

られる。しかし、ほとんどの細胞・組織加工製品などの再生医療等製品はロットを構成せず、その容量も少ないことから、無菌試験法の現状を維持して実施することには無理がある。今後の再生医療等製品の出荷判定には、欧米と同様に、細胞由来製品に特化した無菌試験法や迅速に結果を得る迅速測定法の適用が望まれる。

### 3. 迅速測定法

従来の微生物検出法は結果判定までに時間がかかることから、EP では迅速に結果を得る代替法が提示されている（EP chapter 5.1.6, Alternative methods for control of microbiological quality.）<sup>9)</sup>。最新の手法を追加し、改変した代替法の一覧を Table 3 に示した。微生物の菌体を直接検出する 1) 直接検出法、微生物の脂肪酸や核酸、増殖によって生じる変化を間接的に検出する 2) 間接的測定法に分類される。

#### (1) 蛍光染色法

微生物を蛍光試薬で染色し検出する蛍光染色法が、日局16参考情報 蛍光染色による細菌数の迅速測定法<sup>11)</sup>及び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<sup>12)</sup> B. 指標細胞を用いたDNA染色法として収載されている（Table 4）。蛍光染色法は、蛍光色素で染色した細菌を、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターなど、蛍光シグナルを検出する種々の装置により計数する。直接検出法の蛍光活性染色法は、DNAやRNAに結合する核酸染色剤を用いて染色した死菌を含めた全細菌数、細菌細胞内に普遍的に存在するエステラーゼ活性を carboxyfluorescein diacetate (CFDA) を用いて蛍光活性染色した生菌数、細菌細胞の大きさを含めた形態を、それぞれ蛍光顕微鏡またはフローサイトメーター等を用いて測定する<sup>13)</sup>。間接的測定法のマイクロコロニー法は、細菌を捕集したメンブランフィルターを培地上で短時間培養した後、核酸染色剤を用いて染色したマイクロコロニーを蛍光顕微鏡などで計数する方法で、増殖能力を持つ細菌を迅速かつ高精度に計数できる<sup>14)</sup>。検体又は試料をメンブランフィルター上に捕集すると、いずれの方法でも捕集前の原液で $10^2$ - $10^3$  CFU/mlの検出感度を有する。

また、蛍光染色法及び蛍光シグナルを検出する種々の装置のバリデーションを行うには、CFU が既知の参照菌種、機器を校正する蛍光ビーズ等の整備が必要となる。

#### (2) 核酸増幅検査 (Nucleic acid amplification test, NAT)

増幅した微生物の核酸を検出する核酸増殖法が、日局 16 参考情報 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<sup>12)</sup> C.

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法として収載されている (Table 4)。培養細胞から得た DNA を検体とし、例示されたマイコプラズマの 16S-23S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子間のスペーサー領域等の塩基配列に特異的なプライマーと市販の耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて適切な条件下で反応を行い、増幅した DNA をアガロース電気泳動を用いて分離し、エチジウムブロマイドの染色後、紫外線照射により検出する。参考情報では原則として従来より実績のある「A. 培養法」及び「B. 指標細胞を用いた DNA 染色法」によるマイコプラズマ否定試験の実施を求めており、PCR による検出法はあくまで DNA 染色法を補完する二次的な試験と位置付けられている。しかし、バイオテクノロジー応用医薬品の工程管理試験に適した迅速測定法が要望されており、日局 17 に向けてマイコプラズマ否定試験に PCR を含む NAT を導入する作業が進んでいる。

同様に、例示された細菌の 16SrRNA 遺伝子又は真菌の 18S-5.8SrRNA 遺伝子間のスペーサー領域 (ITS1) の塩基配列に特異的なプライマーを用いて増幅した PCR 産物の遺伝子配列を解析し、データベースと照合して微生物を同定する方法が、日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法<sup>2)</sup>に収載されている。微生物を NAT で検出するプライマー等の設計は、ユニバーサルな塩基配列として、rRNA やそのスペーサー領域を対象とすることが多い<sup>15,16)</sup>。参考情報には、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用可能とされており、完全長 16SrRNA の調製や定量 PCR に用いるプライマーが報告されている<sup>17,18)</sup>。日局 16 一般試験法 4.06 無菌試験法で培地性能試験及び手法の適合性試験に適している試験用菌株に収載された細菌 4 種及び真菌 2 種を含む全 13 菌株 (Table 1) から抽出したゲノム DNA を用い、Table 2 に示したプライマー等で増幅した PCR 産物を Fig. 1 に示した。細菌のゲノム DNA 増幅では、遺伝子解析による微生物の迅速同定法に収載のプライマーセットを用いた反応で、無菌試験法収載菌株を含むすべての菌株に PCR 産物の生成を確認した (Fig. 1A-C)。また、ユニバーサルプライマー-525F を用いた反応でも PCR 産物の生成を確認した (Fig. 1D)。同様に、真菌のゲノム DNA 増幅では、ユニバーサルプライマーセット ITS5F/D2R を用いた反応で、無菌試験法収載菌株を含む菌株に PCR 産物の生成を確認した (Fig. 1E)。

プライマー等の選択によっては、定量 PCR や逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription, RT) -定量 PCR を利用した微生物の検出も可能で、キット化された製品等も市販

Table 3. 新手法の一覧\*

分類と名称	検出対象	原理・特徴	検出・測定装置
1) 直接検出法			
蛍光顕微鏡法	菌体	微生物をフィルター上に捕集し、蛍光染色後、蛍光顕微鏡下で検出・計数する。	蛍光顕微鏡
レーザースキャニングサイトメトリー	菌体	微生物をフィルター上に捕集し、蛍光染色後、レーザーでフィルター全面をスキャンし、シグナルを検出する。精度が高い。	レーザースキャニングサイトメーター
フローサイトメトリー	菌体	蛍光染色した微生物を浮遊状態にし、高速でフローセル内を流しながらシグナルを検出する。迅速な解析が可能。	フローサイトメーター
On-chipフローサイトメトリー	菌体	フローサイトメトリーをマイクロ流路を刻んだデバイス（マイクロ流路デバイス）上で行う。前処理や染色を1枚のデバイス上で行うことも可能。	蛍光検出器
蛍光ファージアッセイ	菌体	蛍光標識したファージを細菌に感染させ、特定属種細菌を検出する。	蛍光顕微鏡等
2) 間接的測定法			
抗原検出法	抗原	微生物が持つ抗原に特異的な抗体を反応させ、発色反応や蛍光をもとに検出する。一部の微生物に対してキットが販売されている。	免疫クロマトグラフィ、マイクロプレートリーダー等
ファージアッセイ法	ファージの感染	検出対象とする細菌に特異的なファージを感染させ、溶菌により生じたプラークや菌体成分を検出する。	カンテン平板培地等
脂肪酸分析法	脂肪酸	微生物の種類によって脂肪酸組成が異なることを利用し、同定する。	ガスクロマトグラフィ等
フーリエ変換赤外分光法	菌体	菌体に赤外線を照射し、その赤外吸収スペクトルパターンから同定する。	フーリエ変換型赤外分光光度計
質量分析法	菌体成分	抽出した菌体成分の組成を質量分析により分析し、その組成から同定する。	質量分析計
核酸増殖法	核酸	対象とする微生物のDNAやRNAをPCR法、RT-PCR法やNASBA法、MAT法等で増幅し、検出する。定量的PCRを用いれば定量も可能である。	電気泳動装置、マイクロチップ電気泳動装置
フィンガープリント法	DNA	微生物から抽出したDNAを制限酵素で切断し、そのパターンをもとに同定する。	電気泳動装置、キャピラリー電気泳動装置、マイクロチップ電気泳動装置
マイクロコロニー法	増殖能	コロニー形成初期のマイクロコロニーを検出・計数する。	蛍光顕微鏡等
インピーダンス法	増殖能	微生物が増殖の際に培地成分を利用して産生する代謝産物の増加により生じる電気抵抗や電気伝導度の変化を検出する。	電気計測器
ガス測定法	増殖能	微生物の増殖に伴う二酸化炭素の産生や酸素の消費等のガス量の変化を検出する。	ガス測定器
生物発光法	ATP	微生物細胞内のATPを酵素反応による発光現象をもとに検出する。	発光測定器
マイクロカロリメトリー	熱	微生物が産生する微弱な熱を測定する。	マイクロカロリメーター

\*表20.1 新手法の一覧<sup>10)</sup>を改変

されている。図には示していないが、525F/800Rユニバーサルプライマーセットは、SYBR Greenを用いた定量PCRでも、無菌試験法収載菌株の検出が可能だった。通常のPCRは生菌

