

表 2. Prion removal using 15nm virus reduction filter

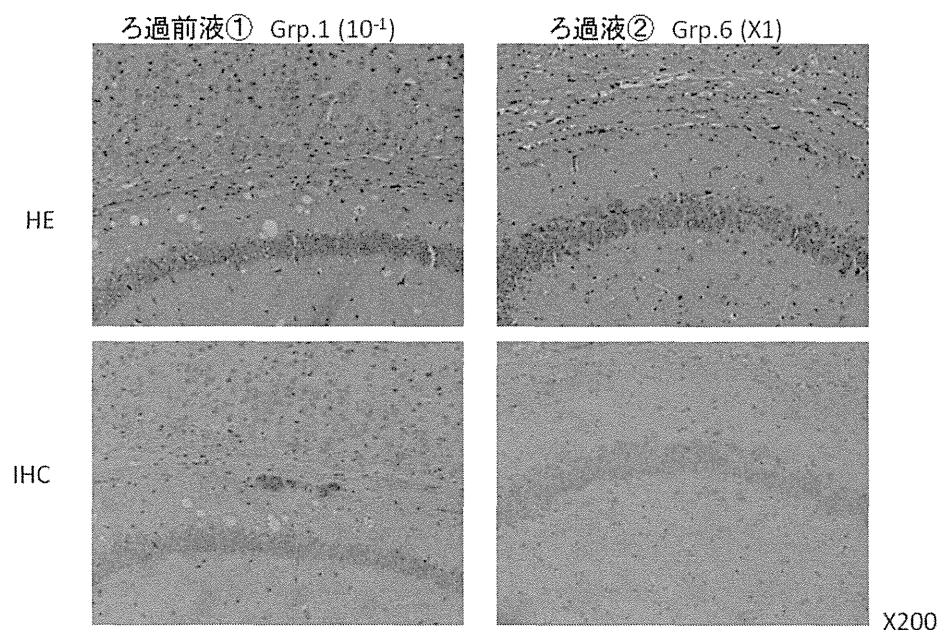
	mo-vCJD (sMF)	
	WB	BA
Pre filtration	2.5	5.2
Post filtration	<-0.3	<1.0 (<-1.0)
LRV	≥2.8	≥4.2 (≥6.2)

Titers are indicated by log₁₀, sMF: super-sonicated microsomal fraction, LRV: Log reduction value
 WB: Western blotting, BA: Bio assay (Infection titer was determined by detection PrP^{res} in brain)
 (): concentrated sample

表 3. 実験結果一覧

group No.	Inoculum dilution	TI or Endpoint dpi	BW (g)		WB		HE		IHC	
			Avr.	Reduc. rate	positive	rate(%)	positive	rate(%)	positive	rate(%)
#1	10 ⁻¹	177	21.1	26.2%	6/6	100	6/6	100	6/6	100
#2	10 ⁻²	189-194	19.1	33.2%	6/6	100	6/6	100	6/6	100
#3	ろ過直前液 10 ⁻³	203	22.3	22.2%	4/6	67	6/6	100	6/6	100
#4	10 ⁻⁴	203	22.2	22.4%	3/6	50	2/6	33	4/6	67
#5	10 ⁻⁵	177	18.6	34.8%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
#6	X1	206	27.4	4.1%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
#7	ろ過液 10 ⁻¹	206	25.8	10.0%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
#8	10 ⁻²	206	22.7	20.6%	0/6	0	0/5	0	0/6	0
#9	ろ過液上清 X2	204	24.5	14.2%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
#10	ろ過液沈殿 100倍濃縮	151-176	19.5	31.7%	0/6	0	0/6	0	0/6	0
CN		203	28.6		0/6	0	0/6	0	0/6	0

図 2. プリオン感染マウス脳の HE 染色像および免疫染色像



厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）
平成26年度分担研究報告書
ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究
-異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究-

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、その原材料に混入する恐れがあるウシ異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の高感度な検出法の開発が望まれている。動物由来製造原材料の品質確保および種々の製造工程の安全性評価を目的とし、特異的にPrP^{Sc}を認識する抗体の作製を行った。

ヒトPrPのN端側43残基のセリン(S43)がPrP^{Sc}形成の初期段階にリン酸化セリン(pS43)に変化する知見から、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を認識する抗体産生ハイブリドーマを樹立した。調製したマウスモノクローナル抗体pSP279を用いてイムノブロット法を行い、正常マウス脳乳液及びスクレイピー感染脳乳液に、糖鎖の無い単量体及び二量体のPrPに相当するバンドを示した。一方、PrP^{Sc}に対する反応性は、PrP^Cと比較して低かった。

これらの研究成果はPrP^{Sc}やBSE罹患ヒツジ試料を用いた解析等への応用が期待され、今後はPrP^{Sc}のマウス脳内投与による伝達実験を行い、感染初期でのPrP^{Sc}検出法確立等への利用を試みる。

A. 研究目的

人のプリオン病には硬膜移植等によって発症した獲得性CJD、プリオン(PrP)遺伝子(PRNP)にコードされた253残基のアミノ酸に変異がある遺伝性CJD及びPRNPに変異のない弧発性CJDが知られ、約85-90%を弧発性CJDが占めている。一方、1996年に英国で発症が確認された変異型CJDは、従来の弧発性CJDとは異なって若年性の患者で発症し、異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の生化学的研究及び英国で多発していた牛海綿状脳症(BSE)に関する疫学研究から、ウシPrP^{Sc}が人へ伝達して発症すると考えられている。また、輸血によって変異型CJDを発症したと推定される症例が報告されており、血液を介したCJDの伝達が注目を集めている。多くの遺伝子組換え医薬品等の製造工程ではウシ胎児血清を用いることから、医薬品へのPrP^{Sc}汚染を防ぐために、ウシ由来原材料中のPrP^{Sc}測定法の確立が望まれている。

本研究は PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体を作製し、新たな検出法の開発を目的とする。スクレイピー(Obihiro 株)を ICR マウスの脳内に投与して増幅された PrP^{Sc} を抗原として特異的に認識する抗体の作製を行う。

最近、PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のセリン(S43)をリン酸化すると、PrP^{Sc}への立体構造変化が促進されることが報告された(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743-8751)。PrP^{Sc}が形成される初期にリン酸化S43 (pS43)への変換が予測され、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体は、プリオン病の早期診断への利用が期待される。

これらの知見をもとに、ヒトPrPのN端側43残

基Serがリン酸化されたプリオンペプチドを架橋剤SPDPを用いて水溶性キャリア蛋白質Blue Carrier Immunogenic Protein (BCIP)に結合させた免疫原pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIPを調製し、免疫したマウス(BALB/c)から調製した脾細胞を用いて細胞融合を行い、リン酸化プリオンペプチドを特異的に認識する3種類のモノクローナル抗体(mAb)を得た。

本年度はこれらの抗体の特異性をイムノブロット法で調べ、正常マウス脳及びPrP^{Sc}感染マウス脳に対する反応性を比較した。

B. 研究方法

1. 抗リン酸化セリンプリオン蛋白質抗体の調製
プリオン蛋白質の43残基リン酸化セリン(pS43)を認識する抗体産生ハイブリドーマ3株をBALB/cマウスに移植して得られた腹水を硫酸分画後、プロテインAカラムで精製し、IgG画分を得た。

2. スクレイピー感染脳乳液の調製

スクレイピー(obihiro株)感染マウス凍結脳は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構プリオン病研究センター 横山隆 チーム長から御供与いただいた。マウスへのPrP^{Sc}感染実験は、広島大学広島大学大学院 生物圏科学研究科 免疫生物学研究室 松田治男教授に御教授いただいた。

ICRマウスの脳にスクレイピー(obihiro株)10%脳乳液を投与し、4か月後に安楽死させた。得られたスクレイピー感染脳を左右に二分割し、それぞれを0.32 Mシヨ糖溶液を用いて10%脳乳液を調製し、以降の実験に用いた。

