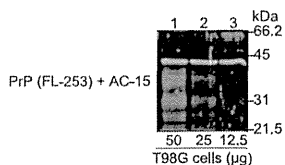


7



8



結果と考察

1. PrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の候補として、リン酸化プリオンヘプチドでマウスを免疫し、3種類のmAb (pS240, pS279, pSP289)産生ハイブリドーマを樹立した。
2. リン酸化プリオンヘプチドを固相抗原としたELISAによる解析で、pSP279はpS43とS43を含むそれぞれのプリオンヘプチドを特異的に識別した。
3. マウス脳乳液を用いたイムノブロット法による解析で、pSP279はPrP^{Sc}及びPrP^CのpS43近傍のアミノ酸配列を認識し、糖鎖の無いPrPの単量体及び二量体に相当する特異的なバンドを示したが、PrP^{Sc}に対する高い特異性は認められなかった。

ウサギポリクローナル抗体を用いた研究で、PrP^{Sc}感染脳は正常脳に比較してpS43が多いと報告されているが、本研究では明確な差が認められなかった。今後はPrP^{Sc}感染脳の例数を増やすこと、PrP^{Sc}接種後のpS43経時変化を調べること、脱リン酸化したPrP^{Sc}感染脳のイムノブロット法や脳切片の免疫蛍光法による比較等を行い、抗リン酸化プリオン抗体pSP279の検証を進める。

9

再生医療等製品等における無菌試験法、マイコプラズマ否定試験法、エンドトキシン試験法の適用に関する提言

内田 恵理子
菊池 裕
山口 照英

無菌試験法の研究一掃：組織加工製品における無菌試験の在り方について
 ・一般的な薬品やバイオテクノロジー応用薬品は、日経16一般試験法 無菌試験法を適用
 ・機体又は試料をメンブランフィルター法又はろ過法で14日間以上培養
 ・ロットあたりの微小供給量と容積の両方に応じた検体採取量を規定
 注：組織加工製品等の再生医療等製品には適用が困難
 ・製造から2日以内に出荷することが多い
 ・ロットを構成せず、前経路製品の容積が少ない
 ・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

再生医療等製品は、アブリレーター等の高速無菌操作技術で細胞培養から製剤化までの工程を管理されていることから、無菌試験法として微生物迅速法を適用
 ・日経16参考情報に記載の蛍光染色法が標準
 ・原理等が参考情報に記載のNATIは、十分なバリデーションを行った上で適用
 ・その他の微生物迅速法は、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、十分な分析バリデーションを経て適用
 ・ロットを構成しない再生医療等製品は、それぞれの最終製品に無菌試験を適用
 【参考：EP Chapter 2を27, Microbiological control of cellular products.
 容積が10mL以上の場合は全量の1%を、1mL以上で10mL未満の場合は100μLをそれぞれ試験に供し、1mL未満の場合は試験に適用不可；決定中のドラフトでは、最終由来製品の容積が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、最終製品と前後に接触する液体や細胞に対して行うローグアウト試験、が取られるべきとしている】

細胞・組織加工製品等における無菌試験法、マイコプラズマ否定試験法、エンドトキシン試験法の在り方に関する研究

＜概要＞
 ○再生医療に使用する細胞・組織加工製品の安全性確保のため、出荷試験として実施される3試験（無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験）の実施が必要
 ○細胞・組織加工製品に特有な試験法はなく、日本薬局方に準拠して実施するしかない
 ○問題点
 ○細胞・組織加工製品の製造には限界があり、試験検体量が少ないため、一定の製造量のあった成品や、再生医療に適用可能な日本薬局方に準拠した試験の実施が困難
 ・迅速な再生医療等製品製造の促進

＜研究内容＞
 ○再生医療等製品の特性に合った、検体量、検出感度及び試験方法に考え方を提案、型番（文庫収載等）のうえ、現実的に適用可能な試験の試験法を検討
 ○研究体制
 研究内容：再生医療等製品の特性に合った、検体量、検出感度及び試験方法に考え方を提案、型番（文庫収載等）のうえ、現実的に適用可能な試験の試験法を検討
 研究体制：再生医療等製品の特性に合った、検体量、検出感度及び試験方法に考え方を提案、型番（文庫収載等）のうえ、現実的に適用可能な試験の試験法を検討

＜研究課題＞
 ・試験法の代替案の作成
 ・試験法の標準化
 再生医療等製品の安全性確保
 再生医療等製品の迅速な開発
 健康・医療戦略、日本再生医療等製品の目標達成

微生物迅速法*

名称	検出対象	検出・測定装置の例
1) 直接検出法		
固相サイトメトリー	菌体	蛍光顕微鏡 レーザーキャノンサイトメーター等
フローサイトメトリー	菌体	フローサイトメーター等
2) 間接検出法		
免疫学的方法	抗原	免疫クロマトグラフィー マイクロプレートリーダー等
核標識検出法	核酸	電気泳動装置 定量的PCR装置 発光検出装置
生物発光法・蛍光法	ATP等	蛍光測定器
マイクロコロニー法	増殖能（マイクロコロニー）	蛍光顕微鏡等
ガス測定法	増殖能（ガス発生等）	ガス測定器 発色の染色反応

*第十七改正日本薬局方参考情報収載案（ハブリックコメント）から抜粋
http://www.pmda.go.jp/public/pubcome_201409_1/ifa/097-1409.pdf

再生医療製品に現行の局方マイコプラズマ試験法を適用する場合の課題

- ① 試験期間：培養法は28日間の試験期間が必要であり、判定が投与後になる。
 ① 検体量：培養法は10mL以上、DNA染色法は1mL以上必要だが、検体量が十分に確保できない場合が想定される。
- ② 検体の種類：マイコプラズマは細胞に接着して増殖するため細胞懸濁液を用いるべきとされるが、細胞がシート状であったり、医療材料等に包埋されている場合（コラーゲンに包埋した軟骨細胞など）は試験の実施が困難。
- ③ NATを用いる場合のランコントロール（陰性対照と陽性対照）はどのように選択すればよいのか。
- ④ NATを培養法やDNA染色法の代替として用いるとすれば、どのようなバリデーションが必要か？（EPでは、マイコプラズマ9種、感度、ランコントロール、検体量、検体試料）。

無菌試験を再生医療等製品に適用する際の考慮点：提言

- 再生医療等製品に適用する際に考慮する点
1. 検出対象及び検出系が従来法とは異なるため、これまでに蓄積したデータとの相関を得られないことがある
 2. 従来法と同等以上の能力を有することを確認することが原則であるが、新手法により新たな管理方法が考案され、従来法がない場合には、その妥当性を検証して新手法を用いる
 3. 標準の選定基準に当たっては、検出対象とする標準菌株を用いて実施
 直接検出法においては標準菌株
 間接検出法においては検出対象となる成分等
 4. 試験法のバリデーションに当たっては、検出対象が増殖数・種属測定の際となる科学的根拠を明らかにし、従来法と比較して優位な点と共に、利用に当たって考慮すべき点についても明らかにすることが望ましい

再生医療等製品へマイコプラズマ試験の適用提言

1. 再生医療等製品では検体量は製品量の一定比率を用いることも可能と考えられる。ただし、BPのように製品量が少ない場合に試験を行わないという考え方は困難。
2. 判定期間：NATのような迅速法が培養法やDNA染色法と感度等について相関が確認できれば出荷直前の試験としても適用可能
3. NAT法を適用する際のバリデーション：マイコプラズマ種、感度、ランコントロールの設定がされていることが必要
4. 検体試料：マイコプラズマは細胞に接着して増殖するために検体法としては細胞懸濁液を選択すべき。ただし細胞からの十分な回収ができていないことがバリデーションされていなければ受け入れ可能
5. 高感度化するためにVero細胞との共培養を行う時の注意点。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。
6. 上清を用いる場合の考慮事項：培養上清を用いる場合には最終製品への製剤化の過程で汚染が起らないことを確認しておくこと。製剤化の過程で汚染のリスクが否定されない場合によっては投与後の試験も考慮すべき。

