

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

論文発表

1. Hagiwara K, Ando T, Koiwa M. The Influence of Borna Disease Viral Infection on Dairy Cow Reproduction. *J Vet Med Sci.* 2012 29; 74(4): 419-421.
2. Kanai Y, Miyasaka S, Uyama S, Kawami S, Kato-Mori Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K. Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. *BMC Res Notes.* 2012 Jan 5; 5(1): 4.
3. Hagiwara K, Kawami S., Kato-Mori Y., Kubota-Koketsu R., Tsujikawa M., Urayama T., Yunoki M., Takahashi K., Ikuta K. Protective Role of Human Intravenous Immunoglobulin from Influenza A Virus Infection in Mice. *The Open Hematology Journal*, 2012, 6, 8-11
4. Higuchi H, Gondaira S, Iwano H, Hirose K, Nakajima K, Kawai K, Hagiwara K, Tamura Y, Nagahata H. *Mycoplasma* species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. *Vet Rec.* 2013; 172(21): 557.
5. ○加藤(森) ゆうこ, 柚木 幹弘, 生田 和良, 萩原 克郎. 血液製剤の安全対策-プリオン除去の現状-. *モダンメディア* 2013; 59(9): 231-237.
6. 高橋一恵、大久保祐士、古木理恵、服部眞次、浦山健、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎、生田和良. 由来の異なる E 型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて. *血液事業*, 2013; 36(3): 679-685.

学会発表

- 1) ○久保 純、上平 崇、坂井 薫、Larisa Cervenakova、柚木 幹弘、萩原 克郎、生田 和良. バイオ医薬品の製造工程におけるマウス馴化型 vCJD 株とハムスター馴化型 Scrapie 株の挙動. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (2012.11.13-15, 大阪)
- 2) Speaker: Mikihiro Yunoki. Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. HEV Prevention, Inactivation and Removal Strategies. *Pathogen Clean Asia Summit* 2013, 15-16 May 2013 Shanghai.

- 3) Speaker: Mikihiro Yunoki. Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during manufacturing processes of plasma derivatives. *Bioplasma World Asia* 2013, 3-4 Sep 2013, Bali, Indonesia.
- 4) 小林不二夫、上園昭人、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎. グロブリン存在下におけるインフルエンザウイルス感染細胞の炎症性因子産生に対する影響. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (2013 年 11 月、神戸) .
- 5) 鈴木瑞穂、加藤(森) ゆうこ、浅川満彦、柚木幹弘、生田和良、萩原克郎. NAT 法の違いによる野外サンプルからの E 型肝炎ウイルスの検出感度の違い. 第 61 回日本ウイルス学会総会 (2013 年 11 月、神戸)
- 6) Speaker: Mikihiro Yunoki
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Pathogen inactivation in plasma derivatives. Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during liquid heating steps of plasma derivatives. *IPFA/PEI 21st International Workshop on "Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens"*. 2014, Rome.
- 7) Speaker: Mikihiro Yunoki
Co-authors: Katsuro Hagiwara, Kazuyoshi Ikuta. Experiences of HEV elimination during the manufacturing process steps and the suitable model viruses. *Workshop on Viral safety of plasma-derived medicinal products with respect to hepatitis E virus.* 13 October 2014. *CHMP/BWP/196177/2014 Biologics Working Party (BWP)*. 2014, London.
- 8) ○加藤(森)ゆうこ、上平崇、坂井薫、柚木幹弘、岡本実、萩原克郎. 変異型クロイツフェルトヤコブ病 (vCJD) 持続発現細胞プリオン蛋白のマウスへの伝達性. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014, 横浜.
- 9) 池川礎令、皆木隆男、井手野祥次、坂井薫、柚木幹弘、宮本尚、大場徹也、川浪雅好、脇坂明美. 日本血液製剤機構 (JB) における原料血漿の HEV 陽性率. 第 38 回日本血液事業学会. 2014, 広島.
- 10) ○上平 崇、久保 純、大久保祐士、坂井 薫、加藤(森) ゆうこ、萩原克郎、柚木幹弘. マ

ウス馴化 vCJD を用いた血漿分画製剤工程のプリオン除去。第 38 回日本血液事業学会。2014, 広島。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
 特許取得：なし
 実用新案登録：なし