3. Proteinase K処理

脳乳液(蛋白質50 µg相当)に4倍量のメタノールを加えて-20°C下に保存し、遠心分離で得ら

れた画分を溶解後、Proteinase K (PK)で消化(50 µg/ml, 37°C, 30分間)した。

4. イムノブロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体にウサギ抗PrPポリクローナル抗体PrP (FL-253) (Santa Cruz Biotechnology)又はマウス抗p43S-hPrP (39-50)-BCIP抗体を、第2抗体にIRDye 680RD 標識抗ウサギIgG又はIRDye 800CW標識抗マウスIgG抗体を用いたイムノブロットングを行い、近赤外蛍光法で検出した。また、発現解析のコントロールとして、第1抗体にマウス抗β-アクチン抗体AC-15 (Sigma)を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いたイムノブロットングを行い、化学発光法で検出した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、「国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定」、「同病原体等安全管理規程」、「同動物実験に関する指針」及び「同遺伝子組換え実験安全管理規則」を遵守した。

C. 研究結果

1. 抗pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPモノクローナル抗体の比較

先に樹立したハイブリドーマ3株から腹水を調製後、プロテインAカラムでIgG画分を精製し、pS43を特異的に認識する抗体pSP240、pSP279及びpSP289を得た。抗体のアイソタイプは、3株ともIgG (κ, γ2b)だった。リン酸化プリオンペプチド[pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA]又はプリオンペプチド[hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA]を固相抗原としたELISAで、抗体の特異性を調べた結果、pSP279の抗体価の比率(リン酸化プリオンペプチドの抗体価/プリオンペプチドの抗体価)が最も高かったことから、以降の実験にはpSP279を用いた。

昨年度までの研究で、抗リン酸化プリオン抗体は、PrP^{Sc}感染脳及びマウス対象脳で二量体のPrPを認識するが、単量体には反応性を示さなかった。pSP279抗体は、ELISAでは固相抗原のリン酸化プリオンペプチドとプリオンペプチドを見分けたことから、43残基のリン酸化セリン周辺の配列を特異的に認識はしていると推定した。一般に、リン酸化チロシンやリン酸化セリン残基を認識する抗体に対するイムノブロット法では、用いる緩衝液系やブロッキング蛋白質の違いが、抗体の反応性に著しく影響する。これらの知見を踏まえて、緩衝液系をPBSからTBSに変更し、抗体の反応系をすべて哺乳動物由来蛋白質を含まない抗リン酸化蛋白質用ブロッキング試薬を用いた。ウサギ抗ヒトPrPポリクローナル抗体を用いたイムノブロット法では(Fig. 1A and C)は、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感

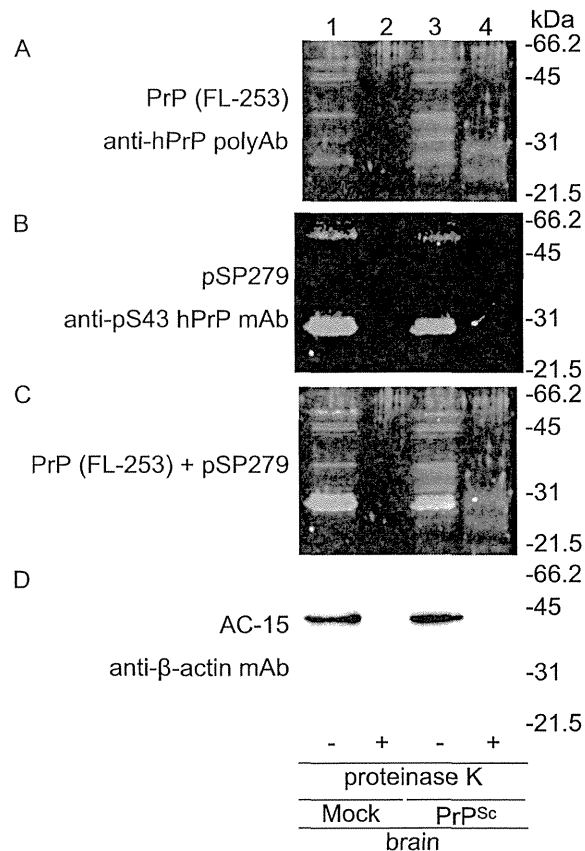


Fig. 1 Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}.

The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. Formation of a protease-resistant form of PrP in mouse brain. Methanol-precipitated brain lysates (50 µg protein) were treated with proteinase K (50 µg/ml) for 30 min at 37°C (lanes 2 and 4) or left undigested (lanes 1 and 3). All lysates were subjected to immunoblot with the anti-hPrP (FL-253; A and C), anti-pS43 hPrP mAb (pSP279; B and C) or anti-β-actin (AC-15; D).

染脳(lane 3)ともに、二量体及び単量体のPrP^{Sc}に相当するバンドを示した。脳乳液をPK処理すると、対象脳ではバンドが消失するが(lane 2)、PrP^{Sc}感染脳ではPrPのN端側が消化されたPK処理耐性のPrP^{Sc}が低分子側にバンドを示した(lane 3)。一方、抗pS43-hPrP (39-50)を認識するマウスモノクローナル抗体pSP279のイムノブロット法(Fig. 1B and C)では、対象脳の糖鎖の無い単量体と、2量体PrPに相当するバンドを認識した(lane 1)。PrPのN端側が消化されるPK処理では、対象脳及びPrP^{Sc}感染脳ともにPrPのバンドは消失した(lanes 2 and 4)。Panel AとPanel Bを重ねると、pSP279が認識したバンドはPrP (FL253)が認識した糖鎖が無いPrPのバンドと重なり、同じ分子量を示した(Panel C)。ウサギ抗PrPポリクローナル抗体はPrP (FL-253)は、ウサギ脳乳液のPK処理でバンドを検出したが、PK未処理のバンドを含めて、反応性は弱かった。ヒト膠芽

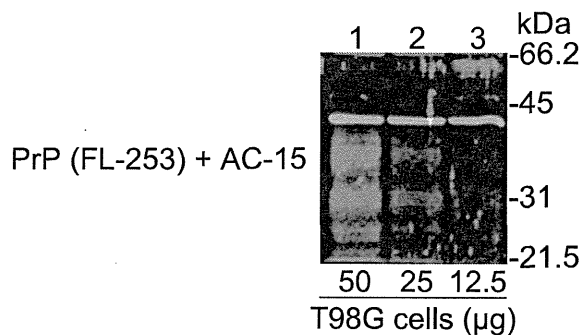


Fig. 2 Immunoblot analysis of human PrP^C.
Human glioblastoma cell line T98G whole-cell lysates were subjected to Immunoblot with PrP (FL-252) (orange) and AC-15 (green) antibodies.

