動物用再生医療等製品の開発に必要な試験法等に関する自主基準

第1版
（2022年）

収載基準

- 製造に用いる原材料等の使用基準
- 有効性に係る細胞の品質管理
- 安全性に係る細胞の品質管理
- 生産・流通における細胞の品質管理
- 臨床試験の有効性評価

一般社団法人動物再生医療推進協議会
Consortium for Advancement of Animal Regenerative Medicine
(CARM)

はじめに

一般社団法人動物再生医療推進協議会（CARM）は、動物用再生医療等製品の開発・実用化に向けて、関連企業（産）及び関連学術研究団体（学）を構成員として 2015 年以来活動を行ってきています。また、オブザーバーとして規制当局（官）の参加も得て、課題解決に向けた意見交換も行っているところです。

動物用再生医療等製品の承認審査において、申請者の負担を軽減し審査の迅速化を図るためには、承認申請に必要な安全性試験等について、必要な試験方法とその評価法を明らかにすることが重要であることから、農林水産省では、2014 年から「動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業」を開始しました。CARM の会員である動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会が本事業の実施主体となり、2019 年に「動物細胞加工製品（同種由来）の品質及び安全性確保に関する指針（案）」及びその「解説書（案）」、並びに「動物細胞加工製品（自己由来）の品質及び安全性確保に関する指針（案）」及びその「解説書（案）」を作成しました。

作成された「指針（案）」及び「解説書（案）」には、動物細胞加工製品の品質及び安全性を確認するための試験法や評価基準等について記載されていますが、開発に必要な試験法が確立されていないもの、評価基準が明確とはなっていないもの等があります。そこで、「指針（案）」及び「解説書（案）」では未だ不明確で、再生医療等製品の実用化に向けて解決すべき事項について、CARM は課題の抽出と優先順位の確認及び具体的な解決策等を整理するために、5 つのワーキンググループ（WG）を設置して検討を行ってきました。

このたび、各 WG が取りまとめた成果を、「動物用再生医療等製品の開発に必要な試験法等に関する自主基準」として公表いたしますので、ご活用いただければ幸いです。

なお、本「自主基準」は、関連する科学的知見の蓄積や技術の発展等に対応して改訂を行う予定にしておりますので、お気づきの点がございましたらお知らせいただきますようお願いいたします。

目次

第 1 章　製造に用いる原材料等の使用基準　・・・・・・・・・・・・・・・ 1

第 2 章　有効性に係る細胞の品質管理　・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

第 3 章　安全性に係る細胞の品質管理　・・・・・・・・・・・・・・・・ 15
I.　無菌試験　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17
II.　マイコプラズマ否定試験　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
III.　エンドトキシン試験　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50
IV.　ウイルス試験　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 65
V.　培養工程由来不純物の評価方法　・・・・・・・・・・・・・・・・ 76

第 4 章　生産・流通における細胞の品質管理　・・・・・・・・・・・・・ 89

第 5 章　臨床試験の有効性評価　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 93

担当者一覧　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 97

第１章

製造に用いる原材料等の使用基準

1. はじめに

近年、ヒト再生医療の進捗と並行して、犬、猫といった愛玩動物に対する再生医療も大きく変わろうとしている。2014 年に施行された「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（薬機法）」では再生医療等製品が新たに組み込まれ、ヒト用だけでなく動物用の製品も承認され始めた。また、日本獣医再生医療学会及び日本獣医再生・細胞療法学会から「犬及び猫における再生医療及び細胞療法の安全性確保に関する指針」が公表され、犬、猫に対して適切に再生医療を提供するための取り組みも進められている。

現在、すでに実施されている動物に対する再生医療としては、幹細胞や免疫細胞を利用するものがあるが、使用する培養液の基準は整備段階である。一方、ヒト細胞の培養に使用する培養液に関しては、生物由来原料基準、ICH-Q5A 等の考えを培養液に反映した PMDA 主導の材料適格性相談の新設により、ウイルスのコンタミネーションなどを排除した製品が承認されるようになってきており、その考えが今後の培養液開発にも影響しつつある。こうした背景からも、動物の再生医療に使用される培養液に関しても原材料等の使用基準のワーキンググループを通じて『動物の細胞治療における培養液に適した成分や基材の基準』について提案する。

2. 培養液の原材料

培養液に使用できる原材料を選定する上で、必須となってくるのは細菌、真菌、ウイルスなどコンタミネーションが否定されていることである。通常、ヒト血液などを原料にするものであれば、生物由来原料基準に明記されている梅毒トレポネーマ、HBV、HCV、HIV-1、HIV-2、HTLV-1 が否定されること、かつ適切な不活化処理が実施されていることが挙げられる。動物に関する否定すべき病原体に関する記載は、「動物用ワクチン−バイオ医薬品研究会　平成 30 年度新技術を活用した動物用医薬品等の基準等作成事業　事業報告書」にあるが、実際、このような病原体が否定された原材料は存在せず、培養液製造企業で、最終的な製品に対して、これら病原体に対する否定試験などを実施することはコスト面からも極めて難しい。こうした背景からも、動物再生医療に使用される培養液の原材料としては、病原体のコンタミネーションが否定できる動物由来成分フリーの原材料や、熱や酸などを使用して加工される高度精製品を選択すべきである。従って、下記に示した基準を満たす原材料（DMEM など一般的な基礎培地も含む）から構成され、FBS などの動物由来原料を使用することなく細胞培養可能な無血清培地こそが、動物再生医療に使用される培養液としては最も望ましいと考えている。ただし、「動物用生物由来原料基準」を満たす原材料や、ガンマ線照射によるウイルスクリアランスが証明された製品、原材料等に関しては、この

限りではない。

表 1　動物再生医療に使用される培養液に使用可能な主な原材料等の基準

原材料のカテゴリー	基準
アミノ酸	植物由来品、化学合成品、微生物生産品、ヒト毛髪由来品で、生産時に動物由来成分を使用せず、動物由来品に関しては高度精製品であること。 各種証明書を取得できること。 各国薬局方準拠品であれば尚可。
ビタミン	植物由来品、化学合成品で、生産時に動物由来成分を使用しないこと。 各種証明書を取得できること。 各国薬局方準拠品であれば尚可。
微量金属	生産時に動物由来成分を使用しないこと。 各種証明書を取得できること。 各国薬局方準拠品であれば尚可。
無機塩	生産時に動物由来成分を使用しないこと。 各種証明書を取得できること。 各国薬局方準拠品であれば尚可。
脂質・脂肪酸	植物由来品、化学合成品、微生物生産品、羊毛由来品で、生産時に動物由来成分を使用せず、動物由来品に関しては高度精製品であること。 各種証明書を取得できること。 各国薬局方準拠品であれば尚可。
タンパク質（サイトカイン、ペプチド性ホルモン含む）	遺伝子組換え品であること。 生産時に動物細胞を使用せず、精製時に動物由来成分を使用しないこと。 各種証明書を取得できること。
その他①（糖、バッファーなど）	植物由来品、化学合成品、微生物生産品で、生産時に動物由来成分を使用しないこと。

	各種証明書を取得できること。 各国薬局方準拠品であれば尚可。
その他②　（DMEM、RPMI1640 といった基礎培地や PBS など）	動物由来原料を使用せず、各種証明書を取得できること。 cGMP 生産品であれば尚可。
その他③（FBS）	無菌であること マイコプラズマ陰性であること PI3、IBR、BVD 陰性 原産国　国際獣疫事務局による BSE ステータスが「無視できるリスク」、「管理されたリスク」であること
水	導電率　2.1 μS/cm 以下 TOC　500 ppb 以下 生菌数　10 CFU/100mL エンドトキシン値　0.25 EU/mL 以下を満たす UF 水や、注射用水であること。

※特に海外輸入品については、アニマルフリー品と記載があっても研究用試薬であるため証明書が発行されないことがある。この場合、証明書が発行される代替品があれば、それらを使用することが望ましい。一方、代替品が無い場合には、カタログ等の記載事項を元に「動物用生物由来原料基準」に合致することを十分に評価して使用すること。

3. 培養液等の容器

培養液、PBS、その他培養に使用する各種試薬などを保存する容器としては以下の基準を満たすものが望ましい。

表 2　容器に関する基準

材質	ガラスや、食品の包装規格を満たす PET（ポリエチレンテレフタラート）などが望ましい。ただし、有機溶剤、強酸、強アルカリは容器の強度を著しく低下させる恐れがあるため、使用限界濃度等は十分検討する必要がある。
品質規格	USP Class IV などを満たす医療グレードであること 細胞毒性を有さないこと パイロジェンフリーであること

	ガンマ線照射滅菌されていること が望ましい。

4. 製造環境

培養液、PBS、その他培養に使用する各種試薬などを製造する環境としては、以下に示す条件を満たすことが望ましい。

表 3　製造環境

秤量、調液	秤量室と調液室は個別に設置し、局所的な排気システム等も導入し、原料のクロスコンタミネーションを防止できる環境下であること。
分注	分注作業は、グレード A 管理下で行うことが望ましく、定期的並びに作業時に完了モニタリングを行うことが望ましい。
ラベリング、梱包	清浄域であること。

5. 培養液の品質管理

生産された培養液に関しては、原料に関する基準に加えて下記表に示す品質管理基準も必要である。

表 4　品質管理基準

試験項目	測定方法	基準値
無菌試験	日本薬局方（局方）　メンブランフィルター法	培養 14 日後に菌の増殖を認めない。
	迅速無菌測定	局方で定められた菌の増殖を認めない（おおよそ 2 日程度）
エンドトキシン	局方　ライセート試薬を用いたカイネティック比色法、比濁法、ゲル化法など	0.3 EU/mL 以下
マイコプラズマ	局方直接培養法 局方　リアルタイム　PCR 法 ATP アッセイなど	陽性の反応を認めない

6. 培養基材

細胞培養に使用する基材に関しては、サイズ、形状等、各社より様々な製品がラインナップされており、用途に応じて選択して使用することが必要である。

表 5　細胞培養基材例

品目	サイズ等	規格
チップ	数 μL~数 mL まで選択可能で、用途によってはタンパク質低吸着やパイロジェンフリーの製品を使用することが望ましい。	非毒性であること。 低エンドトキシン、もしくはフリーであること。 滅菌済みであること。
ピペット	数 mL~数百 mL まで選択可能で、用途に応じて個別包装のペーパー/プラスチック、プラスチックやバルク包装を使用することが望ましい。	非毒性であること。 低エンドトキシン、もしくはフリーであること。 滅菌済みであること。
シャーレ	直径、数 cm~十数 cm まで選択可能で、用途に応じて細胞接着、非接着を選択することが望ましい。	非毒性であること。 低エンドトキシン、もしくはフリーであること。 滅菌済みであること。
フラスコ	数十 cm^2~数千 cm^2 まで選択可能で、用途に応じて細胞接着、非接着を選択することが望ましい。	非毒性であること。 低エンドトキシン、もしくはフリーであること。 滅菌済みであること。
プレート	6 穴~96 穴まで選択可能で、用途に応じて細胞接着、非接着や径の大きさを選択することが望ましい。	非毒性であること。 低エンドトキシン、もしくはフリーであること。 滅菌済みであること。
バッグ	容量　数百 mL 以上の浮遊培養にて使用されることが多い。	非毒性であること。 低エンドトキシン、もしくはフリーであること。 滅菌済みであること。

凍結保存チューブ	容量 1 mL~5 mL 程度のものを選択可能。	非毒性であること。 低エンドトキシン、もしくはフリーであること。 滅菌済みであること。
遠心チューブ	15 mL~200 mL 程度のものを選択可能	非毒性であること。 低エンドトキシン、もしくはフリーであること。 滅菌済みであること。

7. その他

培養した細胞を培養する際や実際に患畜に細胞などを投与する際に使用する基材を下記に示す。

表 6　その他基材

品目	規格
セルスクレーパー	個別包装、滅菌済み、パイロジェンフリーが望ましい。
無菌フィルター	個別包装、タンパク質などが低吸着のものが望ましい。
シリンジ	個別包装、医療グレードが望ましい。
輸液セット	個別包装、医療グレードが望ましい。

第２章

有効性に係る細胞の品質管理

1. はじめに

本 WG の課題は次のとおりである。

(1) 「細胞の同定」に必要な評価法の検討

(2) 「細胞の定量、純度評価」するために必要な評価法の検討

(3) 「細胞の活性を評価」するために必要な評価法の検討

しかしながら上記項目については製品によって評価法も評価基準も大きく異なるため、どの製品にも適応可能な評価法を提示することは難しい。個々の製品の特長、性状に適した品質管理方法と基準を採用すべきであり、その際の考え方の参考となるポイントの一例を以下に提示する。

2. 有効性に係る細胞の品質管理を実施するに際して明確にするポイント

課題について明確にするポイントを以下に記載する。

(1)「細胞の同定」に必要な評価法の検討

1) 目的の細胞と非目的の混入細胞

間葉系幹細胞（脂肪組織由来、骨髄由来、歯髄組織由来、滑膜由来など）、未分化 iPS 細胞、分化 iPS 細胞（神経細胞、表皮細胞等）、造血幹細胞、血球細胞、免疫細胞、線維芽細胞、遺伝子導入細胞など。

何が「目的の細胞」であるのかを明確にすることが望ましい。その上で安全性へのリスクが高い目的外の細胞の混入が想定される場合は、何が「混入の可能性がある目的外の細胞」であるのかを可能な範囲で明らかにすることが望ましい。本章は有効性に関する章であり安全性について該当章を参照されたいが、目的外細胞由来混入によるリスクについては適切に評価されることが望ましい。
また細胞を同定することが困難な製品（例えば人工臓器、シート状の人工組織など）についてはこの限りではなく、細胞同定が困難であることについて説明することが望ましい。

2) 評価対象

タンパク質発現、遺伝子発現、糖鎖、タンパク質のリン酸化、ゲノムのメチル化、活性などの指標等が考えられる。信頼性の高い評価法として確立されていること、再現性・汎用性が高いこと、医薬品評価や文献などで実績があること、コスト面・技術面で導入のハードルが高すぎないことなど等、解析手技、文献報告例などを考慮すると、タンパク質発現、遺伝子発現を評価対象とした方が現実的のように思われる。それぞれの製品の特長に応じた、実施可能な評価を検討する。

3) 評価対象の選定

目的細胞のマーカーとしてどのタンパク質（例：細胞表面マーカー）、どの遺伝子（例：目的細胞に特徴的な遺伝子発現パターン）、どんな指標を評価すべき

なのかを定めておくことが望ましい。目的細胞のマーカー分子として文献等で報告されている分子、作用機序・有効性に関わる分子、それら分子に対する優れた抗体の有無と入手性、*in vitro* と *in vivo* とで発現量が大きく乖離しない分子など、どういった基準でどの分子や指標を選定するのかを可能な限り説明する。

目的の細胞を同定・評価するために「何に着目」して、「どのように評価」するのかを明確にすることが望ましいが、現実的に困難な場合はその理由について説明する。

また安全性へのリスクが高い目的外の細胞の混入が想定される場合、目的外の細胞を「何の分子」に着目して同定・評価するのかを明確にする。

(2) 細胞の定量、純度評価のために必要な評価法の検討

以下に挙げた評価法に適さない製品の場合も考えられる。可能な限り各々の製品の特性に応じた評価法を検討する。

1) 細胞数の測定

細胞数の測定は原則として十分な実績と信頼のある手法、あるいはバリデーションされた手法を採用することが望ましい。また少なすぎる、もしくは多すぎる測定値は正確な細胞数を反映していないことがあるため、バラつきの少ない正確な細胞数の測定を行うためには測定値の有効測定範囲を設定する必要がある。

細胞数測定を実施する場合、その手法、試薬、器具・装置、作業手順、有効な測定範囲について明確にする。

2) 「目的の細胞」と「非目的の混入細胞」

同上

3) 目的の細胞の「生細胞」と「死細胞」

生存率評価方法については、検定或いは認証済み等の信頼性の高い血球計算盤による計測、もしくはその他のバリデーションされた手法が原則として望ましい。

生存率評価を実施する場合、その手法、試薬、器具・装置、作業手順について明確にする。

4) 非細胞の混入物

培養等に由来する非細胞の混入物、凍結液等の由来する成分がこれに該当する。例えば PBS、基礎培地成分や牛血清成分、添加サイトカイン、DMSO、細胞接着マトリックス成分等、様々な混入物が想定されるが、リスクの高い分子の混

入が想定される場合は、混入の可能性がある分子、その測定方法、許容される混入量について明確にする。

(3)「細胞の活性を評価」するために必要な評価法の検討

作用機序・有効性に関連している評価項目である点、再現性がありバラつきの少なく精度の高い評価系である点、文献報告等で報告実績がある点などポイントが挙げられる。必ずしも全てを満たさなければならないというわけではないが、評価法の妥当性について検討されていることが望ましい。サロゲートマーカー（代用マーカー）にて評価する場合、一定のエビデンス構築と説明が必要と考える。細胞活性の評価について、評価項目選定のエビデンスについて明確にする。

技術面、設備面、コスト面も考慮した上で、現実的に実施可能な細胞活性の評価方法について手法、試薬、器具・装置、作業手順、有効な測定範囲について明確にすることが望ましい。

目的の細胞が 20％程度であっても十分な有効性を示し、かつリスクの少ない製品が、今後、開発品として上がってくることも考えられる。目的細胞含有率や生存率などの具体的な量的な指標、リスクの判断基準については製品毎に異なることも考えられるため、本 WG では言及しない。

ただしマーカーの場合と同様に、細胞の活性で評価することが困難な製品（例えば人工臓器、シート状の人工組織など）はその限りではなく、活性評価が困難であることについて言及する必要がある。