I. その他：

本研究は一般社団法人日本血液製剤機構との共同研究として実施した。本研究に用いた mo-vCJD 株は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova より分与された。

図1 ろ過実験及び接種材料調製概略

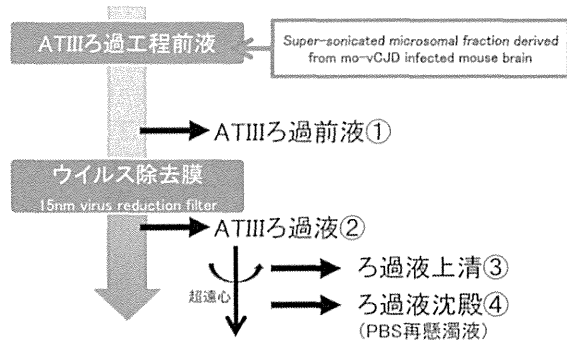
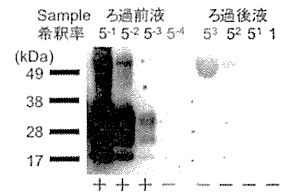


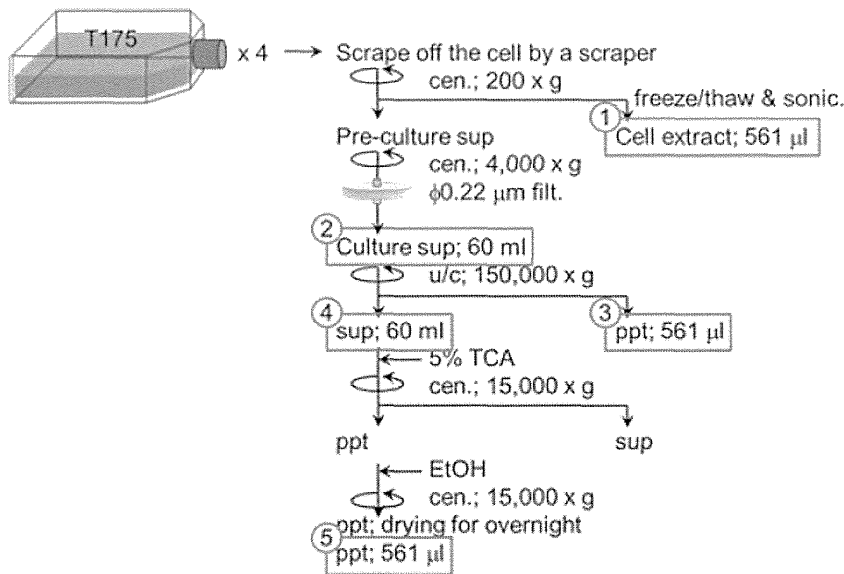
表1・図2 15nm フィルターろ過結果 (WB)

mo-vCJD (sMF)	
ろ過前	2.5
ろ過後	< -0.3
LRV	≥ 2.8



* 数値表記はWestren Blot法によるタイターの log₁₀
 * sMF; super-sonicated microsomal fraction
 * LRV; Log reduction value

図3 vCJD 感染細胞由来プリオン材料調製方法フロー



mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 から、細胞抽出画分①、培養液の超遠心沈殿画分③、超遠心上清画分の TCA 沈殿⑤（プリオン材料）の調製方法。それぞれの画分は 1%脳乳剤 1 mL に相当する細胞数である 5×10^7 cell/ml（検体量として 561µl）に調製した。

表 2 ATIII 製剤 15nm フィルターろ過サンプルのマウス接種試験結果

group No.	Inoculum		BW (g)		WB		HE		IHC	
	dilution	Ti or Endpoint dpi	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