腫細胞株T98Gの総細胞抽出液を用いたイムノブロット法で、PrP (FL-253) 抗体はFig. 1のマウスと同じ50 µg/laneで糖鎖2本、1本、0本のバンドを示しており (Fig. 2)、ヒトPrP全長の蛋白質を免疫原としていることから、マウスPrPに対しては若干反応性が弱かったと推定している。

対象脳とPrP^{Sc}感染脳を比較すると、その蛍光強度は対象脳がPrP^{Sc}感染脳より強く、β-actinの化学発光強度 (Fig. 1D) でPrPの蛍光強度 (Fig. 1B) を正規化すると、PrPの蛍光強度は1.5倍程度の値を示した (Table 1.)。

D. 考察

本研究では遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、ウシ血清などの動物由来製造原料を汚染する恐れのあるPrP^{Sc}の新規検出法の確立を目的とし、PrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の開発を行った。

PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のSerをリン酸化すると、PrP^{Sc}への立体構造変化が促進されることが報告されている (Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743–8751)。ヒトPrPのN端側43残基に位置するSer近傍のアミノ酸配列はほ乳類間で高度に保存されており、pS43を特異的に認識する抗体は、ウシ、ヒツジ、マウス等のPrP^{Sc}を認識することが予想される。現在、リン酸化チロシンを特異的に認識する多くの抗体が知られているが、いまだリン酸化セリンを認識する有効な抗体は得られていない。本研究ではPrP^{Sc}を特異的に認識

Table 1. pS43-PrP in mouse brain homogenates

brain	intensity		normalized
	PrP	β-actin	PrP/β-actin
Mock	0.311	0.648	0.480

PrP^{Sc} 0.207 0.643 0.322
する抗体の候補として、リン酸化プリオンペプチドを免疫して得られた抗体の解析を行った。
マウスをpS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDD-BCIPで免疫し、3種類のmAb (pS240, pS279, pSP289) 産生ハイブリドーマを樹立した。ELISAでpS43に対する特異性が最も高いpSP279を用いたイムノブロット法で、PrP^{Sc}感染マウス脳乳液を解析した。pSP279抗体はpS43近傍のアミノ酸配列を認識し、市販の抗プリオン蛋白質ポリクローナル抗体PrP (FL-253)と同様に、PrP^{Sc}及びPrP^Cに特異的なバンドを示した。前年度までの実験系では、pSP279抗体は二量体のPrPに相当するバンドを示したが、単量体のPrPは認識しなかった。

今年度は、従来の第2抗体に結合させたHRPによる化学発光法の検出系に加えて、第2抗体に結合させた近赤外蛍光色素による近赤外蛍光法の検出系を導入し、感度の向上を図った。また、一般にブロッキング液に含まれるスキムミルクやカゼイン等のミルク系蛋白質は、リン酸化蛋白質を多く含み、リン酸化チロシン、セリン又はスレオニンに対する抗リン酸化抗体の反応を妨げることが多い。pSP279抗体はリン酸化セリンだけではなく、その近傍のアミノ酸配列を認識することから、昨年度までの研究ではPBS系緩衝液とカゼイン含有のブロッキング液を用いていた。今年度は、TBS緩衝液系と哺乳動物由来蛋白質を含まないブロッキング液に変更した。これらを改善した結果、単量体PrPの検出が可能になった。

pSP279が検出したリン酸化プリオン蛋白質は、すべて糖鎖の無い単量体だった。先のGiannopoulos, P.N.らの報告では、*in vitro*でリン酸化したリン酸化PrPには糖鎖が無く、*in vivo*での検出では糖鎖には言及していない。市販の抗リン酸化プリオンポリクローナル抗体は、培養細胞を脱リン酸化阻害剤Calyculin Aで処理すると糖鎖を有したPrPが、未処理では糖鎖が無いPrPを主に認識することを報告している。今回樹立したpSP279は、PrP^{Sc}感染脳及び対象脳で糖鎖の無いPrPを認識しているが、ウサギポリクローナル抗体との比較をするためにも、培養細胞に対するCalyculin A処理や、リン酸化酵素Cdk5処理等を行って特異性を確認する必要がある。

pS43に対して最も高い特異性を示したpSP279抗体は、イムノブロット法で対象脳のPrPを認識したが、PrP^{Sc}に対する反応性は弱く、pS43-PrPは対象脳に多く含まれている結果が得られた (Fig. 1B, Table 1)。先の論文ではウサギポリクローナル抗体を用いた研究で、PrP^{Sc}感染脳では正常脳に比較してpS43が多いと報告されてい

る(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743-8751)。しかし、本研究では免疫ブロット法でpSP279抗体が認識するpS43を含むPrPは対象脳に多く、逆の結果となった。しかし、PrP^{Sc}感染脳の例数が少ないことから、さらに多くの例数を検証し、pS43の経時的変化を調べる必要がある。

E. 結論

本研究ではPrP^{Sc}の新規検出法確立を目的とし、それらに資する基礎研究としてヒトpS43-PrPを認識する抗体の特異性を解析した。免疫ブロット法でpSP279抗体はPrP^{Sc}感染脳を認識するが、pSP279抗体は対象脳により高い特異性を示した。これらの結果は、新たなPrP^{Sc}バイオアッセイ系の構築、プリオン病のバイオマーカー測定法開発への寄与が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 菊池裕, 遊佐精一, 窪崎敦隆, 寺嶋淳, 豊田淑江, 山口照英: 低酸素条件下で発現する GPIアンカー欠損型プリオン蛋白質に関する転写因子BHLHE40の研究、第87回日本生化学会大会、平成26年10月15-18日、京都市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部 中島治
衛生微生物部 遊佐精一

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）
平成26年度分担研究報告書
ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究
無菌試験法の研究－細胞・組織加工製品における無菌試験法の在り方について－

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

再生医療等製品は、製造可能な最終調製品の量に限りがあり、出荷時に適用される無菌試験法に用いることができる検体量が少ない。また、製造から使用までの期間が短いことから、結果判定まで長期間を要する無菌試験法の適用に支障を来している。本研究は、再生医療等製品の安全性の確保のために出荷判定試験として適用される、現実的に実施可能な無菌試験法について検討した。

細胞・組織加工製品など再生医療等製品は製造から出荷までの期間が短いこと、最終調製品の容量が少ないこと、製品を均一にして試験に供するのが難しいことから、従来の無菌試験法を適用するには困難がある。再生医療製品の製造はアイソレーター等の高度無菌操作技術で工程を管理していることから、無菌試験法として試料の培養を前提とした微生物迅速法の適用が望まれるが、製造環境の十分な無菌性保証バリデーションの実施と、用いる新手法が無菌試験法に適用可能な科学的根拠の提示した上で、手法及び機器のバリデーションが必要となる。

同じく、PCR法によるマイコプラズマ否定試験が再生医療製品等の最終出荷判定試験への適用が予想されることから、バリデーションに用いるマイコプラズマ参照品を調製した。

A. 研究目的

平成26年11月25日に改正薬事法が施行され、薬事法は題名を「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」に改称し、再生医療の実用化に対応できるように改正された。併せて、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」も施行された。この法律の枠組みの対象には、幹細胞を使用する、幹細胞以外の細胞を加工して使用するおよび組織を加工して使用する医療が含まれている。これらの医療に用いられる再生医療等製品は、製造可能な最終調製品の量に限りがあり、出荷時に適用される無菌試験法¹⁾に用いることができる検体量が少ない。また、製造から使用までの期間が短いことから、結果判定まで長期間を要する無菌試験法の適用に支障を来している。本研究は、再生医療等製品の安全性の確保のために、出荷判定試験として適用される、現実的に実施可能な無菌試験法について検討した。

一方、再生医療等製品の最終出荷判定試験にはマイコプラズマ否定試験の実施も求められ、第十六改正日本薬局方参考情報「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²⁾」が広く利用されている。本研究ではマイコプラズマ否定試験に用いるマイコプラズマ参照品の調製について検討した。

B. 研究方法

マイコプラズマ参照品の調製とコロニー形成単位 (Colony forming unit, CFU) の算出は、既報³⁾を若干変更して行った。

1. 菌株

マイコプラズマ参照品として、*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 を独立行政法人製品評価技術基盤機構 NBRC (NITE Biological Resource Center) から、*M. arginini* ATCC 23838 を American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。

2. 培地

25%新鮮酵母エキス⁴⁾は、乾燥酵母 (ニッテンドライイースト、日本甜菜株式会社) 250g を超純水 750mL に加えた三角フラスコを 20 分間湯せんして熱水抽出し、水で急冷後に遠心分離 (4°C、8,000×g、20 分間) を 2 回繰り返して、得られた上清に 1mol/L HCl 又は 1mol/L NaOH を加えて pH7.6 に調整し、前処理後に 0.2 µm フィルターで滅菌したものを用いた。