第３章

安全性に係る細胞の品質管理

Ⅰ.　無菌試験

1.　無菌試験を行う目的

動物細胞加工製品の使用法としては、静脈内への点滴、腹腔や疾患臓器への直接注射等が想定されており、剤型上は注射剤に相当するので製品の無菌性は極めて重要である。特に免疫力が低下している個体では、血液中で細菌が急速に増殖し、敗血症に至るリスクが通常より高くなる。

動物細胞加工製品の製造においては、原料である細胞・組織を無菌化処理することや、製造工程内に滅菌工程を設定することはできない。また、製造工程で細菌の混入があれば細胞培養中に増殖することも想定される。更に、自己由来の動物細胞加工製品では最終製品の品質検査結果を待たずに投与しなければならない場合が多い。従って、原料の受入れ試験、中間製品での試験等を含めた製造工程全体を管理することで最終製品の無菌性を確保する必要がある。

なお、培養法による無菌試験法は、試験期間が長いため、特に迅速性が求められている。

2.　無菌試験の公定試験

現在、日本において動物用医薬品としては主に日本薬局方（局方）あるいは動物用生物学的製剤基準（動生剤基準）に収載されている無菌試験法が実施されている。本試験法は、培養法によって増殖しうる微生物（細菌又は真菌）の有無を試験する方法である。局方ではメンブランフィルター法と直接法が収載されているが、動生剤基準では局法の直接法とほぼ同じ方法のみが収載されている。

(1) 第十八改正局方の無菌試験法

無菌試験は「直接法」又は「メンブランフィルター法」によって行われる。試験には適切な陰性対照を置く。試験環境は無菌条件下で行い、環境モニタリングで定期的に監視しなければならない。

1) 直接法

培地容量の 10 %を超えないように試験サンプルを培地に直接接種して試験する。試験サンプルが抗菌活性を有する場合は、適切な中和剤で中和した後、又は十分な量の培地で希釈することによって試験を行う。

2) メンブランフィルター法

ろ過可能な試験サンプルで行う。メンブランフィルターは、孔径 0.45 μm 以下のものを用いる。

1 g/L の肉製又はカゼイン製ペプトン溶液(pH7.1±0.2)のような無菌希釈液の少量をろ過器中のメンブランフィルター上に注ぎろ過する。「手法の適合性試験」

（後述の e）で決定した前処理を試験サンプルに実施し、メンブランフィルター上に移し、ろ過する。当該製品が抗菌活性を有している場合には、「手法の適合性試験」で用いた無菌希釈液の量でメンブランフィルターを 3 回以上 5 回以下で洗浄する。メンブランフィルターを 2 種類の無菌試験用培地に入れるか、又はメンブランフィルターを装着したろ過器内に試料溶液を二等分にろ過後、それぞれの培地を加える。培地は 14 日間以上培養する。

なお、「ステリテスト（株式会社メルク）」や「ステリザルト（ザルトリウス・ジャパン株式会社）」のような装置を使用すると、操作中の細菌のコンタミリスクが小さくなる。

3）試験の詳細

a）サンプル供試量

表 1　サンプル供試量

製品容器の内容量	最少供試量
1 mL 未満	全量
1 mL 以上 40 mL 以下	半量、ただし 1 mL 以上
40 mL 超 100 mL 以下	20 mL
100 mL 超	10%，ただし 20 mL 以上

b）培地及び培養温度

① ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地；真菌及び好気性細菌の培養に適している。20～25 ℃ 培養。

② チオグリコール酸培地；嫌気性細菌の培養を主目的としているが，好気性細菌も検出できる。30～35 ℃ 培養。

c）判定の方法

培養期間中及び最終日（14 日間以上）に、培地に肉眼的な微生物の増殖があるかどうかを確認する。被験材料が培地を混濁させ、微生物増殖の有無を肉眼的に容易に判定できない場合には、培養開始から 14 日後に当該培地の一部（1 mL 以上）を同じ培地の新たな容器に移し、元の培地と移植した培地の両方を 4 日間以上培養する。

陰性（無菌試験合格、無菌試験適合）：微生物の増殖が観察されない場合

陽性（無菌試験不合格、無菌試験不適合）：微生物の増殖が観察され、かつ、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い場合

無効：以下の条件のうち、1 つ以上を満たした場合

- 無菌試験施設の微生物学的モニタリングデータに問題が認められた場合
- 無菌試験中に用いた試験方法を調査した結果、問題が認められた場合
- 陰性対照中に微生物の増殖が認められた場合
- 当該無菌試験から分離された微生物の同定後、この菌種の増殖が無菌試験実施中に用いた材料及び手技又はそのいずれかに問題があると明らかに判断される場合

試験が無効であることが判明したら、初回試験と同じ数の容器を用いて再試験を行う。再試験において微生物の増殖が観察されない場合は、被験製品は無菌試験合格と判断する。再試験において微生物の増殖が観察された場合には、被験製品は無菌試験不合格とする。

d）無菌試験の適合性試験

①無菌性

培地の一部を 14 日間培養し、微生物の増殖がないことを確認する。

② 好気性菌、嫌気性菌及び真菌に対する培地性能試験

無菌試験用培地の各ロットにおいて試験を行う。接種する菌の継代数は、マスターシードロットから 5 代以内のものを使用する。（菌種は表 2 を参照）それぞれの菌について、100 CFU 以下の微生物を接種し、細菌の場合は 3 日間、真菌の場合は 5 日間以内に、微生物の増殖が認められたものを合格とする。

表 2　培地性能試験及び手法適合性試験に適している試験用菌株

	菌種	適している株
真菌	*Aspergillus brasiliensis*	ATCC 16404、IP 1431.83、IMI 149007、NBRC 9455
	Candida albicans	ATCC 10231、IP 48.72、NCPF 3179、NBRC 1594
好気性細菌	*Bacillus subtilis*	ATCC 6633、CIP 52.62、NCIMB 8054、NBRC 3134
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027、NCIMB 8626、CIP 82.118，NBRC 13275
	Staphylococcus aureus	ATCC 6538、CIP 4.83、NCTC 10788、NCIMB 9518、NBRC 13276

嫌気性細菌	*Clostridium sporogenes*	ATCC 19404、CIP 79.3、NCTC 532 又は ATCC 11437、NBRC 14293

e）手法の適合性試験

手法の適合性試験を行うのは、新しい製品に無菌試験を行う場合及び試験の実施条件に変更があった場合（例；試験サンプルの組成が変更された場合、試験方法を変更した場合、無菌試験用培地のメーカーを変更した場合、など）である。サンプルをろ過しても抗生物質が残留する場合は多々あるので、必ず確認が必要である。実際の無菌試験の方法と、前処理などを含めて、厳密に同じ方法で試験を行う。陽性対象として、培地性能試験を行う。

メンブランフィルター法：試験に供された容器の内容物をろ過した後、最終回の洗浄液に表 1 の菌株を 100 CFU 以下加えたものをろ過する。

直接法　：　試験に供された容器の内容物を培地に加えた後、表 1 の菌株 100 CFU 以下をその培地に接種する。

培地を含む全ての容器は規定の温度で最長 5 日間培養する。培養後、陽性対照に匹敵する肉眼的に明瞭な増殖が得られれば、被験製品は本試験条件下で抗菌活性を持たないか、又は抗菌活性が十分に除去されたものとみなす。当該手法は適切であり、試験条件を変更する必要はない。

被験製品の存在下で陽性対照に匹敵する肉眼的に明瞭な増殖が得られなければ、被験製品は当該試験条件下では十分除去できない抗菌活性を有している。この場合、抗菌活性を除去するために条件を変えて手法の適合性試験を繰り返す。

(2) 動生剤基準の無菌試験

（１）細菌否定試験

1.1 培地

別に規定する場合を除き、次の組成の液状チオグリコール酸培地を用いる。培地の液量は通常 1 本当たり 15mL 以上とする。

1.1.1 液状チオグリコール酸培地

1.1.1.1 組成

Ｌ－シスチン	0.5 g
寒天	0.75 g
塩化ナトリウム	2.5 g
ブドウ糖	5.0 g
酵母エキス	5.0 g
カゼイン製ペプトン	15.0 g

チオグリコール酸ナトリウム　　0.5 g
0.1w/v%レザズリン液　　1.0mL
水　　1,000mL

滅菌後の pH が 6.9～7.3 となるように調整し、121 °C で 15 分間高圧滅菌し、2～25 °C の暗所に保存する。培地の淡赤色の層が上部 1/3 を超えたものは使用しない。適当な品質の乾燥製品を用いてもよい。

1.1.1.2 適合性

培地は、次に掲げる試験に適合しなければならない。

1.1.1.2.1 発育試験

Clostridium sporogenes、*Pseudomonas aeruginosa* 及び *Staphylococcus aureus* のそれぞれ 100CFU 以下又は *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* 及び *Clostridium sporogenes* のそれぞれ 100CFU 以下を接種し、30～35 °C で 72 時間培養するとき、十分に増殖しなければならない。

1.1.1.2.2 無菌性試験

培地の一部を 30～35 °C で 14 日間培養するとき、微生物の増殖を認めない。

1.2 培養材料

検体及び試験品を用いる。なお、溶解用液が非添付の凍結乾燥製剤では、リン酸緩衝食塩液等の適当な溶解用液で用法及び用量に記載された規定量に溶解したものを用いる。

1.3 検体等の数量

検体の試験を行う場合は、別に規定する場合を除き、全ての容器から試験を行うに十分な量を採る。試験品の試験を行う場合は、別に規定する場合を除き、7 本以上の容器について試験を行う。

1.4 培地への接種量

検体の場合は、各材料ごとに培地 4 本を用い、2 本には 1mL ずつ、他の 2 本には 0.5mL ずつ材料を接種する。

試験品の試験では、小分容器の表示液量と培地への接種量は、表 3 による。

表 3　小分け容器の表示液量及び 1 容器当たりの接種量及び培地数
（細菌否定試験）

表示液量	1容器当たりの接種量	1容器当たりの培地数	培地への接種
3mL　未満	1/4　量	1　本	1/4量　1本
3mL以上5mL未満	1　mL	2　本	0.5mL　2本
5mL以上10mL未満	1.5 mL	2　本	1　mL　1 本 0.5mL　1本
10mL以上	3　mL	2　本	2　mL　1 本 1　mL　1本

1.5 培養及び観察

検体等を培地に接種後、十分に混和し、30～35 ℃ で 14 日間以上培養し、その間 3～5 日目、7～9 日目及び 14 日目に菌の発育の有無を観察する。

ただし、製剤により培地が混濁した場合その他必要な場合は、7 日目に新しい培地に植継ぎ、同じ温度で 8 日間以上培養して観察する。

1.6 判定

試験の結果、菌の発育を認めないときは、この試験に適合とする。

（２）真菌否定試験

2.1 培地

別に規定する場合を除き、液状チオグリコール酸培地を用いる。チメロサールを含まない検体等には、別に規定する場合を除き、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地を用いる。

培地の液量は、通常 1 本当たり 15mL 以上とする。

2.1.1 液状チオグリコール酸培地

2.1.1.1 組成

（１）の 1.1.1.1 を準用する。

2.1.1.2 適合性

培地は、次に掲げる試験に適合しなければならない。

2.1.1.2.1 発育試験

Aspergillus brasiliensis、 *Bacillus subtilis* 及び *Candida albicans* のそれぞれ 100CFU 以下又は *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*、*Aspergillus brasiliensis* 及び *Candida albicans* のそれぞれ 100CFU 以下を接種し、20～25 ℃ で 5 日間培養するとき、十分に増殖しなければならない。

2.1.1.2.2 無菌性試験

（１）の 1.1.1.2.2 を準用する。ただし、培養温度は 20～25 ℃ とする。

2.1.2 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地

2.1.2.1 組成

カゼイン製ペプトン	17.0 g
大豆製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.3 g
水	1,000mL

滅菌後の pH が 7.1～7.5 となるように調整し、121 ℃ で 15 分間高圧滅菌し、2～25 ℃ の暗所に保存する。適当な品質の乾燥製品を用いてもよい。

2.1.2.2 適合性

（1）の 1.1.1.2 を準用する。

2.2 培養材料

（1）の 1.2 を準用する。

2.3 検体等の数量

（1）の 1.3 を準用する。

2.4 培地への接種量

検体の場合は、各材料ごとに培地 4 本を用い、1mL ずつ材料を接種する。

試験品の試験では、小分容器の表示液量と培地への接種量は、表 4 による。

表 4　小分け容器の表示液量及び 1 容器当たりの接種量及び培地数
（真菌否定試験）

表示液量	1 容器当たりの接種量	1 容器当たりの培地数	培地への接種
3mL　未満	1/2 量	2 本	1/4量　2本
3mL以上5mL未満	1 mL	2 本	0.5mL　2本
5mL以上	2 mL	2 本	1 mL　2本

2.5 培養及び観察

検体等を培地に接種後、十分に混和し、20～25 ℃ で 14 日間以上培養し、その間 3～5 日目、7～9 日目及び 14 日目に菌の発育の有無を観察する。

ただし、製剤により培地が混濁した場合その他必要な場合には、7 日目に新しい培地に植継ぎ、同じ温度で 8 日間以上培養して観察する。

2.6 判定

（1）の 1.6 を準用する。

3 再試験

試験（1）及び（2）の結果が疑わしい場合は、新たに 2 倍量以上の検体等を用いて試験を反復しなければならない

3. 無菌試験に応用可能な試験法

科学技術の進歩により、細菌の生理活性、菌体成分等を高精度に測定できる方法が数多く開発され、新たな細菌検出法、計数・計量法が登場している。無菌試験が短縮されると、り患動物への投与や製品の出荷を早められるだけでなく、異常時への迅速な対応や是正も可能となる。微生物迅速試験法は従来の培養法と比較して、必ずしも全ての点において優れているわけではないが、細胞加工製品のような製品寿命が極めて短い製品に対しては優位であることが多く、ヒトの再生医療分野でも積極的に検討され、取り入れられている。

第十八改正局方参考情報に記載された微生物迅速試験法の中で、無菌試験に

適用可能な原理を以下の表 5 に挙げる。

表 5　無菌試験に応用可能な試験法とその原理

方　法		対象	原　理　等
直接測定法	固相サイトメトリー	菌体	フィルターなどの担体に捕捉した細菌が発するシグナルを直接的に検出する。検出・測定装置として、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡などを含む、種々の光学検出・測定装置を用いる。
	フローサイトメトリー	菌体	流路系を通過する細菌が発するシグナルを直接的に検出する。染色剤を選択することにより、生理活性等にかかわるシグナルを得ることもできるほか、自家蛍光を利用することもある。検出･測定装置として、種々の光学検出･測定装置を用いる。
間接測定法	核酸増幅法	核酸	微生物がもつ核酸を、対象とする微生物に特異的なプライマーを用いて増幅し、検出する。定量的 PCR 法を用いることにより、定量も可能である。
	生物発光法・蛍光法	ATP 等	菌体内の ATP 等を酵素反応による発光現象・蛍光現象をもとに測定する。
	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。平板培養法と同じ培養条件(培地組成、温度等)を使用できる。
	インピーダンス法	増殖能	細菌が増殖の際に培地成分を利用し産生する代謝産物の増加により生じる電気特性の変化を利用する。
	ガス測定法	増殖能	細菌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利用する。
	ハイスループット・シークエンシング	核酸	試料中に存在する多種多様な細菌から抽出した核酸の配列を決定し、その情報をもとに群集構造を解析する。

(1) 固相サイトメトリー

フィルターなどの担体に捕捉した細菌が発するシグナルを直接的に検出する。染色剤を選択することにより、生理活性等にかかわるシグナルを得ることもできるほか、自家蛍光を利用することもある。また特定の細菌を選択的に検出する

ため、遺伝子プローブや抗体、また蛍光標識したファージなどを用いることがある。検出・測定装置として、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡などを含む。種々の光学検出・測定装置を用いる。

長　所	短　所	製品等
・数時間で結果が得られる ・検出した菌を、蛍光顕微鏡で目視確認できる ・検出菌の菌種同定可能	・ろ過できないサンプルは不可能 ・装置・試薬が高価	ビオメリュージャパン KK「Scan® RDI」

(2) フローサイトメトリー

流路系を通過する細菌が発するシグナルを直接的に検出する。染色剤を選択することにより、生理活性等にかかわるシグナルを得ることもできるほか、自家蛍光を利用することもある。また特定の細菌を選択的に検出するため、遺伝子プローブや抗体、また蛍光標識したファージなどを用いることがある。検出・測定装置として、種々の光学検出・測定装置を用いる。

長　所	短　所	製品等
・数分～数時間で結果が得られる ・ろ過が不可能なサンプルにも対応可能	・検出限界が 10^2/mL 程度 ・検出菌の菌種同定不可	シスメックス KK「RF-500」 等

(3) 核酸増幅法

微生物がもつ核酸を、対象とする微生物に特異的なプライマーを用いて増幅し、検出する。定量的 PCR 法を用いることにより、定量も可能である。

長　所	短　所	製品等
・数時間で結果が得られる ・ろ過が不可能なサンプルにも対応可能	・死菌と生菌の区別がつかない場合がある ・検出菌の菌種同定不可 ・検出できる菌種が限定的ではないことを証明する必要有り	（開発中）

(4) 生物発光法・蛍光法

菌体内の ATP 等を酵素反応による発光現象・蛍光現象をもとに測定する。

長　所	短　所	製品等
・数分～数時間で結果が得られる ・感度が非常に高く、従来の培養法では検出できなかった菌も陽性になる	・装置によっては、ろ過できないサンプルは不可能 ・細胞の破片が偽陽性になることがある	KK 日立ハイテクソリューションズ「Lumione BL-2000」