と死菌双方のゲノムDNAを増幅するが、RT-定量PCRでは少量のmRNAを増幅した生菌由来PCR産物を定量することから、蛍光活性染色法と同様に、その計測結果はより生菌数に近いと

Table 4. 日局16 参考情報に記載された迅速測定法の一覧

分類と名称	検出対象	原理・特徴	検出・測定装置
1) 直接検出法			
蛍光染色による細菌数の迅速測定法 <sup>11)</sup>	菌体	死菌を含めた全細菌を核酸染色剤で、生菌をエステラーゼなどを指標とした活性でそれぞれ染色し、蛍光を検出して菌数を計数する。	蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置
マイコプラズマ否定試験* <sup>12)</sup> B. 指標細胞を用いたDNA染色法	菌体	指標細胞に付着した菌体を核酸染色剤で染色し、蛍光を検出して菌数を計数する。	蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置
2) 間接的測定法			
遺伝子解析による微生物の迅速同定法 <sup>2)</sup>	核酸	細菌の16SrRNA遺伝子又は真菌の18S-5.8SrRNA遺伝子間のスペーサー領域 (ITS1) の塩基配列を解析し、データベースと照合して微生物を同定する。	DNA自動解析装置、DNA増幅装置
マイコプラズマ否定試験* <sup>12)</sup> C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法	核酸	16S-23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域等の塩基配列に特異的なプライマーを用いて酵素的に増幅し、増幅産物を種々の方法により検出する。	DNA増幅装置、アガロース電気泳動装置

\*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<sup>12)</sup>

推定される。

また、NAT及び測定機器のバリデーションを行うには、増幅する遺伝子のコピー数とCFUが既知の参照菌種、増幅する遺伝子を含むプラスミドDNA等の標準品の整備が必要となる。

### (3) 迅速測定法の選択

日局16の一般試験法は医薬品の出荷判定に適用される試験を、参考情報は製品の製造工程管理等に利用される情報を示している。EP chapter 2.6.27<sup>6)</sup>は日局の一般試験法に相当し、EP chapter 5.1.6<sup>9)</sup>は参考情報に相当する。Table 3に示した迅速測定法の一部はEP chapter 5.1.6<sup>9)</sup>に記載されており、それらの一部は測定自動化がなされ、簡便な手技で短時間に微生物の計測が可能となっている。

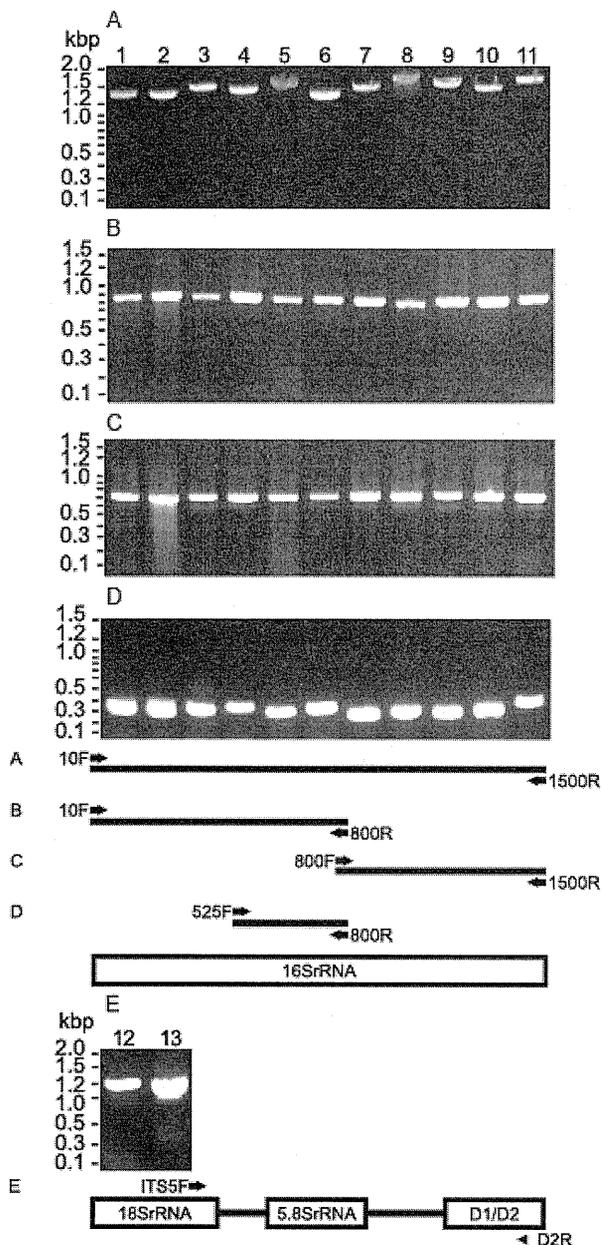
「再生医療等の安全性の確保に関する法律」が公布され、再生医療等製品は独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下「機構」という。）が調査を行い、厚生労働大臣の許可を受けた施設で調製されることになった。再生医療製品等はアイソレーター等を用いた微生物汚染防止措置がされた工程で調製され、バリデーション等の適切な方法によって工程管理がなされることから、最終調製品は無菌的環境を保持している。加えて、細胞・組織加工製品はロットを構成せず品質が不均一となること、採取可能な検体量が少ないことから、再生医療等を受ける者に対して安全性の確保等の必要な事項について適切な説明と同意がなされた上で、日本でも製造工程管理に準じた出荷判定試験の適用が

望まれる。

Table 3に示した代替法の中で、蛍光染色法は迅速測定法として日局16参考情報に記載されていることから、再生医療製品等の出荷判定試験に適用する無菌試験法には最も適している。NATは高い感度と迅速な測定が期待できるが、参考情報ではマイコプラズマ否定試験での適用に限られている。しかし、NATの原理と遺伝子解析による微生物の迅速同定法に用いるプライマー等の一部は参考情報に記載されていることから、十分なバリデーションを行った上で、再生医療等製品の無菌試験への適用が望まれる。

米国薬局方（United States Pharmacopeia、USP）には、記載された公的な微生物代替試験法の使用に際して行うバリデーション方法が定められている（USP Chapter <1223>, Validation of Alternative Microbiological Methods.）<sup>19)</sup>。日局16参考情報にも分析法バリデーション<sup>20)</sup>が記載され、医薬品の試験法に用いる分析法が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確立が許容できる範囲であることを科学的に立証することと規定している。参考情報に記載されていないTable 3に示された迅速測定法については、既に参考情報に記載されている蛍光染色法と比較試験を行うなど、無菌試験法に適用可能な科学的根拠を示し、十分な分析法バリデーションを経ての適用が望まれる。

4. 迅速測定法を適用した再生医療等製品の無菌試験法



**Fig. 1.** PCRによる細菌 16SrRNA 遺伝子と真菌 18SrRNA-D2 領域遺伝子の検出

Table 1 の細菌又は真菌から鋳型 DNA を調製し、パネル A. 10F/1500R、B. 10F/800R、C. 800F/1500R、D. 525F/800R 又は E. ITS5F/D2R プライマーセットを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の生成を確認した。各レーンの番号は Table 1 の菌株番号を、パネル下部の模式図はプライマーが結合する位置の概略を示す。

再生医療等製品の無菌試験は、最終調製品の出荷時点で微生物が陰性であることを保証することを目的とすることから、方法は日局 16 無菌試験法に準ずるが、再生医療等製品に特異的な部位は改変して行う必要がある。

細胞・組織加工製品の再生医療等製品はロットを構成せず、最終調製品の内容量も少なく、製品を均一にして試験に供するのが困難なものが多い。EP chapter 2.6.27<sup>6)</sup>では、血球系製品の

容量が 10mL 以上の場合は全量の 1%を、1mL 以上で 10mL 未満の場合は 100 $\mu$ L をそれぞれ試験に供し、1mL 未満の場合は試験に適用不可としている。現在改定作業が進んでいるドラフトでは、細胞由来製品の容量が 10mL 以上の場合は全量の 1%を試験に供し、10mL 未満の場合は別の方法、最終製品と最後に接触する液体や細胞に対して行うサロゲート試験、が取られるべきとしている (Emmanuelle Charton、私信)。一般社団法人日本再生医療学会は、再生医療等製品の最終出荷試験に際しては、「調製品及び原料の試験検査、その記録並びに参考品の保管について、ドナーへの侵襲性が高く採取可能検体が少ない場合や必要な検体採取が困難な場合においては、採取した検体の増殖を行うこと、又は、検体の試験検査に代えて工程管理での確認によることとして差し支えないこと。」との考え方を示している<sup>21)</sup>。再生医療等製品を無菌試験に供することが困難な場合は、最終調製品に代わる試料の利用や工程管理による無菌性保証などの方策が望まれる。

