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. 核酸増幅法(Nucleic acid amplification test : NAT)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，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.

A法，B法により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ほかの培地でもよい.

2. 培地の性能試験

試験に用いる培地については，バッチ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，ブドウ糖分解マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae* ATCC 15531，NBRC 14401又は同等の種又は株)とアルギニン分解マイコプラズマ(*Mycoplasma orale* ATCC 23714，NBRC 14477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，プレートに均等に広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で，適切な湿度のもと，35～37 ℃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，35～37 ℃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．マイコプラズマ発育阻止因子の測定は，生物学的製剤基準に記載されているマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる.

3) 2)での培養開始後，2,3日ごとに観察し，液体培地の色調変化を観察した日，並びに色調変化が無い場合においても，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日間以上培養する.

4) 全カンテン平板培地を対象に7日目と14日目に倍率100倍以上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*Mycoplasma 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)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，Vero細胞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，マイコプラズマの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，一日増殖させる．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置く．陽性対照には，例えば*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，35～38 ℃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，ビスベンズイミド(bisbenzimide)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，35～38 ℃で一日培養する．

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* (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)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，35～38 ℃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イミド蛍光染色液2 mLを加え，ディッシュにふたをして室温で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) 倍率400～600倍又はそれ以上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. 核酸増幅法(NAT)

核酸増幅法(Nucleic acid amplification test：NAT)は，目的とする細胞やウイルス等の遺伝子や遺伝子発現により転写されたmRNA等をそ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手法である．NATをマイコプラズマ検出に用いることにより，検体(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やプローブを用いて増幅し，マイコプラズマに由来する核酸の存在の有無を高感度に検出することが期待される．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ない．

NATとしては様々な手法が利用可能であり，本参考情報は特定のNATの手法を規定するものではない．使用するNATは，十分な感度と特異性が担保され，核酸抽出手技や反応液組成の僅かな差異により異なる結果が得られることのない頑健性のある手法を用いること．本項に示すバリデーション法により特異性と感度を評価し，その妥当性が立証されるのであれば、どのようなNATの手法を用いることも可能である．市販のキットを用いる場合，キットの製造業者によりバリデーションが実施され，そのデータが入手可能な場合もあるが，使用する機器や目的とする細胞によっては製造業者により実施されたバリデーション結果とは異なる結果が得られる可能性がある．必ず自施設で製造業者のバリデーション通りの結果が得られることを確認する必要がある．特に検査対象となる細胞が異なる場合には，検出感度，再現性について確認しておく必要がある．また，核酸の抽出法や検出法等で製造業者の指定する機器と異なる機器を用いる場合には，採用する手法や当該機器の妥当性を検証する必要がある．

さらに，試薬の組成やプライマー・プローブ等に関する情報が製造業者から開示されない場合には，キットの内容が変更された際にも変更内容に関する情報が得られるような対策が求められる．キットの内容が変更された場合には，必要に応じ目的とするマイコプラズマの検出感度や精度に差異がないことを確認しておく必要がある．一方で，キットが製造中止になる場合もあり，適切な代替法に変更できるような対応も考えておくこと．

細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖する場合が多いため，細胞培養上清ではなく細胞懸濁液を検体とすることが基本的に求められる．細胞培養上清を検体として用いる場合は，細胞を汚染するマイコプラズマを十分に検出できていることの妥当性を示す必要がある．

NATは，以下に示すバリデーションを適切に実施することにより，バリデーション法で例示した全てのマイコプラズマに対して十分な感度を持って検出できる場合には，A法やB法の代替法として用いることができる．

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NAT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．この場合にもバリデーション法で例示した全てのマイコプラズマが高感度に検出できることが示されなければならない．

C-1 核酸増幅法によるマイコプラズマ否定試験の実施

試験は陽性対照(ランコントロール)［例えば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)］と陰性対照を置き実施する．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につき，接種単位をあらかじめ設定したうえで使用しなければならない．細胞懸濁液を検体とする場合にはマイコプラズマ汚染のないことが確認された細胞を陰性対照とし，細胞由来の核酸の存在下での核酸増幅法への影響についてもあらかじめ試験を実施し陽性シグナルが出ないことを確認しておくこと．検体からマイコプラズマの遺伝子が増幅されないときは，この試験に適合とする．

C-2 試験における注意事項

NATは微量の核酸を増幅して検出するため，試験に用いた増幅産物により，施設や機器，試薬等が汚染され偽陽性の結果が得られることがある．このため，試薬の保管･調製，核酸の抽出，核酸の増幅，増幅産物の検出はそれぞれ可能な限り独立した施設ないし設備を用いて，細心の注意を払って実施する必要がある．増幅した核酸のキャリーオーバーによる偽陽性を防止する方法として，Uracil－N－glycosylase(UNG)を用いる方法等が利用できる．また，核酸の抽出効率が低い場合や，NATの阻害物質が検体に含まれるための偽陰性でないことを確認するために，被験細胞のハウスキーピング遺伝子を内部対照として同時に測定することが望ましい．

