citri</i> (製造工程で昆虫または植物由来製品の利用, 接触がある場合)

プラズマの量 (CFU 又はコピー数) を統計値として算出する。

- ③ 比較試験：NAT を培養法又は DNA 染色法の代替法として用いるには、表9のマイコプラズマ標準品を使用して培養法又は DNA 染色法と NAT との比較試験を実施する。培養法の代替法として用いるには、検出限界として 10CFU/ml (もしくはこれに相当するコピー数) を検出できること、DNA 染色法 (指標細胞培養法) の代替法として用いるには、100CFU/ml (もしくはこれに相当するコピー数) を検出できることを示す必要がある。

なお、NAT によるマイコプラズマの検出は多くの経験が積み重ねられているわけではなく、試薬メーカーにより一定の評価がなされた市販のキットを用いる場合でも、基本的には使用目的に応じたキットの検出限界、頑健性、交差反応性などについては使用者が評価を行うことが必要である。

NAT のコントロールとしては、内部標準と外部標準を用いる必要がある。内部標準は反応阻害がないことを確認するためのもので、適切な核酸配列を使用し、試料から核酸を抽出する前に添加して抽出、増幅、検出の全過程のコントロールとすることが望ましいとされる。外部標準としては、陰性対照とコピー数又は単位の定まった陽性対照を1種類以上用いることが必要である。

7 試験法の選択

これまで述べてきたように、培養法、DNA 染色法、PCR/NAT の各試験はいずれも長所と短所があり、単独の試験ではマイコプラズマの存在を否定するには十分ではなく、判定には複数の試験を併用することが必要である。医薬品の製造に用いる細胞基材、MCB、WCB、製造用細胞バンクのマイコプラズマ否定試験として、日局では、基本的には従来より実績のある培養法と DNA 染色法による試験の実施を求めている。しかし、DNA 染色法はマイコプラズマ以外の DNA も検出するため、DNA 染色法のみ陽性を示した場合には、PCR 法によりマイコプラズマの存在を否定することができるとしている。このようなバンク化された細胞では、試験に十分な

時間が取れることから特に迅速法を採用する必要はないと考えられる。EP や FDA/PTC も、細胞基材のマイコプラズマ否定試験としては複数の試験の実施を求めており、日局と同様、培養法と DNA 染色法の併用を求めている（表2）。但し、6.4 項で述べたように、EP では EP 記載の NAT ガイドラインに従って適切にバリデートされた方法であれば、NAT を培養法又は DNA 染色法の代替法として使用することも可能としている。我が国においても、NAT 法によるマイコプラズマ検出の十分なバリデーションが実施されれば、NAT を培養法又は DNA 染色法の代替法として使用しても差し支えないものと考えられる。なお、JIS では培養法又は DNA 染色法と PCR 法の併用を求めている。

一方、細胞治療に用いられる細胞・組織加工医薬品や、遺伝子治療において *ex vivo* で遺伝子導入を行った細胞を投与する場合にも、培養工程でのマイコプラズマ汚染の可能性があることからマイコプラズマ否定試験の実施が求められる。これらの細胞では、医薬品製造用の細胞基材とは異なり、細胞の調製から投与まで十分な時間がないことが多く、試験に時間がかかる培養法や DNA 染色法によりマイコプラズマ否定試験を実施してから投与することは難しいと思われる。このような場合には、PCR 法などの迅速検査によりマイコプラズマの存在を否定した上で投与することが現実的な対応である場合が多い。しかし、結果は投与後に得られることになるとしても、培養法などの複数の試験を併用することが望ましい。一方、細胞・組織加工医薬品等では、ロットあたりの細胞数が少なく、日局の記載のとおり検体を接種することが困難な場合もあるかもしれない。日局の培養法や DNA 染色法は検体が大量に調製される細胞基材を対象として作成されており、少量の細胞培養しか行わないようなケースにまで適用することはむしろ妥当性でない場合があり、適宜製品の特徴に合わせた試験を実施することが合理的である。また、培養細胞のルーチンのモニタリングとしてマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、PCR 法などの迅速検査が適している場合が多いと考えられる。

8 その他のマイコプラズマ検査法

マイコプラズマの PCR/NAT を利用した検査法としては、2 段 PCR 法以外にタッチダウン PCR 法やリアルタイム PCR 法などを利用した方法が開発されている。また、その他の検査法として DNA-RNA ハイブリダイゼーション法、ELISA 法、電子顕微鏡法については JIS¹⁾ に簡単な解説があるので参照されたい。一方、マイコプラズマ特有の酵素活性を基にした方法が簡易迅速検査法として研究用に市販され、培養細胞の汚染調査に使用されている⁶⁾。本法は、培養上清中のマイコプラズマの膜を溶解し、放出されるマイコプラズマ特有の酵素が特異的な基質に作用して ADP から ATP を産生することを利用し、産生された ATP 量をルシフェリン・ルシフェラー

ゼ発光系により測定することで生きたマイコプラズマを検出する。本法はPCR法よりもさらに迅速・簡便であるが、感度はあまり高くないようであり、培養細胞のルーチンのモニタリングとして高度に汚染された細胞を迅速に発見するには有効な方法だと思われるが、あくまでも研究用としての用途に限られるようである。

局方で推奨されている細胞基材のマイコプラズマ検出手法は長期にわたる試験期間が必要であり、より迅速な検出手法とするために新たな手法がこれからも開発されてくると思われるが、既に市販されている手法も含め細胞基材の品質管理試験として利用するには厳密な妥当性の検証が求められる。