なお、一般的な医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品と同様に、ロットを構成し、十分な検体量の確保が可能で、出荷判定まで 14 日間以上の猶予がある再生医療等製品の場合は、日局 16 無菌試験法を適用する。

以下に、再生医療等製品の出荷判定に、日局 16 無菌試験法を適用する際の望ましい措置を示す。

(1) 微生物汚染に対する予防措置

日局 16 無菌試験法に準ずる。

(2) 培地及び培養温度

日局 16 無菌試験法に準じて、培地は液状チオグリコール酸培地とソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いる。EP chapter 2.6.27<sup>6)</sup>では、細胞由来製品の培養工程を考慮し、培養温度を 35-37 $^{\circ}$ C に規定している。再生医療等製品の無菌試験は、環境中に存在する菌ではなく、最終調製品の出荷時点で患者に有害な微生物を対象としていることから、EP と同様に培養温度は 35-37 $^{\circ}$ C が望ましい。

(3) 培地の適合性

日局 16 無菌試験法に準じて行う。試験菌株は培地性能試験及び手法の適合性に適している試験菌株 (日局 16 無菌試験法表 4.06-1) を用いるほか、再生医療等製品の原料 (細胞・組織) に内在性又は特異的に汚染しやすい微生物がある場合には試験菌株に加えることが望ましい。

(4) 手法の適合性試験

迅速測定法を適用するに当たって必要な変更点を含めて、「(5) 製品の無菌試験」に示した方法と、厳密に同じ方法で試験を行う。

#### (5) 製品の無菌試験

無菌試験に供する検体又は試料は、最終調製品から採取しなければならない。最終調製品を含む試験すべき容器の内容物すべてを均一にし、その内容量が 10mL 以上の場合は少なくとも全量の 1%を試験に供する。容量が 10mL 未満のとき、内容物を均一にできないときには、最終調製品と接していた培地や基材等を代替試料とし、可能な限り多くを試験に供する。

得られた試料又は代替試料を培地に接種して 24-36 時間の培養後、あらかじめ選択した迅速測定法で培養物を判定する。直接検出法の蛍光活性染色法を選択したときは、培養後の試料又は代替試料を蛍光活性染色し、蛍光顕微鏡、蛍光検出器又はフローサイトメーター等で検出する。間接測定法のマイクロコロニー法を選択したときは、試料又は代替試料をろ過したメンブランフィルターを培養後、フィルターに保持された微生物を蛍光活性染色し、蛍光検出器等で検出する。間接測定法の NAT を選択したときは、試料又は代替試料を培養後、遠心分離やメンブランフィルター等で濃縮した試料から核酸を抽出して NAT を行う。その他、選択した迅速測定法に適した方法で試料又は代替試料を処理後、微生物を検出する。

再生医療等製品の製造工程で抗生物質などの微生物発育阻止因子を用いた場合には、最終調製品から発育阻止因子の除去を確認したうえで試験を行う。

#### (6) 観察と結果の判定

微生物の増殖が観察されない場合は陰性とし、少なくとも最終調製品の出荷時には無菌試験に適合とする。微生物の増殖が観察された場合は、当該被験製品に無関係な原因により試験が無効であったことを明確に証明できなければ、被験製品は無菌試験に合格しない。

#### (7) 無菌試験への適合が要求される不溶物質を含む最終調製品の試験への適用

試験に供する検体又は試料が不溶物を含む場合は、プレフィルトレーションや遠心分離などにより不溶物を除いた溶液を調製し、以降の試験に用いる。これらの方法は最終調製品の種類や形態に応じて、あらかじめ添加した試験菌株の回収率を確認したうえで実施する。

#### (8) 最小供試個数

細胞・組織加工製品の再生医療等製品はロットを構成しないことから、それぞれの最終調製品について無菌試験を適用する。

### D. 考察

欧州で微生物試験の代替法を収載した EP chapter 5.1.6<sup>9)</sup>及び米国で微生物代替試験法の実施に必要なバリデーションを示した USP

Chapter <1223><sup>19)</sup>は、いずれも日局 16 の参考情報に相当する。日本でも第十七改正日本薬局方（平成 28 年 4 月施行予定）に、参考情報「代替微生物試験法」の新規収載が検討されている<sup>22)</sup>。一方、欧州で細胞由来製品の無菌試験法に適用される EP chapter 2.6.27<sup>6)</sup>は、日局 16 の一般試験法に相当する general chapter に収載されている。細胞治療等に用いられる細胞・組織加工製品は、ロットを構成せず、製造可能な最終調製品の量に限りがあり、出荷までの期間が短い。「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」の公布に伴い、医薬品や医療機器から独立した再生医療等製品として分類されたことから、EP と同様に、日局の一般試験法にも再生医療等製品に特化した無菌試験法の収載が望まれる。

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が公布され、厚生労働大臣は製造をしようとする特定細胞加工物の種類等について認可し、機構が細胞培養加工施設の構造設備について調査を実施する。機構は、細胞・組織加工製品に適用する無菌試験及びマイコプラズマ否定試験について、平成 26 年 1 月 17 日時点での考え方を薬事戦略相談に示している<sup>23)</sup>。そのひとつとして、組織加工製品では製造可能な最終製品の量に限りがある場合、患者に投与（適用）する量を確保すると、品質試験に使用可能な検体の量はわずかとなることから、製造中間体等を試験検体に用いることにより最終製品での無菌試験及びマイコプラズマ否定試験の実施を省略することについて、次の方策を示した。高度な無菌操作技術を用いて細胞培養から製剤化までのすべての工程操作を適切に管理するとともに、中間工程において無菌試験及びマイコプラズマ否定試験を実施し、その工程以降において汚染されていないことを厳格に保証することができる体制を確保することにより、中間工程における無菌試験等の結果及びすべての工程における汚染を否定する工程管理の結果を以て、最終製品が規格に適合すると判断できる場合は、最終製品での無菌試験及びマイコプラズマ否定試験の実施を省略することは可能とした。再生医療等製品はアイソレーター等の高度な無菌操作技術を用いて製造されることから、十分な無菌性保証バリデーションを実施した上で、検体の無菌試験に代えて工程管理での確認による最終調製品の出荷承認が望まれる。

日本薬局方一般試験法は医薬品の出荷判定試験法として遵守すべき試験法を、参考情報は製造工程管理などの業務で参考にすべき情報をそれぞれ収載している。参考情報に収載されている蛍光染色による細菌数の迅速測定法を再生医療等製品の中間工程において実施すること、最

最終調製品の出荷判定に無菌試験法として実施することは、現時点で最も合目的と考えられる。次善の方法としては、無菌試験法に適用するバリデーションを行った上で、原理と用いるプライマーの一部が参考情報に収載されている NAT を利用した迅速測定法の実施が考えられる。

その他の Table 3 に例を示した科学的に根拠のある新手法に関しても、蛍光染色による細菌数の迅速測定法との比較を行い、測定原理が異なることから相関は求めないが、従来法と同等以上であることの証明をした上での採用が考えられる。科学技術の進歩は速く、今後もこれら新手法の著しい検出感度の向上や、Table 3 にも示されていない次世代シーケンサーやマイクロアレイ等の新しい原理に基づく検出技術の普及が予想される。既にいくつかの迅速測定法は医薬品の工程管理等で使われており、多くの新手法の採用が期待できる。

実際の測定では、蛍光染色法は夾雑物の存在下でシグナルを判断しづらくなること、NAT は外来性 DNA 等の阻害物質存在下で偽陽性を示しやすいことが知られている。その他の新手法についても、各々の測定原理に特有な阻害物質の存在が推測される。いずれの方法においても、正確な測定値が得られるように、試料から夾雑物や阻害物質を除去するなどの前処理に留意する必要がある。

再生医療等製品の製造初期の培養工程に抗生物質を用いると、簡略化した施設と工程を採用できることから、その使用が不可欠と考えられる場合が想定される。抗生物質は細胞培養系で極力使用しないことが望まれるが、使用した場合には、無菌試験に影響を及ぼさないよう処置することが、技術要件として定められている<sup>24,25)</sup>。中間工程における無菌試験等の結果を以て、最終調製品が規格に適合すると判断する場合には、細胞培養系で使用する抗生物質等の発育阻止物質に留意し、無菌試験に影響を及ぼさないよう処置することが望まれる。最終調製品の無菌性を確保するため、その出荷時点で抗生物質が十分に除去されていること、または存在許容量の妥当性を規定する必要がある。