(5) マイクロコロニー法

コロニー形成初期のマイクロコロニーを検出・計数する。平板培養法と同じ培養条件（培地組成、温度等）を使用できる。

長　所	短　所	製品等
・検出菌の菌種同定可能	・測定結果が得られるまで数日かかる（培養法の 14 日間よりは短い）	・日本ベクトン・ディッキンソン KK「マイクロバイオ μ3D™」 ・メルク KK「Milliflex® Quantum 微生物迅速検出システム」 ・メルク KK「Milliflex® Rapid 微生物迅速検出システム」

(6) インピーダンス法

細菌が増殖の際に培地成分を利用し産生する代謝産物の増加により生じる電気特性の変化を利用する。

長　所	短　所	製品等
・検出菌の菌種同定可能	・測定結果が得られるまで数日かかる（培養法の 14 日間よりは短い） ・サンプルごとに検量線の作成が必要	（無し）

(7) ガス測定法

細菌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利用する。

長　所	短　所	製品等
・検出菌の菌種同定可能	・測定結果が得られるまで数日かかる（培養法の 14 日間よりは短い）	ビオメリュージャパン KK「バクテアラート 3D 微生物培養検査システム」

(8) ハイスループット・シークエンシング

試料中に存在する多種多様な細菌から抽出した核酸の配列を決定し、その情報をもとに群集構造を解析する。

長　所	短　所	製品等
・無菌試験と同定試験を同時に行える ・数時間で測定結果が得られる	・装置（次世代シーケンサー）と試薬が高価	サーモフィッシャー　ライフテクノロジーズジャパン KK「「Ion S5 XL システム」（装置）及び「Ion 16S Metagenomics キット」（試薬）

4. 動物細胞加工製品（自己・同種由来）の各工程で推奨する試験法

無菌試験として推奨できるのは公定試験であるが、培養法であり 14 日間以上の日数を要するため迅速性に問題がある。このため微生物迅速試験法の応用も考慮すべきである。微生物迅速試験法は、特に細胞加工製品の中間段階での無菌性を確認する方法としては最適である。今回提示した試験法には一長一短があるので、製造する製品の特性も勘案して選択すべきである。当然ながらこれらの方法を採用するためにはバリデーションが必須である。なお、市販品を使用する場合、当該メーカーでのバリデーションデータを入手することでも良い。

ロットが形成でき、かつ比較的長期間の安定性が保証できる同種由来の細胞加工製品の場合、最終製品での無菌試験は公定試験を採用すべきである。

一方、製造サイズが小さい自己由来の細胞加工製品の場合は、微生物迅速試験

法を採用せざるを得ない。

　なお、公定の無菌試験で規定されている接種量、培地本数等については、動物細胞加工製品によっては必ずしも現実的でない場合があるので、実態に合わせた工夫が必要となる。

【参考資料】　表 6　無菌試験迅速測定法

原理	原理の特徴	「製品名」（メーカー名）	所要時間	装置代	ランニングコスト	備考
固相サイトメトリー	フィルターなどの担体に捕捉した細菌が発するシグナルを直接的に検出する。検出・測定装置として、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡などを含む、種々の光学検出・測定装置を用いる。	ScanRDI（ビオメリューージャパン社）	約 1～3 時間	約 4,000 万円以上	約 2,000 円～5,000 円	
フローサイトメトリー	流路系を通過する細菌が発するシグナルを直接的に検出する。染色剤を選択することにより、生理活性等にかかわるシグナルを得ることもできるほか、自家蛍光を利用することもある。検出・測定装置として、種々の光学検出・測定装置を用いる。	RF-500（シスメックス社）	即時	約 350 万円	約 100 円	測定感度が 10 の 2 乗以上なので、無菌試験は不適
		XL-10B（リオン社）	即時	不明	無し	測定対象は「水」なので、細胞用培地は不適
核酸増幅法	微生物がもつ核酸を、対象とする微生物に特異的なプライマーを用いて増幅し、検出する。定量的 PCR 法を用いることにより、定量も可能である。	おそらくニッスイより間もなく上市予定	約 6 時間程度？	不明	不明	

生物発光法・蛍光法	菌体内の ATP 等を酵素反応による発光現象・蛍光現象をもとに測定する。	Lumione BL-2000（日立ハイテクソリューションズ）	約 1 時間	約 2,500 万円	数千円	
マイクロコロニー法	コロニー形成初期のマイクロコロニーを検出・計数する。平板培養法と同じ培養条件(培地組成、温度等)を使用できる。	Milliflex Rapid（メルク社）	1 日～5 日程度	約 3,000 万円	約 5,000～6,000 円	
		マイクロバイオ μ3D（日本 BD）	1 日～5 日程度	約 1,800 万円	数十円	平板培地を使用するので、無菌試験培地と比較が必要
インピーダンス法	細菌が増殖の際に培地成分を利用し産生する代謝産物の増加により生じる電気特性の変化を利用する。	バクトメーター（ビオメリュージャパン社）	販売中止	販売中止	販売中止	
ガス測定法	細菌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利用する。	バクテアラート 3D（ビオメリュージャパン社）	1 日～7 日程度	240 万円～1,700 万円	1,000 円または 1,960 円	

ハイスループット・シークエンシング	試料中に存在する多種多様な細菌から抽出した核酸の配列を決定し、その情報をもとに群集構造を解析する。	Ion S5 XL システム（シーケンサー）及び Ion 16S Metagenomics キット（サーモフィッシャー）	24 時間以内	不明	不明	

装置代は、オプションによって様々なパターンの価格帯があるものが多く、試薬代もプロトコールによって様々な価格になり、具体的に記載するのが難しい。

II.　マイコプラズマ否定試験

1. マイコプラズマ否定試験を行う目的

再生医療において、自己組織・細胞を原材料とする場合には、ウイルスやマイコプラズマなどの原材料に由来する混入はあまり大きな問題とはならないが、同種組織・細胞を使用した再生医療等製品では、製品の安全性を担保する上では極めて重要な課題である。その中でマイコプラズマに関しては、再生医療等製品の原材料への混入の可能性に加え、セルバンク作製時や最終製品の製造段階でも混入、増殖する危険性がある。

以上のことから、マイコプラズマ否定試験の実施は必須であり、万が一混入が認められた場合には、製品が使用される前に確認できる簡便で迅速な試験法が求められる。

2.　マイコプラズマ否定試験の公定試験法

（１）動物用医薬品におけるマイコプラズマ否定試験法

現在、日本において動物用医薬品としては日本薬局方（局方）あるいは動物用生物学的製剤基準（動生剤基準）に準拠しマイコプラズマ否定試験が実施されていることから、その試験法について下記に示す。

１）第十八改正局方 [1)]

＜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＞

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。但し、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又は除去する。

検体を採取後 24 時間以内に試験するときは 2～8 °C 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、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（*M. pneumoniae* ATCC15531、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（ *M. orale* ATCC23714、NBRC14477 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 日目ごとに観察し、液体培地の色調変化を観察した日、及び色調変化がない場合においても、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 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、ATCC17981、NBRC14858 又は同等の種又は株）及び *M. orale*（ATCC23714、 NBRC14477 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 1 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、ATCC17981、NBRC14858 又は同等の種又は株）及び *M. orale*（ATCC23714、NBRC14477 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 35～38 ℃ 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、ATCC17981、NBRC14858 又は同等の種又は株）及び *M. orale*（ATCC23714、 NBRC14477 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）倍率 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 1,000 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方法である。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は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、適正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、核酸の抽出高率が低い場合や、NAT の阻害物質が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 マイコプラズマ抽出のための 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 を 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根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レ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 oral*e（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に対応する最小の菌濃度（CFU 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れることにより、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等）を小さく変動され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、サーマルサイクラー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 を 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、以下の通りである。

・A 法（培養法）の代替法として使用する場合、NAT は 3)に示すマイコプラズマ 7 種全てについて 10CFU/mL で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 100CFU/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 1 つをこの同等性試験として用いることができる。

・CFU で根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、両者の検出限度を同時に評価する。

・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 の根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、1CFU 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の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、1 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 1 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れる方法

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 35mm）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 2mL 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）0.5mL 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、陽性対照及び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。

2）動生剤基準[2)]

検体等にマイコプラズマが存在しないことを調べる次の方法又は International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medical Products のガイドライン（GL34：Testing for the detection of mycoplasma contamination）に定める方法により行う。

1 培地

別に既定する場合を除き、次の組成のマイコプラズマ用液状培地を用いる。培地の液量は、通常 1 本当たり 100mL とする。

1.1 マイコプラズマ用液体培地

1.1.1 組成

1.1.1.1 基礎培地

1,000mL 中

50w/w% 牛心筋浸出液	100mL
獣肉製ペプトン	10g
塩化ナトリウム	5g
ブドウ糖	1g
L-グルタミン酸ナトリウム	0.1g
L-アルギニン一塩酸塩	1g
水	残量

220nm のメンブランフィルターでろ過滅菌し、または 121 ℃ で 15 分間高圧滅菌する。滅菌後の pH を 7.2～7.4 とする。なお、適当な品質の乾燥製品を用いてもよい。

1.1.1.2 培地添加物

1.1.1.1 の基礎培地 77mL に次の各成分を添加する。

馬血清	10mL
非働化豚血清	5mL
25w/v% 新鮮酵母抽出液	5mL
1w/v% β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド〔酸化型〕	1mL
1w/v% L-システイン塩酸塩試液	1mL
0.2w/v% フェノールレッド液	1mL

滅菌した基礎培地にあらかじめ、ろ過滅菌しておいた各添加物を無菌的に加える。

なお、添加物のうち高圧滅菌可能なものは、高圧滅菌してもよい。

さらに、ベンジルペニシリンカリウムを培地 1mL 中に 500 単位及び酢酸タリウムを 0.02w/v%となるように加えてもよい。

1.1.2 性能

マイコプラズマ・ガリセプチカム、マイコプラズマ・シノビエ、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ及びマイコプラズマ・オラーレの 100CFU 未満を接種し、35～37°C で 7 日間培養するとき、十分に増殖しなければならない。

1.2 マイコプラズマ用寒天培地

1.2.1 組成

1.2.1.1 基礎培地

1.1.1.1 の基礎培地 78mL に寒天 1g を加えたものである。

1.2.1.2 培地添加物

1.1.1.2 の培地添加物からフェノールレッド液を除いたものである。

なお、滅菌後、加温溶解した培地は直径 45～55mm の滅菌シャーレに 5mL ずつ分注し、冷却、凝固させ、マイコプラズマ用寒天平板とする。

1.2.2 性能

1.1.1.2 を準用し、各マイコプラズマ菌株 100CFU 未満を接種し、35～37 °C で 5vol%炭酸ガス下で 10 日間培養するとき、固有の集落を形成しなければならない。

2 培養材料

検体又は試験品を用いる。なお、溶解用液が非添付の凍結乾燥製剤では、リン酸緩衝食塩液等の適当な溶解用液で用法及び用量に記載されている規定量に溶解する。また、経口（飲水）投与剤及び穿刺剤では、接種量当たり 1 投与量となるようにリン酸緩衝食塩液等の適当な溶解用液で希釈する。

3 検体等の数量

検体ではそれぞれの容器について、試験品では 2 本以上の小分容器から等量ずつ採り、混合したものについて行う。

4 培地への接種量

液体培地 100mL に検体等を 1mL 接種する。また、液状培地から寒天平板には、それぞれ 0.1mL ずつを接種する。

5 培養及び観察

検体等を液状培地に接種後、十分に混和し、35～37 °C で 14 日間培養する。なお、生活細胞を含む検体等の場合は、適時に培養液の pH を調整する。

培養後、3 日目、7 日目、10 日目及び 14 日目に培養液をマイコプラズマ用寒天平板に接種し、5vol%炭酸ガス下で、35～37 °C で 10 日間培養し、マイコプラズマの集落の有無を観察する。

なお、この場合、対照として培地及びマイコプラズマ・シノビエを接種したものを同様に観察する。

6 判定

試験の結果、検体等及び培地を接種した平板においてマイコプラズマの集落を認めず、マイコプラズマ・シノビエを接種した平板において集落を認めたときは、この試験に適合とする。

マイコプラズマ・シノビエを接種した平板で集落を認めないとき及び培地を接種した平板でマイコプラズマの集落を認めたときは、試験を反復しなければならない。

7 再試験

試験の結果が疑わしい場合は、新たに 2 倍量以上の検体等を用いて試験を反復しなければならない。

（２）局方及び動生剤基準に準ずる試験法を再生医療等製品の試験法として用いる場合の長所と短所

局方及び動生剤基準に収載されているマイコプラズマ否定試験の原理・特徴、必要な試薬・設備等、所要日数、試験費用についてまとめて表 1 に示す。

動生剤基準では、培養法のみの記載であるが、局方では培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、核酸増幅法（以下、NAT）の 3 方法が記載されており、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を対象とし、局方では培養法と指標細胞を用いた DNA 染色法を基本的な試験法として設定している。NAT に関しては適切なバリデーションを実施することにより、培養法もしくは指標細胞を用いた DNA 染色法の代替法として用いることができるとしている。

動生剤基準の培養法と局方の培養法は、培地や継代日などが異なるだけでほぼ同じであることから、培養法を 1 つとしてその他の方法と比較する。

培養法については、マイコプラズマの培養経験がある施設であれば、設備的にも特殊なものは必要でないため、どこの施設においても実施可能な方法であるが、培地が長期間使用できないため、その都度培地を作製し、性能試験を実施する必要がある。それにより、試験期間だけでも 1 カ月ぐらい要するものの、培地調製し性能試験後に試験を開始するため、更に 1～2 週間程度要する。また、再生医療等製品では、被験試料が細胞などである場合も考えられることから、マイコプラズマ用培地でも若干増殖してしまう可能性も考えられ、その場合マイコプラズマの増殖に影響することも考慮すべきと考えられる。これらの点から、培養法については試験結果が得られるまでに長期間を要する点が再生医療等製品においては最大の短所となる

指標細胞を用いたDNA染色法については、細胞培養の経験のある施設であれば、試験は可能であるもの、400倍以上の倍率の蛍光顕微鏡は必須である。細胞を用いること、培養に使用する培地にウシ胎児血清を加えること、抗菌剤は加えられないことは、マイコプラズマのコンタミのリスクを伴う。更に、細胞培養を伴う試験であるため、再生医療等製品では直接的に培養や染色像などに影響することも考えられるため、予備試験は必須と考える。また、培養期間は3〜6日と3法の中では比較的短い点は長所と考える。

NATに関しては、PCRやリアルタイムPCRの実施経験のある施設では、実施可能な試験である。局方第十六改正までは二段PCR法による検出のためのプライマー配列と操作法が収載されていたが、第十七改正からはNATを既に試験法として採用していたEP等の動向を考慮して、プライマーや反応条件などの規定はなく、妥当性が立証された方法であれば、試験条件を含めてどのようなNATを用いることも可能であり、培養法または指標細胞を用いたDNA染色法と同等の感度を示すことが証明できれば、代替法として用いることができる。

しかしながら、検出するマイコプラズマについてはプライマーの配列に依存するため、プライマーの選択によっては検出されるマイコプラズマ種が限定されたり、逆にマイコプラズマ以外の細菌などを検出してしまう可能性も考えられる。また、必ずしも生きたマイコプラズマを検出するのではなく、マイコプラズマに由来するDNAを検出している点は考慮しなければならない。

被験試料が液体、細胞、組織であったとしても試験可能であり、最短で数時間で迅速に結果が得られる点は最大の長所である。

尚、NATを試験法として用いる場合には、局方NATの分析法バリデーションに従って検出感度、特異性、頑健性を評価し、培養法の代替法としては指標菌7種全てが10 CFU/mL以上検出可能なこと、指標細胞を用いたDNA染色法の代替法としては指標菌7種全てが100 CFU/mL以上検出可能なことを証明する必要がある。

なお、培養法では試験期間が長いという欠点があり、これを補う方法として前培養とPCR法を組み合わせてマイコプラズマ生菌を検出する方法が報告されている[4)]。

表 1 日本薬局方と動物用生物学的製剤基準のマイコプラズマ否定試験法の比較

公定書	試験法	原理・特徴	主な試薬、設備等	所要日数	試験費用（人件費別）
日本薬局方	培養法	マイコプラズマの多くが増殖可能な液体培地を用いて培養し、同じ寒天培地に継代し、特有のコロニーを確認する。	指標菌株、培地、安全キャビネット、インキュベーター	28 日（液体培地に接種し、寒天培地に継代後培養が終了するまで）	数千円から数万円（但し、培地の性能試験は別。培地の性能試験は 1～5 万円程度）
	指標細胞を用いた DNA 染色法	指標細胞を用いて共培養後、細胞を固定染色し、マイコプラズマの核 DNA を蛍光顕微鏡で観察する。	指標菌株、指標細胞、培地、CO2 インキュベーター、安全キャビネット、蛍光顕微鏡	4～7 日（調整した細胞播種後）	数千円から数万円（但し、細胞の性能試験は別。細胞の性能試験は 5 千円～3 万円程度）
	核酸増幅法（定性）	検体から抽出した核酸をマイコプラズマ特異的なプライマーを用いて増幅し、電気泳動することにより、特異的な増幅産物の有無により判定する。	指標菌株、DNA 抽出試薬、プライマー、PCR 試薬、サーマルサイクラー、電気泳動装置、写真撮影装置	1～2 日（検体から DNA を抽出し、PCR 後、電気泳動し、写真撮影するまで）	数千円程度（但し、バリデーション費用は別）
	核酸増幅法（定量）	検体から抽出した核酸をマイコプラズマ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を定量的に確認する。	指標菌株、DNA 抽出試薬、プライマー、リアルタイム PCR 試薬、リアルタイム PCR 装置	1～2 日（検体から DNA を抽出し、リアルタイム PCR で増幅し、確認するまで）	数千円程度（但し、バリデーション費用は別）
動物用生物学的製剤基準	培養法	マイコプラズマの多くが増殖可能な液体培地を用いて培養し、同じ寒天培地に継代し、特有のコロニーを確認する。	指標菌株、培地、安全キャビネット、インキュベーター	24 日（液体培地に接種し、寒天培地に継代後培養が終了するまで）	数千円から数万円（但し、培地の性能試験は別。培地の性能試験は 1～5 万円程度）