局方エンドトキシン法を再生医療等製品に適用する際の課題

- ・市販されているエンドトキシンキットの表示感度の確認では、エンドトキシン標準品の検体液に応じた希釈系列を作成して用いる必要
- ・反応干渉因子試験でもエンドトキシン標準品を用いる必要。しかし、多くの製剤が作られる通常の注射用医薬品とは異なり特に自己由来細胞組織加工製品はナイラメド製剤の特徴を持ち、個別製品ごとにエンドトキシン標準品を用いた感度や妨害物質の有無を求めるとは合理的ではない
- ・再生医療等製品は生きた細胞を用いており、細胞そのものがエンドトキシン試験を妨害する可能性が高い。製品をエンドトキシン試験に適用するために製剤から細胞を除去することが必要となる。
- ・再生医療等製品では生きた細胞であることから製造後、短時間の間にヒトに投与される必要がある。例えばゲル化法であれば、前知量に加え、試験の判定に約3時間を要する。出来るだけ迅速な試験法が適用できることが望まれている。
- ・細胞を医療材料等に包埋するような製品の場合に、そのままではエンドトキシン試験の実施が困難
- ・<4.01>では「カプトガニの血球成分より調製されたライセート試薬を用いる」とされているが、最新のキットでは相換エファクターCやEUSA法なども開発されているが、このような試薬を用いた試験では局方に適合していないことになる。



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—

平成27年1月14日
国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
菊池裕



2. 細胞・組織加工製品など再生医療等製品の特徴

- ・製造から2日以内に出荷することが多い
- ・ロットを構成せず、最終調製品の容量が少ない
- ・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

↓
再生医療等製品には無菌試験法の適用が困難

↓
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
↓
無菌試験法として微生物迅速法を適用



研究目的

平成25年11月27日に改正薬事法が公布され、薬事法は名称を「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て、平成26年11月25日に施行された。

医薬品医療機器等法（薬機法）に併せて、先に公布された「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、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に用いることができる検体量が少ないこと、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。



3. 微生物迅速法

日版16 参考情報に取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	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* 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判定法	核酸	細菌の16S rRNA遺伝子又は真菌の18S-5.8S rRNA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特定する。	DNA自動解析装置、DNA増幅装置
マイコプラズマ否定試験* C. フリメラゼ連鎖反応（PCR）による検出法	核酸	16S-23S 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



1. 無菌試験法

- ・医薬品の出荷判定試験として遵守すべき一般試験法として、第十六改正日本薬局方に収載
- ・無菌試験法は無菌であることが求められている原薬又は製造に適用
- ・検体又は試料を14日間以上培養して肉眼的な微生物の増殖を確認
- ・一定以上の製造量があってロットを構成する一般的な医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品に適用
- ・容器の容量に応じた最小試料採取量とロット当たりの製造個数に応じた最小供試個数が規定



微生物迅速法*

3. 応用分野と考慮する点

応用分野の例を以下に示した。

- ・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

*第十七改正日本薬局方参考情報収載案（パブリックコメント）から抜粋
http://www.pmda.go.jp/public/pubcome_201409_1/file/097-1409.pdf

国立医薬品食品衛生研究所 National Institute of Health Sciences			
微生物迅速法1*			
名称	検出対象	原理・特徴	検出・測定装置の例
1) 直接検出法			
蛍光サイトメトリー	菌体	フォルタンなどの染料に染色した細胞が発するシグナルを自動的に検出する。染色を促進することにより、生体活性に依存するシグナルを検出することも可能だが、細胞死を伴う場合もある。蛍光抗体の増強を顕微鏡的に検出するため、凍結サンプルや抗体、また蛍光増強剤を用いたフローシミュレーションなどがある。検出装置として、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡などを用いる。種々の検出装置を用いる。均一な検出を確保する必要がある場合も考慮される。検出精度を向上させることにより、生体活性等にかかわるシグナルを検出することも可能だが、細胞死を利用することもある。また特定の細胞を顕微鏡に検出するため、凍結サンプルが検出、また凍結増強したフローサイトメトリーを用いることがある。検出装置として、種々の検出装置を用いる。	蛍光顕微鏡 レーザーキャキャニング サイトメーター等
フローサイトメトリー	菌体	同様に検出される。検出装置として、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡などを用いる。均一な検出を確保する必要がある場合も考慮される。検出精度を向上させることにより、生体活性等にかかわるシグナルを検出することも可能だが、細胞死を利用することもある。また特定の細胞を顕微鏡に検出するため、凍結サンプルが検出、また凍結増強したフローサイトメトリーを用いることがある。検出装置として、種々の検出装置を用いる。	フローサイトメーター等
*第十七改正日本薬典方書情報収載薬（ハブリックコメント）から抜粋 http://www.pmda.go.jp/public/pubcme_201409_1/file/097-1409.pdf			

国立医薬品食品衛生研究所 National Institute of Health Sciences	
4. 再生医療等製品に微生物迅速法を適用する際に考慮する点	
6) 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、その他の新手法についても測定原理に特有な阻害物質の存在が推測されることから、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。	
7) ロットを構成しない再生医療等製品は、それぞれの最終調製品に無菌試験を適用 EP Chapter 2.6.27, Microbiological control of cellular products. 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100μLをそれぞれ試験に供し、1mL未満の場合は試験に適用不可 改定中のドラフトでは、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	

国立医薬品食品衛生研究所 National Institute of Health Sciences			
微生物迅速法2*			
名称	検出対象	原理・特徴	検出・測定装置の例
2) 培養的検出法			
免疫学的検出法	抗原	培養がもたらした特異的な抗体を反応させ、発色や蛍光を直接またはマイクロプレートリーダーなどで検出する。検出装置はマイクロプレートリーダー等。	免疫検出装置
培養増強法	菌体	検出装置が検出する検出装置に特異的なプライマーを用いて増強し、検出する。従来のPCRを用いることにより、容量も可能である。	増強PCR装置
蛍光検出法・蛍光法	ATP 等	菌体のATP等を酵素反応による発光現象・蛍光現象をもとに検出する。	発光検出器 蛍光検出器
マイクロコロニー法	菌体	コロニー形成初期のマイクロコロニーを検出・計数する。平板培養法と同じ培養法に検出装置、検出装置を用いる。	発光検出装置等
インピーダンス法	菌体	菌体の増殖に伴って培地の電気伝導率や誘電率が増加することにより、インピーダンスが変化する。検出装置はインピーダンス計等。	電気計測器
ガス測定法	菌体	菌体の増殖に伴って二酸化炭素の発生や酸素の消費等のガス量の増加（減少）を検出する。	ガス検出器
近赤外線法	菌体	菌体の増殖に伴って水分含量が増加することを利用する。	近赤外線計測器
赤外線分光法・赤外線分光法	菌体	菌体の増殖に伴って赤外線吸収率が変化する。検出装置は赤外線分光計等。	赤外線分光計等
質量分析法	菌体	菌体の増殖に伴って質量が増加することを利用する。検出装置は質量分析計等。	質量分析計
フィンガープリント法	DNA	菌体から抽出したDNAを制限酵素で消化し、DNA断片の長さ（フィンガープリント）を測定する。データベースと比較することにより検出が可能である。また、T-RFLP法で検出装置が検出される。	電気泳動装置
ハイブリッド・シーケンス	菌体	検出装置に存在する多量体核酸から抽出した核酸の配列を決定し、その結果をデータベースと比較して検出する。	シーケンサー等
*第十七改正日本薬典方書情報収載薬（ハブリックコメント）から抜粋 http://www.pmda.go.jp/public/pubcme_201409_1/file/097-1409.pdf			

国立医薬品食品衛生研究所 National Institute of Health Sciences	
4. 再生医療等製品に微生物迅速法を適用する際に考慮する点	
8) 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、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、採用した場合には、無菌試験に影響を及ぼさないよう処置が必要である。	
9) 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が必要とされ、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。	