公布された「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」では、再生医療等製品の特性を踏まえた規制を構築し、均質でない再生医療等製品について、有効性が推定され、安全性が認められれば、特別に早期に、条件及び期限を付して製造販売承認を与えることを可能とした。同じく公布された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」では、採取等の実施手続き、提供する医療機関の基準、細胞を培養・加工する施設の基準等を規定することにより安全性等を確保し、医療の質及び保

健衛生の向上に寄与することを目的としている。本研究で検討した再生医療等製品の無菌試験法に迅速測定法を導入することにより、製造可能な最終調製品の量を確保すること、結果判定までの時間を短縮することを通じて、再生医療等の安全な提供および普及の促進を図られることを期待する。

## E. 参考文献

1. 無菌試験法, 第十六改正日本薬局方 一般試験法 p.98-100, 厚生労働省 (2011).  
[http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH\\_OU16.pdf](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH_OU16.pdf)
2. 遺伝子解析による微生物の迅速同定法, 第十六改正日本薬局方 参考情報 p.2029-2031, 厚生労働省 (2011).  
[http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH\\_OU16.pdf](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH_OU16.pdf)
3. Sasaki, T., *et al.*, 1997, Evaluation of a new method for identification of bacteria based on sequence homology of 16S rRNA gene. *PDA J Pharm Sci Technol.* **51**: 242-247 (1997).
4. 酒井綾子 他, 2006, DNA塩基配列を利用した真菌の同定: 国産玄米から分離された *Fusarium* の種レベルの同定. *食品衛生学雑誌* **47**: 268-276.
5. Hinrikson, H.P., *et al.*, 2005, Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2092-2103.
6. *European Pharmacopoeia* Chapter 2.6.27, Microbiological control of cellular products, 01/2011, 216.
7. 21 CFR 610.12 Sterility, Code of federal regulations. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title21-vol7/pdf/CFR-2012-title21-vol7-sec610-12.pdf>
8. FDA (2008) Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products/Guidance for Industry DRAFT.  
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm078696.pdf>
9. *European Pharmacopoeia* Chapter 5.1.6, Alternative methods for control of microbiological quality, 01/2008, 560-570.
10. 那須正夫, 山口進康, 微生物迅速検出法, 新 GMP微生物試験法第2版 (佐々木次雄, 棚元憲一, 川村邦夫 編集) pp.489-506, じほう (2013).
11. 蛍光染色による細菌数の迅速測定法, 第十六改正日本薬局方 参考情報 p.2031-2033, 厚生労働省 (2011).

- [http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH\\_OU16.pdf](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH_OU16.pdf)
12. 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, 第十六改正日本薬局方 参考情報 p.2070-2072, 厚生労働省 (2011).  
[http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH\\_OU16.pdf](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH_OU16.pdf)
  13. Yamaguchi, N., *et al.*, 2007, Rapid monitoring of bacteria in dialysis fluids by fluorescent vital staining and microcolony methods. *Nephrol Dial Transplant.* **22**: 612-616.
  14. Kawai, M., *et al.*, 1999, Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 496-504.
  15. Van de Peer, Y., *et al.*, 1996, A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3381-91.
  16. O'Donnell, K., 1996, Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. *Sydowia* **48**: 57-70.
  17. Sasaki, T., *et al.*, 1997, Evaluation of a new method for identification of bacteria based on sequence homology of 16S rRNA gene. *PDA J Pharm Sci Technol.* **51**: 242-247.
  18. Yamaguchi, N., *et al.*, 2012, Global dispersion of bacterial cells on Asian dust. *Sci Rep.* **2**: 525.
  19. *United States Pharmacopoeia* Chapter <1223>, Validation of Alternative Microbiological Methods. USP36-NF31, (U.S. Pharmacopoeia Convention, Rockville, Md., 2013).
  20. 分析法バリデーション, 第十六改正日本薬局方 参考情報 p.2022-2024, 厚生労働省 (2011).  
[http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH\\_OU16.pdf](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/YAKKYOKUH_OU16.pdf)
  21. 細胞調製に関する施設及び運用に対する考え方, 2013年9月3日, 一般社団法人日本再生医療学会.  
<http://www.asas.or.jp/jsrm/pdf/20130904.pdf>
  22. 柘植英哉, 2014, 日本薬局方における微生物等に関連する試験法の検討状況について. 日本防菌防黴学会誌 **42**: 73-77.
  23. 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験の考え方について, 平成26年1月17日, 独立行政法人医薬品医療機器総合機構,  
[http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/sai-sei-iryuu/pdf/H260117\\_Q\\_S1.pdf](http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/sai-sei-iryuu/pdf/H260117_Q_S1.pdf)
  24. ヒト (自己) 由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針, 平成20年2月8日, 厚生労働省医薬食品局長 薬食発第0208003号,  
[http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/sai-sei-iryuu/pdf/H200208\\_0208003.pdf](http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/sai-sei-iryuu/pdf/H200208_0208003.pdf)
  25. ヒト (同種) 由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針, 平成20年9月12日, 厚生労働省医薬食品局長 薬食発第0912006号,  
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/dl/s0519-7k.pdf>
- F. 健康危険情報**  
なし
- G. 研究発表**
1. 論文発表
    - 1) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス (印刷中)
  2. 学会発表
    - 1) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日局参考情報「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」のPCR法の見直しに関する共同研究, 日本薬学会第134年会 (2014.3) 熊本
    - 2) 窪崎敦隆, 菊池裕, 宮原美知子, 遊佐精一, 島崎愛加, 石橋侑季, 鈴木俊宏, 小原有弘, 大谷梓, 佐々木裕子, 松山晃文, 大倉華雪, 古田美玲, 内田恵理子, 山口照英: マイコプラズマ否定試験に利用可能な標準菌株および標準DNAの調製, 日本薬学会第134年会 (2014.3) 熊本
- H. 知的財産権の出願・登録状況**  
なし
- I. 研究協力者**  
大阪大学大学院薬学研究科  
衛生・微生物学分野 那須正夫  
衛生・微生物学分野 山口進康  
国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部 窪崎敦隆  
衛生微生物部 宮原美知子

## マイコプラズマ否定試験法の研究

研究分担者 内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第一室長

再生医療等に適用する細胞・組織加工製品では、最終製品の出荷試験のひとつとしてマイコプラズマ否定試験の実施が求められており、日本薬局方参考情報の試験法が広く利用されている。しかし、日本薬局方のマイコプラズマ否定試験はバイオ医薬品の製造に用いる細胞基材を対象としたものであり、試験に使用可能な検体量が少なく、迅速な試験結果が求められるなどの特性を持つ再生医療等製品を対象とする場合、日本薬局方の試験法をそのまま当てはめることは困難な場合がある。本研究では、再生医療等製品の特性を踏まえた試験法に関する考え方を整理するとともに、再生医療等製品に現実的に適用可能な試験法について考察した。また、マイコプラズマの迅速検査法として、核酸増幅検査(NAT)を再生医療等製品に適用する場合に考慮すべき事項を明らかにした。

### 研究協力者

古田(埜) 美玲 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部第一室長

「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」は、このようなバイオ医薬品の製造に用いる細胞基材について、適切な方法でマイコプラズマ否定試験を実施し、その存在を否定するための試験法として収載されている。

### A. 研究目的

マイコプラズマは細胞壁のない原核生物で、自己増殖能を持つ最小の微生物である。培養細胞を汚染する代表的な微生物であり、国内でも培養細胞のマイコプラズマ汚染は高頻度に認められている。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り見逃されやすい。しかし、マイコプラズマの汚染により細胞は増殖性や形態、表面マーカーの変化や染色体の異常、サイトカインの誘導など様々な影響を受け、またマイコプラズマの菌体成分が抗原性を呈する可能性もあり、医薬品の製造に汚染細胞を用いることは不適切である。日本薬局方(日局)参考情報の

一方、再生医療等に適用する細胞・組織加工製品でも、マイコプラズマ汚染は治療を受けた患者に重篤な感染症をもたらす可能性があることから、その品質・安全性確保のため、薬事承認審査に係る既存指針等において、マイコプラズマ否定試験を最終製品の出荷試験として実施することが求められている。細胞・組織加工製品でも、マイコプラズマ否定試験には日局参考情報が広く利用されているのが現状である。しかし、日局の試験法は、一定以上の製造量のあるバイオ医薬品に適用することが想定されているものであるため、ロットを構成しない、あるいは1ロットの製造量が極めて限られ

る再生医療等製品では、日局で規定されている検体量に準拠した形での試験の実施が困難な場合がある。また、試験に長時間を要するため、再生医療等製品の出荷前に試験結果が得られないという問題も生じている。