文 献

- 1) 日本規格協会, マイコプラズマの検出法-第1部:培養による直接検出法 JIS K 3810-1; 第2部:DNA 蛍光染色による間接検出法 JIS K3810-2; 第3部:2段階PCRによる検出法 JIS K3810-3 (2003)
- 2) 原沢亮ほか, 蛋白質核酸酵素, 40, 2361 (1995)
- 3) 厚生省薬務局長, 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について (薬発第1062号 1995年11月15日, 厚生労働省医薬局長通知医薬発第0329004号 2002年3月29日改正, 薬食発第1228004号 2004年12月28日一部改正)
- 4) 厚生労働省医薬食品局長, ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について (薬食発第0912006号 2008年9月12日)
- 5) 厚生労働省医薬食品局長, ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について (薬食発第0208003号 2008年2月8日)
- 6) 小原有弘ほか, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 26, 159 (2007)
- 7) 厚生労働省, 第15改正日本薬局方第2追補, p222 (2009)
- 8) *European Pharmacopoeia* 6.1, 2.6.7. Mycoplasmas, p3317 (2008)
- 9) Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals, Attachment #2 : Recommended procedures for detection of mycoplasma contamination in biological products produced in cell substrates (1993)
- 10) 厚生労働省, 生物学的製剤基準, p278 (2009)
- 11) 厚生省医薬安全局審査管理課長, 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」(医薬審第873号, 平成12年7月14日)
- 12) 佐々木次雄ほか, 医薬品研究, 39 (5), 299 (2008)
- 13) 水澤博, バイオ医薬品及び産生細胞の品質・安全性評価法, p78, エル・アイ・シー (1992)

第8章 細胞基材のマイコプラズマ試験

- 14) R. S. Gardella *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1976 (1995)
- 15) J. A. Eldering *et al.*, *Biologicals*, **32**, 183 (2004)
- 16) R. Harasawa *et al.*, *Res. Microbiol.*, **144**, 489 (1993)
- 17) F. J. M. van Kuppeveld *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 149 (1994)
- 18) 厚生労働省医薬食品局長, 血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドラインについて (薬食発第 0803002 号平成 16 年 8 月 3 日)

JPTI 2010

The Japanese Pharmacopoeia Technical Information 15th Edition Supplement 1-2

日本薬局方 技術情報 2010 第十五改正第一追補/第二追補対応

財団法人 日本公定書協会 編

「日本薬局方技術情報 2010」の記述について

- 1 「日本薬局方技術情報 (JPTI)」は日本薬局方の規格、試験方法等の解釈及び試験操作上の注意事項等の技術的情報を掲載しています。2010年版では第十五改正日本薬局方の第一追補、第二追補及び一部改正を中心に技術的情報が必要な項目を選択してまとめています。なお、参考として技術情報の前には第十五改正以降の改正を反映させた条文を掲載しています。
- 2 通則、製剤総則、一般試験法、参考情報に関する技術情報としては、解説・解釈・試験操作上の注意点・考え方等を掲載しています。
- 3 医薬品各条については、生薬、添加物及びその他の必要な品目の情報のみに限定して関連する技術情報を掲載しています。特に確認試験、純度試験、定量法の項目ではご協力をお願いした企業から提供された実測データを掲載しています。
- 4 適否の判定に必要な情報として一部の生薬の鏡検写真を掲載し、また色調での判定の際の参考に供するために一部の生薬及び漢方処方エキス剤の確認試験の TLC データを掲載しています。
- 5 各記述については、原理・原則は簡潔な記載に留めてあります。
- 6 薬局方における国際調和の動向を記述しています。
- 7 本書に記述されている「商品名」などは、試験などを行う際の参考に示したものであり、特定の商品を推奨したり、代替可能な同等以上の他の商品を排除するものではありません。試験担当者の専門的な知識による裁量により、試験などを実施してください。

編 集 委 員	大久保恒夫	川西 徹	合田 幸広	小嶋 茂雄
	棚元 憲一	柘植 英哉	○寺尾 允男	徳永 裕司
	早川 堯夫	松田 芳久	四方田千佳子	
執筆者及び校閲者	青柳 伸男	内田恵理子	大内 正	大橋 史明
	岡田 敏史	川崎 ナナ	川原 信夫	木内 文之
	菊地 祐一	合田 幸広	小嶋 茂雄	小松かつ子
	近藤 健児	佐々木次雄	嶋田 康男	関口 道子
	棚元 憲一	徳永 裕司	那須 正夫	早川 堯夫
	淵野 裕之	松田 芳久	森口 展明	山口 進康
	山本 恵一	山本 恵司	山本 藤輔	四方田千佳子

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

局方条文

本文書は、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使用する細胞基材で細胞バンクを基にするものに対し、現段階で実施すべきと考えられるマイコプラズマ否定試験について述べたものである。

試験方法としては、A. 培養法、B. 指標細胞を用いた DNA 染色法、C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法が挙げられる。

本マイコプラズマ否定試験の対象は、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である。これらに対して、A 法と B 法による試験を実施する。ただし、B 法はマイコプラズマ由来以外の DNA も検出するので、B 法のみ陽性を示した場合は C 法によりマイコプラズマの存在を否定することも考えられる。この場合、C 法に用いるプライマーその他の試薬や反応条件を含めた試験方法の選択、方法の感度と特異性及び検体調製の妥当性を含め、マイコプラズマの存在を否定できると判定した合理的な理由を示す必要がある。