表 3 WB 法と BA 法判定による感染価の算出とその比較

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

図 4. プリオン感染マウス脳 of HE 染色像および免疫染色像

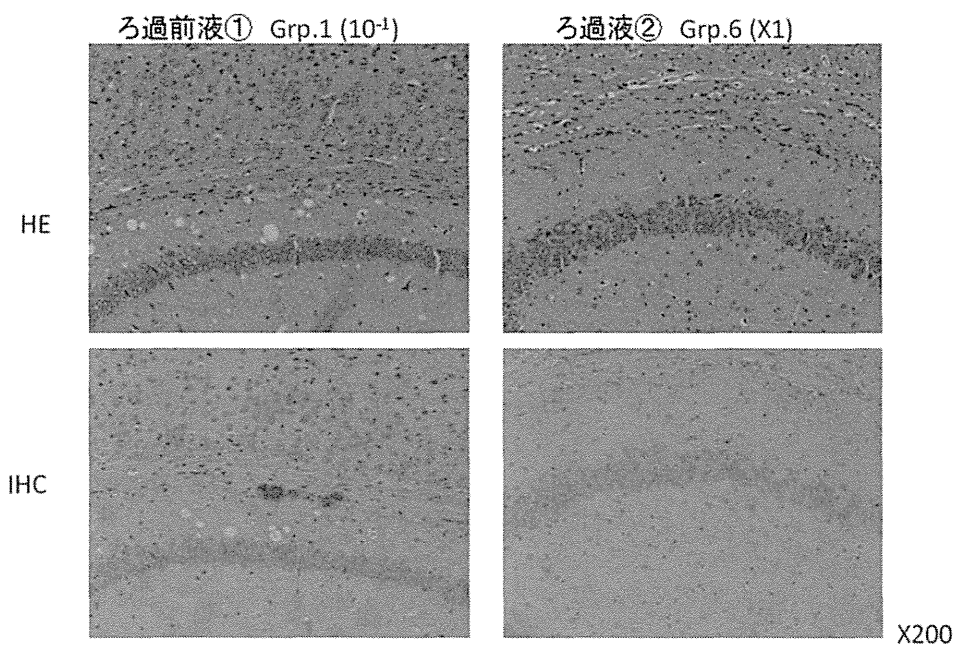


表 4. mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 より調製した細胞抽出画分 (cell extract)、培養液の超遠心沈殿画分 (u/c-p)、超遠心上清画分の TCA 沈殿 (u/c-s-TCA) を感染させた動物の所見

	動物番号	観察期間 (dpi)	HE 染色所見	免疫染色所見	脳検体 WB PrP ^{Res} 検出
Cell extract	1-1	202	+	+	+
	1-2	202	+	+	+
	1-3	175	+	+	+
	1-4	181	+	+	+
	1-5	202	+	+	+
	1-6	181	+	+	+
	1-7	195	+	+	+
	1-8	195	+	+	+
	1-9	180	+	+	+
	1-10	195	+	+	+
u/c-p	2-1	202	+	+	+
	2-2	202	+	+	+
	2-3	202	+	+	+
	2-4	202	+	+	+
	2-5	202	+	+	+
	2-6	202	+	+	+
	2-7	202	+	+	+
	2-8	202	+	+	+
	2-9	202	+	+	+
	10	202	+	+	+
u/c-s-TCA	3-1	202	-	-	-
	3-2	202	-	-	-
	3-3	124	-	-	-
	3-4	202	-	-	-
	3-5	202	-	-	-
	3-6	202	-	-	-
	3-7	124	-	-	-
	3-8	202	-	-	-
	3-9	153	-	-	-
	3-10	153	-	-	-
	3-11	202	-	-	-

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3株を樹立した。最もリン酸化プリオンペプチドに対する特異性が高いpSP279抗体を用いてイムノブロット法では、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に比較して低かった。

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。

本研究で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。pS43に対する反応性の比較は、ペプチドを架橋剤MBSでウシ血清アルブミン(BSA)に結合させたpS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (Fig. 1A)又はhPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (Fig. 1B)を固相抗原として用いたELISAで行った。

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、

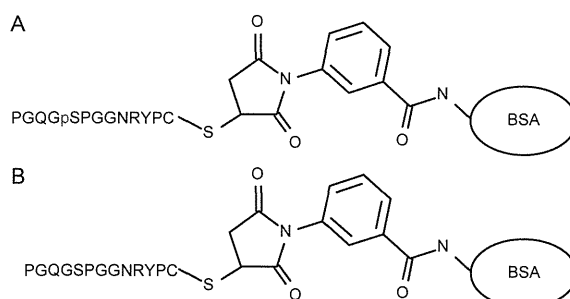


Fig. 1. Schematic diagram of antigens.