そこで、本研究ではマイコプラズマ否定試験について、検体量や迅速性など、再生医療等製品の特性を踏まえた試験法に関する考え方を整理するとともに、再生医療等製品に現実的に適用可能な適切な試験法について検討した。

## B. 研究方法

### 1) マイコプラズマ参照品

*Acholeplasma laidlawii* (NBRC 14400), *Mycoplasma fermentans* (NBRC 14854), *M. hyorhinis* (NBRC 14858), *M. orale* (NBRC 14477), *M. pneumoniae* (NBRC 14401)及び *M. salivarium* (NBRC 14478)は製品評価技術基盤機構 (NBRC) から、*M. arginini* (ATCC 23838) は American Type Culture Collection (ATCC) からそれぞれ購入後、液体培地で増殖し、1mL ずつクライオチューブに分注後、凍結保存 (-80°C) してバリデーション用マイコプラズマ参照品(アコレプラズマを含む)とした。各菌株の由来、自然界の宿主、及び post preservation titer(CFU)を Table 1 に示した。

### 2) 細胞

Mesenchymal stem cell (MSC ; Lonza) は Mesenchymal stem cell growth medium (PromoCell) に Insulin-Transferrin-Selenium-A を添加して培養した。CHO-DG44 細胞 (Life Technologies) は CD DG44 培地 (GIBCO) を用いて培養した。

### 3) MSC の細胞数の検討

種々の濃度の MSC の細胞懸濁液を調製し、マイクロチューブに 900µl ずつ分注した。M.

*hyorhinis* を溶解後、無血清 MEM 培地を用いて段階希釈し、最終濃度が 100 CFU/mL または 10 CFU/mL となるように細胞懸濁液にスパイクした (細胞の終濃度 :  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  cells/mL)。細胞懸濁液及び陰性対照となるマイコプラズマ非感染細胞懸濁液 450µl をそれぞれ 2 本ずつマイクロチューブに分注し、MycotoOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kit (Roche Diagnostics) のマニュアルに従いマイコプラズマ DNA を抽出した。なお、carrier DNA の検討では、Salmon sperm DNA を終濃度 4.4µg/mL となるように試料に添加後、DNA 抽出を行った。

### 4) マイコプラズマ参照品の検出

CHO-DG44 細胞は  $5 \times 10^6$  cells/mL の細胞懸濁液、MSC は  $2 \times 10^5$  cells/mL の細胞懸濁液に Carrier DNA を添加したものを調製し、それぞれマイクロチューブに 900µl ずつ分注した。マイコプラズマ参照品 7 種を溶解後、無血清 MEM 培地を用いて段階希釈し、細胞懸濁液に 1/10 量スパイクして最終濃度が 100, 10, 1 CFU/mL となるように調製した。各試料について、以後、3) と同様の操作によりマイコプラズマ DNA の抽出を行った。

### 5) MycoTOOL PCR

試料から抽出したマイコプラズマ DNA は、MycotoOL PCR Mycoplasma Detection kit (Roche Diagnostics) を用いて検出した。PCR 増幅はキットのプロトコールに従いタッチダウン PCR とした。反応後の検出はマイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いて行い、目的とするサイズのマイコプラズマ特異的なバンドが検出された場合に陽性と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要な試料・

資料の取り扱いはない。

## C. 研究結果・考察

### 1. 核酸増幅法（NAT）を用いたマイコプラズマの迅速検査法

#### 1.1 日局の迅速法の見直しに関する検討

再生医療等製品は生きた細胞をそのまま投与するという点で従来の医薬品と大きく異なる特性を有している。そのために、感染性因子が含まれている場合にも不活化・除去などの工程を適用することができず、十分に検査された原材料の使用、原料細胞の試験、中間工程検査、最終製品での試験が重要となる。再生医療等製品のマイコプラズマ否定試験は最終製品での試験が求められ、日局試験法が参考とされている。

日局にはマイコプラズマ否定試験法として、培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による検出法の3つの試験法が提示されているが、日局では原則として培養法及び指標細胞を用いた DNA 染色法による実施を求めており、PCR 法はあくまで DNA 染色法を補完する二次的な試験と位置付けられている。しかし、培養法や指標細胞を用いた DNA 染色法は、大量にある被検細胞液を対象として試験をすることを想定しており、また試験期間についても、培養法では4週間の培養が必要であるなど、判定までに長期間を必要としている。再生医療等製品では多くの場合、培養終了後に迅速に患者に投与する必要があり、従来の試験法を用いたのでは試験結果が得られるのが患者に投与後になってしまう。このために欧州薬局方（EP）では迅速なマイコプラズマ試験法として NAT 法を適用するためのバリデーション法を示している（European Pharmacopoeia 2.6.7 Mycoplasmas, EP 7.0, 2011, p.156-161.）。この EP のバリデーション法に適合しているとされる NAT を用いたマイコプラズマ検出キット

が既に市販されている。このような市販キットが利用できるのであれば、判定までに数時間しか要しないこともあり再生医療等製品のマイコプラズマ安全性を評価するのに有用と考えられる。

マイコプラズマの特性として細胞内や細胞に接着して増幅する菌種が多く、単に培養液のみや細胞懸濁液の上清を被検液としたのでは十分な感度を担保することが出来ないと考えられる。そこで細胞を含めて被検液とする必要があり、細胞からの抽出では細胞ごとにマイコプラズマ DNA の抽出効率や回収率が変動する可能性が高い。このために、細胞ごとにマイコプラズマゲノムの回収率や感度・精度が担保されていることを評価する必要がある。

一方、市販のキットはバイオ医薬品製造に使用する CHO 細胞などの特定の細胞を対象としたバリデーションが行われていることが多く、全ての細胞に適用するためのバリデーションが行われているわけではない。そのために再生医療等製品に市販キットを適用する場合には、対象とする再生医療製品ごとにその精度・感度等が担保されていることを確認する必要がある。

そこで、まず EP に適合しているとして市販されている複数の PCR キットのうち、プライマーが公開されている MycoTOOL PCR をモデルとして取り上げ、キットが対象とする CHO 細胞を用いて日局 PCR 法との比較を行うと共に、EP のバリデーションの妥当性と NAT 実施上の注意点について検討した（内田恵理子他：細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験の PCR 法の見直しに関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、印刷中）。現在、この検討を基に、日局マイコプラズマ否定試験の改定が進められており、日局でもバリデーションに適合する NAT であれば培養法や DNA 染色法を代替することが可能になると考えられる。この結果を受けて、次のよう

な点を局方改正案に盛り込むことが望ましいと考えられた。

- ① 試薬メーカーによりバリデートされたキットを使用する場合でも、試薬メーカーが示すとおりを検出感度が得られるとは限らない。導入に際しては自施設の機器、細胞を用いて検出感度を含むキットの性能の確認を行う必要がある。
- ② 試験対象となる細胞の種類や細胞数により、核酸の抽出効率や検出感度は大きく変わる可能性がある。試薬メーカーの規定する条件と同じであれば検出感度を確認するだけで良いと考えられるが、プロトコルの変更が必要となる場合は十分な評価を行うことが必要となる。
- ③ NAT では増幅産物による汚染で偽陽性の結果が出やすいため、試薬や試料の取り扱い、試料の汚染には細心の注意が必要である。
- ④ 細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に接着して増殖するケースが多いため、培養上清ではなく細胞懸濁液から抽出する方法を用いるべきと考えられる。培養上清を用いる場合は、細胞の汚染を十分に検出できていることを示す必要がある。
- ⑤ NAT の検出感度は、核酸の増幅・検出だけでなく、検体からの核酸の抽出効率を含めた過程の全体を評価することが必要である。核酸の抽出効率が悪い場合や NAT の阻害物質が検体に含まれるため偽陰性となる可能性があることに注意する。細胞にスパイクしたプラスミドや、細胞由来 DNA を同時に検出することにより、偽陰性を否定することが望ましい。
- ⑥ 現行の日局二段 PCR 用プライマーは、今回の試験結果では EP の評価基準に適合していないことになる。JIS のアコレプラズマ用プライマー等を併用するほか、細胞由来 DNA の非特異バンドの出現を減らしてマイ

コプラズマ由来バンドが検出されるような工夫が必要である。

- ⑦ マイコプラズマ検出に用いる NAT のバリデーションを行うには、濃度が既知のマイコプラズマ参照品の整備が必要である。世界保健機構 (WHO) により 2013 年に NAT 試験用マイコプラズマ DNA の初代国際標準品が樹立された。しかし、樹立された国際標準品は現時点では *M. fermentans* の 1 種類のみであり、NAT が広範なマイコプラズマを検出可能かどうかの評価には向かない。一方、ATCC からは濃度を表示した 10 種のマイコプラズマからなる参照品パネルが入手可能であり、今回参照品として使用した 7 種もパネルに含まれる。しかし今後、7 種のマイコプラズマを日局の参照菌種として NAT のバリデーションを行うには、国内でマイコプラズマ参照品が整備されることが望まれる。