マイコプラズマ否定試験を実施する前には、検体がマイコプラズマ発育阻止因子を有するかどうか試験しておく必要がある。発育阻止因子が含まれる場合には、遠心分離、細胞の継代などの適切な方法により発育阻止因子を中和あるいは除去する。

検体を採取後 24 時間以内に試験するときには 2～8℃で、24 時間を超える場合は -60℃以下で保存する。

マイコプラズマが検出された場合、種を同定するための試験を行えば混入の原因を推定するのに役立つ可能性がある。

A. 培養法

1. 培地

培養法にはカンテン平板培地と液体培地の両方を使用する。両培地にはペニシリン以外の抗生物質を使用してはならない。使用する培地としては、生物学的製剤基準に記載されているものを参考にすること。ただし、2. の培地の性能試験に適合するものであれば他の培地でもよい。

2. 培地の性能試験

試験に用いる培地については、各ロットごとにマイコプラズマの発育性能に関し、適性であるか否かの試験を実施する。そのためには、少なくとも 2 種類の既知の菌株、デキストロース分解マイコプラズマ (*M. pneumoniae* ATCC 15531 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* ATCC 23714 又は同等の種

又は株) を陽性対照として加えた培地での試験をその都度実施し、これらの既知のマイコプラズマが検出できることを確認しておく必要がある。陽性対照試験に使用するマイコプラズマ株は、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で、100 CFU (コロニー形成単位) 以下又は 100 CCU (色調変化単位) 以下で培地に接種する。

3. 培養及び観察

1) カンテン平板培地 1 枚当たり検体 (細胞懸濁液) 0.2 mL 以上を、プレートに均等に広がるように接種する。カンテン平板培地は 1 検体当たり 2 枚以上とする。検体を接種した後、カンテン平板培地表面を乾燥し、5～10% の炭酸ガスを含む窒素ガス中 (微好氣的条件) で、適切な湿度のもと 36 ± 1℃で 14 日間以上培養する。

2) 液体培地 1 本当たり検体 (細胞懸濁液) 10 mL 以上を、100 mL の液体培地を入れた容器に接種する。液体培地は 1 検体当たり 1 本以上とし、36 ± 1℃で培養する。

被検細胞の培養液中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ているような場合には発育阻止因子を除去する必要があるが、遠心処理などはそうした目的に適している。マイコプラズマ発育阻止因子の測定は、生物学的製剤基準に記載されているマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる。

3) 2) での培養開始後 3 日目、7 日目及び 14 日目の計 3 回にわたり、それぞれ各液体培地より 0.2 mL ずつを採取し、カンテン平板培地各 2 枚以上に接種する。カンテン平板培地での培養は微好氣的条件で、36 ± 1℃で 14 日間以上培養する。

4) 全カンテン平板培地を対象に 7 日目と 14 日目に 100 倍以上の倍率の顕微鏡でマイコプラズマの集落の有無を調べる。

B. 指標細胞を用いた DNA 染色法

試験操作法の妥当性についてあらかじめ検討するため、培養 Vero 細胞に 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC 23714 又は同等の種又は株) を接種する。

マイコプラズマ汚染の検出に関して既知のものと同等以上の検出感度があることを示すデータがある場合は上記以外の指標細胞やマイコプラズマ菌株を本試験に使用することもできる。マイコプラズマ菌株は、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につき、接種単位をあらかじめ設定した上で使用しなければならない。細胞は適当と認められた細胞保存機関からマイコプラズマが検出されていないことを確認したデータと共に入手しなければならない。入手した細胞は、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、本文書で示すいずれか一つ以上の方法で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。

カバーグラスを沈めた培養ディッシュ又は同等の容器に指標細胞を接種し、1 日増殖させる。この培養ディッシュ 2 枚以上に試験検体（細胞培養上清）1 mL 以上を接種する。

試験には、陰性（非接種）対照及び 2 種類のマイコプラズマ陽性対照をおく。陽性対照には、例えば *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC 23714 又は同等の種又は株) 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下を使用する。

細胞は 5% 炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 3~6 日間培養する。

カバーグラス上の培養細胞を固定後、ビスベンズイミダゾール (bisbenzimidazole) 又は同等の染色剤により DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡（倍率 400~600 倍又はそれ以上）でマイコプラズマの存在を鏡検する。陰性対照及び陽性対照と検体を比較しマイコプラズマ汚染の有無を判定する。

方法

1) 細胞培養用ディッシュ（直径 35 mm）に滅菌したカバーグラスを無菌的に置く。

2) 10% ウシ胎児血清（あらかじめマイコプラズマがないことを確認しておく）を含むイーグルの最少必須培地中に Vero 細胞が 1 mL 当たり 1×10^4 細胞となるように細胞懸濁液を調製する。

3) Vero 細胞懸濁液 2 mL を各培養ディッシュに接種する。このときカバーグラスを培地中に完全に沈め、培地表面に浮かないように注意する。細胞がカバーグラスに接着するよう 5% 炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 1 日培養する。

4) 培地を新鮮な培地 2 mL と交換した後、試験検体（細胞培養上清）0.5 mL を培養ディッシュ 2 枚以上に添加する。陰性対照と陽性対照 (*M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC 23714 又は同等の種又は株) 等の 2 種類のマイコプラズマ) についても同じ操作を行う。