3. マイコプラズマ否定試験に応用可能な試験法

第十七改正局方参考情報として収載された「微生物迅速試験法」[3)]では、菌体を測定対象とする「直接測定法」と、菌体成分や代謝反応を測定対象とする「間接測定法」に分けて記載されている。

直接測定法としては、以下の 2 つの方法が記載されている。

1) 固相サイトメトリー（フィルターなどの担体上に微生物を捕集し、菌体が発するシグナルを直接検出）
2) フローサイトメトリー（流路系を通過する菌体が発するシグナルを直接検出する）

間接測定法としては、以下の 11 の方法が記載されている。

1) 免疫学的方法（検出対象とする微生物の抗原に対する特異的な抗体の反応を検出する）
2) 核酸増幅法（微生物が持つ核酸（DNA や RNA）を対象として、検出対象とする微生物が持つ特異的な核酸配列を相補的な配列（プライマー）を用いて増幅し、電気泳動などで検出する）
3) 生物発光法・蛍光法（菌体内の成分を酵素反応による発光や蛍光を利用して検出・測定する）
4) マイクロコロニー法（コロニー形成初期のマイクロコロニーを、蛍光や発光を利用して検出・計数する）
5) インピーダンス法（微生物は増殖の際に培地成分を利用して代謝反応を行う。この際に生じる代謝産物の増加により生じる電気特性（電気伝導度）の変化を電気測定器でリアルタイムに測定する）
6) ガス測定法（微生物の増殖に伴う二酸化炭素の発生や酵素の消費等のガス量の変化を検出・測定する）
7) 脂肪酸分析法（細胞膜に含まれる脂肪酸の種類と組成の違いを利用して、分離株から脂肪酸を抽出し、その組成をガスクロマトグラフィー等により分析する）
8) 赤外吸収スペクトル測定法（有機化合物に赤外線を照射すると、その有機化合物の分子が振動し、赤外線が吸収される。そこで分離株に赤外線を照射し、その赤外吸収を分析する）
9) 質量分析法（分離株に含まれるタンパク質や脂質などをイオン化した後、質量分析計により測定し、データベースと照合して同定を行う）
10) フィンガープリント法（分離株から抽出した DNA を制限酵素で切断し、DNA 断片の電気泳動パターンを分析し、データベースと照合することで同定を行

う）

11) ハイスループット・シーケンシング（試料中に存在する全微生物の核酸をまとめて抽出し、ユニバーサルプライマーを用いて核酸を増幅した後、高速シーケンサーを用いて個々の増幅産物の配列を網羅的に解析する）

これら測定法の中で、実際にマイコプラズマ否定試験として応用されているのは、間接測定法の中の核酸増幅法のみで、方法としては特異的プライマーを使用する方法、特異的プライマーやプローブを使用してリアルタイムに検出方法、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法[5)]によって増幅する方法などが報告されている。これらは、何れも数時間で迅速検出できることが長所であるものの、2 の(2)に記載したようにマイコプラズマの生死に関わらず検出してしまう短所もある。

論文レベルでは、Yanting Liu ら[6)]が 2019 年に ssDNA Aptamer Probe を用いたマイコプラズマに感染している細胞の検出法を報告している。この方法は、フローサイトメトリー分析や蛍光顕微鏡観察に、ssDNA Aptamer Probe に組み合わせることで高感度に且つ迅速に検出できるとしている。

4. 動物細胞加工製品（自己・同種由来）の各工程で推奨する試験法

自己由来製品については、原材料となる細胞・組織の受入検査として、細菌、真菌、ウイルスなど以外にマイコプラズマについても迅速検査法である NAT による検査を行うことが望ましい。検出された場合は、可能な範囲で不活化や除去処理を行う。培養を行う場合は、培地や添加成分にマイコプラズマが含まれていないことを適切なマイコプラズマ否定試験で確認したものを使用する。最終製品のマイコプラズマ否定試験も NAT による検査を行うものの、自己由来製品では原材料に含まれている場合も想定されることから、そのような場合は、製品情報として記載するとともに適切な対処法を予め設定しておく。

同種由来製品については、原材料となる細胞・組織の受入検査として、細菌、真菌、ウイルスなど以外にマイコプラズマについても迅速検査法である NAT による検査を行い、汚染されていないことを確認したものを使用することが望ましい。培養を行う場合は、培地や添加成分にマイコプラズマが含まれていないことを適切なマイコプラズマ否定試験で確認したものを使用することが望ましい。最終製品のマイコプラズマ否定試験も NAT による検査を行い、検出されないことを確認し合格とする。

尚、両製品ともに製造工程中にコンタミネーションなどが生じないように無菌性のチェックや、取り違え及びクロスコンタミネーション防止など観点から工程管理試験を定期的に実施することが望ましい。

以上、動物細胞加工製品のマイコプラズマ否定試験法としては、迅速に検査可能で、第十七改正局方に従ってバリデートされた市販のキットが既に市販されていることなどから、NAT による試験法を提案する。

また、東京農工大の水谷らや（株）ケーナインラボの山口らが中心となって、動物用再生医療等製品安全性試験等開発検討委員会で検討された原料に由来する病原体を、リアルタイム PCR を用いて網羅的に迅速に検出する試験法の検討では、犬では 28 種の病原体を短時間で検出できる方法を確立できている[7)]。この中には *Mycoplasma haemocani*s や *Candidatus* Mycoplasma haematoparvum も含まれており、出発材料中における犬に病原性を示すこれら 2 種のマイコプラズマを否定するには、検査法として確立されたこれらマイコプラズマに対するプライマーやプローブ情報が利用できる。以上のことから、製造工程管理試験あるいは品質管理試験として多くのマイコプラズマを否定する一般的なマイコプラズマ否定試験と、病原性のある一部のマイコプラズマのみを否定する試験のどちらを選択できるようにすることも迅速性を要する動物細胞加工製品では必要ではないかと考えられる。

１．　参考資料

1) 第十八改正 日本薬局方
2) 動物用生物学的製剤基準　平成 26 年 2 月 28 日（告示第 346 号）一部改正
3) 微生物迅速試験法　バイオ医薬品等の品質管理のための実践ガイド　（株式会社　じほう）
4) 松本幸子ら, 動薬検年報, 2007, 44, 13-20
前培養と PCR 法を組み合わせたマイコプラズマ生菌の検出～PCR 法を導入したマイコプラズマ否定試験法の検討～
5) Zohre Soheily ら, Cell J. 2019 Spring; 21(1): 43–48.
Detection of Mycoplasma Contamination of Cell Culture by A Loop-Mediated Isothermal Amplification Method
6) Yanting Liu ら, ACS Sens. 2019, 4, 8, 2028–2038
Rapid Detection of Mycoplasma-Infected Cells by an ssDNA Aptamer Probe
7) 平成 30 年度新技術を活用した動物用医薬品等の基準作成事業事業報告書, 平成 31 年 3 月, 動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会

III.　エンドトキシン試験

1.　エンドトキシン試験を行う目的

エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞壁を構成するリポ多糖（Lipopolysaccharide）で、細菌の死滅・破壊によって菌体外に放出される。従って、エンドトキシンは環境中や生体などあらゆる場所に広く存在する。細胞培養で細菌が混入しなくても、使用する器具・器材や培養液からの混入もあり得る。エンドトキシンは、代表的な発熱物質であり、ng (10^{-9} g)という微量でも血中に入ることで、発熱などの種々の生体反応を引き起こす。そのため、体内に直接投与される注射剤・輸液等と同様に動物細胞加工製品においてもエンドトキシンが混入しないように厳格な管理が求められる。

2.　エンドトキシン試験法の公定試験法

エンドトキシン試験法は、カブトガニの血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いて、グラム陰性菌由来のエンドトキシンを検出又は定量する方法である。第十八改正日本薬局方（局方）で規定されているエンドトキシン試験法は以下のとおりである。

(1)ゲル化法･･････ライセート試液のゲル形成を指標

(1)-1　限度試験法･･･エンドトキシンが規格値未満か確認する試験。

(1)-2　定量試験法･･･ゲル化反応のエンドポイントから濃度を調べる試験

(2)光学的定量法･･ライセート試液の光学的変化を指標

(2)-1　比濁法･･･ライセート試液のゲル化過程における濁度変化を指標

(2)-2　比色法･･･合成基質の加水分解による発色を指標

エンドトキシン試験は、「ゲル化法」、「比濁法」又は「比色法」のいずれの方法で行ってもよい。ただし、その結果について疑義又は係争が生じた場合は、別に規定するもののほか、ゲル化法の限度試験法によって最終の判定を行う。本法はエンドトキシンによる汚染を避けて行わなければならない。

（１）試験の準備

１）器具

エンドトキシンによる汚染を避けるため、試験に用いる全てのガラス製及びその他の耐熱性器具は、通例、少なくとも 250 ℃ で 30 分間の乾熱処理を行う。また、プラスチック製品(マルチウェルプレート及びマイクロピペット用チップ等)を用いる場合は、エンドトキシンが検出されないことに加え、試験に対する干渉作用やエンドトキシンの吸着がないことを確認したものを使用する。

2）エンドトキシン標準液の調製

2）-1 標準原液の調製

エンドトキシン標準原液はエンドトキシン標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製する。エンドトキシン標準品の力価は、世界保健機関のエンドトキシン国際標準品を基準として標定される。なお、エンドトキシン単位は EU で示し、1 EU は 1 エンドトキシン国際単位(IU)に等しい。

2）-2 標準溶液の調製

エンドトキシン標準溶液はエンドトキシン標準原液を十分に振り混ぜた後、エンドトキシン試験用水で希釈して調製する。エンドトキシン標準溶液は、エンドトキシンの容器への吸着を避けるため、できるだけ速やかに使用する。

(注) エンドトキシン標準原液の活性は 8 ℃ 以下で凍結を避けて保存すれば 14 日間安定である。しかし、これを希釈して調製したエンドトキシン標準溶液は、濃度が薄くなるほど失活や容器への吸着による有効濃度の低下が起こりやすくなるため、エンドトキシン標準溶液は用時調製が原則であり、調製後はできるだけ速やかに使用する。

3）試料溶液の用意

被検試料をエンドトキシン試験用水で溶解又は希釈し、試料溶液とする。試料により、エンドトキシン試験用水以外の水溶液で溶解又は希釈してもよい。通例、試料溶液の pH は、6.0 ～ 8.0 の範囲にあればよい。pH の調整には、酸、塩基、又は適当な緩衝液を用いることができる。緩衝液は、エンドトキシンが検出されないこと、及び反応干渉因子を含まないことが保証されたものでなければならない。また、試料溶液は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈してもよい。

4）最大有効希釈倍数の求め方

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数である。最大有効希釈倍数は、次の式によって求める。

最大有効希釈倍数＝(エンドトキシン規格値 × 試料溶液の濃度)／λ

a) エンドトキシン規格値

注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、$\frac{K}{M}$ に等しい。

K； 発熱を誘起するといわれる体重 1 kg 当たりのエンドトキシンの量(EU/kg)であり、投与経路による区分に基づき、表 1 の様に設定される。

表 1

投与経路	*K* (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2

M； 体重 1 kg 当たり 1 回に投与される注射剤の最大量。ただし、注射剤が頻回又は持続的に投与される場合は、*M* は 1 時間以内に投与される注射剤の最大総量とする。

b) 試料溶液の濃度

試料溶液の濃度の単位は、エンドトキシン規格値が質量当たり(EU/mg)で規定されている場合は mg/mL、当量当たり(EU/mEq)で規定されている場合は mEq/mL、生物学的単位当たり(EU/単位)で規定されている場合は単位/mL、容量当たり(EU/mL)で規定されている場合は mL/mL である。

c）λ

ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度(EU/mL)であり、比濁法又は比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度(EU/mL)である。

（2）ゲル化法

本法は、エンドトキシンの存在によるライセート試液の凝固反応に基づいて、エンドトキシンを検出又は定量する方法である。本法の精度と有効性を保証するために、予備試験として「ライセート試薬の表示感度確認試験」及び「反応干渉因子試験」を行う。

1) 予備試験

1)-1 ライセート試薬の表示感度確認試験

「ライセート試薬の表示感度」とは、ライセート試薬に規定されている条件下でのライセート試液の凝固に必要な最小エンドトキシン濃度である。ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその表示感度 λ を確認しなければならない。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

【操作法】

① 2λ，1λ，0.5λ 及び 0.25λ の 4 種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、

この 4 種の液を一組とした試験を 4 回行う。

② ライセート試液と①で調製したエンドトキシン標準溶液を等量ずつ試験管にとり、混和する。

(注) 単回試験用のライセート試薬を用いる場合は、その容器にエンドトキシン標準溶液を直接加え、ライセート試薬を溶解する。

③ ②の試験管を通例、37±1 °C に保ち、振動を避けて 60±2 分間静置する。

④ 60±2 分後に、各試験管を穏やかに約 180°転倒し、内容物を観察する。

【ゲル化の判定】

◆ 流出しない堅固なゲルが形成されている ⇒ 『陽性』

◆ ゲルを形成しないか、又は形成したゲルが流出する ⇒ 『陰性』

【試験の有効性判定】

各回の試験において、濃度 0.25λ のエンドトキシン標準溶液が全て陰性を示すとき、試験は『有効』である。

(注) 試験が有効でないときは、試験条件を整備して再試験を行う。

【試験の適合判定】

各回の試験において，陽性を示す最小エンドトキシン濃度をエンドポイント濃度とし、次の式によって 4 回の試験の幾何平均エンドポイント濃度を求める。

幾何平均エンドポイント濃度＝antilog (Σe／f)

Σe：各回のエンドポイント濃度の対数 e の和

f ：試験の回数

求めた幾何平均エンドポイント濃度が 0.5 ～ 2λ の範囲内にあるとき、『ライセート試薬の表示感度は確認された』と判定し、以下の試験にはその表示感度を用いる。

1)-2 反応干渉因子試験

本試験は、試料溶液について、反応を促進又は阻害する因子の有無を調べる試験である。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

【操作法】

① 表 2 に従い、A、B、C 及び D 液を調製し、A 及び B 液は 4 回、C 及び D 液は 2 回試験する。

② 試験方法、反応温度、反応時間及びゲル化判定法は、「1. ライセート試薬の表示感度確認試験」に従う。

③ B 液及び C 液の幾何平均エンドポイント濃度は、「1. ライセート試薬の表示感度確認試験」の計算式を準用して求める。

表 2

液	エンドトキシン濃度/被添加物	希釈液	希釈倍数	エンドトキシン濃度	試験の回数
A*1	0/試料溶液	―	―	―	4
B*2	2λ/試料溶液	試料溶液	1 2 4 8	2λ 1λ 0.5λ 0.25λ	4
C*3	2λ/エンドトキシン試験用水	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	2λ 1λ 0.5λ 0.25λ	2
D*4	0/エンドトキシン試験用水	―	―	―	2

＊1 陰性対照。試料溶液のみ。

＊2 反応干渉因子試験のための、標準エンドトキシンを添加した試料溶液。

＊3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液。

＊4 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

【試験の有効性判定】

A 及び D 液の試験結果が全て陰性で、C 液の試験結果によりライセート試薬の表示感度が確認されたとき、反応干渉因子試験は『有効』とする。

【試験の適合判定】

B 液の試験結果において幾何平均エンドポイント濃度が 0.5 ～ 2λ の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないものと判定し、試料溶液は反応干渉因子試験に『適合』とする。

(注) 幾何平均エンドポイント濃度がこの範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する。試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う。

(参考) より高感度のライセート試薬を用いることにより、被検試料の最大有効希釈倍数をより大きくすることができる。なお、試料溶液から反応干渉作用を除くために、試料溶液又は希釈した試料溶液につき、適切な処理(ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理など)を施すことができる。ただし、処理によりエンドトキシンが損失しないことを保証するために、エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施

すことにより、上記の試験に適合する結果が得られることを確認する。

2) 限度試験法

本法は、被検試料がエンドトキシン規格を超えるエンドトキシンを含むか否かを、ライセート試薬の表示感度に基づいてゲル化反応により判定する方法である。

【操作法】

① 表 3 に従い、A、B、C 及び D 液を調製し、これらの 4 種の液を一組として試験を 2 回行う。

② A 及び B 液の試料溶液は、「(1)-2 反応干渉因子試験」に適合する溶液を用いる。

③ 試験の操作条件は、「(1)-1 ライセート試薬の表示感度確認試験」に準じる。

表 3

液	エンドトキシン濃度/被添加物	試験の回数
A*1	0/試料溶液	2
B*2	2λ/試料溶液	2
C*3	2λ/エンドトキシン試験用水	2
D*4	0/エンドトキシン試験用水	2

＊1 限度試験のための試料溶液。最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる。

＊2 陽性対照。A 液と同倍数で希釈された試料溶液で、終濃度 2λ となるように標準エンドトキシンを添加したもの。

＊3 陽性対照。濃度 2λ のエンドトキシン標準溶液。

＊4 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

【試験の有効性判定】

B 及び C 液の 2 回の試験結果がいずれも陽性で、D 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき、試験は『有効』とする。

