



JFRL ニュース Vol.5 No.24 Oct. 2016

再生医療等製品に係わる マイコプラズマ否定試験について

はじめに

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り、ヒト、哺乳類、爬虫類、昆虫、植物の寄生体として自然界に広く存在しています。知らないうちに感染し、気づかないケースもあります。また、培養細胞を汚染した場合、細胞と共存（細胞表面に付着することが多い）して増殖するため、細胞に対して増殖や代謝機能の抑制といった悪影響を与えます。実際に国内の研究機関でも培養細胞のマイコプラズマ汚染が確認されています。

再生医療等製品とは、まさに培養細胞を用いて、体の構造を修復したり、病気を治療したりするものです。移植や治療を受ける患者さんの安全性を確保するため、マイコプラズマ汚染のない細胞が必要となります。

第十六改正日本薬局方¹⁾（以下、JP16 と記載）には、「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」としてA. 培養法、B. 指標細胞を用いたDNA染色法及びC. ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いる検出法（Nested PCR 法）の3つの方法が収載されていました。C. Nested PCR 法は迅速・高感度な試験法ではあるものの、JP16 ではA法及びB法の補完的な位置づけでした。しかし、近年、多くの再生医療が行われるようになり、医薬品としてよりも医療の一つとして、検査のスピードが要求されるようになってきました。

これらの背景から、平成 28 年 4 月 1 日に施行された第十七改正日本薬局方²⁾（以下、JP17 と記載）では、C. 核酸増幅法（NAT）への内容の見直しが行われ³⁾、適切なバリデーションを実施すれば、A. 培養法及びB. DNA染色法の代替法として使用できることとなりました。最近の医療現場や再生医療等製品の工程管理のニーズを取り入れ、その医療を必要としている患者さんやそのご家族のベネフィットを考えた改訂ということが出来ます。

本稿では、各試験方法の概要と、欧州薬局方（Ph. Eur.）に準じて C. 核酸増幅法（NAT）のバリデーション方法を収載した JP17 の改正点を中心に解説します。

A. 培養法

培地はカンテン平板培地と液体培地の両者を使用します。カンテン平板培地 1 枚当たり試験検体（例：細胞懸濁液又は細胞培養上清）0.2 mL 以上を接種し、5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中で適切な湿度のもと、35～37℃で14日間以上培養します。



写真-1 マイコプラズマの目玉焼き状コロニーの一例

液体培地については培地 1 本当たり試験検体 10 mL 以上を接種し、35～37℃で培養します。培養開始後、2 又は 3 日ごとに観察し、マイコプラズマの代謝に伴う液体培地の色調変化を観察し、3、7 及び 14 日目の計 3 回にわたり、それぞれ各液体培地を採取し、カンテン平板培地 2 枚以上に接種します。接種後は 5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中で、35～37℃で 14 日間以上培養します。