5) 培養液を 5% 炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 3~6 日間培養する。

6) 各ディッシュより培養液を除去し、メタノール/酢酸 (100) 混液 (3:1) (固定液) 2 mL をそれぞれに加え、5 分間放置する。

7) 各ディッシュより固定液を除去し、再度各ディッシュに同量の固定液を加え 10 分間放置する。

8) 固定液を除去し、すべてのディッシュを完全に風乾する。

9) 各ディッシュにビスベンズアミド (bisbenzamide) 蛍光染色液 2 mL を加え、ディッシュに蓋をして室温で 30 分間静置する。

10) 各ディッシュより染色液を吸引除去し、ディッシ

ュを蒸留水 2 mL で 3 回洗浄する。カバーグラスを取り出し乾燥する。

11) カバーグラスに封入液を滴加して封入する。余分な封入液をカバーグラスの端より吸い取る。

12) 400~600 倍又はそれ以上の倍率の蛍光顕微鏡で観察する。

13) 検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較する。

14) 細胞核を囲むように微小な核外蛍光斑点を持つ細胞が 1000 個のうち 5 個 (0.5%) 以上あれば陽性と判定する。

C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法

PCR 法は、非常にわずかな量のマイコプラズマ DNA を特異的に検出することが可能な方法として現在ではよく知られており、細胞のマイコプラズマ汚染の検査法として、近年広く利用されてきている。しかし、その感度と特異性は採用した方法に依存し、また PCR で陽性反応を得てもそれは必ずしも生きたマイコプラズマの存在を意味するものではない。

PCR 法では培養細胞から得た DNA を特異的なプライマーを用いて増幅することによって目的 DNA の有無を検出する。試験の検出感度と特異性を高めるには 2 段 PCR 法 (ネステッド PCR 法) を用いることが望ましい。試験は陽性対照 (例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株)) と陰性対照を置き実施する。

細胞又は細胞培養液に含まれるマイコプラズマ DNA を増幅するにはマイコプラズマに共通な DNA 配列に対応するプライマーを用いる。増幅に際しては耐熱性 DNA ポリメラーゼのような適切なポリメラーゼを用い適切な条件下で反応を行う。増幅した DNA をアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、エチジウムプロマイド染色後、UV 照射により検出する。

本法で重要な点は、マイコプラズマに特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマによく保存されている塩基配列に対応するプライマーを用いることである。例えばマイコプラズマの 16S-23S リボソーム遺伝子間のスペーサー領域等に対応するプライマーがある。

1 次 PCR で陰性となった場合には、感度と特異性を高めるためネステッドプライマーを用いる 2 段 PCR 法を実施することが望ましい。

2 次 PCR に用いるプライマーは内側配列部分のネステッドプライマーを選択する。アウター及びインナープライマーは実験的又は文献的に有効性と特異性が証明されていなければならない。

なお、Vero 細胞を用いて検体中に存在する可能性があるマイコプラズマの増殖を図った後に PCR を行い、感染性マイコプラズマ由来の DNA の検出精度を高める方法もある。

以下に 2 段 PCR 法の例を示す。試薬や反応条件につ

いては、例示に限らず、適切であることが確認されている場合にはそれを使用してもよい。他の方法を使用する場合は、用いた方法の妥当性が立証され、その詳細が記載されていなければならない。その中に方法の感度と特異性が示されていなければならない。

操作法の例

1. テンプレートの調製

1) 被験細胞懸濁液（必要ならば Vero 細胞により継代する）600 μL をチューブにとり、細胞を 0.1% SDS 等で溶かし、同量の TE 緩衝液（10 mmol/L トリス-塩酸 (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA）を飽和したフェノールを加え、混合する。

2) 室温で 15000 rpm, 5 分間遠心する。

3) 上清 400 μL を別のチューブに移し、3 mol/L 酢酸ナトリウム 10 μL を加える。

4) エタノール (95) 1 mL (2.5 倍量) を加え、十分に攪拌する。15 分間水冷した後、4 $^{\circ}\text{C}$ で 15000 rpm, 10 分間遠心する。

5) 上清を除去し、沈殿を 80% エタノール 200 ~ 300 μL で 1 ~ 2 回洗浄し、洗液はピペットで除去する。4 $^{\circ}\text{C}$ で 15000 rpm, 10 分間遠心後、上清を完全に除去し、沈殿を乾燥する。

6) 沈殿を精製水 40 μL に溶解する。

2. 陽性対照、陰性対照についても同様の処理を行う。

3. 1 段目 PCR

1) 耐熱性 DNA ポリメラーゼ、dNTP 溶液、アウトプライマー、反応緩衝液 (Mg イオンを含む) を混合し、1 本のチューブに 90 μL ずつ分注する。

2) 調製したテンプレートより 10 μL をとり、1 段目の PCR 反応液 (90 μL) を入れたチューブ 1 本ずつに加える。

3) 94 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間の変性、プライマーに適した温度 (例示のプライマーの場合は 55 $^{\circ}\text{C}$) で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間の伸長を、30 回繰り返して DNA 増幅を行う。

4. 2 段目 PCR

1) 耐熱性 DNA ポリメラーゼ、dNTP 溶液、インナープライマー、反応緩衝液 (Mg イオンを含む) を混合し、1 本のチューブに 99 μL ずつ分注する。

2) 1 段目の PCR を終了したチューブから、それぞれの生成物 (1 μL) をとり、2 段目の PCR 反応液 (99 μL) を入れたチューブ 1 本ずつに加える。