国立医薬品食品衛生研究所 National Institute of Health Sciences	
4. 再生医療等製品に微生物迅速法を適用する際に考慮する点	
1) 日局16参考情報に収載される直接的検出法の蛍光染色法が最速	
2) 原理等が参考情報に収載のNATは十分なバリデーションを行った上で適用	
3) その他の微生物迅速法は、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、十分な分析バリデーションを経て適用	
4) 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 直接検出法においては標準菌株 間接的検出法においては検出対象となる成分等	
5) 試験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位な点と共に、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。	

国立医薬品食品衛生研究所 National Institute of Health Sciences	
5. 結論	
施行された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」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。	

再生医療製品のマイコプラズマ否定試験 のあり方に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子医薬部
内田 恵理子

ウイルス感染症性遺伝子安全性評価に関する研究 全体研究会 2015年1月14日

日局マイコプラズマ否定試験法の比較

試験法	特徴	長所	短所
A. 培養法	培地(液体培地、寒天培地)に検体を接種してマイコプラズマを培養し、マイコプラズマ特有のコロニーを検出 所量百数:20百以上 検体:細胞懸濁液10mL以上	・マイコプラズマの直接培養法	・判定まで非常に時間がかかる ・培養細胞を汚染するマイコプラズマは人工培地では増殖しないものもある
B. 指標細胞を用いたDNA染色法	指標細胞(Vero細胞)に検体を接種し、細胞に依存して増殖したマイコプラズマをDNA特異的蛍光色素で染色して細胞核外の微小なDNA蛍光斑点として検出する間接検出法 所量百数:4~7日 検体:培養上清1mL以上	・培養細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖しやすいため、培養法で検出されないマイコプラズマも検出できる	・DNAを蛍光染色する間接検出法であり、マイコプラズマDNAを特異的に検出するわけではない ・細胞由来DNAも染色されるため、判定に熟練を要する
C. PCR法	検体からDNAを抽出し、16S-23S rRNA遺伝子のスペーサー領域に対するプライマーを用いて2段階のPCRで増幅して検出する方法が例示 所量百数:数時間 検体:例示は細胞懸濁液0.05μL	・迅速に判定できる ・検出感度、特異性に優れている	・不活性化、DNA断片も検出 ・プライマーに依存 ・マイコプラズマ種が規定される ・キャリアオーバーによる偽陽性が出やすい

各試験法はそれぞれ長所、短所があり、複数の方法での確認が必要
「A法、B法を実施すること。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。」

☞ 日局PCR法はB法を補完する二次的な試験として位置付け

マイコプラズマとは

マイコプラズマ属、ウレアプラズマ属、スピロプラズマ属、アコレプラズマ属等の
モリキューテス綱の細菌

- 無細胞壁の原核生物で、自己増殖能を持つ最小の微生物
- 動物界に広く分布し、種特異的な感染を示す
- 培養細胞では培養作業従事者や血清等を介して種を超えて感染
- 多くは培養細胞表面で細胞と共存して増殖し、マイコプラズマ汚染が生じても細胞傷害性を示さず、培養液の混濁も起こらない
- 細胞壁を持たないためペニシリン系薬剤は無効でカナマイシン、ゲンタマイシンなどには耐性を持つものが多く、滅菌濾過フィルター(0.22μm)を通過

↓
多くの実験室で維持されている培養細胞でマイコプラズマ汚染が高頻度に見られ、
また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

↓
医薬品の製造に用いる細胞基材 } 適切なマイコプラズマ否定試験の実施が
細胞・組織加工医薬品(再生医療製品) } 求められている

*小原ら, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 2007, 25, p. 159-163

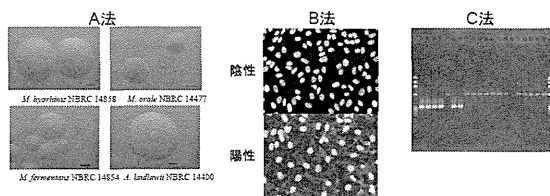
再生医療製品の特性

- 生きた細胞をそのまま投与するため
汚染の除去・不活化が困難
☞ 最終製品に対してマイコプラズマ否定試験を実施
- 迅速な試験結果が求められる
- 製品毎に多様な特性

日本薬局方参考情報 マイコプラズマ否定試験

適用範囲: バイオ医薬品/生物基由来医薬品の製造に用いる細胞基材

- 試験法: A. 培養法
B. 指標細胞を用いたDNA染色法
C. PCR法(2段階PCR法を例示)



再生医療製品に局方マイコプラズマ 否定試験を適用する際の問題点

- 試験期間: 長期にわたる試験期間(培養法:4週間、DNA染色法:一週間)が必要で試験結果が投与後になる。場合によってはNATによる迅速試験で投与の可否を判断したうえで、投与後も継続して試験を実施することもあった(陽性結果が出た場合の追加の対応を規定)
- 検体量: 10mL(培養法)あるいは1mL(DNA染色法)であり、再生医療等製品では実施が困難な場合もある
- 陰性対照と陽性対照: テイラーメイド製品であることの多い再生医療等製品でも個別検体ごとに標準検体等の設定を行うことが必要

細胞治療・再生医療製品におけるマイコプラズマ迅速検査法のニーズ

- 細胞治療・再生医療製品
 - ✓ 細胞の最終調製から投与まで十分な時間がないことが多く、より迅速かつ高感度な試験法が必要
 - ✓ 核酸増幅法の塩基配列特異性から、マイコプラズマ検出の感度や精度の確保



迅速試験であるPCR法などの核酸増幅法(NAT)の利用が望まれ、局方C法の位置づけ・内容の見直しが要望

再生医療製品に局方マイコプラズマ否定試験を適用する場合の問題点

- 迅速な試験結果が求められる
⇒局方の改正により迅速なNATを利用可能
- 細胞の種類が多様多様(細胞ごとに評価が必要)
- 再生医療製品の最終製品では十分な検体量の確保が困難な場合が多い
- 最終製品ではなく上清しか検体にできない場合がある

マイコプラズマ否定試験17局改正案

2014年6月に公表*・パフコメ、2016年4月施行予定

主な改正点：C法の全面改正

C. 核酸増幅法(NAT)

- 16局：特定のプライマーを用いたPCR法の例示
⇒NATのバリデーション法の提示(様々な手法が利用可能)
- C法の位置づけを改正：A法とB法による試験を実施する。ただし、適切なバリデーションを実施することにより、C法をA法やB法の代替法として用いることができる。
- 欧米薬局方との国際調和、生物学的製剤基準との調和

*http://www.pmda.go.jp/public/pubcome_201406_2/file/029-1406.pdf
日本薬局方フォーラム23 (2), 145-149 (2014)

多様な再生医療製品の例

- 活性化リンパ球
 - ✓ 細胞懸濁液のためNATの適用は容易
- 培養角膜シート：10⁷ 細胞/0.2mL
 - ✓ シート状のため最終製品を試験に供しにくい
 - ✓ 試験に用いることのできる細胞が少量で日局の検体量(培養法で10mL以上)での試験の実施は困難
- 培養軟骨製品
 - 医療材料に包埋して投与する場合、最終製品にNATの適用は困難

マイコプラズマ検出のためのNATのバリデーション法

特異性、検出感度、頑健性について評価

■ 特異性と検出感度：7種の参照マイコプラズマを用いる

Acholeplasma laidlawii (ATCC 23206, NBRC 14400又は同等の株)
Mycoplasma arginini (ATCC 23838又は同等の株)
Mycoplasma fermentans (ATCC 19989, NBRC 14854又は同等の株)
Mycoplasma hyarhinis (ATCC 17981, NBRC 14856又は同等の株)
Mycoplasma orale (ATCC 23714, NBRC 14477又は同等の株)
Mycoplasma pneumoniae (ATCC 15531, NBRC 14401又は同等の株)
Mycoplasma salivarium (ATCC 23064, NBRC 14478又は同等の株)