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、第1抗体に抗PrP抗体6H4 (ロシュ・ダイアグノスティックス)、抗p43S-hPrP (39-50)-BCIP抗体又は発現解析のコントロールとしてマウス抗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

Table 1. 抗リン酸化プリオン蛋白質抗体の特異性

抗体	アイソタイプ	抗体価*		比率
		固相抗原		
		リン酸化プリオンペプチド	プリオンペプチド	
pSP240	κ, γ2b	2,941	2,000	1.5
pSP279	κ, γ2b	2,500	294	8.5
pSP289	κ, γ2b	1,111	233	4.8

*IgG 200µg/ml

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。

次に、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(Fig. 2, Table 1)。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)は8.5を示し、pS43を含む配列に対する特異性が最も高かった。pSP289の比率も4.8と比較的高かった。一方、pSP240は高い抗体価を示したが、その比率は1.5で、特異性は低かった。

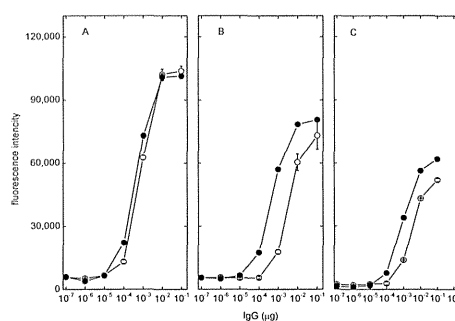


Fig. 2. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP antibodies were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (○) as coating antigen. A, pSP240; B, pSP279; C, pSP289.

2. イムノブロット法によるpS43-PrP^{Sc}の検出

抗体のリン酸化PrPに対する特異性は、正常及びPrP^{Sc}感染マウス脳乳液を用いたイムノブロット法で調べた。脳内にスクレイピー(obihiro株)を接種されたマウスは、その脳内にPrP^{Sc}を蓄積し、4-5か月後に死亡する。本研究ではエンドポイント直前の4か月でマウスを安楽死させ、PrP^{Sc}感染脳及び溶液のみを投与した対照脳(mock)を調製し、イムノブロット法に用いた(Fig. 3)。抗プリオン蛋白質抗体6H4を用いたイムノブロット法(Fig. 3A-C., upper panel)は、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(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 mAbのイムノブロット法(Fig. 3A-C., upper panel)では、対象脳の単量体を認識せず、2量体PrPに相当するバンドを認識した(lane 1)。PrP^{Sc}の認識は対象脳より弱く(lane 3)、N端側が消化されるPK処理ではバンドが消失した(lanes 2 and 4)。