【試験の適合判定】

◆ A 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性 ⇒ エンドトキシン試験『適合』

◆ A 液の 2 回の試験結果がいずれも陽性 ⇒ エンドトキシン試験『不適』

✧ A 液の 2 回の試験結果において、1 回が陰性で他の 1 回が陽性のとき ⇒ この 2 回の試験を繰り返し行う。

◆ その 2 回の試験結果がいずれも陰性 ⇒ エンドトキシン試験『適合』

◆ 両方又は一方が陽性 ⇒ エンドトキシン試験『不適』

(注) 陽性の結果が得られたいずれの場合でも、試料溶液の希釈倍数が最大有効希釈倍数未満の場合、最大有効希釈倍数又はそれを超えない希釈倍数で試験をやり直すことができる。

3) 定量試験法

本法は、被検試料のエンドトキシン濃度をゲル化反応のエンドポイントを求めることにより測定する方法である。

【操作法】

① 表 4 に従い、A、B、C 及び D 液を調製し、これらの 4 種の液を一組として試験を 2 回行う。

② A 及び B 液の試料溶液は、「(1)-2 反応干渉因子試験」に適合する溶液を用いる。

③ 試験の操作条件は、「(1)-1 ライセート試薬の表示感度確認試験」に準じる。

表 4

液	エンドトキシン濃度/被添加物	希釈液	希釈倍数	エンドトキシン濃度	試験の回数
A*1	0/試料溶液	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	－ － － －	2
B*2	2λ/試料溶液	－	1	2λ	2
C*3	2λ/エンドトキシン試験用水	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	2λ 1λ 0.5λ 0.25λ	2
D*4	0/エンドトキシン試験用水	－	－	－	2

＊1 定量試験のための試料溶液。段階希釈倍数は、最大有効希釈倍数を超えない範囲で適宜変更することができる。

＊2 陽性対照。A 液の最小希釈倍数と同倍数で希釈された試料溶液に、終濃度 2λ となるように標準エンドトキシンを添加したもの。

＊3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液。

＊4 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

【試験の有効性判定】

2 回の試験のいずれの結果においても、D 液は陰性を、B 液は陽性を示し、C 液の幾何平均エンドポイント濃度が 0.5 ～ 2λ の範囲にあるとき、試験は

『有効』とする。

【エンドトキシン濃度の算出方法】

① A 液の希釈系列において、陽性を示す最大の希釈倍数をエンドポイントとし、λにエンドポイントにおける希釈倍数を乗じて得た値を試料溶液のエンドトキシン濃度とする。

(注 1) A 液の希釈系列の中に陽性を示すものがないとき、試料溶液のエンドトキシン濃度は λ に A 液の最小希釈倍数を乗じた値未満とする。

(注 2) A 液の希釈系列の全てが陽性のとき、試料溶液のエンドトキシン濃度は、λに A 液の最大希釈倍数を乗じた値以上とする。

② 試料溶液のエンドトキシン濃度から、被検試料のエンドトキシン濃度(EU/mL，EU/mg，EU/mEq 又は EU/単位)を算出する。

【試験の適合判定】

2 回の試験により被検試料について求めた二つのエンドトキシン濃度(EU/mL、EU/mg、EU/mEq 又は EU/単位)のいずれもが、エンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験に『適合』とする。

4) ゲル化法の長所・短所

a. 長所

・専用の検査機器が不必要なため、初期費用の負担が少ない。

b. 短所

・試験者の手技（試験管を転倒する際の力加減）や主観（ゲル形成の微妙な判定）に依存するため、結果判定に個人差が出易い。

・試験の組み立てが複雑で、特に予備試験や定量試験法では準備する試液が多いため、手間とランニングコストが掛かる。

・半定量試験のため試験結果の数値管理が難しい。

・60 分後に順次試験管を転倒し目視判定を行うため、規定時間の反応が終了する直前に作業者は現場に待機しておく必要があり、試験終了までの拘束時間が長い。

（３）光学的定量法

①比濁法

本法は、ライセート試液のゲル化に伴う濁度の変化を測定することにより、被検試料のエンドトキシン濃度を測定する方法である。試験は、通例、37±1 ℃で行い、濁度は吸光度又は透過率で示される。

②比色法

本法は，エンドトキシンのライセート試液との反応により、発色合成基質から遊離される発色基の量を吸光度又は透過率で測定することにより、エンドトキシンを定量する方法である。「エンドポイントー比色法」[*1] と、「カイネティックー比色法」[*2] がある。試験は、通例、37±1 °C で行う。

＊1　エンドトキシン濃度と一定反応時間後における発色基の遊離量との間の用量反応関係に基づく方法

＊2　エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ設定された吸光度又は透過率に達するのに要する時間又は発色の経時変化率との間の用量反応関係に基づく方法

１）予備試験

1)-1 検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその検量線の信頼性を確認しなければならない。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

【操作法】

用いるライセート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲内で、少なくとも 3 種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、これらの各濃度の溶液につき、3 回以上測定して検量線を作成する。

(注 1) エンドトキシン標準溶液とライセート試液の容量比、反応時間、反応温度、pH などの操作条件は用いるライセート試薬の至適条件に従う。

(注 2) 検量線の濃度範囲を 2 桁より大きくするとき、1 桁大きくするごとに用いるエンドトキシン標準溶液の濃度を 1 濃度ずつ追加する。

【試験の適合判定】

作成した検量線の相関係数 r を求め、その絶対値 $|r|$ が 0.980 以上であるとき、『検量線の信頼性は確認された』と判定する。

(注) 検量線の信頼性が確認されなかったときは、試験条件を整備して再試験を行う。

1)-2　反応干渉因子試験

本試験は、試料溶液について、反応を促進又は阻害する因子の有無を調べる試験である。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

【操作法】

表 5 に従い、A、B、C 及び D 液を調製して、試験を行う。

(注) ライセート試液の採取量、ライセート試液に対する試料溶液の容量比、反

応時間などの操作条件は、用いるライセート試薬の至適条件に従う。

表 5

液	エンドトキシン濃度	被添加液	試験管又ウェルの数
A*1	0	試料溶液	2 以上
B*2	検量線の中点温度*2	試料溶液	2 以上
C*3	3 濃度以上	エンドトキシン試験用水	各濃度，2 以上
D*4	0	エンドトキシン試験用水	2 以上

＊1 試料溶液のみ（試料溶液のエンドトキシン濃度測定用）。最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる。

＊2 A 液と同倍数で希釈された試料溶液で、検量線の中点又は中点付近のエンドトキシン濃度になるように標準エンドトキシンを添加したもの。

＊3 「1)-1 検量線の信頼性確認試験」で用いた各種濃度のエンドトキシン標準溶液(検量線作成用)。

＊4 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

【試験の有効性判定】

◆ C 液で作成した検量線の相関係数の絶対値は 0.980 以上

◆ D 液の測定結果は、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満

【試験の適合判定】

B 液で測定されたエンドトキシン濃度と A 液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B 液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算する。添加エンドトキシンの回収率が 50 ～ 200 %の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定し、反応干渉因子試験に『適合』とする。

(注) エンドトキシンの回収率が規定の範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する。試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う。

(参考) 試料溶液又は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉因子を除くために、適切な処理(ろ過，反応干渉因子の中和，透析又は加熱処理など)を施すことができる。ただし、処理によりエンドトキシンが損失しないことを保証するために、エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施すことにより、上記の試験に適合する結果が得られることを確認する。

2) 定量

【操作法】

表 5 に従い、A、B、C 及び D 液を調製して、「1)-2　反応干渉因子試験」に準じて操作する。

【試験の有効性判定】

- ◆ C 液で作成した検量線の相関係数の絶対値は 0.980 以上
- ◆ B 液で測定されたエンドトキシン濃度と A 液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B 液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算するとき、その回収率は 50～200 %の範囲内
- ◆ D 液の結果が、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満

【エンドトキシン濃度の算出方法】

C 液で作成した検量線を用い、A 液の平均エンドトキシン濃度を算出する。

【試験の適合判定】

A 液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被検試料のエンドトキシンの濃度(EU/mL、EU/mg、EU/mEq 又は EU/単位)を求め、エンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験に『適合』とする。

3) 具体例

光学的定量法に用いる検査機器には、主に「チューブリーダー」と「マイクロプレートリーダー」がある。一般的な検査機器の測定原理を以下に記す。

- ■ 「チューブリーダー」; 乾熱滅菌済みのガラス試験管を用い、試料溶液とライセート試薬を 37±1 °C で反応させ、濁度又は発色量に伴う透過光量あるいは吸光度の変化をカイネティックで測定する。

（例；富士フイルム和光純薬株式会社「トキシノメーター® ET-7000」）

- ■ 「マイクロプレートリーダー」; 96 ウェルマイクロプレートを用い、試料溶液とライセート試薬を 37±1 °C で反応させ、吸光度を測定する。測定方式にはカイネティックとエンドポイントがあるが、ライセート試薬の種類の多さや測定感度、操作性の面からカイネティックが主流である。

（例；富士フイルム和光純薬株式会社「ELx808IU プレートリーダー」）

4) 光学的定量法の長所・短所

a. 長所

- 試験結果を数値管理できるので結果の信頼性が高い。
- 高感度測定が可能で多種多様な被検試料に適応できる。
- 測定結果は自動算出され試験者の拘束時間が少ない。

b. 短所

- 専用の測定機器が必要で初期費用の負担が大きい。
- 試験に関する専門知識と測定技術の習得を必要とする。

（4）エンドトキシン試験に応用可能な試験法

局方準拠のエンドトキシン試験法では、局方エンドトキシン標準品を用い、試験毎に標準溶液の希釈系列を調製し、試料溶液と同時に測定することになっている。

一方、簡易法（簡便法）は、局方準拠ではないが、試薬メーカーが検量線データを提供する、さらに試験の有効性判定に毎回必要な陽性製品コントロールの調製作業を簡略化することにより、試験者の負担を軽減し試験時間の短縮を図ることができる新たな手法である。

1) 具体例

国内では簡易法（簡便法）の検査機器として以下 2 製品が市販されている。

■ 富士フイルム和光純薬株式会社「トキシノメーター® ET-Mini&リムルス ES-□プラス CS シングルテストワコー」

《製品概要》

小型チューブリーダー「トキシノメーター® ET-Mini」と専用試薬キット「リムルス ES-□プラス CS シングルテストワコー」の組合せにより、より簡便にエンドトキシン測定を行うことが可能。局方準拠法と同じ測定原理(比濁法)を採用しているため、定量結果の相関性及び信頼性も高い。

■ 株式会社ベリタス「Endosafe® nexgen-PTS™」

《製品概要》

米国 CRL 社の製品で FDA の認可を取得。専用リーダー「nexgen-PTS™」と専用試薬カートリッジ「PTS™ カートリッジ」の組合せにより、簡易的にエンドトキシン測定が可能(測定原理は比色法)。局方準拠法と比べると、少量の検体で測定が完結できる。測定開始から結果判定まで 30 分以内。

2) 簡易法（簡便法）の長所・短所

a. 長所

- 迅速測定により前処理時間も含め試験時間が短縮できる。
- 標準溶液やコントロール溶液の調製が不要で手間が掛からない。
- 局方準拠法に比べるとランニングコストが低減できる。

b. 短所

- 局方準拠ではない。
- 多検体測定に不向き

（4）動物細胞加工製品（自己・同種由来）の各工程で推奨する試験法

局方のエンドトキシン試験は、本試験前に予備試験等を実施する必要があるが、本試験の所要時間は 60 分であり、迅速性をもとめられる動物細胞加工製品の試験法としては特に問題はない。従って、規格検査の試験法として局方に規定された試験の実施を推奨する。製造工程でエンドトキシンフリーの器具、器材、培養液等を使用することで、エンドトキシン試験の頻度を下げることが可能である。ロットを構成できる同種由来製品の場合は原薬で、自己由来製品の場合中間段階での培養物での試験を行うことで最終製品での試験を省略することも可能である。

エンドトキシン規格値の設定について局方の参考情報に以下の記載がある。

エンドトキシン規格値＝$\frac{K}{M}$

K：発熱を誘起するといわれる体重 1 kg 当たりのエンドトキシン量（EU/kg）

M：体重 1 kg 当たり 1 回に投与される注射剤の最大量　静脈内投与では K は 5.0 EU/kg、脊髄腔内投与では 0.2 EU/kg とされている。

なお、これは人用医薬品の規定であり、日本の動物用医薬品についてはエンドトキシン規格値を定めたものがないため、通常、静脈内注射剤については局方を準用している。VICH の新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品）の規格及び検査法の設定（VICH GL40）では、原薬の規格及び検査法として適宜、局方の試験（例えばエンドトキシン試験）を行うと記載されている。

動物用医薬品の対象動物は多種であり、本来動物種ごとにエンドトキシン規格値が設定されるべきものと考えられるので、局方の規格値を必ずしも準用する必要はない。

【参考資料】　エンドトキシン試験の検査機器

製品名 (メーカー)	原理	手法	検出下限 (単位:EU/mL)	測定時間	検査機器本体価格 (希望納入価格)	ランニングコスト (1 検体当り)*1	備考
【日本薬局方準拠法】							
トキシノメーター® ET-7000 (富士フイルム和光純薬㈱)	チューブリーダー	比濁法 比色法 (ゲル化法)	比濁法:0.0078 比色法:0.0002	比濁法:60 分以内 比色法:200 分以内 (検量範囲により短縮可能)	ET-7000:140 万円 QC7 PC ｾｯﾄ:60 万円 QC8 ER/ES PC ｾｯﾄ: 140 万円 (PC ｾｯﾄ:ｿﾌﾄ,PC 込)	比濁法:16,800 円 比色法:24,000 円 (単回用試薬*2 使用時)	試薬の種類により 検出下限,測定時間, ﾗﾝﾆﾝｸﾞｺｽﾄは異なる。 ﾏﾙﾁﾀｲﾌﾟ試薬使用で ｺｽﾄ低減可能。但し、 別途 JP-RSE,試験管 等の消耗品が必要。
EG リーダー SV-12 (生化学工業㈱)	チューブリーダー	比色法	比色法:0.001	不明	本体+ｿﾌﾄ:98 万円 (PC 別売)	比色法:19,500 円 (単回用試薬*2 使用時)	
ELx808IU プレートリーダー (富士フイルム和光純薬㈱)	マイクロプレート リーダー	比濁法 比色法	比濁法:0.01 比色法:0.0005	比濁法:60 分以内 比色法:200 分以内 (検量範囲により短縮可能)	ELx808IU ﾌﾟﾚｰﾄﾘｰﾀﾞｰ:110 万円 QC7 PC ｾｯﾄ:60 万円 QC8 ER/ES PC ｾｯﾄ: 140 万円 (PC ｾｯﾄ:ｿﾌﾄｳｪｱ,PC 込)	比濁法:4,020 円 比色法:5,400 円	別途,JP-RSE や ﾏｲｸﾛﾌﾟﾚｰﾄ等の 消耗品が必要。
ウエルリーダー アドバンス (生化学工業㈱)	マイクロプレート リーダー	比濁法 比色法	比濁法:0.005 比色法:0.001	不明	本体+ｿﾌﾄ:220 万円 DI ｴﾃﾞｨｼｮﾝ ｿﾌﾄ: 120 万円 (PC 別売)	比濁法:4,080 円 比色法:6,720 円	同上
EL×808 リーダー	マイクロプレート	比濁法	比濁法:0.01	不明	本体:98 万円	比濁法:3,900 円	同上

(ロンザジャパン㈱)	リーダー	比色法	比色法:0.005		ｿﾌﾄ:50 万円(PC 別売)	比色法:6,750 円	
【簡易法(簡便法)】							
トキシノメーター® ET-Mini (富士フイルム和光純薬㈱)	チューブリーダー	比濁法	比濁法:0.01 (ﾘﾑﾙｽ ES-II ﾌﾟﾗｽ CS ｼﾝｸﾞﾙﾃｽﾄﾜｺｰ使用時)	60 分以内	ET-Mini:60 万円 有線 PC ｾｯﾄ:50 万円 (PC ｾｯﾄ:ｿﾌﾄｳｪｱ,PC 込)	比濁法:6,190 円 (1 検体測定に単回用試薬 4 本使用)	専用ｷｯﾄとの組合せで使用。検量線ﾃﾞｰﾀと低濃度 CSE 添付。
Endosafe® nexgen-PTS™ (㈱ベリタス)	専用吸光度リーダー	比色法	比色法:0.005 (PTS20005F ｶｰﾄﾘｯｼﾞ使用時)	30 分以内	160 万円	比色法:7,800 円～6,700 円 (1 検体測定にｶｰﾄﾘｯｼﾞ 1 枚使用)	ｶｰﾄﾘｯｼﾞの種類により検出下限が異なる。検量線ﾃﾞｰﾀ添付。

*1：日本薬局方準拠法の場合、1 検体当りのコストは、表(ウ)-1 に従い算出 (チューブリーダー法では単回用試薬 12 本、プレートリーダー法では 12 ウェル分の試薬が必要)。

*2：単回用試薬はコスト高ではあるが、使い切りタイプで試薬の廃棄ロスがなく、小分け分注作業も不要なため使い勝手が良く、試験検体の少ない時には適している。

Ⅳ.　ウイルス試験

1.　ウイルス試験を行う目的

動物細胞加工製品の製造には、原材料である細胞・組織を動物体内から採取する必要があり、それらにウイルス特に病原性のあるウイルスが存在する場合大きな問題となる。ウイルスは、細胞内で増殖するため、製造用細胞にウイルスが迷入していた場合、培養中にウイルスが大量に増えることとなり、治療個体に重大な悪影響を及ぼす。

このため、先ず細胞・組織を採取する動物について、ウイルス感染の有無を確認することが重要であり、当該動物のワクチン接種歴や抗体保有状況も確認しておく必要がある。また、培養にはウイルスフリーの血清等の使用が必須であり、製造のしかるべき工程でのウイルス検査が求められる。

