

厚生労働行政推進調査事業費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
生物学的製剤基準のあり方に関する研究

分担研究報告書

マイコプラズマ否定試験の国際的調和に関する研究

研究分担者 石井 孝司 国立感染症研究所 品質保証・管理部 部長
研究協力者 見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨：マイコプラズマは自己増殖能を持つ最小のバクテリアで、ヒト、哺乳類、爬虫類、昆虫、植物等に寄生して広く存在する。培養細胞を汚染した場合、細胞に対して増殖や代謝機能抑制等の悪影響を与える場合があり、また汚染された培養細胞を用いて生産されるワクチン等の生物学的製剤に混入する可能性もある。生物学的製剤がマイコプラズマにより汚染されていないことは、その安全性を担保する上で重要であり、マイコプラズマ否定試験は、日本薬局方（JP）、生物学的製剤基準（生物基）、欧州薬局方（European Pharmacopoeia, EP）、米国薬局方（United States Pharmacopeia, USP）等各国の薬局方に収載されている。しかしながら、これらの局方等に収載されている試験法には異なる点も多く、国際的調和の観点から、JPや生物基の試験法を他の基準と調和させる必要性が唱えられている。本研究では、生物基のマイコプラズマ否定試験法について、調和のために考慮が必要なポイントについて検討した。

A. 研究目的

マイコプラズマは自己増殖能を持つ最小のバクテリアである。ゲノムサイズが550~1400kBp程度と非常に小さく、細胞壁を欠損している。ヒト、哺乳類、爬虫類、昆虫、植物などの真核生物細胞に付着して寄生し、病原菌であるものも多い。

マイコプラズマは0.22 μ m フィルターを通過するため、細胞培養用の培地を濾過滅菌しても除去できず、培養細胞を汚染することがある。その場合、細胞に対して増殖や代謝機能抑制等の悪影響を与える場合が多い。このような細胞を用いて生産されたワクチン等の生物学的製剤には、マイコプラズマが混入している可能性があり、製剤

の安全性を確保するためには、マイコプラズマの汚染がないことを調べる必要がある。

製造工程で用いられる培養細胞にマイコプラズマの汚染がないことを示すために、マイコプラズマ否定試験が行われる。日本においてはJPと生物基に本試験が記載されており、EP、USPにも本試験は記載されている。近年、薬局方に収載されている試験法については、薬局方検討会議においてJP、EP、USP（三薬局方）間の国際調和の推進が図られており、また、日米EU医薬品規制調和国际会議（The International Council for Harmonisation, ICH）が組織され、品質、安全性及び有効性の各分野での調和の促進を図るための活

動も行われている。これらの基準には、マイコプラズマ否定試験法の種類として3種（培養法、指標細胞を用いた染色法、核酸増幅法。ただし USP のみ酵素蛍光法も記載あり）が記載されているが、中でも特に日本の生物基に一般試験法として収載されている試験法は他の基準と比較してかなりの違いがあり、上記の調和を図るには難しい点が多い。

米国あるいは欧州のメーカーが製造販売する生物学的製剤は、USP あるいは EP に記載されているマイコプラズマ否定試験を準用して品質管理を行っているが、これらの試験は生物基に記載されている手法と異なるため、一般試験法のマイコプラズマ否定試験を準用することができず、個別に記載せざるを得ない。しかしながら、生物基の記載を EP、USP の記載に揃えようとすると、現在の一般試験法を用いている国内メーカーに多大な影響が出ることになる。

本研究では、上記のような問題点の解決を目標として、生物基のマイコプラズマ否定試験法を三薬局方と調和させようとする観点で見た場合に、特に重要と思われる点について検討を行った。

B. 研究方法

生物基、JP、EP、USP に記載されているマイコプラズマ関連試験の比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要となる事項はない。

C. 研究結果

各基準のマイコプラズマ関連試験（表 1）生物基、JP、EP では、「マイコプラズマ否定試験法」として、A 培養法、B 指標細胞法、C 核酸増幅法の記載がある。USP では、<63> Mycoplasma Tests に A 培養法と B 指標細胞法が記載されており、<1127> Nucleic Acid-Based Techniques - Amplification の C 核酸増幅法と D 酵素蛍光法が、マイコプラズマの試験としても使用できるとされている。

A 培養法について（表 2）

EP と USP では 3 種類の培地を記載しており、検出しようとするマイコプラズマ種に応じて使い分けする。一番汎用的なのは Hayflick 培地であり、これが使われる場合が多いと考えられる。JP では「生物学的製剤基準に記載されているものを参考にする」とされている。

生物基のマイコプラズマ否定試験用培地は、組成的には Hayflick 培地と同等と考えてよい。「マイコプラズマ否定試験用培地 I」はブドウ糖を添加しており、「マイコプラズマ否定試験用培地 II」はアルギニンを添加している。ブドウ糖とアルギニンを添加することによって、マイコプラズマが増殖した時の培地の色調変化がわかりやすくなり、判定はしやすくなる（ブドウ糖分解性マイコプラズマがブドウ糖添加培地に増殖すると pH 変化で黄色へ、同様にアルギニン分解性マイコプラズマがアルギニン添加培地に増殖すると赤色への変色ははっきり見られる）。検出されたマイコプラズマがブドウ