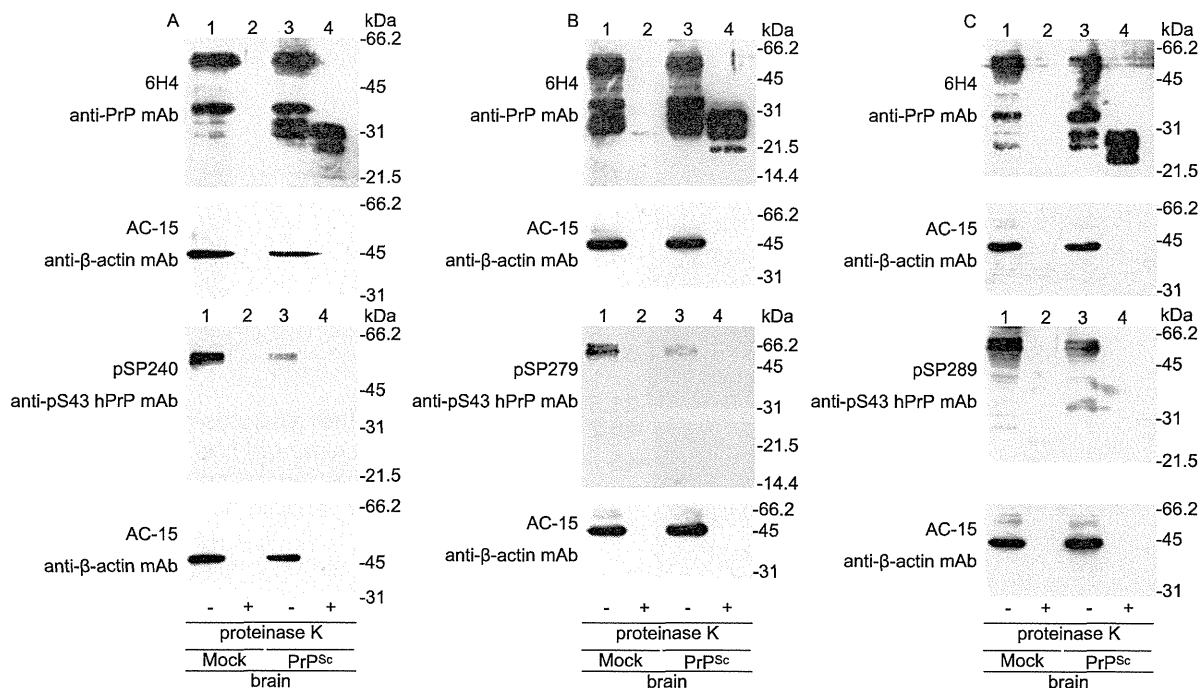


Fig. 3. Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}. The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. (A) Formation of a protease-resistant form of PrP in mouse brain. Methanol-precipitated brain lysates (50 μ g protein) were treated with proteinase K (50 μ g/ml) at for 30 min at 37°C. (lanes 2 and 4) or left undigested (lanes 1 and 3). All lysates were subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or anti-pS43 hPrP mAbs (A, pSP240; B, pSP 279; C, pSP289).

3種類の抗リン酸化プリオンペプチド抗体は、2量体のPrPを同様に認識したことから、以降の実験には、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pSP279を用いて行った。

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. 4A and C)は、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(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. 4B 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 μ g/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

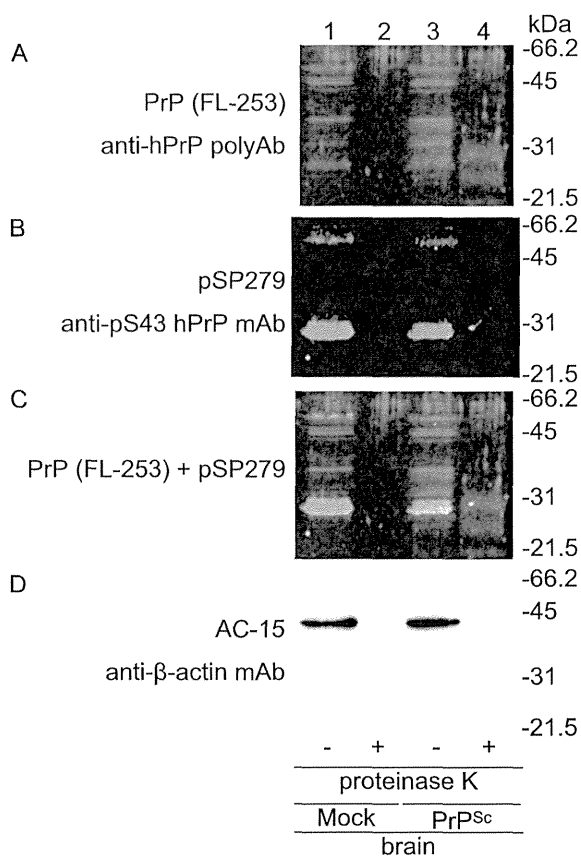


Fig. 4 Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}.

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).

Table 2. 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

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

する抗体の候補として、リン酸化プリオンペプ

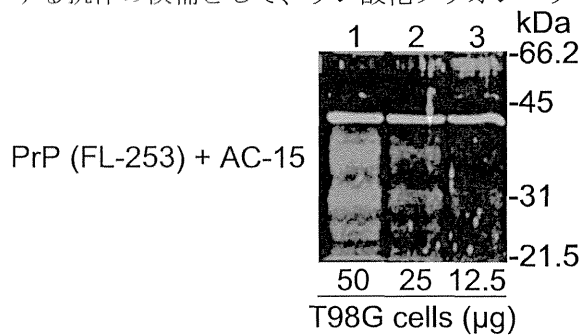


Fig. 5 Immunoblot analysis of human PrP^C.