■ NATをA法、B法の代替法とする場合

同等性試験を実施し、NATとA法又はB法の検出感度を比較
 A法を代替：7種のマイコプラズマ全て10 CFU/mLを検出可能
 B法を代替：7種のマイコプラズマ全て100 CFU/mLを検出可能

マイコプラズマ検出感度は細胞の種類や濃度により異なる

MycotoOL PCR (*M. hyarhinis*)

<i>M. hyarhinis</i>	Carrier DNA	cells/mL								
		CHO	Mesenchymal Stem Cells							
		5 × 10 ⁶	5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁴	2 × 10 ⁵	5 × 10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ²	0	
100 CFU/mL	-	2/2*	4/4	8/8	4/4	2/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	+	nd	nd	nd	nd	8/8	8/8	8/8	8/8	4/4
10 CFU/mL	-	6/6	2/4	7/8	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	+	nd	nd	4/4	4/4	8/8	7/8	6/8	4/4	

*：検出数/泳動レーン数； nd: not determined

⇒細胞毎に最適な試験条件を設定する必要がある

細胞にスパイクした各マイコプラズマ参照株の MycoTOOL PCRによる検出

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

Strain	100 cfu/mL	10 cfu/mL	1 cfu/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

検体量が少ないと検出頻度は低下

検体: Vero細胞 5x10⁶ cells/mLに
各マイコプラズマ10 CFU/mLをスパイク
検体量: 100 μL

菌種	MycoSEQ	MycoTOOL
<i>A. laidlawii</i>	1/4	4/4
<i>M. arginini</i>	1/4	1/4
<i>M. fermentans</i>	2/4	4/4
<i>M. hyorhinis</i>	0/4	1/4
<i>M. orale</i>	0/4	0/4
<i>M. pneumoniae</i>	2/4	4/4
<i>M. salivarium</i>	0/4	4/4

推奨検体量	10 mL	1 mL
推奨検体量での検出感度	<10CFU/mL	<10CFU/mL

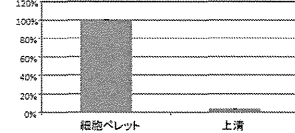
EP準拠市販マイコプラズマ検出キットの特徴

キット名	MycoTOOL (PCR)	MycoTOOL (real-time PCR)	MycoSEQ	CytoCheck	MilliProbe
会社	Roche Diagnostics		Life Technologies	Greiner bio-one	Merck Millipore
特化	CHO		-	-	-
推奨検体量	1 mL		100μL-10 mL	1 mL	20mLまで可能
抽出	細胞濃度/細胞数上限 5 × 10 ⁶ cells/mL		1 × 10 ⁵ cells (1 × 10 ⁶ ~ 2 × 10 ⁶ cellsでは上清を使用)	上清	細胞と分離後抽出
抗原増幅	ターゲット 16S rRNA (DNA)	16S rRNA (DNA)	非公開(DNA)	16S-23S (rRNA spacer (DNA))	16S rRNA
プライマー-プローブ配列	公開	非公開	非公開	非公開	非公開
PCR原理	Touch down PCR	Real-time Touch down PCR	Real-time PCR	PCR	TMA法
検出	PAGE	プローブ法	SYBR Green法	DNA-chip	蛍光プローブ
公表検出下限	< 10CFU/ml	< 10 CFU/ml	< 10 CFU/ml (10mL使用時)	< 10 CFU/ml	< 10 CFU/ml

培養上清を検体とする場合

MycoTOOL 検体	10 CFU/mL	1 CFU/mL
細胞懸濁液 1mL	4/4	1/4
培養上清 1mL	9/12	4/12
上清 10 mL 遠心pellet	2/6	1/6
上清 50 mL 遠心pellet	6/6	1/6
上清 10 mL 細胞添加後 遠心pellet	6/6	0/6
上清 50 mL 細胞添加後 遠心pellet	6/6	5/6

マイコプラズマ汚染細胞での細胞と上清のマイコプラズマ量 (*M. hyorhinis*感染Vero細胞)



上清中のマイコプラズマは汚染全体の数%のみ

検体量が少ない場合

再生医療製品の最終製品では十分な検体量の確保が困難な場合が多い

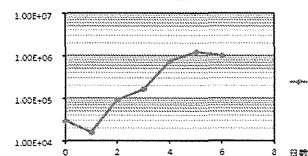
参考までに

英国薬局方 (BP) 細胞治療製品に無菌試験法を適用する場合の 総製品量と検体採取量の考え方	
総製品量	検体量
総量 ≥ 10 mL	総量の1%
1 mL ≤ 総量 < 10 mL	0.1mL
総量 < 1 mL	適用しない

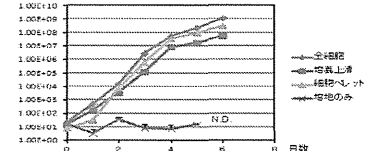
マイコプラズマNATでは、適切な量が確保できれば適用しないという考え方は必ずしも適切ではない

Vero細胞によるマイコプラズマの増幅

細胞数(cells/ml) Vero細胞の増殖曲線



カッター(CFU/ml) *M. hyorhinis*の増殖曲線 (10CFU/mLスパイク)



再生医療製品に適用する際の考慮点

- 試験期間：NAT法が培養法やDNA染色法と感度等について相関が確認できれば出荷当日の試験としても適用可能
- NAT法を適用する際のバリデーション：7マイコプラズマ種、感度、ランコントロールの設定がされていることが必要
- 検体量：再生医療製品では被検量は製品量の一定比率を用いることも可能と考えられる。BPのように製品量が少ない場合に試験を行わないという考え方は適切ではない
- 被検試料：マイコプラズマは細胞に接着して増幅するために被検液としては細胞懸濁液を選択するべき。ただし細胞からの十分な回収ができていないことがバリデーションされていれば受け入れ可能。
- 高感度化のためにVero細胞との共培養を行うことは有用であるが、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
- 上清を用いる場合には最終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。製剤化の過程で汚染のリスクが否定されない場合によっては投与後の試験も考慮すべき

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
清水則夫, 渡邊 健, 高橋秀行, 外丸靖浩, 森尾友宏	再生医療等細胞 製剤の品質評価 法:ウイルス・マイ コプラズマ試験	紀ノ岡正博 監修	再生医療の 細胞培養技 術と産業展 開	シーエムシー 出版	東京	2014	51-62

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
川崎ナナ	生物薬品の局方収載の現状と課題	レギュラトリーサイ エンス学会誌	4(2)	149-154	2014
Hashii N, Harazono A, Kuribayashi R, Takakura D, Kawasaki N	Characterizations of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis.	<i>Rapid Commun. Mass Spectrom.</i>	28(8)	921-932	2014
Maeda Y, Terasawa H, Tanaka Y, Mitsuura C, Nakashima K, Yusa K, Harada S	Separate cellular localizations of human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) Env and glucose transporter 1 (GLUT1) are required for HTLV-1-mediated fusion and infection.	<i>J Virol</i>	89	502-511	2015
Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S	Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program.	<i>Transpl Infect Dis</i>	17	160-161	2015
Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Shimizu N, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ	EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype.	<i>Luek Lymphoma</i>	10	1-27 [Epub ahead of print]	2014

Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A	CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals.	<i>PLoS One</i>	9(11)	e112564	2014
Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N	Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome.	<i>Respiration</i>	87(4)	279-286	2014
Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H	Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan.	<i>Pediatr Int.</i>	56(2)	159-166	2014
Endo A, Watanabe K, Ohya T, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S	Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID.	<i>Clin.Infect.Dis</i>	59	545-548	2014
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
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
Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T	Ultrasensitive detection of PrP ^{Sc} in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion.	<i>Journal of general virology</i>	95	2576-2588	2014

研究成果の刊行物・別刷

- 17) 厚生労働省, 医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について, 医政発0330第2号, 平成22年3月30日通知, http://www.mhlw.go.jp/bunya/iryuu/dl/tuuti_220330.pdf
- 18) 経済産業省, ヒト細胞培養加工装置についての設計ガイドライン〔改訂〕(2010)