3) 94 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒間の変性、プライマーに適した温度 (例示のプライマーの場合は 55 $^{\circ}\text{C}$) で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間の伸長を、30 回繰り返して DNA 増幅を行う。

5. アガロースゲル電気泳動

1) 1 段目及び 2 段目の PCR 生成物 (10 μL) を、泳動の先端を確認するための適当な色素液 (2 μL) と混合し、1% アガロースゲル電気泳動を行う。

2) アガロースゲルをエチジウムブロマイドにより染色し、紫外線照射条件下で写真撮影する。

3) DNA バンドが検出された場合、陽性と判定する。

[プライマーの例示]

・マイコプラズマ検出用

アウトプライマー

F1: 5'-ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT-3'

R1: 5'-CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCA
AGG-CAT-3'

インナープライマー

F2: 5'-GTG(G/C)GG(A/C)TGGATCACCTCCT-3'

R2: 5'-GCATCCACCA(A/T)A(A/T)AC(C/T)
CTT-3'

() は混合

[PCR 反応液]

	[1 段目]	[2 段目]
dNTP 溶液 (各 1.25 mol)	16 μL	16 μL
プライマー (10 pmol/ μL)	F1 2 μL	F2 2 μL
プライマー (10 pmol/ μL)	R1 2 μL	R2 2 μL
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (1 U/ μL)	2 μL	2 μL
反応緩衝液		
25 mmol/L 塩化マグネシウム	8 μL	8 μL
10 倍緩衝液*	10 μL	10 μL
滅菌精製水	50 μL	59 μL

*10 倍緩衝液の組成

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-	100 mmol/L
1,3-プロパンジオール・塩酸 (pH 8.4)	
塩化カリウム	500 mmol/L
塩化マグネシウム	20 mmol/L
ゼラチン	0.1 g/L

[Vero 細胞中でマイコプラズマを増殖させる方法]

1) 試験検体、陽性対照及び陰性対照について、それぞれ 2 枚以上のディッシュを使用する。

2) 細胞培養用ディッシュ (直径 35 mm) に、10% ウシ胎児血清 (PCR によりあらかじめマイコプラズマ DNA が検出されないことを確認しておく) を含むイーグル最少必須培地を用いて調製した Vero 細胞懸濁液 (1 $\times 10^4$ 細胞/mL) を 2 mL ずつ加え、5% 炭酸ガスを含む空气中、36 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ で 1 日培養する。

3) 古い培地を新鮮な培地と交換し、試験検体 (細胞培養上清) 0.5 mL を Vero 細胞の培養ディッシュ 2 枚以上に接種する。陽性対照 (例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株)) と陰性対照についても同じ操作を行う。

4) 試験検体、陽性対照並びに陰性対照を接種した

Vero細胞の培養ディッシュをそれぞれ5%炭酸ガスを含む空气中、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で3～6日間培養する。

[改正：日局15-2追]

薬品製造工程中の培養細胞)である。生物学的製剤基準のマイコプラズマ否定試験法⁹⁾とは異なり、ワクチンは対象としない。

技術情報

1. 目的

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、人工培地に生育可能な最小の微生物である。動植物界に広く分布し、種特異的な感染を示すが、培養細胞では培養作業従事者や培養に用いる血清等を介して種を超えて感染し、細胞膜に付着して増殖する。培養細胞にマイコプラズマ汚染が生じて細胞変性を伴わないことが多く、また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気づかないことが多い。実験室レベルでは培養細胞のマイコプラズマ汚染は高頻度に認められる¹⁾が、マイコプラズマの感染により培養細胞の本来の機能や性質は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^{2,3)}。したがって、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否定試験を実施する必要がある。

本参考情報は、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についてマイコプラズマ汚染を否定するために実施すべきと考えられる試験法として、A. 培養法、B. 指標細胞を用いたDNA染色法、C. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法の3種類の試験法を示したものである。現在まで、日本薬局方(日局)の医薬品各条には本参考情報の対象となる動物細胞基材由来の医薬品は記載されていない。しかし、日局参考情報には、バイオテクノロジー応用医薬品などの新医薬品の開発、品質評価に必要な試験法を積極的に掲載することにより有用な医薬品の開発を支援し、また医薬品の安全性や品質を担保するという目的もあることから、日局13第二追補(1999)より参考情報として記載されている。本試験法の掲載に至る経緯や試験法の詳細な解説は前書⁴⁾を参照されたい。ここでは、試験法の概要と日局15第二追補での改正点についてのみ示す。なお、参考情報は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り、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。

2. 適用対象

マイコプラズマ否定試験の適用対象は、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で細胞バンクを基にするもの(マスター・セル・バンク、ワーキング・セル・バンク及び医

3. 試験法の概要

A. 培養法

培養法は、マイコプラズマを人工培地で培養・増殖させて検出する方法で、カンテン平板培地と液体培地の両方を使用する。カンテン平板培地は検体(細胞懸濁液)を接種後14日間以上培養する。液体培地は検体(細胞懸濁液)を接種後3, 7及び14日間培養後にカンテン平板培地に移植し、更に14日間以上培養する。培養したカンテン平板培地は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)の有無を判定するというものである。培養法はマイコプラズマの直接検出法であるが、試験に要する日数は28日間以上と非常に時間がかかることまた細胞基材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存在するため、必ずしもすべてのマイコプラズマを検出できるわけではないという欠点がある。