2.　ウイルス検査の公定試験法

動物用生物学的製剤基準（動生剤基準）に迷入ウイルス否定試験及び外来性ウイルス否定試験が規定されている。基本的な考え方は、同じであるが、規定された時期が新しい外来性ウイルス否定試験の方がきめ細かく規定されている。以下に犬及び猫を対象にする場合を説明する。

（1）迷入ウイルス否定試験

迷入ウイルス否定試験は、最終製品及び製品を作製するために用いる材料中にウイルスが存在しないかを調べる試験である。その目的は、製品を接種する動物種に影響するウイルスを排除することである。基本的にはそれぞれの材料の由来動物及び接種対象動物について、当該由来細胞を使用して検査する。犬であれば、犬由来細胞を用い、猫であれば、猫由来細胞を用いて検査する。ただし、犬パルボウイルスは、猫腎細胞での感受性が高いため、犬腎細胞に加えて猫腎細胞でも検査する。乳のみマウスの試験は、狂犬病ウイルス（日本脳炎ウイルスも）を否定するために行われている。試験の概略を下表に示した。いずれの試験でも最低 16 日間かかることになる。

試　　験	細胞又は動物	方　　法	判　　定
犬由来細胞接種試験	犬腎初代又は継代細胞	材料を細胞に接種し 5 日後、次代に継代し 10 日間培養	① 期間中 CPE の有無 ② 培養最終日に赤血球吸着の有無

猫由来細胞接種試験	猫腎初代又は継代細胞	同上	① 期間中 CPE の有無 ② 培養最終日に赤血球凝集の有無（犬パルボウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルスの否定）
動物接種試験	乳のみマウス	材料を脳内接種し 5 日後に採材した脳乳剤上清を脳内接種し 10 日間観察	マウスの死亡及び神経症状の有無

（2）外来性ウイルス否定試験

外来性ウイルス否定試験は、共通ウイルス否定試験、特定ウイルス否定試験及び個別ウイルス否定試験の 3 種類からなっている。

共通ウイルス否定試験では、感受性の高い培養細胞を用い、CPE、封入体及び赤血球吸着の有無を観察する。特定ウイルス否定試験では、蛍光抗体法で特定ウイルスの存在を検査する（犬については特定されたものはなく、猫については猫白血病ウイルス及び猫肉腫ウイルスが特定されている）。個別ウイルス否定試験では、牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス、日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルスを対象に検査する。試験の概略を下表に示した。試験期間は、最低 22 日間である。

1）共通ウイルス否定試験

試　　験	細　胞	方　　法	判　　定
感受性細胞接種試験	感受性の高い細胞＊	材料を細胞に接種し 7 日後、次代に継代し 7 日間培養後更に継代し 7 日間培養	① 期間中 CPE の有無 ② 培養最終日に染色し封入体等の有無 ③ 培養最終日に 3 種類の赤血球吸着の有無

＊材料の由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞及び製品の対象動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞を用いる。

2）特定ウイルス否定試験

試　　験	細　胞	方　　法	判　　定
蛍光抗体法	感受性の高い細胞＊	材料を細胞に接種し7日後、次代に継代し 7 日間培養後更に継代し 7 日間培養	培養最終日に猫白血病ウイルス及び猫肉腫ウイルス抗体を用い、蛍光の有無を観察

＊1）と同じ

3）個別ウイルス否定試験

対象ウイルス	細胞又は動物	方　　法	判　　定
牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）	牛精巣継代細胞	材料を細胞に接種し5日後、次代に継代し5日間培養、BVDV の Nose 株を接種して 7 日間培養	CPE の有無
犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス	猫腎初代又は継代細胞	材料を細胞に接種し5日後、次代に継代し10日間培養	赤血球凝集の有無
日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルス	3 日齢以下のマウス	材料を脳内接種し 5 日後に採材した脳乳剤上清を脳内接種し 10 日間観察	マウスの死亡及び神経症状の有無

なお、試験法の詳細は別紙に示す。

（3）生物学的製剤基準

人用ワクチン等の製剤基準では、一般試験法としてのウイルス否定試験は規定されていなく、個別の医薬品各条に外来性ウイルス否定試験として記載されている。試験法としては、動物接種試験、培養細胞接種試験、ニワトリ卵接種試験等があり、基本的には動生剤基準の迷入ウイルス否定試験と同じである。

（4）公定試験法の利点と欠点

動生剤基準で規定されているウイルス否定試験は、ワクチン等の生物学的製剤の最終製剤及びその原材料中に存在しているかもしれないウイルスを否定す

る試験である。

本法の最大の利点は、検査対象サンプル中に存在する生きたウイルスを検出できることである。最終製品に迷入した病原性ウイルスにより、製品を接種された動物が発症することは最も避けなければならないことであり、ウイルス否定試験は、最終製品の安全性を担保する重要な試験である。

迷入ウイルス否定試験で犬用のワクチンの場合、犬腎細胞と猫腎細胞を用いるよう規定されているが、これらの細胞で CPE、赤血球吸着あるいは赤血球凝集を起こすウイルスが検出できるのみである。例えば、犬での重要な病原性ウイルスであるジステンパーウイルスを検出する細胞としては不適である。しかも、野外のウイルスは、培養細胞に順化しておらず、2 代ぐらいの継代で、増殖し CPE を起こすことは少ない。

外来性ウイルス否定試験の共通ウイルス否定試験での規定では、感受性の高い細胞を用いるとされているが、犬を対象とした場合、迷入ウイルス否定試験で規定されている犬腎細胞を使用することとなる。従って、上記と同じ問題点が残る。

一方、人獣共通感染症として重要な狂犬病ウイルスに対しては、感受性の高い乳のみマウスの脳内接種法で、かつ次代への継代も行うことから、検出法としては極めて優れている。

これまで犬及び猫用ワクチンやインターフェロン等のバイオ医薬品の品質検査法として、迷入ウイルス否定試験や外来性ウイルス否定試験が行われてきており、培養細胞における感受性の欠点があるものの、迷入ウイルスによる事故等は報告されていない。従って、現行の試験法は、迷入ウイルスの否定に対して十分機能している試験法と判断される。

しかし、これらの試験法は、試験期間が長いという欠点がある。各試験を同時にスタートしても迷入ウイルス否定試験では 16 日間、外来性ウイルス否定試験では 22 日間もかかり、再生医療等製品の最終製品に採用する品質管理法には向いていない。ただし、血清等培養原材料の検査法には応用可能である。

3. ウイルス試験に応用可能な試験法

動生剤基準で規定されている試験法は、日数がかかり迅速性に欠ける。その点 PCR 法等の遺伝子検査法は、迅速性に優れた方法である。しかし、個々の病原ウイルスの遺伝子検査法は確立されているが、それぞれの試験・解析条件が異なるため、多種類の病原ウイルスを同時に検出する方法（網羅的）がなかった。今般、農林水産省の補助事業（動物用再生医療等製品安全性試験等開発事業）で安全性評価における病原体の網羅的迅速遺伝子解析法が開発された。ここでは、犬の病原ウイルスを対象に記載する。

（1）リアルタイム PCR 法

1）試験方法

検査材料から High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche)又は QIAamp DNA Mini Kit (Q1AGEN)を用いて DNA/RNA を抽出する。Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)(TaKaRa)または（One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)、RT-PCR プライマー及び TaqMan プローブを加え、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始する。反応条件は、45 ℃ 5 分、95 ℃ 30 秒 1 サイクル、95 ℃10 秒、55 ℃ 20 秒、72 ℃ 20 秒 40 サイクルに設定する。プライマー及びプローブの配列は、下表に示した。

No.	病原体の種類	核酸	1反応あたりの検出限界			プローブ配列 5'-3' (FAM/ZEN/ABkFQ、FAM/TAMRAなど)	プライマー配列 5'-3'
			種類	値	単位		
1	狂犬病ウイルス	(-)ssRNA	合成DNA	100	コピー	ACCGAACTTCAGATTCTTAGCTGGAACC	GATGTGTGCCAACTGGAGTA AGATGTTCAATCCGGGAGAAG
2	犬ジステンパーウイルス	(-)ssRNA	ワクチン株	1	TCID50	ACCCAAGAGCCGGATACATAGTTTCAATGC	AGCTAGTTTCATCTTAACTATCAAATT TTAACTCTCCAGAAAACTCATGC
3	犬パルボウイルス2型	(-)ssDNA	ワクチン株	0.1	TCID50	CAGGTGATGAATTTGCTACAGG	TGGAACTAGTGGCACACCAA AAATGGTGGTAAGCCCAATG
4	犬アデノウイルス1型	dsDNA	合成DNA	100	コピー	TGTCTCTATGTCCACAAGGGCCC	TGTCAAGACTTCTGGGTCCT CGCACACACAAGTGGAAGTA
5	犬アデノウイルス2型	dsDNA	ワクチン株	0.1	TCID50	TGACCTTAGCAATGTGCGCTGGTA	CTCTTCTATCCCGCCTTTCTG CTCCGCTTCTGACTTTAGAGATT
6	犬パラインフルエンザウイルス	(-)ssRNA	ワクチン株	0.1	TCID50	AATCATTGAACCCACTTCTGCCGG	TGGATGCCAGGATCATGTA TAGGGTTCGAAAGGATGGAAAC
7	犬ヘルペスウイルス	dsDNA	合成DNA	100	コピー	TCTCTGGGGTCTTCATCCTTATCAAATGCG	ACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATG CTGGTGTATTAAACTTTGAAGGCTTTA
8	犬コロナウイルス	(+)ssRNA	ワクチン株	100	TCID50	ACCTCAATTTAGCTGGTTCGTGTATGGCATT	TTGATCGTTTTTATAACGGTTCTACAA AATGGGCCATAATAGCCACATAAT
9	犬パピローマウイルス	dsDNA	合成DNA	10	コピー	AGCCGCAGCCGTCCTCGTCGT	GGAGGAAGCGGAGAATTACCC GCTGCTGGTGGTTCGTAGTT

本法での検出限界は、10～100 コピーであった。検査に要する期間は最短 2 時間である。

なお、本法は、開発されたばかりで、まだ商業利用化されていないので、ルーチンの品質検査法として採用できない。早期の商業利用化が望まれるところである。

2）リアルタイム PCR 法の利点と欠点

遺伝子検査の最大の利点は、迅速性に優れていることである。今回開発されたリアルタイム PCR 法では犬における主な病原性ウイルス 9 種類を網羅的にかつ 10～100 コピーの感度で検出できることから、極めて有用な試験法である。本法でどのウイルスも陰性であれば、迷入ウイルスがないと判断でき、その製品の安全性を担保することができる。従って、本法は、製品化されて直ちに使用しなければならない製品群での品質検査法には適している。また、検査結果を確認してから次の工程に進むような場合にも有用性が高い。

一方、感染性のないウイルス、単なるウイルス遺伝子又は遺伝子断片の混入でも

陽性となるので、当該ウイルスが生きており感染性を有しているかは別の試験（培養試験等）で確かめなければならないという欠点がある。

4. 動物細胞加工製品（自己・同種由来）の各工程で推奨する試験法

現時点では、網羅的リアルタイム PCR 法がルーチン検査として利用できないことから、個別のウイルスに対する PCR 法での対応となる。

（1）迷入を否定すべきウイルスに対する考え方

動物細胞加工製品（同種由来）及び（自己由来）の品質及び安全性確保に関する指針（案）」でのドナーの選択基準、適格性では、第一条件として健康な動物であることが示されている。そのうえで、ドナーが倫理的、動物福祉・動物衛生及び公衆衛生の観点から適切に選択されていることを示すこととされている。

解説書（案）では、Q3「動物衛生上ドナー候補動物について感染の有無を検査すべき感染症とは何か」の回答で、ドナー動物選択に起因する動物衛生上のリスクは、有効な治療法がなく、レシピエント動物の生命に重大な危害を及ぼす感染症であり、その中でも我が国での有病率が一定以上高いもので、かつ予防のためのワクチンが市販されていない感染症については抗体検査や抗原検査をして、ワクチンが市販されているものはワクチン接種の有無を確認してリスクを判断すべきであるとされている。

具体的な感染症として犬ではウイルスが 6 種類（狂犬病、ジステンパー、犬パルボウイルス感染症、犬伝染性肝炎、犬アデノウイルス 2 型感染症、犬ヘルペスウイルス感染症）、細菌 2 種類及び原虫 1 種類がリストアップされている。見た目上健康なドナー動物からの感染リスクは高くなく、ワクチン普及、効果的な治療薬の存在から検査を必須とする病気は多くない。その上で犬では持続感染する犬ヘルペスウイルス感染症は最低限検査すべきとされている。

Q4「公衆衛生上感染の有無を検査すべき感染症とは」で犬の場合狂犬病を挙げているが、我が国が狂犬病フリーであること、ワクチンが普及していることから検査すべきリスク要因とは考えられないとされている。

以上のことから、犬をドナー動物とした場合、健康であり、該当するワクチンが接種されておれば検査すべき感染症は犬ヘルペスウイルス感染症のみと判断できる。

一方、健康に対する疑義があり、ワクチン接種歴が不明であった場合、上記リストアップされた 6 種類のウイルスに対する検査が必須となる。

（2）試験法の推奨

再生医療等製品の品質管理は、製造工程全般、すなわち原材料、中間製品、最

終製品の品質管理の他、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理を合わせて実施することとされている。特に、ウイルスの迷入に対しては、最終製品での検査よりは、製造工程の上流での検査が合理的と考えられる。原材料でのウイルス迷入が否定されれば、その後の製造工程中で、細菌が混入するリスクと比較して、ウイルスが混入して増殖するリスクはほとんどない。

各試験法の利点と欠点を考慮し、以下のような使い分けを推奨する。

1）同種由来動物細胞加工製品

本製品群は、ロット形成可能で、製造量も多く、品質検査にも比較的多く使用できるという特徴がある。また、保存期間も比較的長い場合が多い。

原料又は培養初期の材料について遺伝子検査法で検査する。結果が陰性であれば、ウイルスの迷入はないと判断する。もし、陽性の場合、当該ウイルスに最も感受性の高い細胞（狂犬病ウイルスの場合は乳のみマウス）を用いてウイルス分離を行う。ウイルスが分離されなければ、迷入ウイルス陰性と判断する。なお、本製品群は不特定多数の個体に投与されるので、最終製品において確認のため遺伝子検査をすることを推奨する。

2）自己由来動物細胞加工製品

本製品群は、製造量が少なく、原料採取から最終製品までの工程が連続し、最終製品の保存性も悪く、直ちに動物に接種する必要がある。従って、本製品群でウイルス否定を行おうとすると、遺伝子検査法でしか検査できない。しかし、最終製品で検査し、陽性となった場合、ウイルス分離を行う時間がないので、最終製品以外での検査が必要と思われる。最も上流である当該原料あるいは培養初期の材料を用いて検査を行うことを推奨する。この段階でのウイルス否定が確認できれば、最終製品での迷入ウイルスの可能性は極めて低いと考えられ、迷入ウイルス陰性と判断する。

（別紙）
動物用生物学的製剤基準　迷入ウイルス否定試験（犬及び猫を対象）
2.5　犬由来細胞接種試験
2.5.1　犬腎培養細胞接種試験
2.5.1.1　細胞観察
2.5.1.1.1　試験法
犬腎初代又は継代細胞を用いる。試料 2mL を、1mL につき 20cm^2 以上の培養細胞に接種し、36　℃で 5 日間培養し、CPE の有無を観察した後、次代に継代し、36　℃で 10 日間培養し、CPE の有無を観察する。
2.5.1.1.2　判定
観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。
2.5.1.2　赤血球吸着試験
2.5.1.2.1　試験法
2.5.1.1 の観察最終日に、培養液を除き、0.1vol％のモルモット赤血球浮遊液を重層し、4　℃で 60 分間静置後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。
2.5.1.2.2　判定
培養細胞に赤血球吸着を認めないときは、この試験に適合とする。
2.6　猫由来細胞接種試験
2.6.1　猫腎培養細胞接種試験
2.6.1.1　細胞観察
2.6.1.1.1　試験法
猫腎初代又は継代細胞を用いる。試料 2mL を、1mL につき 20cm^2 以上の培養細胞に接種し、36　℃で 5 日間培養し、CPE の有無を観察した後、次代に継代し、36　℃で 10 日間培養し、CPE の有無を観察する。
2.6.1.1.2　判定
観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。
2.6.1.2　犬パルボウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルス否定試験
2.6.1.2.1　試験法
2.6.1.1 の観察最終日の培養液に、0.2w/v%牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を等量加える。さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液で調製した 0.5vol%の豚赤血球液を加えて、4 ℃で 18 時間静置後、赤血球凝集の有無を観察する。
2.6.1.2.2　判定
赤血球の凝集を認めないときは、この試験に適合とする。
2.8　動物接種試験
2.8.2　乳のみマウス脳内接種試験　（狂犬病ウイルスを対象）
2.8.2.1　試験法

3 日齢以内のマウスを用いる。試料 0.02mL ずつを 10 匹のマウスの脳内に注射し、5 日目に採取した脳の混合乳剤遠心上清を更に 10 匹のマウスの脳内に注射し、10 日間観察する。

2.8.2.2　判定

マウスに死亡又は神経症状を認めないときは、この試験に適合とする。

動物用生物学的製剤基準　外来性ウイルス否定試験　（犬及び猫を対象）

2 共通ウイルス否定試験

2.1 感受性細胞接種試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 培養細胞

培養細胞の由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞及び製品の対象動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞を用いる。

2.1.2 試験方法

2.1.2.1 培養

試料 1mL につき 70cm^{2}以上の培養細胞に接種し、37 ℃ で 7 日間培養し、次代に細胞を継代する。継代した細胞を 37 ℃ で 7 日間培養した後、更に次代に細胞を継代し、37 ℃ で 7 日間培養する。