マイコプラズマの培養には、Hayflick の変法培地を用いた。Difco PPLO broth (日本 BD、商品番号 255420) 21g、グルコース (和光純薬工業) 又はアルギニン塩酸塩 (ナカライテスク) 3g、フェノールレッド 20mg を超純水 800mL に溶解し、1mol/L HCl 又は 1mol/L NaOH を加えてグルコース添加 Hayflick の変法培地は pH7.6-7.8 に、アルギニン添加 Hayflick の変法培地は pH7.0-7.2 にそれぞれ pH を調整し、高圧蒸気滅菌 (121°C、20 分間) した。室温まで冷却後、非働化ウマ血清 (Biowest) 100mL、25%新鮮酵母エキス 100mL、ペニシリン G カリウム (Meiji Seika ファルマ) 50 万単位を加えて 1L

とした。

CFU の測定には、Hayflick の寒天平板培地を用いた。Difco PPLO Agar (日本 BD、商品番号 241210) 35g を超純水 800mL に溶解し、高压蒸気滅菌 (121°C、20 分間) した。60°C に冷却後、非働化ウマ血清 100mL、25%新鮮酵母エキス 100mL、ペニシリン G カリウム 50 万単位を加えて 1L とし、9cm シャーレに 25mL ずつ分注した。

3. 培養

A. laidlawii NBRC 14400、*M. hyorhinis* NBRC 14858 及び *M. pneumoniae* NBRC 14401 の培養にはグルコース添加 Hayflick の変法培地を、*M. arginini* ATCC 23838、*M. fermentans* NBRC 14854、*M. orale* NBRC 14477 及び *M. salivarium* NBRC 14478 の培養にはアルギニン添加 Hayflick の変法培地を用いた。前培養した F1 から F4 の各菌種 1mL を液体培地 200mL を含む 150cm² 組織培養用フラスコに菌を接種後、密栓してインキュベーターで培養 (36°C) した。陰性対象培地に対する色調変化を 1日に 2回観察し、菌の増殖で pH が下がってグルコース添加 Hayflick の変法培地が黄色に、pH が上がってアルギニン添加 Hayflick の変法培地がピンク色にそれぞれ変化した直後に培養を終了した。*M. pneumoniae* NBRC 14401 はセルスクレーパーで回収して 20G 注射針シリンジに通して剪断した菌体を含む培養液を、それ以外は直接フラスコから回収した菌体を含む培養液をクライオチューブ (Corning、430658) に 1mL ずつ分注し、超低温槽に凍結保存 (-80°C) してマイコプラズマ参照品 (アコレプラズマを含む) とした。

4. CFU 測定

超低温槽で -80°C 下に保存しているマイコプラズマ参照品を含むクライオチューブをヒートブロック (38°C) で解凍し、*M. pneumoniae* NBRC 14401 は 27G 注射針シリンジに 10 回通して剪断した菌液を、それ以外は直接クライオチューブから回収した菌液を用い、滅菌生理食塩水で原液から 10⁻⁷ まで 10 倍希釈系列を調製した。各希釈系列菌液 5 µL を 2 スポット Hayflick の寒天平板培地に滴下し、シャーレにフタをした状態で乾燥させた後、上下転倒させたシャーレを CO₂ インキュベーターで培養 (5% CO₂、36°C) した。培養 4 日目と 7 日目に 100 倍の実体顕微鏡下で寒天平板上のコロニー数を計測し、CFU を算出した。

5. ゲノムコピー数の測定

凍結融解後のマイコプラズマを遠心分離 (14,000×g、4°C、30 分間) し、回収したペレット状の菌体を洗浄せずに PBS に懸濁した。得られた菌体全量から PureLink Genomic DNA mini kit (Life Technologies) を用いてゲノム

DNA を抽出した。DNA 含量を 260nm の吸光度測定により求め、以下の計算式を用いてゲノムコピー数を算出した⁵⁾。

$$\text{Copies/mL} = [\text{DNA contents } (\mu\text{g/mL})] \times 10^6 \times (0.978 \times 10^9) / [\text{genome size}]$$

6. マイコプラズマ PCR 検出のための試料調製

市販の CHO-DG44 細胞を CD DG44 培地 (GIBCO) を用いて 5 × 10⁶ cells/mL の細胞懸濁液として調製し、マイクロチューブに 900 µL 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 量スパイクした。マイコプラズマの最終濃度が 100、10、1CFU/mL となるようにスパイクした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 450 µL をそれぞれ 2 本ずつマイクロチューブに分注し、MycTOOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kit (Roche Diagnostics) を用いて、添付文書にしたがってマイコプラズマ DNA を抽出し、DNA 溶液各 200 µL を得た。

7. PCR 法

PCR は MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit (Roche Diagnostics) を用い、添付文書のプロトコールにしたがって実施した。PCR 一反応につき DNA 抽出液 20 µL を使用した。プライマーは添付のユニバーサルマイコプラズマプライマーを使用した。反応条件はタッチダウン PCR とし、94°C で 10 分間の変性後、94°C で 30 秒の変性、70°C で 30 秒のアニーリング、72°C で 45 秒の伸長のサイクルを 2 回、以後アニーリング温度のみ 69°C から 61°C まで 2 サイクルごとに 1°C ずつ下げて変性、アニーリング、伸長反応を行った後、アニーリング温度 60°C で 25 サイクル、最後に 72°C で 4 分間の伸長反応を行った。反応後の検出は MultiNA (島津製作所) 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)

本研究の遂行にあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定」及び「同病原体等安全管理規程」を遵守した。

C. 研究結果・考察

1. 無菌試験法

前年度の研究で、細胞・組織加工製品など再生医療等製品は製造から 2 日以内に出荷すること、ロットを構成せずに最終調製品の容量が少ないこと、多くの製品は製品を均一にして試験に供するのが難しいことから、従来の無菌試験法の適用が困難な現状と、アイソレーター等の高度無菌操作技術で細胞培養から製剤化までの

工程を管理していることから、無菌試験法として試料の培養を前提とした微生物迅速法を適用が望まれることを報告した。適用が予想される微生物迅速法としては、第十六改正日本薬局方参考情報に記載されている蛍光染色による細菌数の迅速測定法⁶⁾を再生医療等製品の中間工程と、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が、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の遺伝子解析による微生物の迅速同定法⁷⁾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²⁾に記載されている PCR 法を利用した迅速測定法の実施が考えられる。

平成 26 年 9 月 1 日に公表された第十七改正日本薬局方収載原案で、参考情報の微生物迅速法について、パブリックコメントが 9 月 30 日まで募集された⁸⁾。新手法の例には、直接検出法として種々の光学検出装置を用いて菌体の発する蛍光を検出する固相サイトメトリーとフローサイトメトリー、間接検出法として核酸を検出する核酸増幅法 (Nucleic acid amplification test, NAT)、ATP 等を検出する生物発光法・蛍光法、増殖能をマイクロコロニーとして検出するマイクロコロニー法、増殖能をガス産生として検出するガス測定法などが紹介されている。機器の適正評価に当たっては、検出対象とする標準試料を用いて実施し、直接検出法においては標準菌株を、間接的検出法においては検出対象となる成分等を用いること、試験方法のバリデーションに当たっては、検出対象が細菌数・細菌量測定の指標となる科学的根拠を明らかにし、従来法と比較して優れた点と共に、利用に当たって考慮すべき点についても明らかとすることが望ましいとしている。新手法の応用分野の例としては、製薬用水の品質管理、製造区域

の微生物評価、無菌試験、微生物限度試験、保存効力試験、原材料受入試験などをあげている。

微生物の迅速測定法を無菌試験法へ適用するには、再生医療製品を製造する環境の十分な無菌性保証バリデーションを実施した上で、用いる新手法が無菌試験法に適用可能な科学的根拠の提示と、手法と機器のバリデーションが必要となる。