B. 指標細胞を用いたDNA染色法

DNA染色法は、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3～6日間培養後、細胞表面で増殖したマイコプラズマを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蛍光斑点として検出する間接検出法である。DNA染色法はマイコプラズマに特異的な検出法ではなく、細胞由来DNAも染色されるため判定には熟練を要するが、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場合も多いため、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特徴がある。試験には陰性対照と2種類のマイコプラズマ陽性対照を用いて判定を行う。

C. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法

PCRによる検出法は、検体(細胞懸濁液)からDNAを抽出し、マイコプラズマ特異的なプライマーを用いてPCRで増幅することによりマイコプラズマDNAを検出する方法である。プライマーにはマイコプラズマに特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマによく保存されている領域を対象にしたものを用いる必要がある。試験の感度と特異性を増すためには2段PCR法(ネステッドPCR法)が望ましく、本参考情報には2段PCR法が使用するプライマーとともに例示されている。PCRによる検出法は、迅速、簡便で検出感度と特異性に優れた試験法であるが、検出は用

いるプライマーに依存し、また不活性菌やマイコプラズマのゲノム断片も検出されるので注意が必要である。

以上のように、A法、B法、C法の3つの試験法にはそれぞれ長所と短所があることから、判定には単独の試験ではなく、各試験を組み合わせる必要がある。基本的には従来より実績のあるA法とB法による試験を実施するが、B法はマイコプラズマ以外のDNAも検出するためB法のみ陽性を示した場合には、C法によりマイコプラズマの存在を否定することも考えられる。

4. 改正の経緯及び改正点

マイコプラズマ否定試験が参考情報として記載されてから10年が経過し、この間に記載にあたり参考にされた欧州薬局方(EP)のマイコプラズマ否定試験法が最新のEP 6.0⁶⁾で大きく改正された。また、本参考情報に対して問題点を指摘する論文⁷⁾が発表され、改正要望も寄せられたことから、試験法の改正が行われることとなった。改正に当たっては、国内外のガイドラインを参照した(表1)。改正案に対する意見公

募でも多数の意見が寄せられたため、更に必要な修正が追加された。以下に、日局15第二追補での改正にあたり検討された点及び改正点を示す。

(1) 培養法の培養条件

培養法における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「5～10%の炭酸ガスを含む空気中(好氣的条件)」及び「5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中(嫌氣的条件)」で半数ずつ培養を行うというものであった。しかし、今回の改正で、カンテン平板培地は「5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中(微好氣的条件)」のみ、また液体培地の培養条件からは気相の条件が削除された。これに伴い検体の接種数も変更となり、1検体当たりの接種はカンテン平板培地では「4枚以上」から「2枚以上」へ、液体培地は「2本」から「1本以上」に修正された。これは、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が、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⁸⁾、また従来からの培養条件はEPに準じたものであったが、EPの改正により欧米のガイドラインはいずれもカンテン平板培地は微好気

表1 国内外のガイドラインにおけるマイコプラズマ否定試験法の比較(改正点に関連する記載を抜粋)

	EP 6.0 (2008) ⁶⁾	FDA/PTC (1993) ⁹⁾	生物学的製剤基準 (1998) ⁹⁾	JIS (2003) ²⁾	日局改正前 (1999)	日局改正後 (2009)
培養法						
カンテン平板培地培養条件	微好気(5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス) 35～38℃	5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス又は水素ガス、酸素0.5%未満 36±1℃	5～10%の炭酸ガスを含む空気又は窒素ガス 35～37℃	密閉容器 37±1℃	好気(5～10%の炭酸ガスを含む空気)と嫌気(5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス)で半数ずつ、36±1℃	微好気(5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス) 36±1℃
液体培地培養条件	密栓培養 35～38℃	36±1℃	35～37℃	寒天液体二層培地 密栓培養 37±1℃	好気と嫌気で半数ずつ 36±1℃	36±1℃
DNA染色法	あり	あり	—	あり	あり	あり
陽性対照	<i>M. hyorhinitis</i> ATCC 29052 (=DBS 1050) <i>M. orale</i> NCTC 10112, CIP 104969, ATCC 23714 (=CH 19299)	<i>M. hyorhinitis</i> DBS 1050 <i>M. orale</i> CH 19299	—	<i>M. hyorhinitis</i> ATCC 29052, IFO 14858 (=BTS 7) <i>M. arginini</i> ATCC 23838, IFO 14476	<i>M. hyorhinitis</i> DBS 1050 <i>M. orale</i> CH 19299	<i>M. hyorhinitis</i> ATCC 29052, ATCC 17981 (=BTS 7) <i>M. orale</i> ATCC 23714
接種量	100 CFU又はCFU-like micro-organisms 以下	100 CFU 以下又は100 CCU 以下	—	100 CFU	100 CFU 以下	100 CFU 以下又は100 CCU 以下
PCR法	NATの概論とバリデーション法について記載	—	—	2段PCR法	2段PCR法(例)	2段PCR法(例)
実施すべき試験法	培養法とDNA染色法(細胞基材の場合) NATは適切なバリデーションを実施すれば培養法又はDNA染色法の代替法となり得る	培養法とDNA染色法	培養法	培養法又はDNA染色法とPCR法	培養法とDNA染色法 DNA染色法でのみ陽性を示した場合、PCR法で否定できる	培養法とDNA染色法 DNA染色法でのみ陽性を示した場合、PCR法で否定できる

培養のみ、液体培地の培養条件は温度のみで気相条件は記載なしとなったため、国際調和も考慮して改正が行われたものである。なお、「微好氣的条件」は従来の「嫌氣的条件」と同一の条件であるが、EPの用語(microaerophilic conditions)に合わせて「微好氣的条件」に変更された。

