20. 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

次のように改める.

本文書は,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使用する細胞基材で細胞バンクを基にするものに対し，現段階で実施すべきと考えられるマイコプラズマ否定試験について述べたものである.

試験方法としては，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）による検出法が挙げられる.

本マイコプラズマ否定試験の対象は，マスター・セル・バンク（MCB），ワーキング・セル・バンク（WCB）及び医薬品製造工程中の培養細胞である．これらに対して，A 法と B 法による試験を実施する．ただし，B 法はマイコプラズマ由来以外の DNA も検出するので，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．この場合，C 法に用いるプライマーその他の試薬や反応条件を含めた試験方法の選択，方法の感度と特異性及び検体調製の妥当性を含め，マイコプラズマの存在を否定できると判定した合理的な理由を示す必要がある.

マイコプラズマ否定試験を実施する前には，検体がマイコプラズマ発育阻止因子を有するかどうか試験しておく必要がある．発育阻止因子が含まれる場合には，遠心分離，細胞の継代などの適切な方法により発育阻止因子を中和あるいは除去する.

検体を採取後 24 時間以内に試験するときは 2 ～ 8℃で，24 時間を超える場合は－60℃以下で保存する.

マイコプラズマが検出された場合，種を同定するための試験を行えば混入の原因を推定するのに役立つ可能性がある.

A. 培養法

1. 培地

培養法にはカンテン平板培地と液体培地の両方を使用する．両培地にはペニシリン以外の抗生物質を使用してはならない．使用する培地としては，生物学的製剤基準に記載されているものを参考にすること．ただし，2. の培地の性能試験に適合するものであれば他の培地でもよい.

2. 培地の性能試験

試験に用いる培地については，各ロットごとにマイコプラズマの発育性能に関し，適性であるか否かの試験を実施する.そのためには,少なくとも 2 種類の既知の菌株,デキストロース分解マイコプラズマ（*M. pneumoniae* ATCC15531 又は同等の種又は株）とアルギニン分解マイコプラズマ（*M. orale* ATCC23714 又は同等の種又は株）を陽性対照として加えた培地での試験をその都度実施し，これらの既知のマイコプラズマが検出できることを確認しておく必要がある．陽性対照試験に使用するマイコプラズマ株は，公的又は適切と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いもので，100 CFU（コロニー形成単位）以下又は 100 CCU（色調変化単位）以下で培地に接種する.

3. 培養及び観察

1）カンテン平板培地 1 枚当たり検体（細胞懸濁液）0.2 mL 以上を，プレートに均等に拡がるように接種する．カンテン平板培地は 1 検体当たり 2 枚以上とする．検体を接種した後，カンテン平板培地表面を乾燥し，5 ～ 10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中（微好気的条件）で，適切な湿度のもと 36±1℃で 14 日間以上培養する.

2）液体培地 1 本当たり検体（細胞懸濁液）10 mL 以上を，100 mL の液体培地を入れた容器に接種する．液体培地は 1 検体当たり 1 本以上とし，36±1℃で培養する.

被検細胞の培養液中に抗生物質などのマイコプラズマ発育阻止因子が含まれているような場合には発育阻止因子を除去する必要があるが，遠心処理などはそうした目的に適している.

3）2）での培養開始後 3 日目，7 日目及び 14 日目の計 3 回にわたり，それぞれ各液体培地より 0.2 mL ずつを採取し，カンテン平板培地各 2 枚以上に接種する．カンテン平板培地での培養は微好気的条件で，36±1℃で 14 日間以上培養する.

4）全カンテン平板培地を対象に 7 日目と 14 日目に 100 倍以上の倍率の顕微鏡でマイコプラズマの集落の有無を調べる.

B. 指標細胞を用いた DNA 染色法

試験操作法の妥当性についてあらかじめ検討するため，培養 Vero 細胞に 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis*（ATCC29052 又は同等の種又は株）及び *M. orale* （ATCC23714 又は同等の種又は株）を接種する.

マイコプラズマ汚染の検出に関して既知のものと同等以上の検出感度があることを示すデータがある場合は上記以外の指標細胞やマイコプラズマ菌株を本試験に使用することもできる．マイコプラズマ菌株は，公的又は適当と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いものにつき，接種単位をあらかじめ設定した上で使用しなければならない．細胞は適当と認められた細胞保存機関からマイコプラズマが検出されていないことを確認したデータ

と共に入手しなければならない．入手した細胞は，マイコプラズマ混入を避けて注意深く培養し，多数の種ストックを作製して，本文書で示すいずれか一つ以上の方法でマイコプラズマの混入を否定した後，凍結保存する．試験にはこのストックを解凍し，6 継代以内のものを使用しなければならない．

カバーグ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を接種し，1 日増殖させる．この培養ディッシュ 2 枚以上に試験検体（細胞培養上清）1 mL 以上を接種する．

試験には，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おく．陽性対照には，例えば *M. hyorhinis*（ATCC29052 又は同等の種又は株）及び *M. orale*（ATCC23714 又は同等の種又は株）100 CFU 以下又は 100 CCU 以下を使用する．