2. マイコプラズマ参照品の調製

平成 26 年 6 月 1 日に公表された第十七改正日本薬局方収載原案で、参考情報の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について、パブリックコメントが 6 月 30 日まで募集された⁹⁾。マイコプラズマ参照品を用いたバリデーションに適合すれば、培養法や DNA 染色法の代替法として PCR 法を使用可能としている。PCR 法によるマイコプラズマ否定試験は、再生医療製品等の最終出荷判定試験への適用が予想されることから、バリデーションに用いるマイコプラズマ参照品を調製した。

バリデーション用マイコプラズマ参照品の CFU とゲノムコピー (GC) 数の測定結果を Table 1 に示した。GC/CFU 比を求めたところ、*A. laidlawii* NBRC 14400 は比較的高い値 85.09 を、その他のマイコプラズマ参照品は 3 から 53 を示した。これらの値は、ATCC のマイコプラズマ参照品パネル¹⁰⁾と同程度に低い GC/CFU 比で、調製した参照品は比較的高い生存率・分散性を示すことが確認された。

メーカーによるバリデーション結果が公表¹⁰⁾されている MycoTOOL PCR を用いて、バリデーション用マイコプラズマの検出を行った。マイコプラズマ参照品として *M. fermentans* NBRC 14854 を測定した結果を Fig. 1 に示した。陽性対象のプラスミド (PC-10 copy) はバンドを検出したが、CHO-DG44 由来の非特異的バン

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	Post preservation titer (CFU/mL)		Genome copies (GC) (copies/mL)		Genome size bp	GC/CFU ratio
	mean*	range	mean*	range		
	<i>A. laidlawii</i> NBRC14400	3.72E+07	2.44E+07	3.17E+09		
<i>M. arginini</i> ATCC23838	1.82E+08	2.85E+07	5.56E+08	1.75E+08	615,621	3.06
<i>M. fermentans</i> NBRC14854	1.25E+07	1.90E+06	6.62E+08	7.79E+07	1,004,014	52.99
<i>M. hyorhinis</i> NBRC14858	9.30E+07	1.00E+07	8.13E+08	2.40E+08	835,925	8.74
<i>M. orale</i> NBRC14477	3.79E+07	6.55E+06	1.59E+09	8.09E+08	713,526	41.95
<i>M. pneumoniae</i> NBRC14401	1.04E+08	4.95E+07	1.10E+09	4.62E+08	814,886	10.56
<i>M. salivarium</i> NBRC14478	2.73E+08	5.20E+07	1.17E+09	2.75E+08	710,549	4.29

n=2

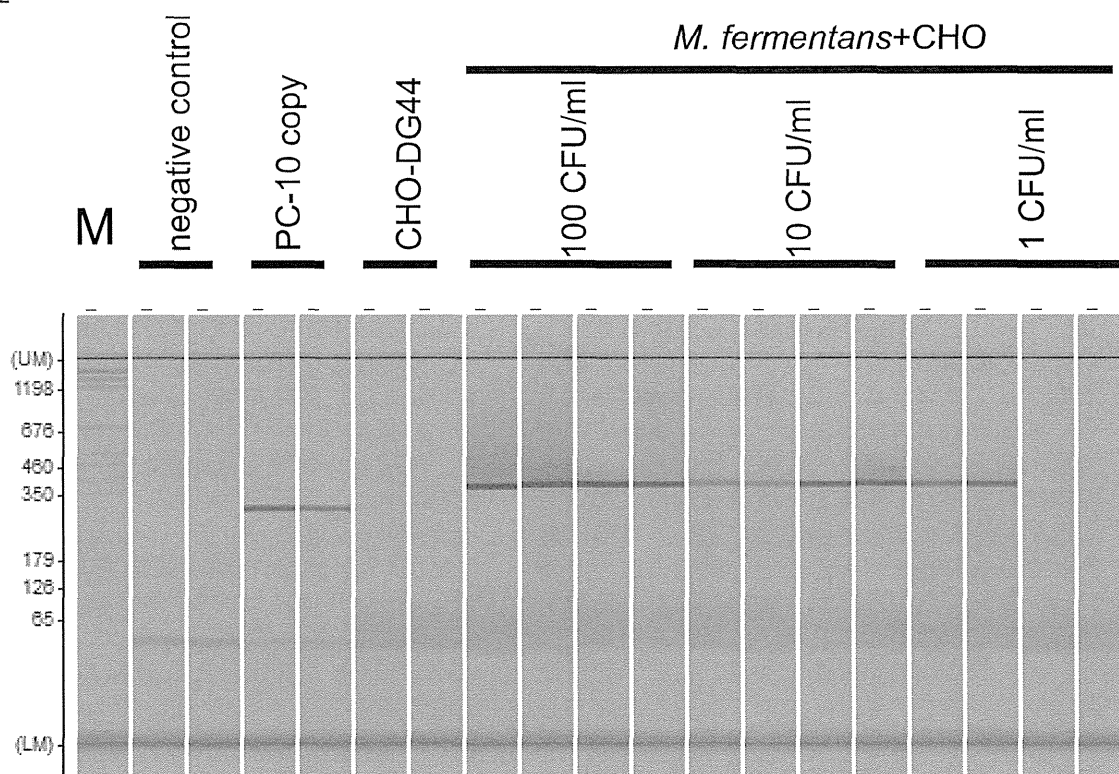


Fig. 1. MycoTOOL PCR での検出例

M. fermentans NBRC 14854 参照品をスパイクした CHO-DG44 細胞から DNA を調製し、ユニバーサルマイコプライマーを用いてタッチダウン PCR を行い、MultiNA を用いて検出した。

Table 2. MycoTOOL PCR による検出

Strain	positive lanes/total lanes		
	100 CFU/ml	10 CFU/ml	1 CFU/ml
<i>A. laidlawii</i> NBRC14400	4/4*	0/4	0/4
<i>M. arginini</i> ATCC23838	4/4	4/4	3/4
<i>M. fermentans</i> NBRC14854	4/4	4/4	2/4
<i>M. hyorhinis</i> NBRC14858	4/4	4/4	1/4
<i>M. orale</i> NBRC14477	4/4	4/4	3/4
<i>M. pneumoniae</i> NBRC14401	4/4	4/4	0/4
<i>M. salivarium</i> NBRC14478	4/4	4/4	3/4

* 検出数/試験数 (泳動レーン数)

ドは検出されず、試料の抽出・検出操作には問題がなかった。*M. fermentans* NBRC 14854 参照品をスパイクした 100CFU/mL と 10CFU/mL では 4 レーンすべてに、1CFU/mL でも 2 レーンでバンドを確認した。マイコプラズマ参照品 7 菌種を MycoTOOL で測定した結果を Table 2 に示した。試験に供した菌種の 100%検出感度は、*A. laidlawii* NBRC 14400 は 100CFU/mL、そのほかは 10CFU/mL だった。先に調製したマイコプラズマ参照品¹¹⁾では、すべての菌種で 10CFU/mL で検出できたが、本研究で調製した参照品では *A. laidlawii* NBRC 14400 のみが検出できなかった。本研究で *A. laidlawii* NBRC 14400 参照品のは GC/CFU 比は 85.09 で、ATCC のマイコプラズマ参照品パネル *A. laidlawii* ATCC 23206 (PG8) の 72.98 に比較して、若干高い値を示した。先に調製した *A. laidlawii* NBRC 14400 参照品の GC/CFU 比は 18.92 で、10CFU/mL をスパイクした試料の MycoTOOL による検出感度は 17/18 であった。第十七改正日本薬局方収載原案では、C 法 (NAT) を A 法 (培養法) の代替法とする場合にはマイコプラズマ 7 種全てについて 10CFU/mL を検出可能なことを、B 法 (指標細胞を用いた DNA 染色法) の代替法とする場合には 100CFU/mL を検出可能なことを、どちらの場合も、CFU で適切に値付けされたマイコプラズマ参照品を用いて示す必要があるとしている⁹⁾。本研究で調製した *A. laidlawii* NBRC 14400 参照品は、C 法の代替法としての利用には適応するが、B 法の代替法へは適用はできないことになり、培養条件を検討するなどして、新たな参照品の調製が必要と判断した。その他の 6 菌種については、全て 10CFU/mL を検出可能だったことから、参照品として適用可能と判断した。

D. 結論

平成 26 年 11 月 25 日に再生医療等の安全性の確保等に関する法律が施行され、幹細胞や幹細胞以外の細胞や組織を加工して使用する再生医療は実用化の時代に入った。従来の無菌試験法を再生医療等製品の最終出荷判定試験に適用するのは難しいが、高度無菌操作技術で工程を管理していることから、試料の培養を前提とした微生物迅速法の適用が望まれる。再生医療等製品製造環境の十分な無菌性保証バリデーションの実施と、微生物迅速法が無菌試験法に適用可能な科学的根拠の提示した上で、用いる手法及び機器のバリデーションが必要となり、それらの方法について考察した。同様に、最終出荷判定試験として求められるマイコプラズマ否定試験のバリデーションに必要な参照品を調製し、それらの適用について検証した。

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>
2. 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>
3. 佐々木裕子, 2012, こうすればできる 日本薬局方 微生物試験8 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に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験. 日本防菌防黴学会誌 **40**: 247-258.
4. 肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) 検査マニュアル (2011).