第19章 品質評価

1 再生医療等細胞製剤の品質評価法：ウイルス・マイコプラズマ試験

清水則夫*¹, 渡邊 健*², 高橋秀行*³, 外丸靖浩*⁴, 森尾友宏*⁵

1.1 はじめに

安倍首相が提唱する「日本再興戦略-JAPAN is BACK-」の中の「第三の矢：新たな成長戦略」の柱の一つに再生医療の産業化の促進が据えられている。国際競争を意識した規制・制度改革や研究開発及び海外展開支援の取り組みを加速することが計画され、その一環として成長戦略実行国会と銘打った平成25年秋の臨時国会では、同年4月に成立した「再生医療推進法」(表1の(1))の後を受けた形で「再生医療等安全性確保法」(表1の(2))と「薬事法の一部を改正する法律」が成立し、平成26年11月までには施行される予定である。「再生医療等安全性確保法」では、再生医療をその人の生命および健康に与える影響の程度から第1種から3種に3分類し、それぞれ必要な手続きが定められた。また、再生医療等に使用する特定細胞加工物の製造を許可制(医療機関等の場合には届け)とし、医療機関が特定細胞加工物の製造を委託する場合には、許可等を受けた者又は届出をした者に委託しなければならないとされ、細胞加工の委受託が可能になった。現在、法律の施行規則を定める省令案が厚生労働省の専門家会議で討議されているが、本節の執筆時点ではその詳細が明らかとなっていないため、これまでに公布された指針や関連学会からのガイドラインなどを参考に、再生医療の微生物安全性の評価法を考えてみたい。従来の医療用具・機器であれば滅菌操作により感染リスクをなくすことができ、血液など生物材料を用いた生物学的製剤でも放射線照射、フィルター操作、加熱処理などによりそのリスクを十分に低下させることが可能である。しかし、再生医療に使用する細胞治療製剤は生きた細胞・組織を原材料とし、培養操作による増殖・分化誘導などの後に簡単な洗浄操作を行なったうえで患者に投与するのが一般

-
- * 1 Norio Shimizu 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 フロンティア研究室
ウイルス治療学 准教授
- * 2 Ken Watanabe 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野
特任助教
- * 3 Hideyuki Takahashi 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 フロンティア研究室
ウイルス治療学 技術補佐員
- * 4 Yasuhiro Tomaru 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 フロンティア研究室
ウイルス治療学 共同研究員
- * 5 Tomohiro Morio 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野
准教授

表1 再生医療のウイルス・マイコプラズマ安全性に関する指針など

(1)再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律（平成25年5月10日 法律第13号）
(2)再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成25年11月27日 法律第85号）
(3)ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成25年10月1日 厚生労働省告示 第317号）
(4)ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日 薬食発0907第2号）
(5)ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日 薬食発0907第3号）
(6)ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日 薬食発0907第4号）
(7)ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について（平成24年9月7日 薬食発0907第5号）
(8)ヒトES細胞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24年9月7日 薬食発0907第6号）
(9)医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について（平成22年3月3日 医政発0330第2号）
(10)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（平成16年8月3日 薬食発第0808002号；平成26年1月21日に改正案が提示され意見募集中）
(11)ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について（ICHQ5A）（平成12年2月22日 医薬審第329号）
(12)免疫細胞療法細胞培養ガイドライン（平成25年11月12日制定 日本免疫学会・日本がん免疫学会・日本バイオペリア学会・癌免疫外科研究会・血液疾患免疫療法研究会）

的であり、原材料、培養工程の中間体、最終製造物のいずれに対しても十分な消毒・滅菌処理を施すことが不可能との本質的な問題を抱えている。また、本文でも述べるように、ヒトには多くの微生物が持続感染しているため、特にウイルス・マイコプラズマ汚染に関する問題は治療の安全性確保において避けては通れない重要な課題であり、最終製品の全数検査が可能性能を持つ新しい検査法を実用化することが求められている。本節では、再生医療のウイルス・マイコプラズマ安全性の考え方と筆者らが開発した新しい検査系を紹介する。

1.2 再生医療のウイルス安全性確保

再生医療を新しい医療として確立するためには、患者に投与される細胞製剤の品質を保証し治療の安全性を確保することが極めて重要である。培養細胞が直接患者に投与されることを考えれば、初期の臨床研究の段階から実用化段階と同等のウイルス・マイコプラズマ安全性確保策が講じられていることが必要である。再生医療の実用化が遅れている原因の一つとして細胞製剤製造の安全基準・規制が未整備なことが挙げられていたが、平成18年9月1日に再生医療の臨床研究に関する指針「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が公布され安全性管理の方向性が示

された。その後、本指針は平成22年11月1日および平成25年10月1日に全面改定され（以下、平成25年改訂版の指針を「ヒト幹指針」と記載）、対象とするヒト由来幹細胞として体性幹細胞に加えES細胞とiPS細胞が加えられた。ヒト幹指針には、原材料となる細胞・組織や調製細胞の安全性確保の基準が示されているが、同指針の「幹細胞」には、臨床研究に用いられるすべての培養細胞が含まれるとの解釈もあり、実際、免疫細胞療法細胞培養ガイドライン（表1の(12)）もそのような考え方に基づいている。

1.2.1 原材料のウイルス検査

厚生労働省の川崎班では、細胞組織加工医薬品を移植する際に患者への影響を排除しないウイルスとして138種類のウイルスをリスト化している¹⁾。その中でも、牛胎児血清・ブタトリプシン・フィーダー細胞からの混入が懸念されるウイルスを除外し、混入の危険性が大きいウイルスの多くはヒトに持続感染するウイルスと考えられる。ヒトには多くの持続感染ウイルスが存在することが知られている（表2）。すべての成人には多数の持続感染ウイルスが感染しており、その多くは末梢血からも検出される。再生医療の原材料となる細胞・組織には末梢血の混入が避けられないため、ウイルス汚染は事実上不可避の問題である。つまり、原材料の段階でウイルス汚染の可能性を排除して安全性を担保することが不可能なため、そのような認識に立って原材料のウイルス汚染の可能性を正しく評価し、安全性確保対策を講じることが必要となる。自己細胞を原材料とする際の指針（表1の(2)、(4)）ではドナーに対する留意点として、【採取細胞・組織を介して感染する可能性がある感染症に関する検査項目を定め、その妥当性を明らかにすること】とし、具体的には【特にB型肝炎（HBV）、C型肝炎（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症、成人T細胞白血病（HTLV）】が留意すべきウイルス感染症として記載されている（表3）。一方、同種細胞を原材料とする際の指針（表1の(3)、(5)、(6)）では、ドナーの選択基準にバルボウイルスB19（B19）感染症が加わりHBV、HCV、HIV、HTLV、B19を【問診及び検査（血清学的試験や核酸増幅法等）により否定すること】が求められ、加えて【サイトメガロウイルス（CMV）感染、EBウイルス（EBV）感染及びウエストナイルウイルス（WNV）感染については必要に応じて検査により否定すること】とされている（表3）。ヒト幹指針では、第3章第2の1【提供者の選択基準及び適格性】に同様の規定があるが、ここでは【CMV、EBVおよびWNV感染】が必要に応じて検査により感染を否定するウイルスとして挙げられ、同種細胞を原材料とする場合を意識した規定となっている。細則では、【自己由来のヒト幹細胞を用いる場合は必ずしも提供者のスクリーニングを必要としないが、製造工程中の交差汚染の防止、製造者への安全対策等の観点からHBV、HCV、HIV等のウイルスに対する検査の実施を考慮すること】とされている。各々100万人以上存在するHBV、HCV、HTLVのキャリアを治療対象から外すことは患者の「治療を受ける権利」を侵害する恐れがあるため、自己由来の原材料を用いる場合には製造・医療従事者の危険に配慮したうえで培養を行うことが容認されている。また、ヒト幹指針及び同種細胞を用いる際の指針に記載されているCMV、EBVは大多数の成人に持続感染しているため、原材料にCMV、EBVが混入する危険性が非常に高い。したがって、CMV、EBVを含む原材料そして