糖分解性かアルギニン分解性かわかれば、種の推定にも役立つ。EP、USP では培地にブドウ糖とアルギニンを添加していない。これらを添加しなくてもマイコプラズマの増殖による培地の色調変化は起こる。ただし、少しわかりにくく、増殖が起きているかの判定はカンテン培地への移植が頼りになる。

培地性能試験と発育阻止因子試験について 培地性能試験

培地性能試験は通常、培地の調製ロットごと、または試験ごとに行う。表 3 に各基準の培地性能試験の概略を記す。

液体培地の性能について、生物基は培地の色調変化で判定し、カンテン培地に移植はせず、培養期間も 7 日と短い。一方、EP、USP では液体培地をカンテン培地に移植して判定する（検体の試験と同じ手順）。JP は培地性能試験の培養手順を詳しく書いていないので、生物基の手順でも EP、USP の手順でもあてはまる。

カンテン培地の性能試験には各基準で大きな違いは無い。

発育阻止因子試験

本試験は、被検検体がマイコプラズマの発育阻止活性を有するかについて、試験前に 1 度評価を行うものである。表 4 に各基準の発育阻止因子試験の概略を記す。製造方法などに大きな変更が無い限り、ロットごとに実施する必要は無い。マイコプラズマ否定試験の対象となる検体はマイコプラズマの発育を阻止する活性を含んでいるこ

とも多い（細胞培養液に加えられた抗菌薬など）。

EP、USP は、発育阻止因子試験も培地性能試験と同様に検体の試験と同じ条件で実施すると考えてよい。同じ試験手順に、陽性対照菌、検体を加えた場合を見ることによって、培地性能、発育阻止活性の確認を行う考え方になっている。一方、生物基は、発育阻止因子試験の方法も、培地性能試験同様、検体の試験とは区別して設定しているように思われる。JP は生物基の方法を参考にできるとしている。また、生物基においては、検体に強い発育阻止因子が認められたとき、メンブランフィルターを使用する方法を選択できる点が他と異なっている（後述の「メンブランフィルター法について」を参照）。

検体の試験

表 5 に各基準の培養法の検体の試験の実施方法の概略を記す。また、各基準の培養法における検体の試験方法の概略を、図 1 から 4 に示す。

生物基の②増菌培養法は他の基準と大きく異なっており、各基準の調和のためにはこの検討が重要と思われる。また、生物基では、検体に強い発育阻止因子活性が認められる場合③メンブランフィルターを使用する方法（図 2）のみで培養法が実施可能とされているが、これは生物基独自であり、他の基準にはない。

EP、USP の試験法（図 4）は JP と似ているが、培養期間が 1 週間長い。また、EP は他の基準の培養温度の上限より 1℃高い

(38℃)。

B 指標細胞を用いた核染色法について (表 5)

指標細胞を用いた核染色法は、どの基準もほぼ同様な記載になっているが、EP のみこの方法だけでマイコプラズマ否定試験が実施できる書き方になっている。他の基準では基本的に培養法と併用する方法になっている (表 1)。なお、USP の培養温度の上限は他の基準より 1℃ 低い。

生物基、JP では蛍光顕微鏡観察の際の励起波長やフィルターなどの情報が無い。これは記載してもよいかもしれない。

C 核酸増幅法 (NAT) について (表 6)

核酸増幅法はどの基準でも基本的な考え方は同じだが、記載のしかたには違いがある。USP の核酸増幅法は、マイコプラズマ否定試験の項目 (<63> Mycoplasma Tests) の中に記載されているのではなく、核酸増幅検査全般を扱う項目 (<1127> Nucleic Acid-Based Techniques–Amplification) の中に書かれている。このため、マイコプラズマに特化した NAT 法の記載にはなっていない。一方、EP と JP の記載はマイコプラズマ否定試験についてのものであり、記載内容はかなり似ている。

D. 考察

各基準のマイコプラズマ関連試験

調和のために考慮が必要なポイント 1

・ A、B、C のどの試験を選択するのが、マイコプラズマ否定試験の必須条件か、基

準間で統一されていない。調和のためにはこの整理が必要と思われる。生物基では、A 培養法による試験が必須であり、これを B または C のみに置きかえて試験が実施できる書き方にはなっていない。この点は JP、EP のような形がよいのかもしれない。

・ 生物基のマイコプラズマ否定試験法で、他の基準と大きな違いがあるのは、A 培養法である。B 指標細胞法と C 核酸増幅法にも違いはあるが、培養法に比べれば調和は容易と思われる。

A 培養法について

各基準 (特に EP と USP) で記載している培地は、推奨される培地を例示する書き方であり、培地性能試験に適合するならば他の培地も使用できる。

各基準における培地の種類や組成に、ある程度の違いがあっても、培地性能試験によって培地の同等性が担保できるならよいと思われる。培地組成を厳密に同じにするような調和はあまり必要ないと思われる。

培地性能試験と発育阻止因子試験について 培地性能試験

培地が陽性対照菌を増殖させる能力があることを示せばよい試験なので、生物基と EP、USP の方法でどちらが特に優れているということはない。カンテン培地への植え継ぎの有無で、培地性能試験の試験精度に大きな違いがあるとは思えない。