一方，核酸の抽出から増幅まで自動化された機器を用いるこ

とにより交差汚染を防ぐための対策がとられている場合には，必ずしも独立した施設で実施することは不要であるが，増幅産物の廃棄等に際しては汚染の起こらないような対策をとる必要がある．

C-3 マイコプラズマ検出のためのNATのバリデーション法

NATによる目的核酸の検出法としては，定性的試験と定量的試験がある．細胞基材へのマイコプラズマ汚染の検出には，定性的試験として限度試験が考慮される．ここにマイコプラズマ汚染を検出するための定性的NATの評価方法を示す．この評価方法は，適切なカットオフ値を設定した定量的NATにも適用できる．

NATによる分析の検証に最も重要な項目は特異性と検出感度である．また，分析法の頑健性も評価する必要がある．なお，NATによる分析の評価には，核酸の抽出から増幅産物の検出までの全工程が含まれる．

市販キットをNATによる試験の一部又は全部に用いる場合は，キットの製造業者により添付され文書化されたフルバリデーションデータがあれば，使用者のバリデーションの代替として用いることが可能であり，使用者が再度フルバリデーションを行う必要はない．しかし使用者は，キットの性能(特異性，検出感度等)について，使用目的に十分かなっていること，使用者の試験系でも目的とした性能が得られることを確認する試験を必ず実施し，データを提示すべきである．

NATは以下の目的で用いることができる．

・工程内管理の目的として

・A法又はB法の代替法として

本項は，第一にNATそのもののバリデーション手順，第二にNATとA法又はB法との比較試験のバリデーションの2つの目的について書かれている．

なお，NATの特異性や検出感度のバリデーションにはCFU又はそれに相当するコピー数等が明らかにされたマイコプラズマ参照品が様々な段階で必要とされる．また通常の試験では，マイコプラズマ参照品，あるいは参照品を用いて適切に値付けされた検体が陽性対照として用いられる．試験では，陽性対照としてマイコプラズマの菌体の他に核酸(プラスミド等)が用いられることもあるが，抽出効率を含めたバリデーションの検討では菌体を用いる必要がある．

1) 評価項目

特異性，検出感度，頑健性の3つのパラメーターについて評価する必要がある．

2) 特異性

NATにおける特異性とは，存在が予想される検体中に含まれる標的核酸を確実に検出する能力である．NATの特異性はプライマーやプローブの選択，及び試験条件の厳密さ(増幅及び検出段階)に依存する．

マイコプラズマ(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)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するプライマーやプローブを用いることが重要である．NATが幅広いマイコプラズマパネルを検出する能力は，プライマーとプローブのデータベースとの比較による理論的分析のみにより示すのではなく，3)に示された参照マイコプラズマを用いた実証評価により示されなければならない．

3) 検出感度

検出感度とは，試料中に含まれる検出可能な標的核酸の最低量であり，必ずしも定量する必要はない．検出感度を確立するには、NATの陽性カットオフ値を決定する必要がある．陽性カットオフ値は，試験において95 %の確率で検出可能な試料の一定容量に含まれる標的配列の目的核酸量である。この陽性カットオフ値は試験を行う試料に含まれる目的マイコプラズマ遺伝子配列と酵素の活性などの要因に影響され，結果として各試験により異なる95 %カットオフ値が得られることになる．陽性カットオフ値を決定するには，特性解析され菌濃度(CFU又はコピー数等)が明らかにされたマイコプラズマ参照品又は国際標準品の希釈系列について，試験ごとの変動を調べるために日を変えて試験を実施する．

検出感度のバリデーションには，以下の種について検討すること．選択されたこれらのマイコプラズマ種は，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される哺乳動物由来培養細胞への汚染の出現頻度や系統発生，更には培養等で用いられる動物由来原料を考慮して選択されたものである．なお，このリストはバリデーションのためのものであり，通常の試験でこれら全てを陽性対照として用いることを求めているわけではない．

・*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 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)

昆虫細胞や植物由来細胞を製造に用いる場合は，上記のマイコプラズマに加えて，昆虫や植物に由来するマイコプラズマ(*Spiroplasma citri*など)，鳥類に由来する細胞や試薬を製造に用いる場合は鳥類に由来するマイコプラズマ(*Mycoplasma synoviae*など)の検出が可能であることを評価する必要がある．