表2 主なヒトに持続感染する主なウイルス

ウイルス名	関連疾患	感染細胞 (存在部位)	成人の陽性率 (%)	備考
B型肝炎ウイルス (HBV)	B型肝炎	肝実質細胞 (肝臓、血液、体液)	0.9	輸血による感染および母子感染が減り、若年者の陽性率が低くなりつつある
C型肝炎ウイルス (HCV)	C型肝炎	肝実質細胞 (肝臓、血液)	1~1.5	医療行為による新たな感染が激減し、中高年層が主なウイルスキャリアーである
単純ヘルペス ウイルス1型 (HSV-1)	口唇ヘルペス、ヘルペス脳炎	上皮細胞、神経細胞 (唾液、血液)	80~100	性器ヘルペスの原因にもなる(主な原因は2型)
サイトメガロ ウイルス(CMV)	先天性サイトメガロウイルス感染症	マクロファージ (血液)	70~95	代表的な日和見感染症の原因ウイルスで、間質性肺炎、肺炎、網膜炎などの原因
水痘帯状疱疹 ウイルス(VZV)	水痘、帯状疱疹	上皮細胞、神経細胞 (渗出液、血液)	90~95	水痘発症時に体内に潜伏し、加齢などが誘引となり帯状疱疹を発生
EBウイルス (EBV)	伝染性単核症、バーキットリンパ腫、胃がん	B細胞、上皮細胞 (唾液、血液)	70~90	T細胞、NK細胞に感染することがある
ヒトヘルペス ウイルス6型 (HHV6)	突発性発疹	T細胞 (唾液、血液)	95~100	ほとんどが、乳幼児期に感染し、日和見感染症の原因となる
ヒトT細胞嚮性 ウイルス1型 (HTLV-1)	成人T細胞性白血病、HTLV-1関連骨髄症	T細胞 (血液、母乳)	1	九州(特に南部)に多く5~7%が陽性、一部地域では30%以上が陽性
ヒト免疫不全ウイ ルス1型(HIV-1)	エイズ、エイズ関連症候群	T細胞、マクロファージ (血液、体液)	僅少	我が国では、感染者、エイズ患者ともに増えつつある
JCウイルス (JCV)	出血性膀胱炎、進行性多巣性白質脳症	尿管上皮細胞 (尿、まれに血液)	70以上	無症状でも時々尿中からウイルスが検出され、ときに末梢血からも検出される
バルボウイルス B19型(B19)	りんご病、赤芽球病	赤芽球(血液)	—	通常は一過性に症状が出た後治癒するが、持続感染患者は希にだが存在する

HBV, HCV, HTLVキャリア由来の原材料を製造施設に受け入れる事を前提に、受け入れ、細胞プロセッシング中や最終調製物のウイルス検査基準を定める必要である。再生医療のような新しい医療を実施するためには、利益と不利益のバランスを正しく評価することが大切である。原材料の受け入れ・培養過程で避けられないウイルス汚染の問題は、治療法の開発に際し原材料採取段階でのウイルス汚染の実態・製造段階でのウイルス増殖の有無・最終調製物への混入の有無などに関する定量的で科学的なデータを蓄積しておくことが望まれる。我々の研究室では、様々な医療機関との共同研究として、ウイルス汚染状況・培養中のウイルス動態・細胞との相互作用に

表3 指針などで検査が求められているウイルス

<p>★自己細胞を用いる場合(表1の(2), (4))</p> <ul style="list-style-type: none"> • 原材料となるヒト細胞・組織 HBV, HCV, HIV, HTLV • 最終製品 HBV, HCV, HIV, HTLV (患者の段階で否定し得ず、かつこれらのウイルスを増殖させる可能性がある細胞の場合)
<p>★同種細胞を用いる場合(表1の(3), (5), (6))</p> <ul style="list-style-type: none"> • 原材料となるヒト細胞・組織 HBV, HCV, HIV, HTLV, B19(必要に応じて: CMV, EBV, WNV) • 最終製品 HBV, HCV, HIV など (バンク化されておらず、ウインドウペリオドが否定できず、製造工程中で増殖させる可能性がある細胞を用いる場合)

関するデータ収集を目的として、ウイルス陽性検体のパイロット培養やウイルス添加試験を積極的に行っている。

1.2.2 製造工程におけるウイルス検査

製造工程におけるウイルス安全性に関しては、ヒト幹指針の「第4章 ヒト幹細胞の調製段階における安全性対策等」に記載されている。

細胞調製中のウイルス混入の可能性は、作業着、フィーダー細胞、トリプシンなどの細胞分散剤、培地・血清由来のものが考えられる。フィーダー細胞として使用されるマウスなどげっ歯類由来の細胞株には内在性レトロウイルスの遺伝子が存在し、ウイルス粒子を産生している場合もある。また、トリプシンへのブタウイルス混入や牛胎児血清へのウシウイルス混入の危険性もあり、そのようなリスクに十分に配慮し、フィーダー細胞の選択、安全性に配慮して飼育されている動物からの採取、十分なウイルスクリアランスを行って安全性が保証された細胞分散剤・血清の使用、などを考慮することが重要である。さらに、新興・再興感染症の発生を念頭においた対処法を予め考えておくことも必要であろう。一方、作業着からのウイルス混入は、細菌や真菌の汚染を起こさないような作業環境と作業手順を順守していれば問題とならないと考えられるが、作業着への感染事故が起きる可能性があるため(特にHBVなどの強い感染性を持つウイルス)、ドナーに持続感染しているウイルス種とその量に関する的確な情報を作業着に与えるとともに、ワクチン接種の励行や汚染事故および感染事故を防止できるような作業環境と作業手順を定めておくことが重要である。

ヒト幹指針の「第4章 1 品質管理システム」に、【(4)研究者等は、調製工程において複数の提供者からのヒト幹細胞等を同一培養装置内で同時期に扱わないこと、また、交叉汚染を引き起こすような保管方法を採用しないこと等により、取り違えや微生物等の伝播の危険性を避けなければならない】と規定されており、同時に同一の作業空間で複数の提供者からの細胞を扱うことを禁じ、クロスコンタミネーションの危険性を排除することとしている(自己・同種細胞を用いる

際の方針にも同様な記載がある)。また、「6 微生物等による汚染の危険性の排除」として、4つの方策を掲げ【適宜組み合わせることにより、微生物等による汚染の危険性を排除するものとする】と規定されている。4つの方策の中には、【(3)調製の各段階における必要性に応じた試験及び検査】とウイルス検査を求めると考えられる記述があるが、具体的な検査方法や対象ウイルスは明記されていない。

一方、血清から感染因子が混入する危険があり、自己および同種細胞を用いる際の指針には、第2章 第1の2(1)(3)に【異種血清及び異種もしくは同種の血清に由来する成分については、細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと】とし、使用が避けられない場合の考慮点が5つ挙げられている。なお、自己血清の使用は問題とはされていないが、血清の使用に際しては血清にも持続感染ウイルスが含まれる可能性があることに十分に配慮して作業者の安全性を確保するとともに、血清の取り違えによる感染事故の発生を防止する管理体制の構築が求められる。さらに、血清を使用する前に加熱あるいは放射線照射などのウイルスの不活化工程を加えることも検討するべきであろう。