全てのカンテン平板培地を対象に、倍率 100 倍以上の顕微鏡でマイコプラズマの集落（写真－1）の有無を確認します。

B. 指標細胞を用いた DNA 染色法

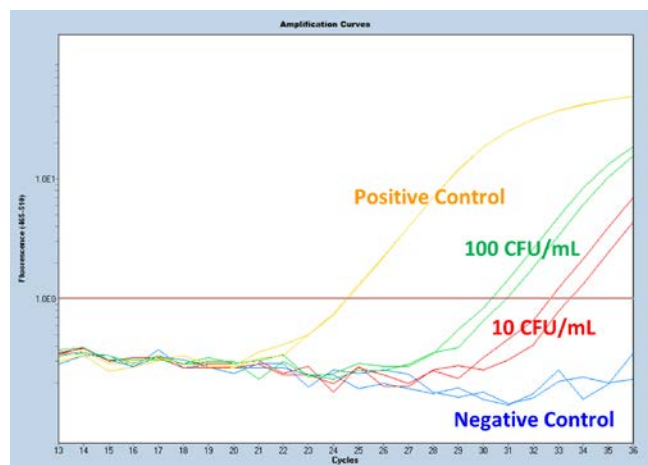
カバーガラスを沈めた培養ディッシュ又は同等の容器に指標細胞（Vero 細胞：マイコプラズマ陰性）を接種し、1 日増殖させます。この培養ディッシュ 2 枚以上に試験検体（例：細胞懸濁液又は細胞培養上清）1 mL 以上を接種します。同時に、陰性（非接種）対照及び 2 種類のマイコプラズマ陽性対照を設定します。陽性対照には、*M. hyorhinis*（ATCC 29052, ATCC 17981, NBRC 14858 又は同等の種又は株）及び *M. orale*（ATCC 23714, NBRC 14477 又は同等の種又は株）100 CFU（Colony-forming units：コロニー形成単位）以下又は 100 CCU（Color-changing units：色調変化単位）以下を使用します。

5%CO₂、35～38℃で 3～6 日間培養し、固定後、ビスベンズイミド又は同等の染色剤により DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡（倍率 400～600 倍又はそれ以上）でマイコプラズマの存在を確認します。陰性対照及び陽性対照と試験検体を比較し、マイコプラズマ汚染の有無を判定します。細胞核を囲むように微小な核外蛍光斑点を持つ細胞が 1000 個のうち 5 個（0.5%）以上あれば陽性と判定します。

C. 核酸増幅法（NAT）

従来の JP16 C. ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いる検出法（Nested PCR 法）は、二段 PCR 法としてプライマーの例示を含む特定の方法が記載されていました。JP17 では Ph. Eur. に準じ、PCR を含む核酸増幅法（Nucleic acid amplification test：NAT）としてバリデーションの方法や条件を示すにとどめ、特定の方法は記載されなくなりました。試験検体（例：細胞懸濁液又は細胞培養上清）から抽出した核酸をマイコプラズマに特異的なプライマーを用いて増幅し、マイコプラズマに由来する核酸の存在の有無を高選択、高感度かつ迅速に検出することが出来ます（図－1）。ただし、NAT は目的とする塩基配列の存在を示すものであり、必ずしも生きたマイコプラズマの存在を意味するものではありません。

当センターでは、現在市販されている数種のキットを使用してバリデーションや検討を進めています。



図－1 マイコプラズマ遺伝子の増幅曲線の一例

【試験の実施における注意点】

試験は陽性対照 [100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC 17981, NBRC 14858 又は同等の種又は株) 等] 及び陰性対照を設定します。また、細胞懸濁液を試験検体とする場合には、マイコプラズマ陰性の細胞を陰性対照とし、細胞由来の核酸が多量に含まれる状態で NAT への影響を確認しておく必要が有ります。試験検体からマイコプラズマの遺伝子が増幅されないとき、この試験に適合となります。なお、NAT は微量の核酸を増幅して検出するため、増幅産物が施設や機器、試薬等を汚染し偽陽性となる可能性があります。このため、試薬の保管・調製、核酸の抽出、核酸の増幅、増幅産物の検出は可能な限り独立した施設や設備・エリアを用い、細心の注意を払って実施する必要があります。

【マイコプラズマ検出のための NAT のバリデーション法】

バリデーションには菌濃度 (CFU 又はそれに相当するコピー数等) が明確な生きたマイコプラズマ参照菌株が様々な段階で必要となります。

バリデーションでは、以下の 7 菌種を用います。

- ・ *Acholeplasma laidlawii* (ATCC 23206, NBRC 14400 又は同等の株)
- ・ *Mycoplasma arginini* (ATCC 23838, NBRC 111899 又は同等の株)
- ・ *Mycoplasma fermentans* (ATCC 19989, NBRC 14854 又は同等の株)
- ・ *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC 17981, NBRC 14858 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. 培養法及び B. DNA 染色法の代替法として用いる場合、求められる検出感度は以下のとおりです。