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/MycoplasmaIpn.pdf>

5. DOLEŽEL, J. *et al.*, 2003, Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* **51**: 127-128.
6. 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>
7. 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>
8. 日本薬局方収載予定の案, 参考情報新収載, 微生物迅速法: 日本薬局方収載原案に関する御意見の募集について (平成26年9月分) .
http://www.pmda.go.jp/public/pubcome_201409_1/file/097-1409.pdf
9. 日本薬局方収載予定の案, 参考情報既収載, 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: 日本薬局方収載原案に関する御意見の募集について (平成26年6月分) .
http://www.pmda.go.jp/public/pubcome_201406_2/file/029-1406.pdf
10. Dabrazhynetskaya *et al.*, 2013, Collaborative study report: Evaluation of the ATCC experimental mycoplasma reference strains panel for comparison of NAT-based and conventional mycoplasma detection methods. *Biologicals* **41**: 377-383.
11. 内田恵理子 他, 2014, 平成24年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告: 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 **45**: 442-451.

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, 2014, 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 **45**: 442-451.

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: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験のPCR法改正のための共同研究、日本マイコプラズマ学会第41回学術集会、平成26年5月22-23日、東京都文京区

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究協力者

慶應義塾大学先端生命科学研究所
理化学研究所統合生命医科学研究センター

福田真嗣

国立医薬品食品衛生研究所

生物薬品部 古田美玲

衛生微生物部 遊佐精一

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 遺伝子医薬部第一室長

研究要旨

再生医療等に適用する細胞・組織加工製品（再生医療等製品）では、最終製品の出荷試験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。今年度は、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の評価法を整理すると共に、検体量が少ない場合や培養上清を検体とする場合の考慮点をまとめた。

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

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「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

一方、再生医療等製品でも、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。

日局参考情報の試験法は、大量の製品を製造するバイオ医薬品に適用することが想定されており、また基本的にセルバンク等の試験法として想定されているものであるため、ロットを構成しない自己由来製品や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多い。

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、様々な細胞が用いられること、検体量の問題や迅速性が要求されることなど、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を行った。昨年は迅速性の問題及び細胞の種類が異なる場合について検討したが、今年度は検体量が少ない場合及び細胞培養上清を検体とする場合について、マイコプラズマの増幅によく用いられる Vero 細胞を用いて検討した。

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) されたバリデーション用マイコプラズマ参照品を用いた。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

Vero 細胞 (JCRB 細胞バンク JCRB0111) は Eagle's minimal essential medium (Sigma-Aldrich) に 5% ウシ胎児血清を用いて培養した。

3) NAT によるマイコプラズマの検出

マイコプラズマの検出には主に MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit (Roche Diagnostics) 又は MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit (Roche Diagnostics) を用いて行った。通常、1 検体 1mL を 0.45mL ずつマイクロチューブに 2 本ずつ分注後、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。培養上清や細胞数が少ない検体を測定する場合は carrier DNA 溶液 (Roche Diagnostics 社、 1×10^7 個の CHO 細胞ゲノムを含有、DNA 濃度は非公開) を終濃度 $80 \mu\text{L/mL}$ 検体となるようにマイクロチューブに添加後、DNA 抽出を行った。得られた DNA について、各チューブ 2 反応の PCR 又は real-time PCR を行った。MycoTOOL PCR の場合、増幅はキットのマニュアルに従いタッチダウン PCR とし、反応後の検出はマイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いて行った。450bp のバンドを測定した場合は陽性と判定した。PCR 反応をモニターするキットに添付された positive control (PC) は増幅断片のサイズは 300bp である。PC-Mh は *M. hyorhinis* のゲノム DNA、PC-Mo は *M. orale* のゲノム DNA、いずれも ATCC から購入した標準品であり、1 pg/reaction を使用した。MycoTOOL real-time PCR で測定する場合は、キットに添付された PC のほか、 1×10^7 CFU/mL の *M. hyorhinis* 菌液から抽出したゲノムの希釈列をスタンダードに用い、CFU に換算してマイコプラズマを定量した。

4) 検体量の検討

検体量の検討は MycoTOOL PCR の他に MycoSEQ (Life Technologies) を用いて行った。MycoTOOL PCR で検出する場合、 $5 \times$

10⁶ cells/mL の Vero 細胞懸濁液 0.9ml に carrier DNA 溶液 (Roche Diagnostics 社, 1 × 10⁷ 個の CHO 細胞ゲノムを含有、DNA 濃度は非公開) を終濃度 80 μL/mL 検体となるようにマイクロチューブに添加後、マイコプラズマ参照品 7 種を最終濃度が 10 CFU/mL となるように 1/10 量スパイクした。この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 0.1mL 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) のマニュアルに従ってゲノム DNA の抽出、PCR 検出を行った。

Mycoseq で検出する場合、Vero 細胞 5 × 10⁶ cells/mL に最終濃度が 10 CFU/mL となるようにマイコプラズマ参照品を添加した細胞懸濁液 0.1mL を Mycoseq Mycoplasma Detection Kit (Life Technologies) のマニュアルに従い抽出、検出を行った。

5) マイコプラズマ感染細胞の作製と培養上清のマイコプラズマ測定

マイコプラズマ参照品 *M. hyorhinitis* を無血清 MEM 培地を用いて希釈し、最終濃度が 10 CFU/mL となるように 1 × 10⁴ cells/mL に調製した Vero 細胞懸濁液に接種した。その後、抗生物質を添加しない培地で繰り返し継代を行い、*M. hyorhinitis* 感染 Vero 細胞株を樹立した。100 mm dish で培養した継代 3 日目のコンフルエントに増殖した *M. hyorhinitis* 感染 Vero 細胞から培養上清を回収し (上清画分)、10 mL の PBS を dish に添加してスクレイパーにより細胞を回収した (細胞ペレット画分)。各画分のサンプル量を 11ml に揃えて、それぞれ 1 mL を検体とし、carrier DNA 溶液を添加後、MycotoOL PCR キットのマニュアルに準じてマイコプラズマ DNA の抽出を行い、MycotoOL

real-time PCR で定量した。

6) マイコプラズマの遠心濃縮

10 CFU/mL あるいは 1 CFU/mL の *M. hyorhinitis* をスパイクし、キャリア DNA 溶液を添加した Vero 細胞培養上清 (50mL、10 mL) について(1)遠心: 16,000 × g で 30 分間の遠心、または(2)細胞添加後遠心: 終濃度 5 × 10⁴ cells/mL となるように Vero 細胞を添加後に 16,000 × g で 30 分間の遠心を行った。遠心後、上清を除去し、得られた菌体ペレットを 0.45mL の PBS に懸濁し、キャリア DNA 溶液を添加後に MycotoOL のマニュアルに従い DNA を抽出し、PCR で検出した。対照として、細胞懸濁液に *M. hyorhinitis* をスパイクしたサンプル未処理 (細胞懸濁液)、及び未処理の細胞培養上清に *M. hyorhinitis* をスパイクしたサンプル 0.45mL にキャリア DNA を添加してから菌体のゲノムを抽出し、PCR 測定を行い検出の有無を判定した。