## 1.2 MSC を用いた NAT の検証

1.1 で検討した NAT 法は、バイオ医薬品製造に用いられる CHO-DG44 細胞を対象としたものであり、再生医療等製品にそのまま当てはめることが可能か、また細胞数が少ない場合も同様の感度で検出ができるのかは不明である。そこで、再生医療等製品の一例として Mesenchymal stem cell (MSC) をモデル細胞として取りあげ、Mycotool PCR によるマイコプラズマの検出を検討した。

まず、Mycotool の標準プロトコルとなる CHO 細胞と同じ細胞濃度の  $5 \times 10^6$  cells/mL の MSC に *M. hyorhinis* をスパイクして Mycotool PCR による検出頻度を検討した。MSC は CHO DG44 細胞に比べて細胞が大きく、培養面積も多く必要であり、 $5 \times 10^6$  cells/mL からの DNA 抽出液は粘性が高く濁ったものとなった。それでも *M. hyorhinis* のスパイク量が 100 CFU/mL であれば 4 レーン

全てで陽性のバンドが検出されたが、スパイク量が 10 CFU/mL の場合は 2/4 のレーンで検出されたにとどまった (Fig.1, Table 2)。

次に、細胞数を減らして検出頻度を検討した。100 CFU/mL をスパイクした場合には、細胞濃度が  $2 \times 10^5$  cells/mL 以上あれば 100%陽性となったが、 $5 \times 10^4$  cells/mL では検出率が 1/2 に低下し、 $5 \times 10^3$  cells/mL 以下では全て陰性であった (Table 2)。一方、*M. hyorhinis* のスパイク量を 10 CFU/mL とした場合、どの細胞濃度でも 100%陽性とはならず、特に  $5 \times 10^4$  cells/mL 以下では全く検出されなかった。MycotoOL の DNA 抽出法は細胞 DNA に依存して DNA を回収するものであるため、細胞量が少ないとマイコプラズマ DNA の収率が低く、細胞濃度が低い場合には carrier DNA を添加して DNA を抽出することが推奨されている。そこで、MSC に carrier DNA を添加して抽出を行ったところ、スパイク量が 10 CFU/mL でも、MSC が  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$  cells/mL の範囲では確実に検出が可能となった。

そこで、 $2 \times 10^5$  cells/mL の MSC にバリデーション用マイコプラズマ参照品 7 種をスパイクし、Carrier DNA を添加した条件でマイコプラズマの検出を検討した。その結果、この条件では参照品 7 種全てについて、10CFU/mL を 100%の確率で検出可能であることが確認された (Table 3)。これは  $5 \times 10^6$  cells/mL の CHO 細胞で得られた結果 (Table 4) と同等の検出感度である。細胞数が少ないため、細胞あたりの汚染量としての検出感度は CHO 細胞の 1/25 という計算になる。

今回の検討により、CHO 細胞に特化された市販の検出キットである MycoTOOL PCR は、MSC にはそのまま当てはめることはできないことが確認された。MSC では細胞数を CHO 細胞の 1/10 以下に減らす必要があり、また carrier DNA の添加がマイコプラズマ DNA の抽出・検出には必要である。同じ再生医療製品

でも、MSC と異なる細胞が対象となる場合には、目的細胞を用いて最適化を行うことが必要であろう。また今回は検討していないが、MycotoOL PCR では抽出効率の確認と PCR 阻害物質の混入等による false negative ではないことを確認するため、同一試料について細胞由来の GAPDH を同時に確認するプロトコールになっている。しかし、MycotoOL は CHO 細胞に特化されたキットであり、キットに添付されたプライマーでは CHO 細胞の GAPDH は検出できるがヒトの GAPDH は検出されないため、抽出効率の確認には別の手段を講じる必要がある。

## 2. 再生医療等製品の細胞特性に応じたマイコプラズマ試験の適用

再生医療等製品は、製品ごとに多様な特性を持っており、臨床適用においても様々なバリエーションが存在する。例えば、培養角膜上皮細胞や角膜内皮細胞では、臨床適用されるのは非常に少量の細胞であり、培養角膜シートで重層化した角膜細胞が  $10^7$  cells/0.2mL 程度とされている。試験に用いることが出来る検体も同様に少量である場合も多い。また、培養角膜上皮シートや培養心筋シートなどでは最終製品の形態がシート状であり、これらの最終製品を対象に試験を実施する場合、その一部を剥ぎ取って被検液とするのか、あるいは試験のために別途パイロット培養した被検細胞を調製し、最終製品の試験に用いることも想定される。この場合には、パイロット培養された被検液は患者に投与される培養製品と同様の操作が適用されており、汚染等のリスクが同一とみなせることが十分に説明可能であることが必要である。

一方、抗腫瘍活性が期待される活性化リンパ球などは、細胞が懸濁液の状態でも培養されており、最終製品も容易に懸濁状態にすることが可能であり、NAT 法を適用するための DNA の抽出操作も比較的容易であると想定される。一

方、接着細胞では通常はトリプシン等により細胞を懸濁状態にする操作が必要となるが、この操作により、細胞に接着しているマイコプラズマが除去されてしまう可能性がある。このような細胞懸濁操作の必要な製品を対象とする場合には、マイコプラズマの添加回収試験を実施することにより十分な感度が担保されることを確認しておく必要がある。

さらに再生医療等製品の種類によっては、培養軟骨製品や培養骨細胞製品のように医療材料等に包埋して投与される製品もある。このような製品では、最終製品に NAT 法を適用することが困難な場合もある。このような場合、包埋後にそれ以上の汚染の可能性がないことを前提に、混合する直前の細胞と医療材料を対象にそれぞれ DNA 抽出操作を行って各検体で NAT 試験を行うことにより、マイコプラズマの存在を否定することも可能であろう。

また、特定の医療材料の中で培養され、簡単な洗浄の後にそのまま投与されるような製品の場合には、スキャホールドから直接、NAT 検査用の DNA 抽出が必要とされる場合もあると考えられる。このような場合には、指標となるマイコプラズマをスキャホールドに添加し、十分な添加・回収ができることを示すことで評価が可能と考えられる。

### 3. 再生医療等製品のマイコプラズマ否定試験に用いる検体量の考え方

上述したように、再生医療等製品は非常に少量しか培養しない製品から比較的大量に培養される製品まで、多様な特徴を有する。日局の培養法では、カンテン平板培地で 0.2mL 以上の検体（細胞懸濁液）をプレート 2 枚以上に接種すること、液体培地では 10mL 以上の検体を 1 本以上の培地に接種すること、とされている。試験に用いる検体の量が多いほど感度が高いと想定されるが、本来、日局で対象としているのは細胞バンクを形成する細胞基材での試

験であり、大量培養が可能であり数百 mL の細胞懸濁液が得られるため、そのうち 10mL を被検液として用いるのは合理的と考えられる。しかし、再生医療等製品で非常に少量しか培養されない製品の場合、大量の検体を用いてマイコプラズマ試験を実施するのは合理的ではない。

英国薬局方（BP）では、細胞治療製品に無菌試験を適用する際の被検液として Table 5 に示す採取量を推奨している。細胞懸濁液が 10mL を超えるだけ十分な量がある場合には、総量の 1% を被検液とし、10mL 未満の場合には 100  $\mu$ L としている。これは基本的な考え方として、総量の 1% 以上を検体とすることによりその無菌性を担保しようとするものである。この考え方はマイコプラズマ否定試験でも適用可能と考えられ、必ずしも最終製品の細胞懸濁液量が十分でない再生医療等製品では、被検液量の目安として適用できると考えられる。

なお、この BP の考え方は無菌試験の培養法を適用するときのものであり、NAT の被検液量を設定するときには、NAT の特性に応じた考え方を適用すべきであろう。例えば、BP では総量が 1mL 未満の製品では試験の適用はなしとしているが、適切な量が確保できるのであれば、NAT が適用できる場合に試験の実施を不要とすることはできないと考えられる。また、総量の 1% を試験するという場合には、被検サンプル数を増やすという考え方も必要になると考えられる。

### D. 結論

再生医療等製品の最終製品の出荷試験のひとつとして実施が求められているマイコプラズマ否定試験について、再生医療等製品の特性を踏まえた試験法に関する考え方を整理した。再生医療等製品では迅速試験法が求められているが、NAT を再生医療等製品に適用する場合に考慮すべき事項を明らかにした。また、検