- ・ A. 培養法の代替法とする場合
マイコプラズマ 7 菌種全てについて、10 CFU/mL を検出可能なことを示すこと。
- ・ B. DNA 染色法の代替法とする場合、
マイコプラズマ 7 菌種全てについて、100 CFU/mL を検出可能なことを示すこと。

NAT による分析法の検証に最も重要な項目は特異性と検出感度です。また、頑健性も重要です。分析法の評価には、核酸の抽出から増幅産物の検出までの全工程が含まれなければなりません。また、市販のキットを用いる場合、キット製造業者によるバリデーションデータを入手し、引用することが出来ます。しかし、使用する機器や目的とする試験検体が、キット製造業者が実施した条件と同一ではない場合、必ず自施設でキット製造業者のバリデーションと同等の結果が得られることを確認する必要があります。適切なバリデーションを行えば、A. 培養法又は B. DNA 染色法の代替法として使用することが出来ます。

なお、用いたプライマーやプローブ等によってはマイコプラズマ以外の核酸を増幅し、偽陽性の結果を導くことがあるため、確認方法を確立しておく必要が有ります。

試験法の比較

マイコプラズマ否定試験の A, B 及び C 法には、それぞれ一長一短があります。
概要を表-1 にまとめました。

表-1 マイコプラズマ否定試験の比較

方 法	A. 培養法	B. DNA 染色法	C 法	
			JP17 改正 核酸増幅法 (NAT)	JP16 改正 Nested PCR 法
原理	培養後コロニー計数	培養後 DNA 染色	核酸抽出後増幅	核酸抽出後増幅
特異性	生菌のみ検出	生菌のみ検出	生菌/死菌ともに 検出	生菌/死菌ともに 検出
感度	高感度	低感度	高感度	高感度*1
試験期間	1 箇月以上	約 1 週間	1 日～2 日	1 日～2 日
特徴	・ 高度な培養技術 ・ 培地の性能試験 ・ 発育阻止因子確認	・ 判定に熟練 ・ 蛍光顕微鏡	・ 方法の指定なし ・ バリデーション*2 ・ PCR	・ 特定の方法を収載 ・ PCR
試験費用	比較的高額	比較的安価	比較的安価 (バリデーションは高額)	安価
JP 適合性	採用可	採用可	採用可 (A 及び B 法の 代替法になり得る)	採用不可 (A 及び B 法補完用)

*1：検出できない菌種有り

*2：試験期間；数箇月間，方法や条件を JP で指定，試薬・キットが高額

おわりに

新しい C 法を必要とする試験検体は，培地や培養上清，細胞を含む細胞懸濁液や細胞シート等々，形状や種類は様々です。加えて，この試験検体の特性上，試験のために準備可能な量のごくわずかな場合が多く，個々の試験検体に応じた試験方法の設計が必要かつ重要となります。適切なバリデーションには，その試験特有の特異性，検出感度，頑健性及び反応阻害などに注意を払うだけでなく，生きた参照菌株の準備といった培養のノウハウも必要となります。広範囲の技術を要する試験設計となり，試験法確立までには時間も費用もかかる試験です。

しかし，その技術を必要とする医療があり患者さんがいます。待っている人がいます。

NAT による日局の規格試験は日本でも始まったばかりで，当センターでも，検討・試行錯誤の連続です。しかし，今後の再生医療等製品の発展と共に，ますます必要性が高まってくる試験だと考えています。この迅速法の普及により，再生医療を必要としている患者さんやそのご家族の期待に応えられるように，当センターでも努力して参ります。

参考文献

- 1) 第十六改正日本薬局方（平成 23 年 3 月 24 日厚生労働省告示第 65 号）
- 2) 第十七改正日本薬局方（平成 28 年 3 月 7 日厚生労働省告示第 64 号）
- 3) 内田恵理子ら：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（2014）