現行の生物基の培地性能試験に問題は無い。しかし EP、USP と調和を考えるなら、培地性能試験の違いは調整した方がよいと

思われる。

発育阻止因子試験

発育阻止因子試験も生物基の方法に問題があるわけではないが、EP、USP と調和を考えるなら、調整した方がよいと思われる。

調和のために考慮が必要なポイント 2

EP、USP では培地性能試験、発育阻止活性試験の手順は検体の試験と同じ手順にしている（試験が一体化している）のに対し、生物基は培地性能試験、発育阻止因子試験を、検体の試験の手順とは別にしている。JP もこの点はあいまいな作りになっている。

検体の試験

調和のために考慮が必要なポイント 3

生物基の増菌培養法の部分が他の基準と大きく異なっている。この部分を JP、EP、USP の液体培地法と同じ形式に変更できれば、基準間の違いが少なくなる。生物基の増菌培養法は、科学的な観点からは、JP、EP、USP の液体培地法よりマイコプラズマの検出感度などが優れているという根拠はないと思われる（供される検体量も少ない）が、液体培地法に変更する場合、判定には液体培地の色調変化ではなく、カンテン培地のコロニー観察が必要になる、

なお、生物基の増菌培養法を JP、EP、USP の液体培地法のように変更する場合は、国内製造メーカーにどのくらい負担や不具合が生じるかについての調査が必要である。

生物基のメンブランフィルター法について

生物基のマイコプラズマ否定試験法が適用される検体は、強い発育阻害活性を含むものもあると考えられる。培養細胞系に添加された抗菌薬などは、濃度によっては希釈だけでは十分に活性を下げることができず、メンブランフィルター法の使用が不可欠なケースもあると思われる。生物基のメンブランフィルター法の要否の判断は、国内メーカーの状況の調査が必要だと思われる（ただし、H23 年度の厚労科研究班で行われた製造業者へのアンケートでは、メンブランフィルター法を使用している例は多くないように見える）。

もし、メンブランフィルター法が不可欠なケースがあるようであれば、生物基にはこのままメンブランフィルター法を残してよいかもしれない（生物基の直接塗抹培養法や増菌培養法の試験を JP や EP のように変更した場合は、検体量を同じにする調整は必要）。生物基にメンブランフィルター法が残っていても、海外基準で試験された製剤が、生物基に適合しないことは起こらない。逆にメンブランフィルター法が適用された国内メーカーの製剤が海外に輸出される場合は、問題になる可能性はある。

C 核酸増幅法 (NAT) について

生物基の核酸増幅法の記載は他の基準と比べてかなり簡略なものとなっている。この理由は、生物基では培養法が必須であり、核酸増幅法は併用できるという作りになっているためだと思われる。現行の生物基で

は核酸増幅法のみでマイコプラズマ否定試験を実施することがないため、この部分の整備が進まなかったと思われる。

調和のために考慮が必要なポイント 4

生物基も他の基準のように、核酸増幅法（バリデートされた NAT）のみでマイコプラズマ否定試験を実施できるようにするのなら、C 核酸増幅法の内容はもっと詳しい記載が必要と思われる（JP の C 核酸増幅法（NAT）の記載されている内容程度）。現行の生物基の C 核酸増幅法の記載内容だけでは、試験法として利用しようとする NAT 法を用意したとしても、それをどのように評価しバリデートするのかがあまり詳しく書かれておらず、難があると思われる。

E. 結論

本研究では、生物基のマイコプラズマ否定試験法について、三薬局方との調和のために考慮が必要なポイントについて検討した。

まず、A 培養法、B 指標細胞法、C 核酸増幅法、のどの試験を選択するのがマイコプラズマ否定試験の必須条件かが基準間で統一されていない点については、生物基で A が必須とされ、B と C は併用のみ可とされている記載を、JP、EP のような記載（A および/または B を行い、バリデーションされていれば A や B の代わりに C も可能）に揃えていくことが望ましいと思われる。

次に試験法について、生物基のマイコプラズマ否定試験法で他の基準と大きな違いがあるのは、A 培養法である。B 指標細胞

法と C 核酸増幅法にも違いはあるが、培養法に比べれば調和は容易と思われる。特に大きな違いがあるのが、A の検体の試験での増菌培養法である。この試験を JP と同じ試験法に揃えることができれば、三薬局方との違いは少なくなる。ただ、このような変更は、生物基の一般試験法を準用してマイコプラズマ否定試験を実施している国内メーカーへの影響が大きく、生物基の試験法を改定する場合、現在の各メーカーのマイコプラズマ否定試験実施状況の調査は必須と考えられる。

生物基のマイコプラズマ否定試験の改定が困難な場合は、「承認された方法を行う」として、EP、USP のマイコプラズマ否定試験も承認された方法とみなすという整理も考えられるかもしれない。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

関連資料

1. 生物学的製剤基準（平成16年厚生労働省告示第155号）
2. 第十八改正日本薬局方（令和3年厚生労働省告示第220号）
3. 欧州薬局方 第10版
4. 米国薬局方 第43版