体の種類や検体の採取量など、再生医療等製品の特性を考慮した、現実的に適用可能な試験法について考察した。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験の PCR 法の見直しに関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス (印刷中)

### 2. 学会発表

- 1) 内田恵理子、古田美玲、菊池裕、窪崎敦隆、遊佐精一、宮原美知子、佐々木裕子、小原有弘、大谷梓、松山晃文、大倉華雪、山口照英：日局参考情報「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」の PCR 法の見直しに関する共同研究、日本薬学会第 134 年会 (2014.3) 熊本

- 2) 窪崎敦隆、菊池裕、宮原美知子、遊佐精一、島崎愛加、石橋侑季、鈴木俊宏、小原有弘、大谷梓、佐々木裕子、松山晃文、大倉華雪、古田美玲、内田恵理子、山口照英：マイコプラズマ否定試験に利用可能な標準菌株および標準 DNA の調製、日本薬学会第 134 年会 (2014.3) 熊本

## F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Table 1 バリデーション用マイコプラズマ参照菌株の濃度とゲノムコピー数

Strain	Origin	Host	Post preservation titer (CFU/mL)		Genome copies/CFU ratio
			mean	SE	
<i>Acholeplasma laidlawii</i> NBRC 14400	Sewage	Bovine	2.87E+08	6.67E+06	18.92
<i>Mycoplasma fermentans</i> NBRC14854	Ulcerative balanitis	Human	7.97E+06	2.79E+06	67.38
<i>Mycoplasma hyorhinis</i> NBRC14858	Nasal cavity of pig	Swine	2.19E+08	3.68E+07	10.23
<i>Mycoplasma orale</i> NBRC14477	Human-orpharynx of child	Human	1.18E+08	1.02E+07	22.20
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> NBRC14401	Human-atypical pneumoniae	Human	2.42E+07	6.86E+06	57.85
<i>Mycoplasma salivarium</i> NBRC14478	Saliva	Human	6.93E+07	4.11E+07	30.30
<i>Mycoplasma arginini</i> ATCC23838	Mouse brain experimentally infected with scrapies	Bovine, Caprine	5.30E+08	2.29E+07	8.11

Table 2 MSC にスパイクした *M. hyorhinis* の MycoTOOL PCR による検出

<i>M. hyorhinis</i>	Carrier DNA	MSC (cells/mL)						
		$5 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	0
100 cfu/ml	-	4/4*	8/8	4/4	2/4	0/4	0/4	1/4
	+	nd	nd	nd	8/8	8/8	8/8	4/4
10 cfu/ml	-	2/4	7/8	2/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	+	nd	4/4	4/4	8/8	7/8	6/8	4/4

\*: 検出数/試験数 ; nd: not determined

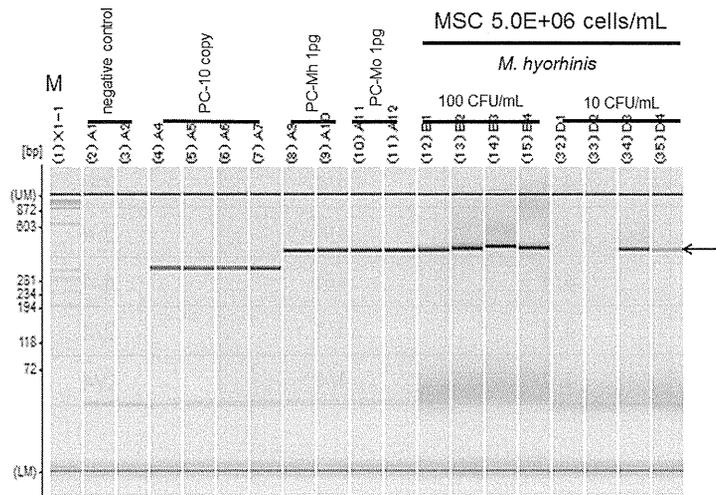


Fig.1 MSC ( $5 \times 10^6$  cells/mL)にスパイクした *M. hyorhinis* の MycoTOOL PCR による検出

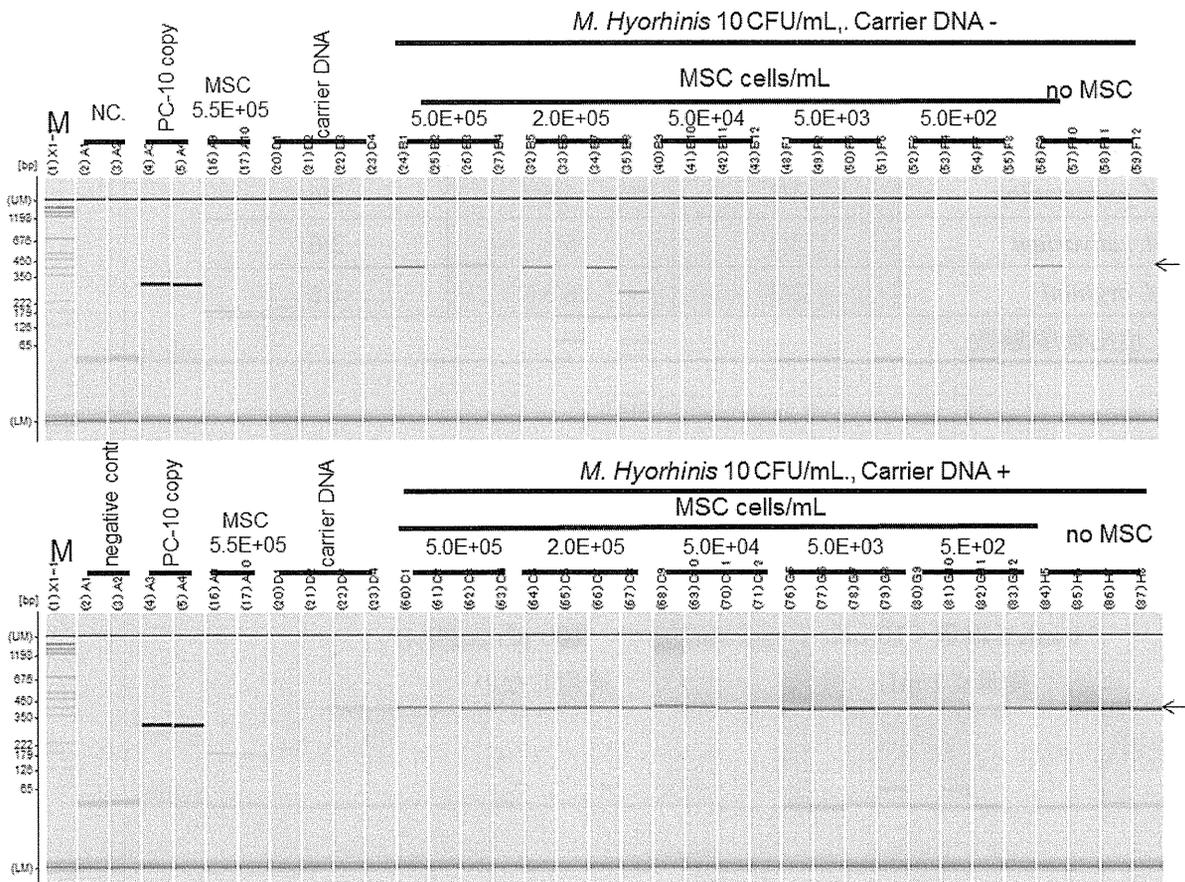


Fig.2 MSC にスパイクした *M. hyorhinis* の MycoTOOL PCR 検出に与える細胞数と Carrier DNA の影響

Table 3 MSC にスパイクしたマイコプラズマ参照株の MycoTOOL PCR による検出  
( $2 \times 10^5$  cells/mL, Carrier DNA+)

Strain	100cfu/ml	10cfu/ml	1cfu/ml
<i>A. laidlawii</i>	4/4*	4/4	0/4
<i>M. fermentans</i>	4/4	4/4	1/4
<i>M. hyorhinis</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. orale</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. pneumoniae</i>	4/4	4/4	4/4
<i>M. salivarium</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. arginini</i>	4/4	4/4	0/4

\*: 検出数/試験数

Table 4 CHO 細胞にスパイクしたマイコプラズマ参照株の MycoTOOL PCR による検出  
( $5 \times 10^6$  cells/mL)

Strain	100cfu/ml	10cfu/ml	1cfu/ml
<i>A. laidlawii</i>	2/2*	6/6	0/6
<i>M. fermentans</i>	2/2	2/2	2/2
<i>M. hyorhinis</i>	2/2	6/6	0/6
<i>M. orale</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. pneumoniae</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. salivarium</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. arginini</i>	2/2	6/6	1/6

