



8. 第十四改正日本薬局方における国際調和

日本薬局方がヨーロッパ薬局方 (The European Pharmacopoeia, Ph.Eur.) 及び米国薬局方 (The United States Pharmacopeia, USP) と調和合意した事項の第十四改正日本薬局方への反映状況は次のとおりである。

薬局方調和事項の欄には薬局方調和合意文書の調和事項を、第十四改正日本薬局方の欄には調和合意を反映した第十四改正日本薬局方の項目名等を記載する。備考欄には、第十四改正日本薬局方の調和合意事項との差違等を必要に応じて記載する。

薬局方調和事項	第十四改正日本薬局方	備考
Bacterial Endotoxin Test	エンドトキシン試験法	
Apparatus	器具	
Preparation of Standard Endotoxin Stock solution	エンドトキシン標準原液の調製	
Preparation of Standard Endotoxin solution	エンドトキシン標準溶液の調製	
Preparation of sample solutions	試料溶液の調製	
Determination of Maximum Valid Dilution	最大有効希釈倍数の求め方	
Gel-clot technique	ゲル化法	
(1)Preparatory testing	(1)予備試験	
(2)Limit test	(2)限度試験法	
(3)Assay	(3)定量試験法	
Photometric techniques	光学的測定法	
(1)Turbidimetric technique	(1)比濁法	
(2)Chromogenic technique	(2)比色法	
(3)Preparatory testing	(3)予備試験	
(4)Assay	(4)定量	
Reagents, Test Solutions	試薬・試液	
Amebocyte lysate	ライセート試薬	
Lysate TS	ライセート試液	
Water for bacterial endotoxins test (BET)	エンドトキシン試験用水	

注：エンドトキシン規格値の設定方法については、三極間で調和しているが、第十四改正日本薬局方の参考情報「エンドトキシン規格値の設定」では、最大投与量の算出に、成人の平均体重 60 kg を用いている。

9. 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對し、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、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、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 °C で、24 時間を超える場合は -60 °C 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

培養法には寒天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ソウ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、各ロット毎にマイコプラズマの発育性能に關し、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* FH 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* CH 19299 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、公的又は適當と認められた機関より入手後適切に管理されたもので、100 CFU 以下で培地に接種する。

3. 培養及び観察

1) 寒天平板培地一枚当たり検体（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。寒天平板培地は一検体当たり 4 枚以上とする。検体を接種した後、寒天平板培地表面を乾燥し、半数の寒天平板培地は 5 ~ 10 % の炭酸ガスを含む空気中（好気的条件）で、残りの半数は 5 ~ 10

%の炭酸ガスを含む窒素ガス中（嫌気的条件）で、いずれも適切な湿度のもと $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ において 14 日間以上培養する。

2) 液体培地一本当たり検体（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。液体培地は一検体当たり 2 本とし、各々 1 本ずつを好気的条件及び嫌気的条件で培養する。

被検菌株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) 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、寒天平板培地各 2 枚以上に接種する。寒天平板培地での培養に際しては、好気培養した液体培地から植え継いだものは好気的条件で、嫌気培養した液体培地から植え継いだものは嫌気的条件で、それぞれ $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 14 日間以上培養する。

4) 全寒天平板培地を対象に 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 以下の *M. hyorhinis* DBS 1050 又は *M. orale* CH 19299 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ものでなければならない。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、多數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的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 繼代以内のものを使用しなければならない。

カバーガラスを沈めた培養ディッシュ又は同等の容器に指標細胞を接種し、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* (DBS 1050) 及び *M. orale* (CH 19299) 100 CFU 以下を使用する。

細胞は 5 % 炭酸ガスを含む空気中 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ において 3 ~ 6 日間培養する。

カバーガ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検鏡する。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）に滅菌したカバーガ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。この時カバーガ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。細胞がカバーガラスに接着するよう 5 % 炭酸ガスを含む空気中 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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* 及び *M. orale* 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 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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。カバーガラスを取り出し乾燥する。

11) カバーガ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ガ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增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 以下の *M. hyorhinis*）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、エチジウムプロマイド染色後、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二段 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ぬ。

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。

以下に二段 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ぬ。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ぬ。

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 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 mM トリス-塩酸（pH 8.0）、1 mM EDTA）を飽和したフェノールを加え、混合する。

2) 室温で 15000 min⁻¹、5 分間遠心する。

3) 上清 400 μL を別のチューブに移し、3 M 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、じゅうぶん攪拌する。15 分間氷冷した後、4 °C で 15000 min⁻¹、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、洗液はピベットで除去する。4 °C で 15000 min⁻¹、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) ミネラルオイル等を滴加して反応中の蒸発を防ぎながら、94 °C 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 °C）で 2 分間のアニーリング、72 °C 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) ミネラルオイル等を滴加して反応中の蒸発を防ぎながら、94 °C 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 °C）で 2 分間のアニーリング、72 °C 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プ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 × 10⁴ 細胞/mL）を 2 mL ずつ加え、5 % 炭酸ガスを含む空気中、36 ± 1 °C 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 以下の *M. hyorhinis*）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 °C で 3 ~ 6 日間培養する。

10. 培地充てん試験法

本試験法は、無菌操作法で製造される医薬品の無菌性保証の適切性を充てん医薬品の代わりに無菌培地などを用いて検証するプロセスバリデーションの一方法である。したがって、充てん・閉塞工程、作業環境、作業操作、作業従事者などについては、実製品の製造工程を用い、かつ最悪ケースを想定したものでなければならない。本試験を実施するに当たっての必要な情報については、医薬品 GMP, WHO 医薬品 GMP, ISO 基準などを参考にすること。