1.2.3 最終調製物のウイルス検査

調製工程が終了した細胞は、細胞浮遊液あるいは細胞シートとして患者へ投与されるが、細胞分散や洗浄などの工程を経るのが一般的である。治療の安全性を確保するためには、投与形態の細胞の一部を検査用として分取し投与前にウイルス検査を行なうことが理想である。しかし、自己細胞を利用したオーダーメイド型の再生医療では患者に投与される細胞はロットを形成せず、また、一般に投与形態にした細胞は出来るかぎり速やかに患者に投与する必要があるため、最終調製物を直接検査することは困難な場合が多い。次善の策として、細胞を回収する前日に一部の細胞を分取してウイルス検査を行う・細胞の一部を回収できない場合には培養液の検査を行うなどの取り組みが行われている。また、開発段階で投与形態にした細胞製剤の一部を分取してウイルス検査を行い、データを収集する取り組みも行われている。検査結果が細胞の投与後に得られる場合には、検査陽性となった際の対処方法を予め決めておき患者の安全確保に適切に対処できる体制を構築しておくことが必要である。

ヒト幹指針には、「第4章 ヒト幹細胞等の調製段階における安全対策等」の第1の5(2)(3)に【ウイルス等の検査】としてウイルス検査が最終調製物の品質管理試験として例示されている。しかし、検査すべきウイルス種などの詳細は例示されておらず、自己・同種細胞を使用する際の指針を参考に検査項目を決めることになるだろう。自己細胞を使用する際の指針(表1の(4)、(6))では、第2章 第3の2(8)に【HBV、HCV、HIV、HTLVにつき、患者の段階で否定し得ず、かつこれらのウイルスを増殖させる可能性のある細胞の場合には、増殖可能性のあるウイルスについてその存在量に関する試験を実施し、体性幹細胞(iPS(様)細胞)加工医薬品等の投与が患者の不利益にならないことを確認する必要がある】と記載されている。一方、同種細胞を使用する際の指針(表1の(5)、(7))では、同様に【バンク化されておらず、ウインドウピリオドが否定できず、HBV、HCV、HIV等を製造工程中に増殖させる可能性のある細胞を用いる際には、中間

製品、最終製品等についてもウイルス等の存在を否定する適切な試験を実施すること】と記載されており、「等」の文字が入ることにより、培養中のウイルス増殖に一層の注意を払うことを求めている。また、免疫細胞療法細胞培養ガイドライン(表1の(2))では、「第4章 第8の7 ウイルス等の試験」で上記指針と同様にHBV、HCV、HIV、HTLVに関しその存否と増殖の可能性のある細胞では存在量に関する試験の実施を考慮することを求めている。また、(補足)として【その他、培養中に増殖することが確認されているウイルス種について、臨床上で問題となる可能性が否定できていない場合は、十分留意した上で……】と可能な範囲での検査の実施とリスクなどについての説明と同意の取得の必要性が記載されている。筆者は免疫療法に使用する活性化T細胞の培養中にEBVやHHV6などが増殖する例を経験しており、自己細胞の場合でも試験培養やウイルススライク試験によりその培養系におけるウイルス動態を把握し、大量のウイルスが投与されるような事態を避けるために適切な品質管理体制を整えておくことが望まれる。

1.3 再生医療のマイコプラズマ安全性確保

ヒト幹指針をはじめとした諸指針には【適切なマイコプラズマ否定試験を実施すること】と記載されており、マイコプラズマの否定試験は必須項目になっている。マイコプラズマ否定試験法は日本薬局方(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」に記載されており、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つの試験法を提示している。しかし、A法、B法は試験結果を得るまでに1週間~1月間を要することから、オーダーメイド医療である再生医療のマイコプラズマ否定試験法には不向きである。また、C法として例示されているPCR法は2段階(ネステッド)PCR法であり、キャリアオーバーコンタミネーションの危険性が高く、欧州・米国薬局方に記載の*Acholeplasma laidlawii*を検出できない欠点が明らかになっている。一方、欧州薬局方(EP)では、適切なバリデーションを行うことにより、PCR法を含む核酸増幅検査(NAT)を培養法又はDNA染色法の代替法として使用可能とし、そのためのバリデーション条件が提示されている²⁾。EP準拠のバリデーションに適合するとされるマイコプラズマ検出用PCR検出キットが複数市販されており、欧州では市販のPCRキットを製造工程管理に用いた医薬品が承認されている。

免疫細胞療法細胞培養ガイドライン(表1の(2))にも【マイコプラズマ否定試験については、最終調製物で検証を行う場合は核酸増幅法を推奨する】と記載されている。実際、現行のような特定のPCR法を示すのではなく、EPに準じてバリデーションの条件を示すという方向で検討するのが適当との考えが主流になっており、次期薬局方はその方向で改正する準備が進められているようである。筆者の研究室では新しいマイコプラズマ検査系の開発を進めており、EPで求められる性能を持つことを確認している。

1.4 新しいウイルス・マイコプラズマ検査系の開発と再生医療への応用

1.4.1 ウイルス検査系

細菌・真菌と違いウイルスはその増殖に特定の生細胞を必要とするため、培養法により多くのウイルスを同時に検査することは事実上不可能であり（培養法が確立されていないウイルスも多数存在する）、核酸増幅法により検査が推奨される。筆者の研究室では、各種指針に記載されているウイルス9種類を含め表2に示す持続感染ウイルスの同時・網羅的検査を可能にする新しい検査系の開発を行った。

検査系の作成に当たっては、多くのサブタイプがあることが知られているHBV、HCV、HIV、HTLV検査系では可能な限り検出漏れを回避するため、より多くのサブタイプを検出できる共通プライマーの選定に留意するとともに1反応系に多くのプライマー・プローブを投入するマルチプレックスPCR法を採用した。また、試薬の入れ忘れを防止するとともに作業者の手間を省くため、試薬を8 well stripに安定化剤とともに固相化する手法を開発し（図1）、検査に当たっては検体とバッファー・酵素などを含むプレミックスとの混合液により固相化試薬を溶解するだけで検査を行うことが可能である（固相化試薬は室温で6ヶ月間以上安定）。測定項目にはDNAウイルス・RNAウイルス・レトロウイルスが含まれるためRT-PCRの条件で検査を実施するが、そのような条件でもPCRとRT-PCR反応が良好に進むための酵素の選択や反応条件の設定を行っている³⁾。

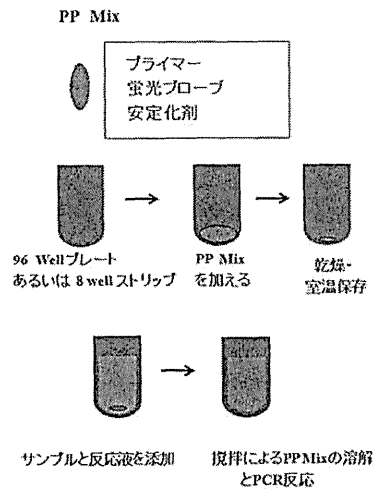
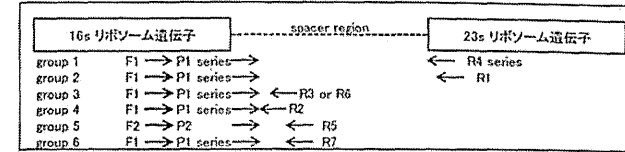


図1 固相化試薬の作成と検査実施



各グループの代表例

Group 1: *M. orale*, Group 2: *M. pneumoniae*, Group 3: *M. gallisepticum*, *U. urealyticum*, Group 4: *A. laidlawi*, Group 5: *S. citri*, Group 6: *M. synoviae*

forward primer	probe	reverse primer	target
F1	P1-1 or P1-3	R4-1	<i>M. arginalis</i> , <i>M. buccale</i> , <i>M. faucium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. salivarium</i>
F1	P1-1 or P1-3	R4-2	<i>M. fermentans</i> , <i>M. lipophilum</i> , <i>M. primatum</i>
F1	P1-1	R4-3	<i>M. hyothinis</i>
F1	P1-3	R7	<i>M. synoviae</i>
F1	P1-4	R1	<i>M. genitalium</i> , <i>M. pneumoniae</i>
F1	P1-1	R2	<i>A. laidlawi</i>
F1	P1-1	R3	<i>U. urealyticum</i>
F1	P1-2	R6	<i>M. gallisepticum</i>
F2	P2	R5	<i>S. citri</i>