Human glioblastoma cell line T98G whole-cell lysates were subjected to Immunoblot with PrP (FL-252) (orange) and AC-15 (green) antibodies.

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種類のマAb (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モノクローナル抗体6H4及び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。従来の第2抗体に結合させたHRPによる化学発光法で検出する実験系では、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。そこで、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、化学発光法では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。近赤外蛍光法では、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、本研究ではイムノブロット法で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。イムノブロット法で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

1. Sei-ichi Yusa, José B. Oliveira-Martins, Yoshiko Sugita-Konishi, Yutaka Kikuchi: Cellular Prion Protein: From Physiology to Pathology, 2012, *Viruses* **4**, 3109-3131.
2. Yutaka Kikuchi, Takahiro Ohnishi, Hiroko Furusawa, Takao Kawai, Yutaka Fukuda, Hiroshi Yokoyama, Yoshiko Sugita-Konishi: ELISA Detection of *Kudoa septempunctata* in Raw *Paralichthys olivaceus* (Olive Flounder) using a Chicken Anti-*Kudoa* Antiserum. 2013, *Biocontrol Science* **18**, 193-197.
3. Takahiro Ohnishi, Yutaka Kikuchi, Hiroko Furusawa, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi: *Kudoa septempunctata* Invasion Increases the Permeability of Human Intestinal Epithelial Monolayer. 2013, *Foodborne Pathog. Dis.* **10**: 137-142.

2. 学会発表

1. 菊池裕, 遊佐精一, 中島治, 手島玲子, 小西良子, 山口照英: リン酸化セリンを含むプリオン蛋白質を認識する抗体に関する研究、第85回日本生化学会大会、平成24年12月14-16日、福岡市
2. 玉川萌笑, 遊佐精一, 中島治, 手島玲子, 辻勉, 小西良子, 菊池裕: PrP遺伝子欠損細胞株HpL3-4に導入したヒツジプリオン蛋白質の解析、第85回日本生化学会大会、平成24年12月14-16日、福岡市
3. 菊池裕、豊田淑江、遊佐精一、窪崎敦隆、山口照英: 低酸素条件下で誘導されるスプライス変異GPIアンカー欠損型プリオン蛋白質の発現、第1回低酸素研究会、平成25年7月6日、東京都新宿区
4. Ohnishi T, Kikuchi Y, Yoshinari T, Yamazaki A, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: Invasion of *Kudoa septempunctata* increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. IAFP European Symposium (2013.8)
5. 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

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 青笹正義
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
衛生微生物部 窪崎敦隆

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。

日本薬局方、欧州薬局方及び米国薬局方には三薬局方調和合意に基づき規定した無菌試験法があり、ロットを構成する一般的な医薬品の出荷時判定に用いられている。欧米薬局方にはロットを構成しない細胞由来製品に対する無菌試験法も収載されているが、日本薬局方にはない。加えて、欧米薬局方では細胞由来製品の無菌試験法に微生物の迅速検出技術の適用を認め、代替微生物試験法も収載されている。一方で日本薬局方には、蛍光染色による細菌数の迅速測定法及びPCR法を利用した試験法が参考情報に収載されている。日本で行う再生医療等製品の無菌試験には、蛍光染色による細菌数の迅速測定法と、バリデーションを実施した上で核酸増幅検査の適用が考えられることより、以下に無菌試験への適用に必要な諸条件を考察した。また、微生物の迅速検出技術の進歩は速く、今後、科学的根拠が明確なものについては、このような新手法の利用も期待されることから、採用にあたっての留意点について考察した。

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。

B. 研究方法

1. 菌株

第十六改正日本薬局方 一般試験法 無菌試験法¹⁾表 4.06-1 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 *Staphylococcus aureus* NBRC 13276、*Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Clostridium sporogenes* NBRC 14293、*Candida albicans* NBRC 1594 及び *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9455 を含む 13 菌株

を選択し (Table 1)、独立行政法人製品評価技術基盤機構 NBRC (Biological Resource Center、NITE) から購入して PCR 試験用菌株とした。