(2) マイコプラズマ発育阻止因子の測定法

マイコプラズマ否定試験は、検体中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、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。これまで、マイコプラズマ発育阻止因子の測定法については特に記載されていなかったが、生物学的製剤基準⁹⁾には記載がある。そこで、参考情報としての利用者の利便性を考慮し、「マイコプラズマ発育阻止因子の測定は、生物学的製剤基準に記載されているマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる」ことが培養法の関連記載中に追記された。

(3) DNA 染色法の指標菌株と接種単位

DNA 染色法で陽性対照として例示された2種類の指標菌株 (*M. hyorhinis* DBS 1050 及び *M. orale* CH 19299) について、陽性対照として適切でないとの指摘があり、指標菌株と接種量の表示単位に関して見直しが行われた。

これら2種類の指標菌株は、いずれもFDAのガイドライン (FDA/PTC)⁹⁾で例示されている。また、EP 6.0⁹⁾では、ATCC等で保存されている同等の菌株が「試験に適していることが確認された菌株 (strain)」として保存機関のコード番号で示されていることから、菌株の選択に問題はないと考えられた。しかし、マイコプラズマは長期間の継代培養により性質が変化するため、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。そこで、日局15第二追補の改正では、EPに準じて指標菌株をATCCコード番号で表示し、「*M. hyorhinis* DBS 1050」を「ATCC 29052」、「*M. orale* CH 19299」を「ATCC 17981」に変更することにより、適切な菌株を入手可能とした。また、公的又は適当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」を使用するべきとの注意喚起を行っている。更に、ATCCから入手したものは単位が設定されていないため、「接種単位をあらかじめ設定した上で使用しなければならない」ことが追記された。

DNA 染色法の指標菌のうち、*M. hyorhinis* DBS 1050 株については、細胞との共存で生育しており、人工培地上でコロニーが形成できないため、「100

CFU 以下」と規定されている「陽性対照としての接種量の設定」が困難であるとの指摘があった。同じ *M. hyorhinis* でも BTS-7 株はカンテン平板培地で増殖しやすいことが知られ、JIS¹⁾では指標菌として ATCC 29052 (DBS 1050) 又は IFO 14858 (BTS-7) が指定されている。これらの点を考慮して、日局15第二追補の改正では、「ATCC 29052 (DBS 1050)」に加えて「ATCC 17981 (BTS-7)」も指標菌の例示に追加された。また、これらの菌株は必ずこれを使用しなければならないという指定菌株ではなく、あくまで試験に適切と考えられる菌株を例示したものであることをより明確にするために、「同等の種又は株」を用いてもよいことが明記された。

一方、FDA/PTC⁹⁾では、マイコプラズマの接種単位としてカンテン平板培地でのコロニー形成に基づくCFU (コロニー形成単位) の他に、液体培地の色調変化に基づくCCU (色調変化単位) も併記されている。接種単位がCFUではカンテン平板培地でコロニー形成しないマイコプラズマの接種量の設定と使用は困難だが、液体培養で単位が設定できればコロニーを形成しないマイコプラズマでも使用可能となることから、指標菌の接種単位として、従来のCFUに加えて「CCU」が併記された。

なお、ATCCコード番号による指標菌の表示と接種単位のCFUとCCUとの併記に関する改正は、DNA染色法に限るものではなく、培養法及びPCR法についても同様に行われた。

(4) PCR 法

操作法の例として記載されている2段PCR法については、マイコプラズマの種類によっては検出感度が低く反応しない場合があることや、操作法の更新を求める意見などが寄せられた。これらの意見について検討した結果、例示の2段PCR法は感度と特異性に優れた方法であり、プライマーも含めてJISとほぼ同様の方法であること、培養細胞への汚染が知られているマイコプラズマの95%以上を検出できることが確認されていること、公的細胞バンクの試験に現在も使用されている実績のある方法であることが確認された。また、この操作法の例は、本文に記載のとおりプライマーも含めて一例を示したものであり、妥当性が立証されていれば他のプライマーを用いることや、1段PCRを実施することや、反応条件等を変更することも可能であり、例示の方法に限定されたものではないことから、特に例示の記載を修正する必要はないとされた。ただし、現在汎用されているPCRの実施条件を考慮して、操作法から「ミネラルオイルの滴加」は削除された。

また、PCR法は培養法とDNA染色法を補完する方法とされているが、PCR法も第一試験とすべきと

の意見も寄せられた。PCR法は、参考情報に記載された当時は欧米のガイドラインには未記載であり、欧米ではいずれも培養法とDNA染色法の両方の実施が求められていた。日局では培養法とDNA染色法の両方の実施を基本としつつ、これらの試験法を補完するものとして迅速性、簡便性、検出感度に優れたPCR法の例が記載されたものである。EPは最新のEP 6.0⁶⁾で初めて核酸増幅検査(NAT)法が記載され、マイコプラズマ否定試験としては従来と同様、培養法とDNA染色法の実施を求めているが、適切なバリデーションを実施することによりNATを培養法又はDNA染色法の代替法として使用することも可能としている。EPにはNATの具体的な試験法ではなく、NATのバリデーション法に関する詳細なガイドラインが掲載されている。一方、日局のPCR法は例示として記載されており、培養法又はDNA染色法の代替法となるものではない。したがって、PCR法の位置付けについては、事態の推移をみながら今後の検討課題とされた。