表 1. 各基準のマイコプラズマ関連試験

| 基準 | 生物学的製剤基準 (現行版) | 日本薬局方 (JP18) | 欧州薬局方 (EP 10.0) | 米国薬局方 (USP43) | |
|--------------------|------------------------------------|--|--|--|------------------|
| マイコプラズマ否定試験に該当する項目 | 【一般試験法】 マイコプラズマ否定試験法 | 【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 | 2.6.7 Mycoplasmas | <63> Mycoplasma Tests | |
| | | | | <1127> Nucleic Acid-Based Techniques–Amplification | |
| 試験法の種類 | A | A 培養法 | A. 培養法 | 培養法 | 培養法 <63> |
| | B | B 指標細胞を用いた核染色法 | B. 指標細胞を用いた DNA 染色法 | 指標細胞法 | 指標細胞培養法 <63> |
| | C | C 核酸増幅法 | C. 核酸増幅法 (NAT) | 核酸増幅法 (NAT) | 核酸増幅による方法 <1127> |
| | D | | | | 酵素蛍光法 <1127> |
| 試験法の選択 | 通常、A による試験を実施し、 <u>B、C は併用できる。</u> | A および B を用いる。 <u>規定の方法でバリデーションされた C であれば、A、B のかわりに使用できる。</u> | A または B を用いる。 <u>規定の方法でバリデーションされた C であれば、A、B のかわりに使用できる。</u> | A および B を用いる。 <u>C、D は A、B と同等と評価されれば使用可能。</u> | |

A 培養法について

表 2. 各基準の培養法で用いる培地

| 基準 | 生物学的製剤基準 (現行版) * | 日本薬局方 (JP18) | 欧州薬局方 (EP 10.0) | 米国薬局方 (USP) |
|----|---|---|---|---|
| 培地 | <ul style="list-style-type: none"> ・ マイコプラズマ否定試験用培地 I ・ マイコプラズマ否定試験用培地 II ・ マイコプラズマ否定試験用カンテン培地 | <p>記載なし</p> <p>生物基の培地を参考にし、培地性能試験に適合するもの。</p> | <ul style="list-style-type: none"> ・ Hayflick 培地 ・ Frey 培地 ・ Fris 培地 <p>の液体培地とカンテン培地</p> | <ul style="list-style-type: none"> ・ Hayflick 培地 ・ Frey 培地 ・ Fris 培地 <p>の液体培地とカンテン培地</p> |

* 生物基の培地は D 緩衝液及び培地に培地組成の項に記載

培養法の培地性能試験と発育阻止因子試験について

培地性能試験

表 3. 各基準の培地性能試験の概略

| 基準 | 生物学的製剤基準 (現行版) | 日本薬局方 (JP18) | 欧州薬局方 (EP 10.0) | 米国薬局方 (USP) | |
|-------------------|--|---|---|---|---|
| 培地性能 試験の方 法 | 陽性対照菌を 100 CFU 以下液体培地に接種する。 陽性対照菌を 100 CFU 未満カンテン培地に接種する。 35～37℃で培養する。 | 陽性対照菌を 100 CFU または 100 CCU 以下培地に接種して培養する。 | 陽性対照菌を 100 CFU 以下を培地に接種し、35～38℃、5～10%の CO ₂ 条件下で培養する。 カンテン培地は 60mm 直径のプレートに培地 9 mL が入ったもの、液体培地は 100 ml 使用。 液体培地は所定の間隔で固体培地へ 0.2ml を移植培養する。 | 陽性対照菌を 100 CFU または 100 CCU 以下を培地に接種して培養する。 カンテン培地は 9 ml 以上の培地量、液体培地は 100 mL 使用。 液体培地は所定の間隔で固体培地へ 0.2ml を移植培養する。 | |
| 陽性 対照 菌 | 菌種 | <i>M. pneumoniae</i> 又は同等のグルコース分解性の種、又は株 <i>M. orale</i> 又は同等のアルギニン分解性の種、又は株 | <i>M. pneumoniae</i> 又は同等のグルコース分解性の種、又は株 <i>M. orale</i> 又は同等のアルギニン分解性の種、又は株 | <i>A. laidlawii</i> <i>M. gallisepticum</i> <i>M. hyorhinis</i> <i>M. synoviae</i> <i>M. orale</i> <i>M. pneumoniae</i> (又は <i>M. fermentans</i>) | <i>A. laidlawii</i> <i>M. gallisepticum</i> <i>M. hyorhinis</i> <i>M. synoviae</i> <i>M. orale</i> <i>M. pneumoniae</i> (又は <i>M. fermentans</i>) 昆虫細胞を試験するときは <i>Spiroplasma</i> 対照株も |
| | 条件など | | 公的機関から入手し、継代の回数が少ないもの。 | 継代の回数、15 回未満の株 | 分離後の継代回数、15 回未満の株 |
| 適合の判定 | 液体培地は 7 日以内に变色が認められなければならない。 カンテン培地は 14 日以内にマイコプラズマの集落が認められなければならない。 | 陽性対照菌が検出されること。 | 接種した陽性対照菌が適切に検出されること。 カンテン培地に出現するコロニー数は、接種量から計算したと 5 factor 以上変わらないこと(1/5 以下でないこと)、液体培地は、カンテン培地に移植して少なくとも 1 継代できること。 | 接種した陽性対照菌が適切に検出されること。 カンテン培地に出現するコロニー数は、カンテン培地は接種量から計算した値から違いが 0.5 log 以内、液体培地は、カンテン培地に移植して少なくとも 1 継代できること。 | |
| 培養温度 | 35～37℃ (カンテン培地は 5～10% CO ₂ 存在下) | 35～37℃ (カンテン培地は 5～10% CO ₂ 存在下) | 35～38℃ (カンテン培地は 5～10% CO ₂ 存在下) | 36 ± 1℃ (カンテン培地は好気条件：<0.5% O ₂ の水素雰囲気または、5-10% CO ₂ の窒素中) | |