検出感度は，菌濃度(CFU等)を測定した原液から，適切な希釈系列(10倍希釈列ないしは$10^{0.5}$倍希釈列)の検体を作製し，各希釈に対してNATでの試験を実施する．検出限界となった希釈倍数をもとに検体中の標的配列の最小のCFU値等を陽性カットオフ値として算出する．例えば，増幅産物を電気泳動で分離し，蛍光染色等で陽性バンドを検出する場合には，マイコプラズマを含まない細胞から得られた検体は陽性バンドが検出されないことを確認すること．また，定量的PCR法を用いて検出する場合には適切な増幅サイクル数をカットオフ値として設定すること．また，設定したカットオフ値の妥当性を証明すること．NATの検出には検体からの核酸の抽出効率も影響するため，細胞懸濁液に含まれるマイコプラズマの検出感度を評価する．

上記マイコプラズマ参照品の各菌種について，最低3つの異なる10倍希釈列を作成し，統計解析を可能とするため各希釈列について合計24となるように十分な繰り返し数を試験する

必要がある．例えば，3つの希釈列を異なる日に各希釈段階で8回繰り返す，4つの希釈列を異なる日に各希釈段階で6回繰り返す，あるいは6つの希釈列を異なる日に4回繰り返して実施してもよい．希釈列の数を扱いやすい量にするために，陽性カットオフ値(陽性シグナルが得られる最高希釈倍率)を求めるための予備試験を行うべきである．希釈の範囲は予備的に求められたカットオフ値の周辺で選ぶことができる．試験により95 %の確率で検出されるマイコプラズマの濃度(CFU等)を適切な統計学的解析により算出する．これらの結果は分析法の変動を評価するために用いることもできる．

4) 頑健性

頑健性とは，パラメーターの小さな意図的変動で変化しない能力の指標であり，通常の使用での分析法の信頼性を示すものである．頑健性の評価は開発段階で検討すべきである．パラメーターを意図的に変動させることにより分析法の信頼性を示す必要がある．NATでは、パラメーターの小さな変動により結果に大きく影響する可能性がある．試薬濃度($MgCl_2$, プライマー，デオキシリボヌクレオチドなど)を小さく変動させた試験が開発段階で実施されていれば、方法の頑健性が示される．抽出キットや抽出法の変更，サーマルサイクラ―の種類の違いも評価される．

5) NATをA法及びB法の代替法として用いる場合

NATはA法(培養法)，B法(指標細胞を用いたDNA染色法)の代替法として用いることができる．この場合，同等性試験を実施する必要がある．試験では主としてNATとA法又はB法との検出感度の比較を行うが，特異性(検出可能なマイコプラズマパネル，偽陽性の結果)についても考慮すべきである．

検出感度の判定基準は以下のとおりである．

・A法(培養法)の代替法とする場合、NATは3)に示すマイコプラズマ7種全てについて10 CFU/mLを検出可能なことを示す必要がある．

・B法(指標細胞を用いたDNA染色法)の代替法とする場合，NATは3)に示すマイコプラズマ7種全てについて100 CFU/mLを検出可能なことを示す必要がある．

どちらの場合も，判定基準に達することを示すにはCFUで適切に値付けされたマイコプラズマ参照品を用いる必要がある．以下の2つの方法のうち一つをこの同等性試験として用いることができる．

・CFUで値付けされたマイコプラズマ株を用いてNATをA法又はB法と並行して実施し，両者の検出限界を同時に評価する．

・NATによる試験結果をA法又はB法の評価で得られたデータと比較する．この場合，両者の評価に用いる参照品のCFUの値付け及び安定性について注意深く説明すること．

あるいは，試料に含まれるマイコプラズマ核酸のコピー数等で同等の検出感度を示すことでもよい．この場合，1 CFUに相当するマイコプラズマのコピー数等を明らかにしておく必要がある．

6) 対照群

・内部対照：バリデーションにおいて内部対照を用いることにより，検体由来の阻害物質等による影響を受けず核酸増幅が適切に行われていることが確認できる．また日常の試験では、抽出操作に問題がなく，またNAT反応を阻害する物質がないことを示すために必要となる．内部対照はプライマー結合部位その他の適切な配列を用いる．検体から核酸を抽出する前に添加し，核酸の抽出，逆転写，増幅，検出の全体の対照となることが望ましい．検体となる細胞の遺伝子を内部対照として用いることもできる．

・外部対照：外部陽性対照は，試験条件のバリデーションに用いられるマイコプラズマ種のうち，一種類以上の適切なマイコプラズマ種について標的配列の一定のコピー数あるいは一定のCFUを含むものである．陽性対照の一つは期待される感度が達成できることを示す陽性カットオフ値近傍にセットする．陰性対照は，標的配列を含まないもので，必ずしも検体と同じマトリクスである必要はない．

7) 結果の解釈

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．バリデーションでは必要に応じて，陽性の結果の確認のための方法を確立しておくこと．

C-4 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(NAT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，35～38 ℃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* (ATCC 17981，NBRC 14858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，35～38 ℃で3～6日間培養する．