◇◇◇ 文 献 ◇◇◇

- 1) 小原有弘, 大谷梓, 小澤裕, 塩田節子, 増井徹, 水澤博: 培養細胞研究資源のマイコプラズマ汚染調査, *Tiss Cult Res Commun* 26: 159-163, 2007.
- 2) 日本規格協会: マイコプラズマの検出法-第1部: 培養による直接検出法 JIS K 3810-1; 第2部: DNA 蛍光染色による間接検出法 JIS K 3810-2; 第3部: 2段階 PCR による検出法 JIS K 3810-3, 2003.12.20
- 3) 原沢亮, 水澤博, 竹内昌男: 動物細胞・培養における“コンタミ”の簡易検出, *蛋白質核酸酵素* 40(15): 2361-2368, 1995.
- 4) 日本公定書協会: 日本薬局方技術情報 JPTI 2006, 参考情報 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, pp 298-304, 東京, じほう, 2006.
- 5) 厚生労働省: 生物学的製剤基準, マイコプラズマ否定試験法, pp 14-15, 1998.
- 6) *European Pharmacopoeia* 6.0: 2.6.7. Mycoplasmas, pp 159-164, 2008.
- 7) 佐々木次雄, 岩田浩明, 栃木公太, 久保田眞由美: 平成 18 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告-医薬品製造用細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験法の問題点, *医薬品研究* 39(5): 299-309, 2008.
- 8) FDA: Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals, Attachment #2: Recommended procedures for detection of mycoplasma contamination in biological products produced in cell substrates, 1993.



Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers

Shihori Tanabe, Yoji Sato and Kazuhiro Suzuki

Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science, Tokyo, Japan

ABSTRACT

In recent years, the information of stem cells has been accumulated as the research progressed. It is important to understand their characteristics for proper application of stem cells in cellular therapy. The common feature of stem cells can be described as their capacity for self-renewal and differentiation. Stem cells do, however, have different features that characterize each species of stem cells, such as mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, neural stem cells, embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Moreover, cancer stem cells have recently been shown to play an important role in cancer, which suggests the possibility of targeting cancer stem cells for its treatment. This review describes the characteristics of stem cells to provide a better understanding of the unique features

of these cells represented by the term of 'stemness'.

1. INTRODUCTION

Stem cells have the unique capacity for self-renewal and multilineage differentiation (1). Recent research has revealed detailed features of stem cells, which provide us with the key to understanding the origin of the cell. This article reviews recent perspectives in the stem cell research.

2. FEATURES OF STEM CELLS

A. Mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells, a type of somatic stem cells derived from tissues such as bone marrow, can differentiate into osteogenic cells, chondrogenic cells and adipogenic cells (2). In recent years, mesenchymal stem cells have been used in cellular therapy or

Address correspondence to: Shihori Tanabe, Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan., E-mail: stanabe@nihs.go.jp

immunotherapy to reconstitute tissue or to prevent an immune response in transplantation by exploiting their capacity for differentiation or their immunosuppressive feature (3). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell culture is positive for CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a and CD124 and negative for CD34 and CD45 (2). Mesenchymal stem cells are also characterized by the positive expression of Sca1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD106 and are found to be negative for CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD19, CD79, CD31 and HLA-DR (4). It has also been reported that mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood and bone marrow are positive for CD29, CD44, CD105, CD73 and HLA-A, -B and -C and negative for CD31, CD34, CD45 and HLA-DR (5). Furthermore, it has been described that bone marrow mesenchymal stem cells express the following phenotype: CD34, CD44, CD45, c-Kit, and major histocompatibility complex class I and II negative; Flk-1, Sca-1 and Thy-1 at low levels and CD13 and stage-specific antigen I (SSEA-I) at high levels (6). On the other hand, flow cytometry analyses of stem cells derived from connective tissue have shown that the cells stain positively for CD34 and CD90 and negatively for CD3, CD4, CD8, CD11c, CD33, CD36, CD38, CD45, CD117, Glycophorin-A and HLA-DR II (7). Overall, mesenchymal stem cells derived from bone marrow may be commonly characterized by positive expression for CD29, CD44, and other molecules.

B. Hematopoietic stem cells

Hematopoietic stem cells differentiate into the blood cell lineage, including T cells, B cells, NK cells, erythrocytes, monocytes and megakaryocytes. The hematopoietic stem cells as well as other types of stem cells have the capability to self-renew. The cells are usually found in the bone marrow, cord blood and peripheral blood. Human hematopoietic stem cell culture is positive for CD34 and CD90 and negative for Lin and CD38 (8,9,10). For mouse hematopoietic stem cells, Kit (c-Kit), Sca1, CD34 and Slamf1 are known as positive markers, whereas Lin and Flt3 (Flk2) are negative markers. The combination or expression of surface markers for hematopoietic stem cells changes as the cells develop and differentiate into the several types of multipotent or oligopotent progenitor cells. It is known that the expression level of Flt3 increases, whereas that of Slamf1 decreases as mouse hematopoietic stem cells differentiate into progenitor cells. In the human hematopoietic cell lineage, the expression of CD38 increases in progenitor cells (8). It is also suggested that the surrounding microenvironment (niche) is important for supporting stem cells including hematopoietic stem cells (11). Myc (c-myc) and Mycn (N-myc) activities are reported as key factors for hematopoietic stem-cell function including proliferation, differentiation, and survival (12).

C. Neural stem cells

Neural stem cells are positive for glial