| | | | | |
|----|--|---|---|---|
| 備考 | <p>100 CFU 以下と未滴の不統一があるが、記載整備時の見落としと思われる。</p> <p>EP、USP のように使用する培地量を規定していない。</p> | <p>CCU は JP と USP で使用されている。</p> <p>CCU と CFU は近い値になるが、同じではない。</p> | <p>EP のみ 培養温度が 35～38 °C となっており、上限が 1°C 高く設定されている。</p> | <p>EP と同様に、陽性対照菌の種類が多いが、動物用のワクチンなどの試験も想定したものであり、ヒト用の製剤の場合は、主に <i>A. laidlawii</i>、<i>M. orale</i>、<i>M. pneumoniae</i> (又は <i>M. fermentans</i>) を使う。</p> |
|----|--|---|---|---|

培地性能試験は通常、培地の調製ロットごと、または試験ごとに行う。

* EP、USP は培地が 3 種類記載されているため、陽性対照菌の種類も多い。

発育阻止因子試験

表 4. 各基準の発育阻止因子試験の概略

| 基準 | 生物学的製剤基準 (現行版) | 日本薬局方 (JP18) | 欧州薬局方 (EP 10.0) | 米国薬局方 (USP) |
|--------------------|--|--|---|---|
| 発育阻止因子試験 | <p>培地 10 mL に検体を 0.2 mL 加え、さらに <i>A. laidlawii</i> を約 100 CFU 加えて 35～37°C で 7 日間培養する。</p> <p><i>A. laidlawii</i> の増殖が認められない場合、または検体を加えない対照に比べて発育に遅延が見られた場合は、マイコプラズマに対する発育阻止活性があると判断する。</p> | <p>方法の記載なし。</p> <p>「生物基の方法を参考にできる。」としている</p> | <p>具体的な方法の記載なし。 (培地性能試験の条件に検体を加える)</p> <p>検体を接種していない物に比べて、1/5 のコロニーしか認められない場合は、検体に発育阻止因子があると考ええる。</p> | <p>具体的な方法の記載なし。 (培地性能試験の条件に検体を加える)</p> <p>検体を接種していない物に比べて、コロニー数が 0.5 log 単位の範囲にない場合場合は、検体に発育阻止因子があると考ええる。</p> |
| 発育阻止因子が認められる場合の対処法 | <p>培地量を増やすなど適切な方法で発育阻止活性を中和、除去する。</p> <p>発育阻止活性の強い検体については、メンブランフィルター法を使用できる。</p> | <p>発育阻止因子を除去する必要がある。</p> <p>(具体的な対処法の記載なし)</p> | <p>阻害物質を含まない培地での継代、希釈、中和など。または検体を複数の 100mL 培地フラスコに分けて接種する (希釈する)。</p> | <p>阻害物質を含まない培地での継代、希釈、中和など。または検体を複数の 100mL 培地フラスコに分けて接種する (希釈する)。</p> |