図2 開発した新規マイコプラズマ検査法

1.4.2 マイコプラズマ検査系

マイコプラズマはMollicutes綱に属し、同綱に属するAcholeplasma, Ureaplasmaや Spiroplasmaも培養系への汚染の原因となり、欧州や米国薬局方に記載されている9種類に含まれるため、マイコプラズマ検査系はこれらを網羅的に検出できる性能を持つことが求められる（本節ではこれらを総称してマイコプラズマと記す）。筆者らの研究室では、3極薬局方記載の9種類を含む142種類が検出可能（遺伝子配列からの推定）なりアルタイムPCR検出法を開発した（図2）。本検査系はプライマー11種類とプローブ5種類を1つの反応系に投入するマルチプレックスPCR法で、局方記載の9種類に加えて合計17種類のマイコプラズマを10 cfu/mlの感度で検出可能なことを確認している。

1.4.3 ウイルス・マイコプラズマ同時検査系

作成したウイルス検査とマイコプラズマ検査を同時に実施することも可能である。図3に作成した同時検査試薬の1例を示す。16種類のプライマー・プローブを使用するマイコプラズマ検査系を1well目に、2well目から6well指針に記載されているウイルスを、7well目に頻繁に検出されるヘルペスウイルス属のウイルスの検査系を配している。この検査系では最大3項目のマルチプレックスPCR検査系となっている。すでに記したようにウイルス検査系やマイコプラズマ検査系は複数のプライマー・プローブを含むマルチプレックスPCR/RT-PCR系であるが、使用する酵素・バッファー・反応条件を工夫することにより同時検査が可能である。本検査試薬や持続感染ウイルスを網羅した検査試薬（HHV1-8, BKV, JCV, AdV, B19, HBV）なども作成し、細胞製剤の安全性検査の他に移植患者の日和見ウイルス感染症の検査に用いている。

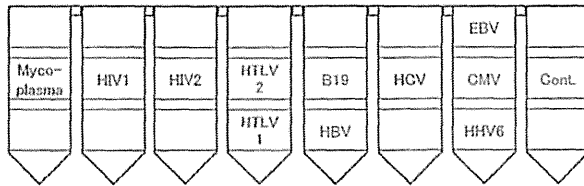


図3 ウイルス・マイコプラズマ同時検査試薬の1例

1.5 細胞培養工程におけるウイルス動態の検討

再生医療に用いる細胞製剤のウイルス検査項目が確定していないのは、様々な細胞を原材料とする培養系があり、その培養系へのウイルス混入の割合や混入ウイルスの培養系での動態などに関するデータが不足していることが原因の一つである。また、細胞製剤は、滅菌できない・自己細胞を使用する場合ロットを形成しないため抜き取り検査が出来ないなど、従来の医薬品製造の安全管理に対する考え方では対処できないため、臨床研究を行う前にウイルス混入の危険性や培養段階でのウイルス増幅の有無などを明らかにし、リスク情報として患者に十分に説明して同意を得ることが必要である。そのためには、原材料のウイルス検査やウイルス陽性の原材料を積極的に培養し、ウイルスが細胞培養に与える影響やウイルス動態に関するデータを蓄積しておくことが重要である。

筆者の研究室では、再生医療の実用化を目指す医療機関や企業との共同研究として、原材料のウイルス検査・ウイルス陽性患者由来細胞の試験培養・培養系に積極的にウイルスを添加するウイルススパイク試験を実施し、ウイルス汚染の頻度、細胞培養に与える影響、培養系でのウイルス動態に関するデータを取得・蓄積する試みを進めている。これまでの研究では、原材料に混入するウイルスとしてEBV、HHV6、B19の頻度が多いこと、特に造血幹細胞培養系ではB19が、骨髄由来間葉系幹細胞培養系ではCMVの感染増殖に注意すべきこと、などが明らかになっている。

1.6 おわりに

すべての成人には様々な微生物が複数持続感染していたため原材料へ混入する危険性を排除できず、しかも最終製品を滅菌できない再生医療の特質をよく理解した上で再生医療の微生物安全性確保を考える必要がある。本節にも記したように、開発段階でのウイルス・マイコプラズマ検査データの取得と陽性ドナー由来の原材料の試験培養やスパイク試験などにより積極的にデータを蓄積する取り組みが重要である。再生医療のような新しい治療法を確立するためには、治療のリスクとベネフィットの比重を考えることはきわめて重要であるが、そのためにも微生物混入のリスクを正しく評価するためのデータの蓄積が欠かせない。

筆者は、科学技術振興機構（JST）が実施中の再生医療実現拠点ネットワーク事業・再生医

療実現拠点ネットワークプログラム・技術開発個別課題「iPS細胞・体性幹細胞由来再生医療製剤の新規品質評価技術法の開発」（代表研究者 森尾友宏）の分担研究者として開発したウイルス・マイコプラズマ検査系の実用化を目指しており、近日中に大手試薬メーカーから検査キットをリリースする方向で調整している。また、再生医療実施施設との共同研究として、ウイルス・マイコプラズマ検査の受託とデータ蓄積、さらに、細胞の試験的培養とウイルス・マイコプラズマ検査やスパイク試験の実施や技術移転・検査試薬の提供も積極的に行なっている。

（共同研究の申し込みや検査系に関する質問などの連絡先：東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ウイルス治療学 清水則夫 nshivir@tmd.ac.jp）。

文 献

- 1) 小林哲, 遊佐敬介, 川崎ナナ, ウイルス等感染性因子安全性評価に関する研究, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 131, 7-15 (2013)
- 2) European Pharmacopoeia: 2.6.7, *Mycoplasmas*, EP 7.0, p156 (2011)
- 3) 清水則夫, 渡邊健, 外丸靖浩, 原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド 最強のステップUPシリーズ, 北條浩彦編, 「実践編—プロトコールを中心に—IV章 遺伝子量解析15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」, p192-202, 羊土社 (2013)

特集 (日本薬局方)

生物薬品の局方収載の現状と課題

Current Status and Issues of Biologicals in Japanese Pharmacopedia

川崎 ナナ

Nana KAWASAKI

Abstract

Because of recent changes in the therapeutic regimens for various diseases, the Japanese Pharmacopoeia (JP) monographs have begun to include more biotechnological drugs and synthetic peptides. Insulin glargine and leuprorelin acetate have been listed in the latest version as the ninth biotechnological drug substance and the sixth synthetic peptide drug, respectively. Meanwhile, state-of-the-art science and technology, including NMR, capillary electrophoresis, and *in vitro* assay, have been utilized for the quality control in the drug monographs. International harmonization is underway for some of the test methods, including electrophoresis and peptide mapping. Specifications in some of the existing monographs will be partially revised, such as purity tests for human menopausal gonadotropin and vasopressin. Glycan analysis and biological activity tests are being drafted by industry-government-academia research groups. The next challenges in JP Biologicals will be adapting a quality-by-design approach to the JP monographs, and providing quality control for the monoclonal antibodies that are not listed in the JP monographs.

抄 録

臨床現場での実績を反映して、JP各条に収載されるバイオ医薬品や合成ペプチドの割合が増えている。第十六改正第二追補には9品目目の遺伝子組換え医薬品であるインスリングルルギンや、6品目目の合成ペプチドであるリュプロレリン酢酸塩などが収載される予定である。同時に、医薬品各条では、キャピラリー電気泳動、NMR、及び培養細胞を利用した試験法など、新しい技術が用いられるようになってきている。また、電気泳動法やペプチドマップ法の改正に向けた国際協力、下垂体性腺刺激ホルモンやバソプレシンの純度試験など既収載各条の部分改正、及び糖鎖試験法や生物活性試験法など産官学共同による各種試験方法の原案作成が進んでいる。今後の課題は、クオリティ・バイ・デザインで品質管理される医薬品への対応、及び、各条収載されていない抗体医薬品の品質管理方法をどのように示していくかであろう。

Key words: Japanese Pharmacopoeia, biologicals, biotechnological drug substance