2.1.2.2 細胞観察

CPE の有無をすべての培養期間中少なくとも 2 日ごとに観察する。

2.1.2.3 細胞染色

12cm^{2}以上の培養細胞について培養最終日にヘマトキシリンーエオジン又はメイグリュンワルドーギムザで染色し、顕微鏡下で CPE 及び封入体その他迷入因子に起因する細胞異常の有無を観察する。

2.1.2.4 赤血球吸着

培養最終日に培養細胞をそれぞれ 18cm^{2}以上になるように 3 群に分け、培養細胞表面をリン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄後、モルモット、がちょう及び 7 日齢以内の鶏の 0.1vol%赤血球浮遊液をそれぞれの群に重層し、4℃ で 30 分間静置後、20～25 ℃ で 30 分間静置する。その後リン酸緩衝食塩液で洗浄後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

2.1.3 判定

観察期間中、培養細胞に CPE 及び封入体ほか細胞異常を認めず、かつ、培養細胞に赤血球の吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

3.1 特定ウイルス否定一般試験

3.1.1 蛍光抗体法

3.1.1.1 試験材料

3.1.1.1.1 培養細胞

培養細胞の由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞及び製品の対象動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞を用いる。（猫由来細胞を用いる場合は、猫白血病ウイルス、及び猫肉腫ウイルスを対象）

3.1.1.2 試験方法

3.1.1.2.1 培養

試料 1mL につき 70cm^{2}以上の培養細胞に接種し、37 °C で 7 日間培養し、次代に細胞を継代する。継代した細胞を 37 °C で 7 日間培養した後、更に次代に細胞を継代し、37 °C で 7 日間培養する。

3.1.1.2.2 蛍光抗体法

培養最終日にワクチン（シードロット製剤）の部の各項で規定するウイルスに対し、それぞれの抗血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

3.1.1.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

3.2　個別ウイルス否定試験

3.2.5　牛ウイルス性下痢ウイルス否定試験

3.2.5.1 試験方法

牛精巣継代細胞を用いる。試料 2mL を、1mL につき 20cm^{2}以上の培養細胞に接種し、34～36 °C で 5 日間培養し、CPE の有無を観察した後、細胞を 10 本の小試験管に分注して継代し、5 日間培養し、CPE の有無を観察する。培養液を除き、1mL 中約 10^5TCID$_{50}$の牛ウイルス性下痢ウイルス Nose 株を含む維持用培養液 0.5mL をそれぞれに加え、34～36 °C で 7 日間回転培養し、CPE の有無を観察する。

3.2.5.2 判定

観察期間中、牛ウイルス性下痢ウイルス接種前の培養細胞に CPE を認めず、接種後の培養細胞に CPE を認めたときは、この試験に適合とする。

3.2.6 犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス否定試験

3.2.6.1 試験方法

猫腎初代又は継代細胞を用いる。試料 2mL を、1mL につき 20cm^{2}以上の培養細胞に接種し、36 °C で 5 日間培養後、次代に継代し、36 °C で 10 日間培養する。培養最終日の培養液に、0.2w/v%牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を等量加える。さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液で調製した 0.5vol%の豚赤血球液

を加えて、４℃で 18 時間静置後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.6.2 判定

赤血球の凝集を認めないときは、この試験に適合とする

3.2.8 牛伝染性リンパ腫ウイルス否定試験

3.2.8.1 試験方法

体重 100～200kg の健康な牛又は体重 30～50kg の健康な羊を用いる。

試料 10mL を 1 頭の牛又は羊の筋肉内に注射し、2 及び 3 カ月目に採血して得た血清について、受身赤血球凝集反応、酵素抗体反応又は寒天ゲル内沈降反応により牛伝染性リンパ腫ウイルス抗体の検出を行う。

3.2.8.2 判定

牛伝染性リンパ腫ウイルスに対する抗体を認めないとき、この試験に適合とする。

3.2.9 日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルス否定試験法

3.2.9.1 試験方法

3 日齢以下のマウスを用いる。

試料 0.02mL ずつを 10 匹のマウスの脳内に注射し、5 日目に採取した脳の混合乳剤遠心上清を更に 10 匹のマウスの脳内に注射し、10 日間観察する。

3.2.9.2 判定

マウスに死亡又は神経症状を認めないときは、この試験に適合とする。

Ⅴ.　培養工程由来不純物の評価方法

1.　培養細胞由来不純物についての試験を行う目的

動物細胞加工製品は、動物個体から採取された組織あるいは細胞を培養することで製造される。動物細胞加工製品に混入する可能性のある製造工程由来の不純物としては、細胞培養液に含まれる成分（無機塩類、アミノ酸、ビタミン類、脂質、糖類、タンパク質（成長因子、酵素、血清成分など）、抗生物質など）と細胞処理で用いられる成分（酵素類など）などが考えられる。これらの不純物が最終製品に残り、動物に投与された場合、アレルギーなどの副作用を及ぼす可能性がある。その可能性が高い物質は、タンパク質や抗生物質である。タンパク質は、総タンパク質量としての定量が可能であり、未知物質や定量が困難な物質の除去のサロゲートマーカーともなり得ることから総タンパク質量の測定は、動物細胞加工製品の安全性を担保する重要な検査項目である。

また、細胞培養では、原材料中や培養工程中の微生物の混入リスクがあることから、抗生物質の使用は避けることができない。細胞培養に汎用されるペニシリンは、ペニシリン・ショックを起こす物質として知られており、最終製品中の濃度を低くすることが必須である。

以上のことから、細胞工程由来不純物としてタンパク質及び抗生物質を対象として、その評価法を検討し提案する。

2.　タンパク質

（1）タンパク質測定の公定試験法

タンパク質を測定する公定試験法は、特に定められていないが、窒素定量法として日本薬局方（局方）ではセミミクロケルダール法、動物用生物学的製剤基準（動生剤基準）では蛋白窒素定量法が定められている。タンパク質中の窒素含量は、タンパク質の種類により多少異なるが、平均的に 16 %ほどとされている。したがって窒素量からタンパク質量に換算するには、その逆数である 6.25 をかけて求める。この数値 6.25 を 窒素係数と呼ぶ。

なお、セミミクロケルダール法と動生剤基準の蛋白窒素定量法は、同じであるので、ここでは蛋白窒素定量法について説明する。

1）蛋白窒素定量法

トリクロロ酢酸を加えて加熱し、沈殿する蛋白に含まれる窒素量をミクロケルダール法によって測定し、検体等の蛋白窒素含有量を定量する方法である。

（１）　試液及び試薬

1.1 50w/v%トリクロロ酢酸試液

トリクロロ酢酸 500g に水を加えて溶かし、1,000mL とする。

1.2 5w/v%トリクロロ酢酸試液

1.1 を水で 10 倍に希釈する。

1.3 1mol/L 水酸化ナトリウム試液

水酸化ナトリウム 4.0g に水を加えて溶かし、100mL とする。

1.4 分解剤

硫酸カリウム 100g 及び硫酸銅(□）五水和物 10g の混合物を粉末とする。

1.5 30w/v%水酸化ナトリウム試液

水酸化ナトリウム 300g に水を加えて溶かし、1,000mL とする。

1.6 指示薬

ブロモクレゾールグリーン 0.15g 及びメチルレッド 0.1g を 90vol%エタノールに溶かし、200mL とする。

1.7 ホウ酸試液

ホウ酸 40g に水を加えて溶かし、1,000mL とする。

1.8 0.005mol/L 硫酸（容量分析用標準液）

1,000mL 中に硫酸 0.4904g を含む。

0.05mol/L 硫酸の調製：硫酸 3 mL に水を加え 1,000mL とし、次の標定を行う。

0.05mol/L 硫酸の標定：炭酸ナトリウムを 500 ～ 650°C で 40 ～ 50 分間加熱した後、デシケーター（シリカゲル）で放冷し、その約 0.08g を精密に量り、水 30mL を加えて溶かし、メチルレッド試薬 3 滴を加え、調製した硫酸で滴定し、規定度係数を計算する。ただし、滴定の終点は、液を注意して煮沸し、ゆるく栓をして冷却するとき、持続する橙色ないし橙赤色を呈するときとする。

0.05mol/L 硫酸 1 mL ＝ 5.299mgNa_2CO_3

0.005mol/L 硫酸の調製：用時、0.05mol/L 硫酸に水を加えて正確に 10 倍容量とする。

（２）試験方法

蛋白窒素量として 10 ～ 200 μg に対応する検体等を正確に採り、その 10 分の 1 容の 50w/v%トリクロロ酢酸試液を加え、沸騰浴中で 15 分間加熱した後、常温まで冷却する。その後、遠心し、沈さに 5 w/v%トリクロロ酢酸の適当量を加えて遠心洗浄後、沈さを少量の 1 mol/L 水酸化ナトリウム試液で溶解し、試料とする。

分解フラスコに分解剤約 70mg 及び試料を入れ、更に硫酸 1 mL をフラスコの内壁に沿って加える。約 5 時間加熱分解し、液が青色透明となりフラスコ内壁に炭化物を認めなくなったとき、加熱をやめる。分解のとき、必要があれば、過酸化水素（30）を分解フラスコに加えてもよい。放冷後、水約 5 mL を加えて冷却し、あらかじめ水蒸気を通して洗った蒸留フラスコに水で洗い込む。さらに

30w/v%水酸化ナトリウム試液 6 mL を蒸留フラスコに入れる。

受器にホウ酸試液 5 mL 及び指示薬数滴を入れ、冷却器の下端をこの液に浸す。

蒸留フラスコに水蒸気を通し、留液 70 ～ 80mL を得るまで蒸留する。冷却器の下端を液面から離し、少量の水でその部分を洗い、0.005mol/L 硫酸で滴定する。滴定の終末点は、緑色が微灰青色を経て微灰赤紫色に変わるときとする。水で空試験をし、補正する。

0.005mol/L 硫酸 1 mL＝ 140.07 μg N

（2）タンパク質測定に応用可能な試験法

1）電気泳動と高感度染色法（銀染色、蛍光染色）又は免疫染色法（特異抗体が入手可能な場合のみ適用可能）

・高感度染色（銀染色、蛍光染色）での検出感度は、バンド当たり 0.1 ng 程度と考えられる（表 1）。

・免疫染色での検出感度は検出法によって異なるが、バンド当たり発色法で数十 pg、化学発光法で数十 fg と考えられる。

・電気泳動から解析までは、1～2 日必要である。

・高感度染色（銀染色、蛍光染色）で定量性を持たせるためには、アルブミンなどの標準サンプルを同時に泳動する必要がある。

表 1　ゲル染色法の比較

染色剤セレクションガイド

タイプ		製品名	染色時間	検出感度	検出条件	ステップ数	特徴
可視染色	CBB染色	QC Colloidal Coomassieステイン	1～20時間	3.0 ng		3ステップ	濃青色 環境にやさしい成分 目的に応じた2種類の染色方法 （簡便な1時間染色、高感度な10～20時間染色） より高感度検出に対応し、再現性、直線性に優れるため、定量目的にも適します。
		Bio-Safe CBB G-250ステイン	1時間～	8-28 ng		3ステップ	淡青色 水だけで染色可能
		CBB R-250ステイン＆デステイン	2.5時間～	36-47 ng		3ステップ	濃青色 一般的なCBB染色剤
	銀染色	シルバーステインプラスキット	1.5時間	0.6-1.2 ng		4ステップ	低バックグラウンド 糖タンパク質の染色は不可 アガロースゲルも染色可能
		シルバーステインキット	2時間	0.6-1.2 ng		8ステップ	広く使用されている銀染色 IEFゲル、糖、糖タンパク質の染色可能 アガロースゲルは染色不可
蛍光染色		Oriole蛍光ゲルステイン	1.5時間	0.5-1 ng	Ex:270 nm Em:604 nm	1ステップ	ワンステップで簡便な染色 UVによる励起可能 質量分析にも使用可能 低ランニングコスト
		Flamingoゲルステイン	5時間	0.25-0.5 ng	Ex:512 nm Em:535 nm	2ステップ	高感度 質量分析にも使用可能
		RUBY GELステイン	4.5時間	1-10 ng	Ex:300/480 nm Em:618 nm	3ステップ	高感度 質量分析にも使用可能 1xのため用事調製不要

バイオ・ラッド社資料より（https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/japan/japanese/literature/C12521L_EPWB_catalog.pdf、2022 年 2 月 13 日確認）

2）BCA 法（比色法）

・簡単な操作で短時間にタンパク質の定量が可能

・タンパク質の種類の違いによる変化が比較的少なく、0.02～2 mg/mL の広い範囲で直線性を示す

・界面活性剤による影響を受けにくい

・本法による検量線の例を図 1 に、各種タンパク質の本法による発色率を表 2 に示す

BSA 標準溶液の測定

1. 1.5 ml のマイクロチューブに 1) で作製した BSA 標準溶液の各希釈液をそれぞれ 50 μl 分注する。各濃度について、2 連（n=2）以上並行で測定する。
2. 1 ml の Working Solution を加え、直ちに混合する。
3. 37℃の水浴中で 30 分間反応する。反応後は室温に戻す。
4. 分光光度計を用いて、562 nm の吸光度を測定する。測定には、1 ml のキュベットを使用する。ゼロ点校正は水を用いる。
5. 各濃度の標準液の吸光度から Blank 値を差し引いた値を平均して、標準曲線を作成する。

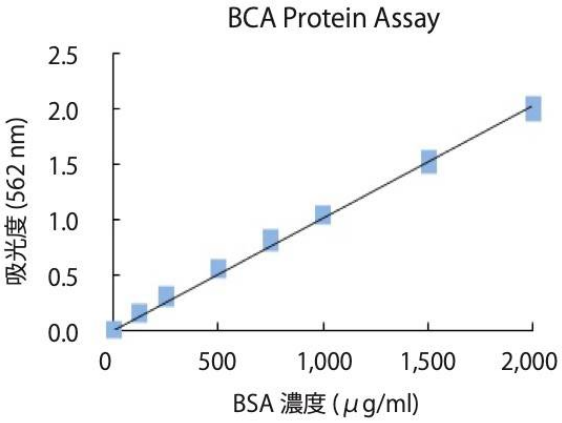


図 1　BCA 法によるウシ血清アルブミンの検量線の例

TaKaRa 情報（https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/t9300a_j.pdf、2022 年 2 月 13 日確認）

表 2　BCA 法による各種タンパク質の発色率

Protein	Ratio＊
Albumin, bovine serum (BSA)	1.00
Alcohol Dehydrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*	0.54
Aldolase from rabbit muscle	0.89
Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes	0.77
a-Chymotrypsin, bovine pancreas	1.06
Cytochrome C, bovine heart	0.90
Gamma globulin, bovine (BGG)	1.16
Hemoglobin, bovine	0.66
IgG, rabbit	1.29
IgG, mouse	1.15
Insulin, human	1.28
Lysozyme, chicken egg white	1.19
Ovalbumin, chicken egg white	0.95
Transferrin	0.85
Trypsin	0.98

＊：Ratio ＝（各種タンパク質の吸光度の平均値）/（BSA の吸光度の平均値）

TaKaRa 情報（https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/t9300a_j.pdf、2022 年 2 月 13 日確認）

3）高感度タンパク質定量キット（蛍光）

・検出限界は 5 μg/mL 以下
・96 ウェルマイクロタイタープレートで、15 分以内に測定
・様々なサンプル中の脂肪族第一級アミン（ペプチドまたはタンパク質）を、蛍光検出色素で測定
・本法による検量線の例を図 2 に示す

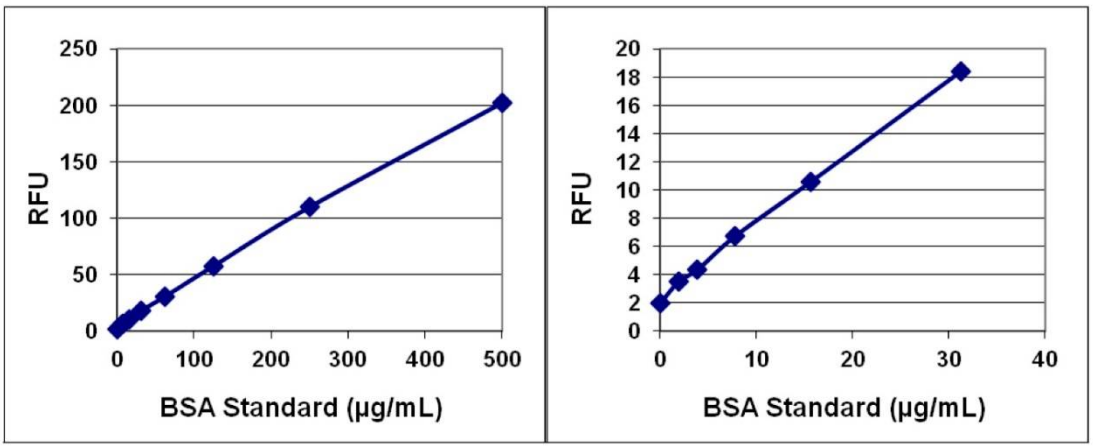


図 2　高感度タンパク質定量キット（蛍光）の検量線例
コスモバイオ扱い High Sensitivity Protein Quantitation Assay Kit (fluorometric)製造元情報（http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-185-high-sensitivity-protein-quantitation-assay-kit-fluorometric.pdf、2022 年 2 月 13 日確認）

4）ELISA 法（例：ウシアルブミン ELISA キット）

・定量域：0.69～500 ng/mL
・ウシアルブミン特異的に定量
・測定時間 5 時間程度
・ELISA キットが開発されていない成分に関しては、測定できない。また、ヒトの ELISA キットに関しては、標準物質が対象動物の成分と異なる場合には、参考値としての取扱いになる。
・市販されているウシアルブミン ELISA キットに関する情報を図 3 及び 4 に示す。