培養法の検体の試験について

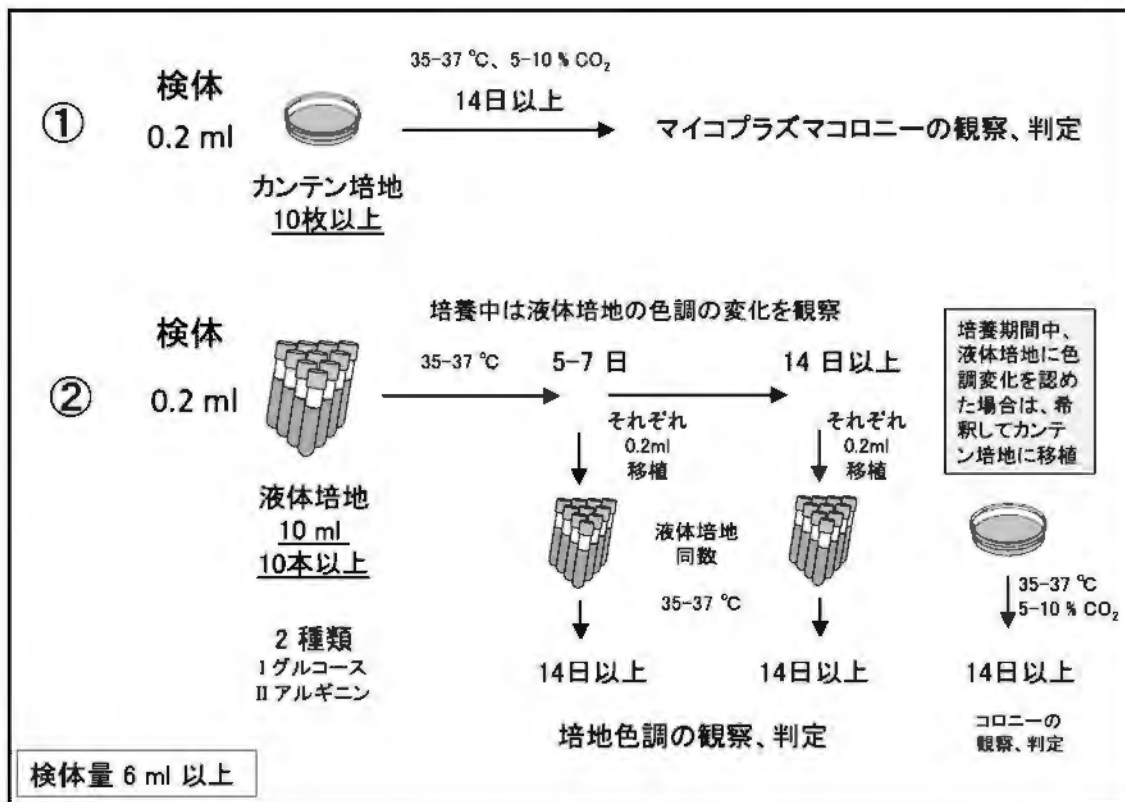
表 5. 各基準の培養法の検体の試験実施方法

| 基準 | 生物学的製剤基準 (現行版) | 日本薬局方 (JP18) | 欧州薬局方 (EP 10.0) | 米国薬局方 (USP) |
|--------|-------------------------------------|-----------------|--------------------|----------------|
| 培養法の種類 | ① 直接塗抹培養法 | 塗抹法 (カンテン培地) | 塗抹法 (カンテン培地) | 塗抹法 (カンテン培地) |
| | ② 増菌培養法 | 液体培地法 | 液体培地法 | 液体培地法 |
| | ③ メンブランフィルターを使用する方法 | | | |
| 試験法の適用 | ①と②を実施。検体に強い発育阻止因子活性が認められる場合は③のみ実施。 | ① と ② を実施。 | | |