2. 鋳型 DNA の調製

鋳型 DNA の調製は、日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法²⁾に準じて行った。液体培地で培養した細菌又は真菌を遠心分離後、菌体を 10 倍容量の滅菌精製水に懸濁して熱処理 (96°C、5 分間) し、遠心分離して得た上清を測定用テンプレートとした。

3. PCR

PCR は、日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法²⁾に準じて行った。用いたプライマーを Table 2 に示した。PCR 反応液に加熱処理した菌液の DNA 抽出物を加え、細菌の場合は 10F/1500R、10F/800R、800F/1500R 又は 525F/800R プライマーセットを、真菌の場合は ITS5F/D2R プライマーセットを添加して以下の条件で PCR を行った。細菌は 94°C、30 秒→55°C、60 秒→72°C、60 秒の反応を 30 サイクル、それぞれ約 1500bp、800bp、700bp 又は 250bp の DNA 断片が増幅生成した。真菌は 94°C、30 秒→52°C、40 秒→72°C、70 秒の反応を 35 サイクル、1200bp の DNA 断片が増幅生成した。反応終了後の PCR 液 5µL を 1µL のローディング緩衝液と混合し、アガロースゲルのウェルに添加し、1 倍 TAE 緩衝液を用いて電気泳動する。泳動後、トランスイルミネーターで観察した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、「ヒトゲノム・遺伝

Table 1. PCR 試験用菌株

No.	菌種	株
細菌		
1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	NBRC 100797
2	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	NBRC 102204
3	<i>Kocuria rhizophila</i>	NBRC 12708
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBRC 12993
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NBRC 13275*
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	NBRC 13276*
7	<i>Proteus mirabilis</i>	NBRC 13300
8	<i>Clostridium sporogenes</i>	NBRC 14293*
9	<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC 3134*
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NBRC 3512
11	<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972
真菌		
12	<i>Candida albicans</i>	NBRC 1594*
13	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	NBRC 9455*

*日局 16 一般試験法 無菌試験法¹⁾表 4.06-1 収載菌株

Table 2. PCR 試験用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F ^{2)*}	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	525F ³⁾	5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTA-3'
	800F ^{2)*}	5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
	800R ^{2)*}	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
	1500R ^{2)*}	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'
真菌	ITS5F ⁴⁾	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
	D2R ⁵⁾	5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3'

*日局 16 参考情報 遺伝子解析による微生物の迅速同定法²⁾収載プライマー

子解析に関する倫理指針」、「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

1. 無菌試験法

無菌試験は、検体又は試料を規定の方法で処理し培養することによって、培地で増殖する検体又は試料に由来する微生物の有無を確認する試験である。日局 16 一般試験法は医薬品の出荷判定試験として遵守すべき試験法で、無菌試験法¹⁾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される。日局 16 の無菌試験法は、液状チオグリコール酸培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いて、検体又は試料をメンブランフィルター法又は直接法によって 14 日間以上培養し、肉眼的な微生物の増殖があるかどうかを調べると規定されている。また、本試験法は一定以上の製造量があつ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されることから、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されている。

2. 再生医療等製品に対する無菌試験法

細胞・組織加工製品などの再生医療等製品は、一般に製造から使用までの期間が短いことから、試料又は検体を 14 日間以上培養する無菌試験法を適用することは難しい。欧州薬局方 (European Pharmacopoeia, EP) では一般的な医薬品を対象とした無菌試験法とは別に、細胞由来製品の微生物管理が規定され (EP Chapter 2.6.27, Microbiological control of cellular products.)⁶⁾、自動化された検出法では 7 日間の培養を、肉眼での確認には 14 日間の培養を必要としている。しかし、細胞由来製品は製造から 2 日以内に出荷することが多いことから、緊急の改定が要望されて現在改定作業が進んでいる (Emmanuelle Charton、私信)。FDA は、細胞由来製品は保管期間が短いことから、従来の無菌試験法 (21 CFR 610.12 Sterility)⁷⁾より迅速な無菌試験法を開発し、それらの検証が必要と発出している⁸⁾。

一方、日局には細胞由来製品に特化した微生物管理試験はないことから、再生医療等製品の出荷判定には、一般的な医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品と同じく、無菌試験法が科せられる。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.)⁹⁾。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¹¹⁾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¹²⁾ B. 指標細胞を用いたDNA染色法として記載されている (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¹³⁾。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¹⁴⁾。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¹²⁾ C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法と