1. 培地充てん試験の実施頻度

1.1 初期評価

初期評価の対象は、それぞれ初めて使用する設備、装置、工程及び異なった容器デザイン（同じ容器デザインでサイズの異なるものは除く）などである。実製品のロットサイズが 3,000 個以上の場合は、培地充てん試験を少なくとも連続 3 回、別々の日に実施する。実製品のロットサイズが 3,000 個未満の場合は、表 3 による。

1.2 再評価

1) それぞれの充てんラインの各作業シフトについて定期的に実施する。無菌作業従事者は、無菌操作に関する教育訓練を受け、培地充てん試験に参加した者でなければならない。
2) 充てんラインを 6 ヶ月以上使用しなかった場合は、その充てんラインを再使用する前に初期評価に準じる回数の培地充てん試験を実施しなければならない。
3) 無菌性保証に影響を与える工程、設備又は装置の変更（標準部品の交換は再評価の対象にならない）、無菌重要工程作業者の変更（例えば、新しい作業者の参入）、環境微生物試験結果の異常、最終製品の無菌試験で汚染製品が認められた場合には、必要に応じて初期評価に準じる回数の培地充てん試験を実施しなければならない。

2. 培地充てん試験の許容基準

0.1 % の汚染率をじゅうぶん検出できる数の容器に培地を充てんし、95 % 信頼上限値での汚染率が 0.05 % 以上、0.1 % 未満を警報基準値、0.1 % 以上を処置基準値とする。充てん容器数と警報基準値及び処置基準値との関係について表 1 に示す。表 2 は、充てん容器数当たり検出された汚染容器個数の汚染率を求めるために使用される。なお、培地充てん試験における汚染率 0.05 % は最低許容基準であって、製造者はより低い汚染率を達成できるよう努力しなければならない。無菌充てんラインの初期評価及び再評価に対する警報基準値及び処置基準値と、それらに対して必要な行動を表 3 及び表 4 に示す。実製品のロットサイズが 3,000 個未満の場合の培地充てん試験における警報基準値及び処置基準値は、半自動もしくは手動製造を考慮したものとなっている。

2.1 各基準値と必要な行動

2.1.1 初期評価・培地充てん試験

1) 警報基準値未満の場合には、培地充てん試験に適合しているものとみなす。

2) 連続 3 回以上行った培地充てん試験の何れかにおいて警

報基準値又は処置基準値に達した際には、汚染原因の調査後、更に 3 回以上培地充てん試験を行い、各試験結果が警報基準値未満の場合には、培地充てん試験に適合しているものとみなす。

2.1.2 再評価・培地充てん試験

1) 警報基準値未満の場合には、培地充てん試験に適合しているものとみなす。

2) 警報基準値に達した際には、汚染原因の調査が必要であり、更に 1 回培地充てん試験を行い、その試験結果が警報基準値未満の場合には培地充てん試験に適合しているものとみなす。

3) 処置基準値に達した際には、汚染原因の調査と同時にそのラインで前回成功した培地充てん試験と今回の培地充てん試験との間に製造された製品に関連した関係記録などについて機敏な調査を行い、必要に応じて保存中及び（又は）販売中の製品に対して適切な行動をとらなければならない。汚染原因の調査後、必要に応じて更に連続 3 回培地充てん試験を行い、3 回の培地充てん試験結果が警報基準値未満の場合には、培地充てん試験に適合しているものとみなす。

2.2 無菌性に影響を及ぼす諸要因

警報基準値又は処置基準値に達した培地充てん試験において、汚染原因の調査を行うに当たって、必要な評価対象要因としては以下のものが含まれる。

- 1) 環境微生物モニタリングデータ
- 2) 環境微粒子モニタリングデータ
- 3) 作業従事者の微生物モニタリングデータ（作業終了時、無塵衣や手袋表面などに付着している微生物のモニタリング）
- 4) 培地、器材、装置等の滅菌サイクルデータ
- 5) 滅菌装置のキャリブレーションデータ
- 6) 滅菌機材の保存状態の適切性
- 7) HEPA フィルターの評価（空中微粒子レベル、DOP テスト、流速など）
- 8) 使用前及び使用後のフィルター完全性試験結果（フィルターハウジング組立の適切性も含む）
- 9) 無菌エリアでの空気の流れと圧力の適切性
- 10) 培地充てん試験中に起こった通常と異なった出来事
- 11) 汚染微生物の諸性状検査結果
- 12) 衛生管理方法とそのトレーニング内容の適切性
- 13) 作業従事者のガウニングとそのトレーニング内容の適切性

14) 作業従事者の無菌操作技術とそのトレーニング内容の適切性

15) 作業従事者の健康状態（特に、呼吸器系疾患による咳やくしゃみなどの影響）

16) その他、無菌性に影響を及ぼす要因

3. 培地充てん試験におけるデータ管理

それぞれの培地充てん試験において、下記の事項を詳細なデータとして記録しなければならない。

- 1) 試験実施日時
- 2) 試験実施充てん室、充てんラインの識別
- 3) 容器、栓の種類とサイズ
- 4) 充てん容量
- 5) 充てん速度
- 6) 滅菌フィルターのロット番号、カタログ番号