生物基にのみ③のメンブランフィルター法がある。

以下、各基準の培養法における検体の試験方法の概略を図で示す。

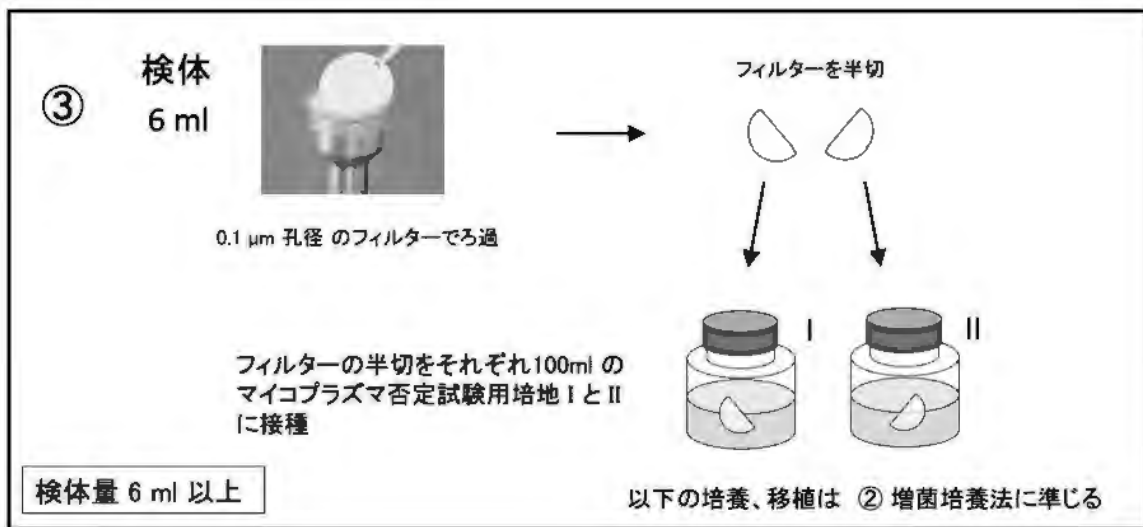
図 1. 生物基 ① 直接塗抹培養法 と ② 増菌培養法



生物基の② 増菌培養法は、他の基準と大きく異なっている。各基準の調和には、この

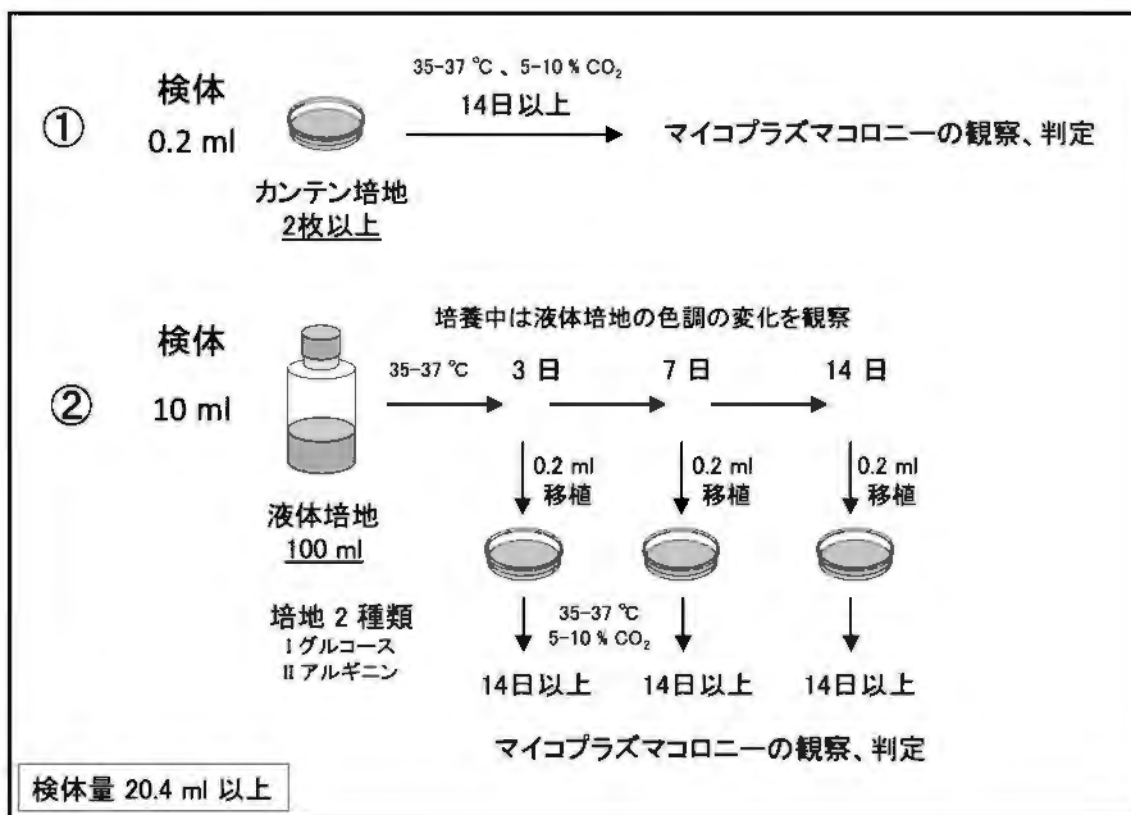
部分の検討が重要と思われる（図3と図4を比較参照）。
検体量 6ml は供試する検体の総量。

図2. 生物基 ③ メンブランフィルターを使用する方法



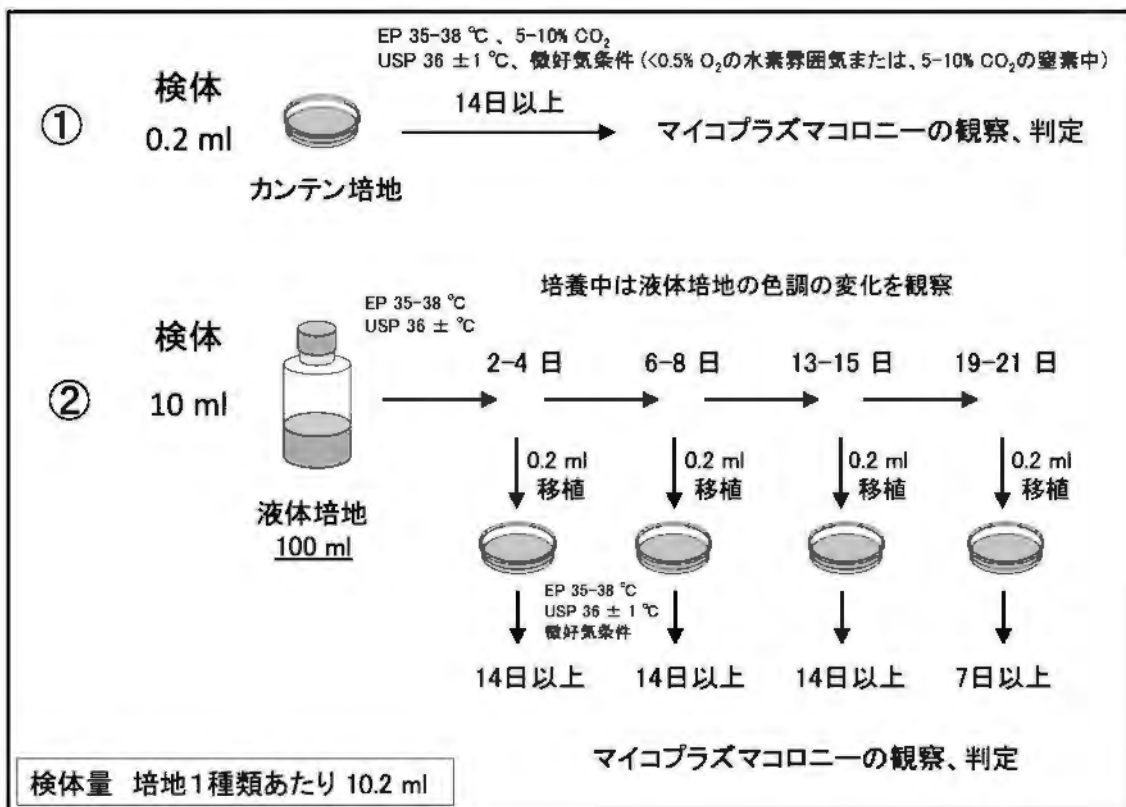
生物基では、検体に強い発育阻止因子活性が認められる場合、③メンブランフィルター法のみで培養法が実施可能（①と②の実施は不要）。これは生物基独自で、他の基準にはない。検体量 6mL は、①と②を実施する時と同量を供試すると考えた場合。