して記載されている (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²⁾に記載されている。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^{15,16)}。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^{17,18)}。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記載された細菌 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記載のプライマーセットを用いた反応で、無菌試験法記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、無菌試験法記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¹⁰⁾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

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 ¹¹⁾	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* ¹²⁾ 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 ²⁾	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* ¹²⁾ 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¹²⁾

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 2.6.27⁶⁾は日局の一般試験法に相当し、EP chapter 5.1.6⁹⁾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 5.1.6⁹⁾に記載されており、それらの一部は測定の実動化がなされ、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」が施行され、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.)¹⁹⁾。日局16参考情報にも分析法バリデーション²⁰⁾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

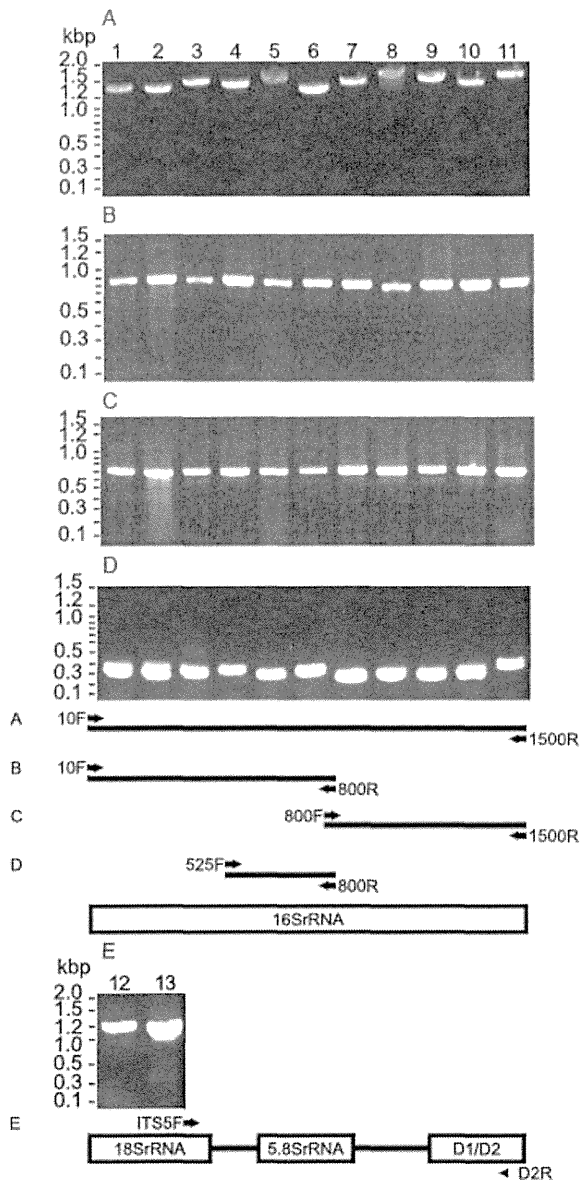


Fig. 1. PCRによる細菌 16SrRNA 遺伝子と真菌 18SrRNA-D2 領域遺伝子の検出

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 2.6.27⁶⁾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 μ 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²¹⁾。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 2.6.27⁶⁾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 以上の場合に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記載した EP chapter 5.1.6⁹⁾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>¹⁹⁾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」の新規記載が検討されている²²⁾。平成 26 年 9 月 1 日に公表された第十七改正日本薬局方記載原案で、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²³⁾。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、増殖能をガス発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・細菌量測定の際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。

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 2.6.27⁹⁾は、日局 16 の一般試験法に相当する general chapter に記載されている。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」の施行に伴い、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記載が望まれる。

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が施行され、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²⁴⁾。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^{25,26)}。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。

施行された「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。同じく施行された「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. 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。

F. 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. 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
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
 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
 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. Pharmacopeia 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
 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. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 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>
- G. 健康危険情報**
なし
- H. 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
- 3) 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

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

J. 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

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

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(医薬品等規制調和・評価研究事業))
分担総合研究報告書

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て試験を適用する際の評価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、特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(塙) 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

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

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。再生医療等製品でも、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、日局参考情報の試