\*: 検出数/試験数

Table 5 細胞治療製品の総製品量と検体の採取量の考え方(BP)

総製品量	検体量
総量 $\geq 10$ mL	総量の 1%
$1$ mL $\leq$ 総量 $< 10$ mL	100 $\mu$ L
総量 $< 1$ mL	適用しない

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

ウシ等由来原料の基準の研究  
研究分担者 吉倉廣 国立感染症研究所 客員研究員

本研究では、国際獣疫事務局 (OIE) において、日本、米国等が新たに牛海綿状脳症 (BSE) の「無視できるリスク国」に指定されたことを踏まえ、海外規制状況、国内規制に対する国内研究者の意見等について調査を行うとともに、医薬品等に用いる原料規制のあり方を提言する。

### 協力研究者

小野寺節 (東京大学大学院)  
甲斐智恵子 (東京大学医科学研究所)  
北本哲之 (東北大学大学院)  
四方靖 (株式会社エーザイ)  
中村好一 (自治医科大学)  
毛利資郎 (東北大学)  
山口照英 (国立医薬品食品衛生研究所)  
山本茂貴 (東海大学)

### A. 研究目的

生物由来原料を用いる医薬品等については、最終製品の安全性を確保するため、薬事法に基づき、当該生物由来原料に対して細菌やウイルス安全性に係る基準 (平成 15 年 5 月 20 日厚生労働省告示第 210 号 生物由来原料基準) を定めている。特に、細胞培養技術等を活用して製造される医薬品等については、培地等にウシ血清をはじめとする反芻動物由来原料が用いられていることから、伝達性海綿状脳症 (TSE) の発生日スクに応じて、原料として使用可能な部位、原産国を定めて規制している。今般、国際獣疫事務局 (OIE) において、日本、米国等

が新たに牛海綿状脳症 (BSE) の「無視できるリスク国」に指定されたことを踏まえ、海外規制状況、国内規制に対する国内研究者の意見等について調査を行うとともに、医薬品等に用いる原料規制のあり方を提言する。

### B. 研究方法

海外規制状況、国内規制に対する国内研究者の意見等について調査を行うとともに、会議により研究協力者との意見交換を実施する。

### C. 研究結果

海外の規制状況、OIE、欧州食品安全機関 (EFSA) 等の国際機関のリスク評価情報を収集し、検討を行った。

今後は、原則的に OIE の基準に沿って、生物由来原料基準による規制を見直す方向性が確認された。

また、使用可能な部位等の見直しについては、現状における問題点の抽出・整理を行った。

## D. 考察

平成 15 年に制定された生物由来原料基準では、EFSA 等が用いていた地理的 BSE リスク (GBR) に基づき、個別評価を経て使用可能国が選定された。

平成 17 年に CVO/EU 議会は、BSE 分類は、可能な限り OIE ガイドラインに基づく必要があると結論を示した。

これを受け、EFSA は、専門家によるパネルを設置し、平成 19 年には、EFSA は、GBR 評価手法は OIE の基準の枠組みに一致させる方針を決めた。現時点では、WTO の SPS 協定のリファレンスとされる OIE 基準が今後国際的なスタンダードとして、受け入れられる方向にあると考えられる。

平成 25 年度においては、当該年度に OIE 基準において「無視できるリスク国」に指定された日本及び米国について、両国を生物由来原料基準の使用可能国に加えることを、喫緊の課題として検討することとした。

尚、平成 15 年生物由来原料基準において GBR に基づき使用可能国としてきた国々の中には、OIE が評価していない国々がある。これらの国々については、平成 15 年の生物由来原料基準設定以来 BSE 発生リスクが上昇している事実があるか確認することが必要とされた。

将来的な検討課題として、今後我が国の生物由来原料基準の使用可能国を OIE 基準

に連動させるのが適切か否かについての検討或いは提言が必要であるが、それに先立ち、欧米の OIE の WTO の中での役割を考慮し、規制当局の本件に関する動向を調査することとした。

## E. 結論

ウシ等由来原料の基準に係る提言を行うに当たり、必要な検討事項を一定程度整理した考え方をまとめた。

来年度以降は、整理された検討事項についてさらに検討を進める。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 【参考資料】

生物由来原料基準

OIE Terrestrial Animal Health Code  
-Bovine spongiform encephalopathy-  
原産国規制状況

○生物由来原料基準

(平成十五年五月二十日)

(厚生労働省告示第二百十号)

改正	平成一六年	三月三〇日	厚生労働省告示第一五七号
	同 一六年	七月 五日	同 第二六二号
	同 一七年	三月三一日	同 第一七七号
	同 一九年	九月二八日	同 第三一〇号
	同 二一年	七月 一日	同 第三四三号

薬事法(昭和三十五年法律第百四十五号)第四十二条第一項(同法第六十八条の五において準用する場合を含む。)及び第二項の規定に基づき、生物由来原料基準を次のように定め、平成十五年七月三十日から(生物由来原料基準中の生物由来原材料等の記録及び保存に関する規定は、平成十五年十月三十日から)適用し、細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する基準(平成十三年厚生労働省告示第百一号)は平成十五年七月二十九日限り廃止する。ただし、同日において現に同法第十四条(第二十三条において準用する場合を含む。)又は同法第十九条の二の規定による承認を受けている医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療用具については、平成十五年十月二十九日までは、なお従前の例によることができる。

生物由来原料基準

第1 通則

- 1 本基準は、医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器(以下「医薬品等」という。)に使用される人その他の生物(植物を除く。)に由来する原料又は材料(添加剤、培地等として製造工程において使用されるものを含む。)について、製造に使用される際に講ずべき必要な措置に関する基準を定めることにより、医薬品等の品質、有効性及び安全性を確保することを目的とする。
- 2 体外診断用医薬品その他人体に直接使用されることのない製品に使用される原料又は材料並びにワクチン等の製造に用いられる微生物及びウイルスには本基準は適用しないものとする。
- 3 「原材料」とは、医薬品等の製造に使用する原料又は材料の由来となるものをいう。
- 4 「原血漿」とは、必要に応じ、原材料から適当な方法を用いて分離された血漿であり、血漿分画製剤を製造するための一群の個々の分離血漿又はそれらの全部若しくは一部を混合したものをいう。
- 5 「ドナー」とは、人細胞組織製品の原料又は材料となる細胞又は組織を提供する人(臓

器の移植に関する法律(平成9年法律第104号)第6条第2項に規定する脳死した者の身体に係るものを除く。)をいう。

- 6 「ドナー動物」とは、動物細胞組織製品の原料又は材料となる細胞又は組織を提供する人以外の動物をいう。
- 7 「ドナースクリーニング」とは、ドナーについて、問診、検査等による診断を、又はドナー動物について試験検査及び飼育管理を行い、当該ドナー又はドナー動物が生物由来製品の原料又は材料となる細胞又は組織を提供するにつき十分な適格性を有するかどうかを判定することをいう。
- 8 「ウインドウピリオド」とは、感染初期であって細菌、真菌、ウイルス等又はこれらの抗原、抗体、遺伝子等を検出できない期間をいう。
- 9 医薬品等の品質及び安全性について、本基準中の規定により求められるものと同等以上の妥当性を有することが確認され、その旨が薬事法に基づく承認等の際に交付される承認書に記載されている医薬品等については本基準の当該規定を適用しないものとする。

第2 血液製剤総則

1 輸血用血液製剤総則

- (1) 輸血用血液製剤(医薬品等の製造工程において添加剤、培地等に用いられるものを含む。以下同じ。)に用いる血液の提供者(以下輸血用血液製剤総則において「献血者」という。)は、問診等により、血液によって伝播される疾患にかかっている疑いがなく、輸血用血液製剤の原材料となる血液を提供するに十分な適格性を有するものであると認められる者でなければならない。ただし、血液によって伝播される病原体が製造過程において不活化又は除去されることが確認され、その旨が、薬事法に基づく当該輸血用血液製剤の製造販売の承認の際に交付される承認書に記載されているものについては、この限りではない。
- (2) 採血は、次のいずれかの採血法によって行わなければならない。
  - ア 全血採血 血液セットに、適当な血液保存液を注入し、直ちに採血針を組み立てた後、セットを密封し、高圧蒸気滅菌したものをを用いて行うもの。
  - イ 血液成分採血 血漿、血小板等の特定の血液成分のみを採取し、これ以外の成分を返還するものであって、次によって行うもの。
    - (ア) アを準用して全血採血を行った後、適当な方法によって特定の血液成分を採取し、これ以外の血液成分を返還する用手法