Procedure Overview

1. Add 100 µl of standard or sample to designated wells.
   Note: Run each standard or sample in duplicate.

↓

2. Cover the plate and incubate at room temperature (20-25°C) for 1 hour.

↓

3. Wash the plate FOUR times.

↓

4. Add 100 µl of anti-albumin Detection Antibody to each well.

↓

5. Cover the plate and incubate at room temperature for 1 hour.

↓

6. Wash the plate FOUR times.

↓

7. Add 100 µl of HRP Solution C to each well.

↓

8. Cover the plate and incubate at room temperature for 30 minutes.

↓

9. Wash the plate FOUR times.

↓

10. Add 100 µl of TMB Substrate Solution to each well.

↓

11. Incubate the plate in the dark at room temperature for 30 minutes.

↓

12. Stop the reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.

↓

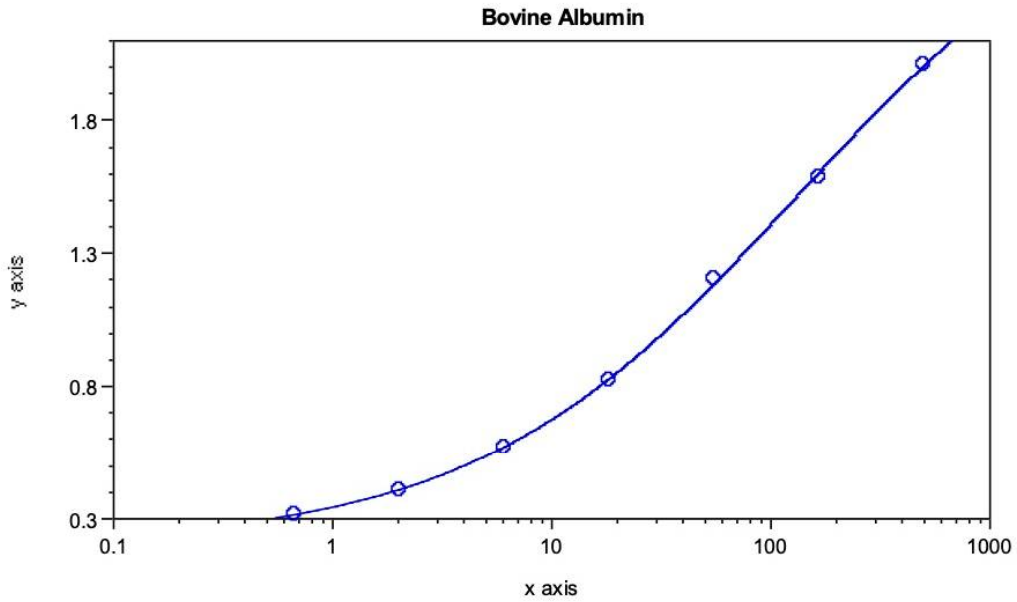
13. Measure absorbance on a plate reader at 450 nm.

図 3　ウシアルブミン ELISA キットの使用法概要
フナコシ情報（https://www.funakoshi.co.jp/domestic/data/datasheet/BET/E11-113.pdf 、2022 年 2 月 13 日確認）

Performance Characteristics

Typical Standard Curve

- This typical standard curve was generated using the Bovine Albumin ELISA Kit Protocol. This standard curve is for demonstration only. A standard curve must be generated for each assay.



4-P Fit: y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D:	A	B	C	D	R^2
Plot#1 (Std#2: Concentration vs MeanValue)	0.198	0.587	132	2.83	1

Weighting: Fixed

Assay Range: 0.69 – 500 ng/ml

- Suggested standard curve points are 500 ng/ml, 167 ng/ml, 55.6 ng/ml, 18.5 ng/ml, 6.17 ng/ml, 2.06 ng/ml, 0.69 ng/ml, and 0 ng/ml

Specificity

- By immunoelectrophoresis and ELISA the antibodies in this kit react specifically with Bovine Albumin, not with other Bovine immunoglobulins or other Bovine serum proteins. Cross-reactivity with other species has not been tested.

図 4　ウシアルブミン ELISA キットの性能
フナコシ情報（https://www.funakoshi.co.jp/domestic/data/datasheet/BET/E11-113.pdf 、2022 年 2 月 13 日確認）

タンパク質測定に応用可能な試験法の比較を表 3 に示す。

表 3　タンパク質測定法比較表

試験法	原理・特徴等	感度	試験所要日数	市販品の有無	費用	備考
蛋白窒素定量法	分解で生じるアンモニアを硫酸で滴定し窒素量を求める。	10-200 µg 窒素/サンプル	1 日		数万円/1 試験	
電気泳動と高感度染色法（銀染色、蛍光染色等）	タンパク質を可視化させるには、タンパク質特異的な色素結合性/発色性の化学反応をゲル内タンパク質に対して行う。	銀染色、蛍光染色：0.25 ng/バンド CBB：2-4 ng／バンド	電気泳動：数時間 染色・測定：数時間	Silver Stain Kit Wako WSE-7010（2332333） EzLabel FluoroNeo イーラーラベルフルオロネオ	1～2 万円/10 枚のゲル 30,000 円/2000 検体	蛍光検出の場合には、イメージアナライザーが必須
BCA 法（比色法）	高感度のタンパク質溶液の BCA 比色定量	0.02～2 mg/mL	測定終了まで数時間	TaKaRa BCA Protein Assay Kit	15,000 円/500 回	プレートリーダーが必要
蛍光タンパク定量	蛍光検出色素を利用して、様々なサンプル中の	5 µg/ mL～	測定終了まで数時間	コスモバイオ High Sensitivity Protein	54,000 円/200 アッセイ	蛍光プレートリーダーが必要

試験法	原理・特徴等	感度	試験所要日数	市販品の有無	費用	備考
	脂肪族第一級アミン（ペプチドまたはタンパク質）の測定を行う。			Quantitation Assay Kit (fluorometric)		
ELISA 法（例：ウシアルブミン ELISA キット）	特異抗体を用いた検出	0.69～500 ng/mL	数時間～1 日程度	フナコシ Albumin, Bovine, ELISA Kit (96well)	104,000 円/1 プレート	プレートリーダーが必要

（3）動物細胞加工製品（自己・同種由来）の各工程で推奨する試験法

タンパク質の測定法としては、公定試験法である蛋白窒素定量法、市販測定キットがある BCA 法又は蛍光タンパク定量法を推奨する。

但し、最終製品段階で洗浄工程を行う場合は残存するタンパク質量は、極めて少なくなると想定される。洗浄効果について事前にバリデーションを行うことで、タンパク質の残存量を把握しておくことを推奨する。この減少率によっては、最終製品の品質検査項目にタンパク質測定を含める必要がなくなることもあり得る。

3. 抗生物質

（1）抗生物質測定の公定試験法

抗生物質測定の公的試験法としては局方の抗生物質の微生物学的力価試験法が最も有用な方法である。なお、目的は異なるが、厚生労働省から、食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法が公表されており、高速液体クロマトグラフ法も応用可能である。

1）抗生物質の微生物学的力価試験法

抗生物質の抗菌活性を微生物を用いた方法により測定する方法である。菌の発育阻止円の大きさを指標とする円筒平板法及び穿孔平板法、並びに菌液の濁度を指標とする比濁法がある（試験法の詳細は省略する）。本法は、特殊な装置を使用しないので汎用性が高いが、感度、選択性や迅速性の面で問題がある。

（2）抗生物質測定に応用可能な試験法

1）高速液体クロマトグラフ法（HPLC）又は高速液体クロマトグラフ質量分析法（LC/MS/MS）

LC/MS/MS は、非常に感度が高く、選択性や迅速性にも優れているが、装置が高額なため汎用性は低い。

（3）動物細胞加工製品（自己・同種由来）の各工程で推奨する試験法

上述した抗生物質定量法の比較を表 4 に示す。

表 4　抗生物質定量法の比較

	微生物学的力価試験法 （日本薬局方）	高速液体クロマトグラフ法 （HPLC-UV）	高速液体クロマトグラフ タンデム型質量分析法（LC/MS/MS）
測定方法	抗菌活性に基づく測定	クロマトグラフィーによる分離と UV検出器による検出	クロマトグラフィーによる分離と 質量分析計による検出
選択性	×	○ UV吸収を持つ化合物のみ検出	◎ 高い選択性
感度	△ mgオーダー以上	○ μgオーダーまで可能	◎ pgオーダーまで可能
測定時間	△ 数日	◎ 数十分以内	◎ 約10分以内
用途	抗生物質原薬・製剤等の 力価測定	抗生物質原薬・製剤等定量法、 洗浄バリデーション試験	生体試料中微量分析 洗浄バリデーション試験
細胞、培養液等の 測定の可否	× 選択性が無く、感度も不足	△ 微量測定は困難、共存する夾雑物の影響大	○ 複雑なマトリックス中でも高感度測定が可能

島津テクノリサーチ情報（https://www.shimadzu-techno.co.jp/technical/regenerative_m1.pdf、2022 年 2 月 13 日確認）

動物細胞加工製品中に含まれるかもしれない抗生物質は、培養時に添加する抗生物質であることから、当該抗生物質を対象とした測定となる。感度が高く、選択性や迅速性にも優れている LC/MS/MS が推奨される。

但し、製造の初期に抗生物質を使用しても抗生物質を含まない製造工程を経て製品化される場合には、抗生物質を直接測定しないで、製品への混入量を理論的に算出することによりリスク評価することが可能である。更に、最終製品段階で洗浄工程を行う場合は残存する抗生物質の量は、ほとんどなくなると想定される。

なお、洗浄効果については、事前にバリデーションを行うことで、抗生物質の残存量を把握しておくことを推奨する。

これらのリスク評価を行うことで、最終製品の品質検査項目に抗生物質測定を含める必要はなくなる。

第４章

生産・流通における細胞の品質管理

1. はじめに

「動物細胞加工製品（同種由来）の品質及び安全性確保に関する指針（案）」及び「動物細胞加工製品（自己由来）の品質及び安全性確保に関する指針（案）」では「原料となる細胞・組織」、「最終製品」を運搬する場合には、「運搬容器、運搬手順（温度管理等を含む。）を定め、その妥当性について明らかにすること」とある。

また、これらの指針の「解説書（案）」では「最終製品の保存や輸送に伴う安定性を確認する試験とは」との問いに対する答えとして、「申請する保存温度、容器、容量、細胞数、保存液、期間等を考慮した試験系により保存期間中の安定性を確認する。また、出荷後の最終製品について、輸送時の温度変化、振動、輸送形態等を考慮した安定性の評価も必要であるが、実際に輸送試験を行い、必要とされている品質が保たれていることを確認することでもよい」とある。

2. 具体的な解決策

通常、再生医療等製品の被験物質は凍結状態あるいは低温状態下で輸送され、温度管理を厳格にする必要がある。このため安定性を保証する条件（温度・時間）で輸送されたこと及びその記録が重要であると考える。振動等その他の条件が保存期間中の安定性に影響を与えると考えられる場合には、その記録も重要である。なお、原料や最終製品の輸送方法の妥当性に関しては、想定した輸送条件で品質が確認されるのであれば、必ずしも様々な輸送条件で検証する必要はなく、文献等や実施可能性の観点から考察することでもよい。

（1）最終製品

想定する輸送工程にて、輸送前後の品質を評価するほか、温度振動記録計を用いるなどして、温度・振動等に関する試験を実施し、輸送容器内の最終製品が安定性を保証する条件で輸送されたことを示し、必要とされている品質が保たれていることを確認することでもよい。最終製品の品質及び安定性の指標としては、外観、性状、表面マーカー解析、細胞数・細胞濃度、細胞生存率、生物活性などが挙げられる。その測定が困難なものを除き、これらの中から適切な指標を用いて評価を行い、品質及び安定性が保たれていることを確認する。

（2）原料となる細胞・組織

最終製品と同様の指標を用いて、再生医療等製品が製造できると期待される条件を満たしていることを確認することが望ましいが、その品質を保証する項目や試験法がないか分からないことも多く、運搬容器や運搬手順に対し、一般的な注意（温度管理、汚染防止、取り違い防止等）に対する措置が取られているか

を確認することでもよい。

第 5 章

臨床試験の有効性評価

1. はじめに

平成 30 年度に作成された「動物細胞加工製品（同種由来）の品質及び安全性確保に関する指針（案）」では第 7 章に「臨床試験を始めるにあたって」との記載があるのみで、臨床試験の具体的な実施方法等には触れられていない。動物用再生医療等製品の製造販売承認の申請には臨床試験が不可欠であり、特にその有効性評価は最重要課題である。しかし、これらの製品群は多様で、対象疾患も多岐に渡るため、統一した有効性評価法を提示することは困難である。そこで、先ず日本で最初に承認された犬の胸腰部椎間板ヘルニアを適応症とする製品における臨床試験の有効性評価法について作成した。

なお、今後は臨床現場で行われている臨床研究等の進捗状況を参考にしながら、開発が進められると思われる代表的な製品群を対象に順次、有効性評価法を作成することとしたい。

2. 椎間板ヘルニアを適応症とする動物用再生医療等製品の臨床試験における評価法

本評価法は、犬の胸腰部椎間板ヘルニアを適応症とする動物用再生医療等製品の製造販売承認申請の目的で実施される臨床試験（治験）について、標準的な試験法や評価法を取りまとめたものである。したがって、他に科学的に妥当な試験法を排除するものではなく、そのような試験方法を採用する場合には、その試験の妥当性を説明することを推奨する。なお、本評価法に従って臨床試験を実施する際には、動物用再生医療等製品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 26 年農林水産省令第 61 号）を遵守して実施しなければならない。

（1）胸腰部椎間板ヘルニア症の診断法

犬の胸腰部椎間板ヘルニア症は以下の方法で診断する。

1）臨床徴候の確認（問診、視診、触診）
2）神経学的検査（姿勢反応、脊髄反射、脳神経検査、知覚検査、皮筋反射）
3）画像診断（X 線検査、脊髄造影検査、CT 検査、MRI 検査）

（2）臨床試験への組み入れ基準

臨床試験に組み入れる患犬は以下の基準に全て適合していなければならない。

1）上記（1）で診断された患犬であること。
2）当該再生医療等製品の使用により効果が期待でき、かつ安全性のリスクが低いと見込まれる患畜であること。

3）進行性脊髄軟化症など致死的な併発症を有していないこと。

（3）試験群と対照群の設定

臨床試験を行う際には、対照群（従来治療群）と試験群（従来の治療に当該再生医療等製品を加えた群）を設定するのが望ましい。対照群を設定する場合には、不利益の生じないように十分に配慮する。

（4）臨床試験に使用する製品

臨床試験に使用する製品は、適切な品質管理がなされたもので、可能な限り最終製品と等質な製品を使用する。

（5）投与量と投与期間

最終製品として想定する投与量、投与回数、投与間隔で試験を実施する。一方、それらを臨床試験で決定するために複数の投与量、投与方法を設定して試験することも可能である。

（6）有効性の判定方法

有効性の評価は、科学文献で公表されている評価法を用いることを推奨する。基本的には以下に例示したいずれかの項目が改善された程度で評価する。

1）神経学的検査（姿勢反応、脊髄反射、脳神経検査、知覚検査、皮筋反射）
2）神経学的グレード（Neurological grade: 1～5）, Scott, 1997.
2）Olby score
3）Basso-Beattie-Bresnahan（BBB）score
4）Texas Spinal Cord Injury Score (TSCIS)
5）Tarlov score
6）MRI 検査による脊髄の所見
7）電気生理学的検査（SEP）

なお、再生医療等製品は、安全性が確認され、有効性が推定された場合には条件・期限付の承認が与えられるので、必ずしも多数の症例を目指さなくても良い。

担当者一覧

担当理事

竹根　幸生（(株）J-ARM）
平山　紀夫（動物用ワクチン–バイオ医薬品研究会）

ワーキンググループ（◎は各ワーキンググループ運営責任者）

製造に用いる原材料等の使用基準ワーキンググループ

上田　忠佳（DS ファーマアニマルヘルス（株））
竹根　幸生（(株）J-ARM）
◎對比地　久義（コージンバイオ（株））

有効性に係る細胞の品質管理ワーキンググループ

新井　克彦（東京農工大 TASRA）
◎木原 孝洋（DS ファーマアニマルヘルス（株））
三谷　康介（(株）J-ARM）

安全性に係る細胞の品質管理ワーキンググループ

荻野　祥樹（日本全薬工業（株））
木澤　元維（富士フイルム和光純薬（株））
◎平山　紀夫（動物用ワクチン–バイオ医薬品研究会）
山口　智宏（(株）ケーナインラボ）
山本　千景（シスメックス（株））

生産・流通における細胞の品質管理ワーキンググループ

◎猪狩　義勝（日本全薬工業（株））
上田　忠佳（DS ファーマアニマルヘルス（株））
光　綾乃（コージンバイオ（株））

臨床試験の有効性評価ワーキンググループ

◎枝村　一弥（(一社）日本獣医再生医療学会）
荻野目 里美（日本全薬工業（株））
河本　光祐（アニコムホールディングス（株））
野村　明徳（DS ファーマアニマルヘルス（株））
横山　篤司（(一社）日本獣医再生医療学会）

（五十音順、所属は WG 成果とりまとめ時点）

動物用再生医療等製品の開発に必要な試験法等に関する自主基準

（第１版　2022 年 9 月 10 日発行）

発行者　一般社団法人動物再生医療推進協議会
神奈川県相模原市緑区橋本台三丁目７番１１号
TEL　042-762-2775