細胞は 5%炭酸ガスを含む空気中 36±1℃で 3 ～ 6 日間培養する．

カバーグラス上の培養細胞を固定後，ビスベンズイミダゾール（bisbenzimidazole）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鏡検する．陰性対照及び陽性対照と検体を比較しマイコプラズマ汚染の有無を判定する．

方法

1）細胞培養用ディッシュ（直径 35 mm）に滅菌したカバーグラスを無菌的に置く．

2）10%ウシ胎児血清（あらかじめマイコプラズマがないことを確認しておく）を含むイーグルの最少必須培地中に Vero 細胞が 1 mL 当たり 1 × 10^4 細胞となるように細胞懸濁液を調製する．

3）Vero 細胞懸濁液 2 mL を各培養ディッシュに接種する．このときカバーグラスを培地中に完全に沈め，培地表面に浮かないように注意する．細胞がカバーグラスに接着するよう 5%炭酸ガスを含む空気中 36±1℃で 1 日培養する．

4）培地を新鮮な培地 2 mL と交換した後，試験検体（細胞培養上清）0.5 mL を培養ディッシュ 2 枚以上に添加する．陰性対照と陽性対照（*M. hyorhinis*（ATCC29052 又は同等の種又は株）及び *M. orale*（ATCC23714 又は同等の種又は株）等の 2 種類のマイコプラズマ）についても同じ操作を行う．

5）培養液を 5%炭酸ガスを含む空気中 36±1℃で 3 ～ 6 日間培養する．

6）各ディッシュより培養液を除去し，メタノール/酢酸（100）混液（3：1）（固定液）2 mL をそれぞれに加え，5 分間放置する．

7）各ディッシュより固定液を除去し，再度各ディッシュに同量の固定液を加え 10 分間放置する．

8）固定液を除去し，すべてのディッシュを完全に風乾する．

9）各ディッシュにビスベンズアミド（bisbenzamide）蛍光染色液 2 mL を加え，ディッシュに蓋をして室温で 30 分間静置する．

10）各ディッシュより染色液を吸引除去し，ディッシュを蒸留水 2 mL で 3 回洗浄する．カバーグラスを取り出し乾燥する．

11）カバーグラスに封入液を滴加して封入する．余分な封入液をカバーグラスの端より吸い取る．

12）400 ～ 600 倍又はそれ以上の倍率の蛍光顕微鏡で観察する．

13）検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較する．

14）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する．

C. ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による検出法

PCR 法は，非常にわずかな量のマイコプラズマ DNA を特異的に検出することが可能な方法として現在ではよく知られており，細胞のマイコプラズマ汚染の検査法として，近年広く利用されてきている．しかし，その感度と特異性は採用した方法に依存し，また PCR で陽性反応を得てもそれは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ない．

PCR 法では培養細胞から得た DNA を特異的なプライマーを用いて増幅することによって目的 DNA の有無を検出する．試験の検出感度と特異性を高めるには 2 段 PCR 法（ネステッド PCR 法）を用いることが望ましい．試験は陽性対照（例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis*（ATCC29052 又は同等の種又は株））と陰性対照を置き実施する．

細胞又は細胞培養液に含まれるマイコプラズマ DNA を増幅するにはマイコプラズマに共通な DNA 配列に対応するプライマーを用いる．増幅に際しては耐熱性 DNA ポリメラーゼのような適切なポリメラーゼを用い適切な条件下で反応を行う．増幅した DNA をアガロースゲル電気泳動を用いて分離し，エチジウムブロマイド染色後，UV 照射により検出する．

本法で重要な点は，マイコプラズマに特異的で，かつ広範囲のマイコプラズマによく保存されている塩基配列に対応するプライマーを用いることである．例えばマイコプラズマの 16 S - 23 S リボソーム遺伝子間のスペーサー領域等に対応するプライマーがある．

1 次 PCR で陰性となった場合には，感度と特異性を高めるためネステッドプライマーを用いる 2 段 PCR 法を実施することが望ましい．

2 次 PCR に用いるプライマーは内側配列部分のネステッドプライマーを選択する．アウター及びインナープライマーは実験的又は文献的に有効性と特異性が証明されていなければならない．

なお，Vero 細胞を用いて検体中に存在する可能性があるマイコプラズマの増殖を図った後に PCR を行い，感染性マイコプラズマ由来の DNA の検出精度を高める方法もある．

以下に 2 段 PCR 法の例を示す．試薬や反応条件については，例示に限らず，適切であることが確認されている場合にはそれを使用してもよい．他の方法を使用する場合は，用いた方法の妥当性が立証され，その詳細が記載されていなければならない．その中に方法の感度と特異性が示されていなければならない．

操作法の例

1. テンプレートの調製

1）被験細胞懸濁液（必要ならば Vero 細胞により継代する）600 μL をチューブにとり，細胞を 0.1%SDS 等で溶かし，同量の TE 緩衝液（10 mmol/L トリス‐塩酸（pH 8.0），1 mmol/L EDTA）を飽和したフェノールを加え，混合する．