図 3. JP ① 塗抹法 と ② 液体培地法



JPの方法は、EP、USPの方法に似ているが、②の培養期間が1週間短い。

図 4. EP、USP ① 塗抹法 と ② 液体培地法



EP、USPの方法はJPの方法に似ているが、②の培養期間が1週間長い。EPは他の基準の培養温度の上限より1°C高い(38°C)。

B 指標細胞を用いた核染色法について

| 基準 | 生物学的製剤基準 (現行版) | 日本薬局方 (JP18) | 欧州薬局方 (EP 10.0) | 米国薬局方 (USP) |
|-------|--|--|--|---|
| 試験名称 | B 指標細胞を用いた核染色法 | B. 指標細胞を用いた DNA 染色法 | Indicator cell culture method | Indicator cell culture method |
| 指標細胞 | Vero 細胞又はマイコプラズマの検出感度が同等以上であることが評価された細胞 | Vero 細胞 | Vero 細胞又は実際に製造に使用している細胞など | Vero 細胞又は実際に製造に使用している細胞など |
| 陽性対照菌 | <i>M. hyorhinis</i> (ATCC29052) <i>M. orale</i> (ATCC23714) 等と同等の種または株 | <i>M. hyorhinis</i> (ATCC29052) <i>M. orale</i> (ATCC23714) 等と同等の種または株 | <i>M. hyorhinis</i> (ATCC29052) <i>M. orale</i> (ATCC23714) 等と同等の種または株 | <i>M. hyorhinis</i> 、 <i>M. orale</i> と同等の種または株 |
| 培養条件 | 35～38℃ | 35～38℃ | 35～38℃ | 36±1℃ |
| 判定 | マイコプラズマ由来の蛍光斑点が見える細胞が存在しなければ適合。 | マイコプラズマ由来の蛍光斑点が見える細胞が 5% (5/1000) 存在したら陽性。 | マイコプラズマ由来の蛍光斑点が見える細胞が存在しなければ適合。 | マイコプラズマ由来の蛍光斑点が見える細胞が存在しなければ適合。 |
| 備考 | 観察時の蛍光波長の記載なし。 | 観察時の蛍光波長の記載なし。 | 330nm/380nm の励起フィルターと LP 440nm のバリアフィルターが適している、と記載あり。 | 330nm/380nm の励起フィルターと LP 440nm のバリアフィルターが適している、と記載あり。 |

C 核酸増幅法 (NAT) について

| 基準 | 生物学的製剤基準 (現行版) | 日本薬局方 (JP18) | 欧州薬局方 (EP 10.0) | 米国薬局方 (USP) |
|---------------------------|--|--|--|--|
| 試験の名称 | C 核酸増幅法 | C. 核酸増幅法 (NAT) | Nucleic acid amplification techniques | <1127> Nucleic Acid-Based Techniques-Amplification |
| 核酸増幅 の方法 | 特定のの方法の記 載無し | 特定のの方法の記載無 し (バリデートされた 方法なら、どのよう な NAT 法でもよい。) | 特定のの方法の記載 無し (バリデートされ た方法なら、どの ような NAT 法で もよい。) | 特定のの方法の記載無し (バリデートされた方法な ら、どのような NAT 法で もよい。) |
| 陽性対照 菌 | <i>M. hyorhinis</i> (ATCC29052) など | <i>M. hyorhinis</i> (ATCC29052) など 100CFU または 100CCU 以下。 | 特に指定無し | 特に指定無し |
| NAT の評価に 使用する 菌株 | 複数のモリキュ ーテス綱の細菌 | <i>Acholeplasma laidlawii</i> <i>Mycoplasma arginini</i> <i>Mycoplasma fermentans</i> <i>Mycoplasma hyorhinis</i> <i>Mycoplasma orale</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Mycoplasma salivarium</i> (又はこれらと同等 の株) 鳥類由来の原料があ る場合は、 <i>M. sinoviae</i> 昆虫、植物 由来原料の使用があ る場合は <i>Spiroplasma citri</i> 等も検討する。 | <i>A.laidlawii</i> <i>M. fermentans</i> <i>M. hyorhinis</i> <i>Mycoplasma orale</i> <i>M. pneumoniae</i> or <i>M. gallisepticum</i> <i>M. sinoviae</i> (鳥類由来の原料 がある場合) <i>M. arginini</i> <i>S. citri</i> (昆虫、植 物由来原料を使用 する場合) (又はこれらと同 等の株) | 同上 |

| | | | | |
|------------------------------------|--|--|--|--|
| <p>NAT の評価項目</p> | <ul style="list-style-type: none"> ・ 特異性 ・ 検出限界 ・ 核酸抽出手技 <p>反応液組成の違いにより結果が異なること (頑健性)</p> | <ul style="list-style-type: none"> ・ 特異性 ・ 検出感度 ・ 頑健性 | <ul style="list-style-type: none"> ・ Specificity ・ Detection limit ・ Robustness | <p>Assay validation is achieved by establishing the performance characteristics of the NAT assay in terms of reproducibility, accuracy, ruggedness, robustness, specificity, precision, and analytical and clinical sensitivity.</p> |
| <p>備考</p> | | <p>Vero 細胞中でマイコプラズマ増殖させる方法の記載がある。 マイコプラズマの混入が疑われる検体を Vero 細胞とともに培養して、増殖を図ってから NAT で検出する。</p> | | <p>NAT についての記載は、マイコプラズマ否定試験の項 <63> ではなく、NAT に特化した項目 <1127>なので、汎用的な記載になっている。</p> |