7) Vero 細胞でのマイコプラズマ増殖曲線

マイコプラズマ参照品 *M. hyorhinitis* を無血清 MEM 培地を用いて希釈し、最終濃度が 10 CFU/mL となるように 1 × 10⁴ cells/mL に調製した Vero 細胞懸濁液に接種した。その後 6 well dish に 3mL ずつ播き、培養を行った。培養開始日 0 から 6 日まで、毎日、2 well の細胞をスクレイパーで細胞を培地ごと回収し全細胞画分とした。また、別の 2 well について培養上清を回収し (培養上清画分)、well に残った細胞は 1mL の PBS を添加してスクレイパーで回収した (細胞ペレット画分)。全てのサンプルは 16,000 × g で 30 分遠心し、上清を除去後のマイコプラズマ及び細胞を含むペレットを再び PBS 0.45mL に懸濁し、carrier DNA 溶液を添加後にマイコプラズマ DNA の抽出を行った。対照として、

Vero を含まない MEM 培地に 10 CFU/mL となるようにマイコプラズマを添加したのも同様に培養し、培地面分とした。各画分について MycoTOOL real-time PCR によりマイコプラズマ量を定量した。同時に、同じ条件で培養した非感染 Vero 細胞を培養開始日 0 から 6 日まで連日ハーベストし、細胞数をカウントした。

(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

1) MycoTOOL PCR を用いたマイコプラズマ検出の Vero 細胞での再現性

MycoTOOL はバイオ医薬品の製造に繁用されている CHO 細胞を用いてバリデーションされたマイコプラズマ汚染検出キットである。そこで予備検討として、Vero 細胞でも CHO 細胞と同様の条件でマイコプラズマの検出が可能か検討した。MycoTOOL の推奨する細胞濃度である 5×10^6 cells/mL の Vero 細胞懸濁液、及びその 1/5 (1×10^6 cells/mL)、1/10 (5×10^5 cells/mL) の細胞濃度の Vero 細胞懸濁液を調製し、*M. hyorhinitis* をスパイクして検討した (Fig.1)。その結果、*M. hyorhinitis* を 100 CFU/mL の濃度でスパイクした場合はすべての細胞濃度で 4 反応中 4 回の陽性反応が得られた。しかし、マイコプラズマのスパイク量が 10 CFU/mL の場合、細胞濃度が 5×10^6 cells/mL ではシグナルを 4 回中 2 回測定できず、細胞濃度を 1/5 に減らすと 4 反応全て検出された。MycoTOOL 推奨の細胞濃度(総細胞数)では検出感が劣り、細胞数を減らす必要があるということは昨年度報告したヒト MSC 細胞でも確認されており、CHO 細胞以外の細胞を対象にマイコプラズマ汚染を検出する場合、対象細胞を

用いて、予め十分な検出感度が得られる最適条件を検討することが必要と考えられる。

2) 検体量が少ない場合のマイコプラズマの検出感度

再生医療では、治療の目的に応じて使用する細胞の種類は多様であり、またオーダーメイドで作成されることが多いため培養規模が小さく、充分量の検体を試験に用いることが困難な場合もある。マイコプラズマの検出に用いることが可能な EP のバリデーションに適合するマイコプラズマ検出キットは複数市販されているが、推奨検体量は各キットにより異なっている (Table 2)。例えば、MycoTOOL の標準検体量は、細胞懸濁液を検体とする場合は 1 ml(0.9mLを使用)であるが、MycoSEQ では従来の培養法と同じ 10 mL の使用が推奨されている。再生医療製品の最終製品は培養規模が小さいものも多く、マイコプラズマ否定試験の推奨検体量に満たない可能性もある。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総製品量と検体採取量に関する考え方として、細胞懸濁液が 10mL を超える十分な量がある場合には総量の 1%、1mL 以上 10mL 未満の場合には 0.1mL、総量が 1mL 未満の場合には適用しないとの考え方が示されている。しかし、マイコプラズマ NAT では適切な検体量が確保できれば適用しないという考え方は必ずしも適切ではないと考えられる。そこで被検液が 0.1mL しか得られない場合でも NAT によるマイコプラズマ否定試験が実施可能かどうかについて検討した。

Vero 細胞懸濁液 0.1mL (5×10^5 cells) に 10 CFU/mL となるようにマイコプラズマ標準株 7 種をそれぞれスパイクした試料について、MycoTOOL PCR と MycoSEQ の 2 製品を用いてマイコプラズマの検出を検討した。その結果、MycoTOOL PCR では *A. laidlawii*,

M. fermentans, *M. pneumoniae*, *M. salivarium* の 4 菌種についてはこの試験条件でも 100%の検出感度が得られたが、残りの 3 菌種については検出できない場合が認められた。また、MycoSEQ を用いた場合、今回の測定条件ではどの菌種も 100%の検出はできず、3 菌種は全く検出されなかった。両キットともに推奨検体量での検出限界は 10 CFU/mL 以下と公表されているが、検体量の低下により検出感度の低下が確認された (Table 3)。

3) 培養上清を検体とする場合

マイコプラズマは細胞に付着して増殖するものが多く、基本的に、細胞のマイコプラズマ汚染は細胞懸濁液を検体とすることが求められる。しかし、再生医療等製品の最終製品には、培養角膜シートのように細胞シートの完全性が要求されるものや、培養軟骨製品のように医療材料に包埋して投与する場合もあり、最終製品に NAT の適用は困難な場合もある。このような場合には細胞懸濁液ではなく培養上清を検体とすることも想定される。そこで、マイコプラズマ汚染細胞では、培養上清と細胞画分にどのような比率でマイコプラズマが分布するのかを検討した。

M. hyorhinitis 感染 Vero 細胞株を作製し、コンフルエントの時点で培養上清と細胞画分それぞれに含まれるマイコプラズマを測定したところ、上清中のマイコプラズマは細胞を汚染するマイコプラズマの 5%未満であり、マイコプラズマの大部分は細胞画分に存在することが明らかになった (Fig. 2)。培養細胞を汚染するマイコプラズマが 10~100 CFU/mL 程度の場合でも上清中のマイコプラズマの比率が同程度と仮定すると、培養上清中のマイコプラズマの濃度は 0.5~5 CFU/mL 以下と想定される。この場合、細胞懸濁液を測定すれば NAT の検出限界以上と

なり検出可能だが、上清のみを測定した場合には検出は困難と予想される。しかし、培養上清中のマイコプラズマ含有量は低濃度でも容量はある程度得られるのであれば、total のマイコプラズマ量は検出限界以上となる可能性がある。そこで、上清中のマイコプラズマを濃縮して測定する方法を検討した。

10 CFU/mL あるいは 1 CFU/mL の *M. hyorhinitis* をスパイクした Vero 培養上清 10mL、50 mL について、16,000×g で 30 分遠心したペレット、または培養上清に Vero 細胞 5×10^4 個を添加後、16,000×g で 30 分遠心処理を行い得られたペレットから抽出したものを、未処理の上清及び細胞懸濁液 1ml から抽出した場合と比較した (Table. 8)。その結果、10CFU/mL の場合、細胞懸濁液では 100%の検出感度が得られたが、培養上清 1mL では十分な検出感度が得られず、10mL からの遠心濃縮でも感度は上がらなかった。50mL から遠心濃縮した場合は 100%の頻度で検出できるようになった。また、上清に Vero 細胞を添加後に遠心した場合は、10mL からの濃縮でも 100%検出された。遠心操作によりマイコプラズマ全量が回収できれば 10mL の遠心でも 10 倍濃縮となり 100%の頻度で検出できることを期待したが、今回の条件はマイコプラズマがごく低濃度で菌体量が少ないため、遠心のみでは上清を除去して pellet にする過程で菌体のロスが起こり十分な回収ができなかったものと推測される。一方、細胞を添加した場合は細胞ペレットと共にマイコプラズマが沈殿するため、十分な濃縮が可能になったと思われる。今回は Vero 細胞を共沈剤として使用したが、細胞に限らず、菌体を共沈させるものを添加して菌体の回収率を上げることで十分な濃縮が可能と考えられる。