2）室温で 15000 rpm，5 分間遠心する．

3）上清 400 μL を別のチューブに移し，3 mol/L 酢酸ナトリウム 10 μL を加える．

4）エタノール（95）1 mL（2.5 倍量）を加え，十分に撹拌する．15 分間氷冷した後，4℃で 15000 rpm，10 分間遠心する．

5）上清を除去し，沈殿を 80%エタノール 200 ～ 300 μL で 1 ～ 2 回洗浄し，洗液はピペットで除去する．4℃で 15000 rpm，10 分間遠心後，上清を完全に除去し，沈殿を乾燥する．

6）沈殿を精製水 40 μL に溶解する．

2. 陽性対照，陰性対照についても同様の処理を行う.

3. 1 段目 PCR

1）耐熱性 DNA ポリメラーゼ，dNTP 溶液，アウタープライマー，反応緩衝液（Mg イオンを含む）を混合し，1 本のチューブに 90 μL ずつ分注する．

2）調製したテンプレートより 10 μL をとり，1 段目の PCR 反応液（90 μL）を入れたチューブ 1 本ずつに加える．

3）94℃で 30 秒間の変性，プライマーに適した温度（例示のプライマーの場合は 55℃）で 2 分間のアニーリング，72℃で 2 分間の伸長を，30 回繰り返し DNA 増幅を行う．

4. 2 段目 PCR

1）耐熱性 DNA ポリメラーゼ，dNTP 溶液，インナープライマー，反応緩衝液（Mg イオンを含む）を混合し，1 本のチューブに 99 μL ずつ分注する．

2）1 段目の PCR を終了したチューブから，それぞれの生成物（1 μL）をとり，2 段目の PCR 反応液（99 μL）を入れたチューブ 1 本ずつに加える．

3）94℃で 30 秒間の変性，プライマーに適した温度（例示のプライマーの場合は 55℃）で 2 分間のアニーリング，72℃で 2 分間の伸長を，30 回繰り返し DNA 増幅を行う．

5. アガロースゲル電気泳動

1）1 段目及び 2 段目の PCR 生成物（10 μL）を，泳動の先端を確認するための適当な色素液（2 μL）と混合し，1% アガロースゲル電気泳動を行う．

2）アガロースゲルをエチジウムブロマイドにより染色し，紫外線照射条件下で写真撮影する．

3）DNA バンドが検出された場合，陽性と判定する．

［プライマーの例示］

・マイコプラズマ検出用

アウタープライマー

F1：5′‐ACACCATGGGAG（C/T）TGGTAAT-3′

R1：5′‐CTTC（A/T）TCGACTT（C/T）CAGACCCAAGGCAT-3′

インナープライマー

F2：5′‐GTG（G/C）GG（A/C）TGGATCACCTCCT-3′

R2：5′‐GCATCCACCA（A/T）A（A/T）AC（C/T）CTT-3′

（ ）は混合

［PCR 反応液］

	［1 段目］	［2 段目］
dNTP 溶液（各 1.25 mol）	16 μL	16 μL

プライマー（10 pmol/μL）	F1　2 μL	F2　2 μL
プライマー（10 pmol/μL）	R1　2 μL	R2　2 μL
耐熱性 DNA ポリメラーゼ（1 U/μL）	2 μL	2 μL
反応緩衝液	68 μL	77 μL
25 mmol/L 塩化マグネシウム	8 μL	8 μL
10 倍緩衝液＊	10 μL	10 μL
滅菌精製水	50 μL	59 μL

＊10 倍緩衝液の組成	
2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール・塩酸（pH 8.4）	100 mmol/L
塩化カリウム	500 mmol/L
塩化マグネシウム	20 mmol/L
ゼラチン	0.1 g/L

［Vero 細胞中でマイコプラズマを増殖させる方法］

1）試験検体，陽性対照及び陰性対照について，それぞれ 2 枚以上のディッシュを使用する．

2）細胞培養用ディッシュ（直径 35 mm）に，10%ウシ胎児血清（PCR によりあらかじめマイコプラズマ DNA が検出されないことを確認しておく）を含むイーグル最少必須培地を用いて調製した Vero 細胞懸濁液（1 × 10^4 細胞/mL）を 2 mL ずつ加え，5%炭酸ガスを含む空気中，36±1℃で 1 日培養する．

3）古い培地を新鮮な培地と交換し，試験検体（細胞培養上清）0.5 mL を Vero 細胞の培養ディッシュ 2 枚以上に接種する．陽性対照（例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis*（ATCC29052 又は同等の種又は株））と陰性対照についても同じ操作を行う．

4）試験検体，陽性対照並びに陰性対照を接種した Vero 細胞の培養ディッシュをそれぞれ 5%炭酸ガスを含む空気中，36±1℃で 3 ～ 6 日間培養する．