4) Vero 細胞を用いたマイコプラズマの増幅

マイコプラズマ否定試験 17局改正案には、Vero 細胞を用いてマイコプラズマを増幅後に NAT で検出する方法も示されている。培養上清中のマイコプラズマは高濃度であれば直接測定可能だが、低濃度の場合、前述の遠心法などを利用して濃縮後に測定する方法の他に、Vero 細胞で増幅することにより高感度に検出する方法もある。また、検体量が少ないため感度が得られない場合でも、Vero 細胞で増幅すれば感度を上げられる可能性がある。そこで、Vero 細胞を用いたマイコプラズマの増幅について検討した。

Vero 細胞に 10 CFU/mL となるように *M. hyorhinis* をスパイク後、経時的に dish1 の全細胞 (培養上清を含む)、dish2 の培養上清、及び dish2 の上清を除去した細胞画分に分けてマイコプラズマを定量した。その結果、Vero 細胞を含まない MEM 培地に *M. hyorhinis* をスパイクしても増幅しないが、Vero 細胞に接種した場合、Vero 細胞の増殖に伴って *M. hyorhinis* が増幅し、10CFU/mL が 3 日で 10^6 CFU/mL、6 日で 10^9 CFU/mL まで急激な増幅が認められた (Fig. 3)。この結果から、試験に数日かかるが、検体として低濃度の上清しか得られないような場合でも Vero 細胞で増幅後に測定することにより高感度に検出できる可能性が示唆された。ただし、データは示さないが、最初にスパイクするマイコプラズマを 1CFU/mL とした場合、低濃度のため必ずしも全ての well でマイコプラズマが増殖するわけではないことも経験している。なお、細胞画分と上清中のマイコプラズマを比較したところ、やはりマイコプラズマはほとんどの時点で細胞ペレット中に回収され、培養上清中のマイコプラズマはほとんどの時点で全マイコプラズマの 10% 以下であった。

D. 考察

1) 検体量が少ない場合

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少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くなると想定されるが、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、そのうちの 10mL を被検液として用いること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。

BP の無菌試験法では、再生医療製品の被検量は製品量の一定比率を用いるとの考え方が示され、製品量が少ない場合に試験を行わないという考え方を示している。しかし、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るべきであろう。

市販のマイコプラズマ測定用 NAT も細胞基材の品質管理を想定して作られており、標準検体量は MycoTOOL で 1mL、MycoSEQ では 10mL を用いて行うこととされるが、特に検体量が少ない場合を想定して 0.1mL を検体として検討を行った。その結果、0.1mL からでも測定は可能であるが、10CFU/mL を測定可能な感度を有するキットを使用しても、検体の容量を標準使用量の 1/10 又は 1/100 の 0.1mL に減らすと当然のことながら感度は低下し、偽陰性となる菌種が認められた。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、どの程度の感度が得られるのかを確認したうえで 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や、Vero 細胞に接種して検体の容量と検出感度を上げるという方法を取ることとも可能と考えられる。

2) 培養上清を検体とする場合

マイコプラズマは細胞に接着して増幅するため、被検液としては細胞懸濁液を選択すべきとされるが、再生医療等製品では必ずしも細胞懸濁液を検体とすることができない場合がある。細胞からマイコプラズマが十分に回収できていることがバリデーションされていれば培養上清を検体としてもよいと考えられるが、今回の検討でも示されたように培養上清中のマイコプラズマは細胞培養中のマイコプラズマのごく一部であることが確認されており、培養細胞のマイコプラズマ汚染を検出するには、大量の培養上清からマイコプラズマを濃縮する等の方法を取る必要があると考えられる。上清からの濃縮法としては、16,000×g で 30 分間の遠心処理により、ある程度濃縮可能であるが、低濃度の試料からの濃縮では細胞などのマイコプラズマを共沈させるものを添加して遠心する方法が培養上清中のマイコプラズマを回収する方法として利用できる。また、Vero 細胞に接種して増幅後に測定する方法は、時間はかかるが、3 日で 10⁵ 倍に増幅させることが可能であり、低濃度の試料を高感度に測定するのに有用な方法と考えられる。しかし、特に検出に際して偽陽性や偽陰性を生じることがないことを評価しておくことが重要と考えられる。また、上清を検体として用いる場合には、最終細胞製品への製剤化の過程で汚染が起こらないことを確認しておくこ

とも必要と思われる。製剤化の過程で汚染のリスクが否定されない場合は、投与後の試験も考慮すべきとおもわれる。

E. 結論

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するため、検体量が少ない場合及び培養上清を検体とする場合の考慮点をまとめた。

F. 健康機器情報

該当なし

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 45 (5), 442-451 (2014)
- 2) 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: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究、マイコプラズマ学会雑誌 (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: 日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究、日本マイコプラズマ学会第 41 回学術集会(2014.5) (東京)

- 2) 内田恵理子：生物薬品委員会の検討課題－マイコプラズマ否定試験の改正による NAT 法の積極的活用－、第 13 回日本薬局方に関する研修会（2014. 10）（大阪, 東京）
- 3) 内田恵理子：新しいマイコプラズマ否定試験法、第 15 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム(2015.2) (東京)
- 4) 古田美玲、内田恵理子、山口照英：再生医療製品のマイコプラズマ否定試験としての NAT の適用に関する研究、第 14 回日本再生医療学会総会(2015.3)（横浜）

H. 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-oropharynx 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

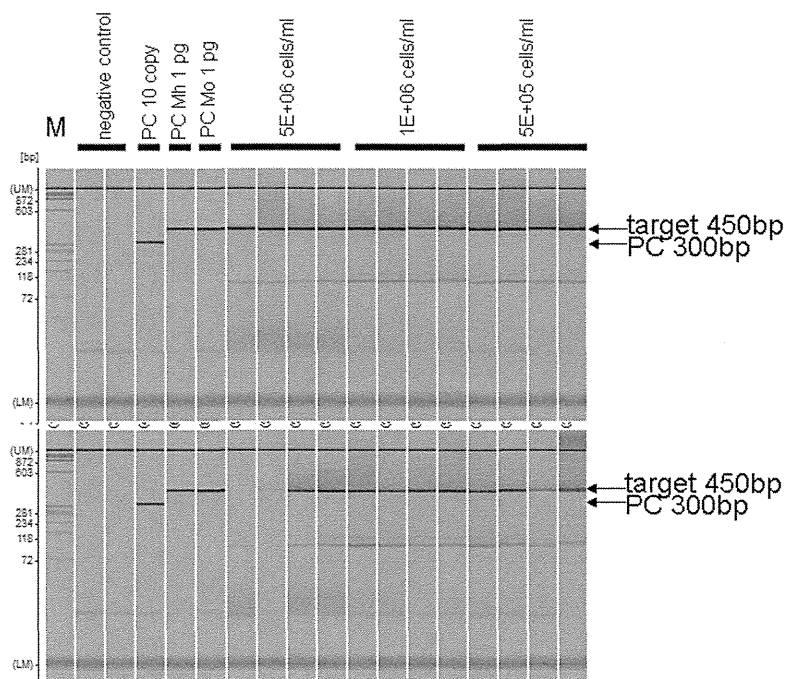


Fig. 1 Vero 細胞にスパイクした *M.hyorhinis* の MycoTOOL PCR による検出
上 : 100CFU/mL, 下 : 10CFU/mL