

# 再生医療の無菌試験の考え方

第102回厚生科学審議会再生医療等評価部会

金沢工業大学・特任教授/日本薬科大学 客員教授  
山口 照英

本資料は、令和3～5年度 AMED 再生医療等実用化研究事業「医療提供される再生医療等に用いる細胞加工物の実用的な微生物等検査方法の開発および最適化」（研究代表者：山口 照英）の研究成果に基づき作成した。

## 細胞治療のための迅速無菌試験法の公定書

- 米国薬局方USP : <1071> Rapid Microbial Tests for Release of Sterile Short-Life Products: A Risk-Based Approach. 2022
- ヨーロッパ薬局方EP : 5.1.6. Alternative Methods for Control of Microbiological Quality. Revised 2017
- ヨーロッパ薬局方 2.6.27. Microbiological Examination of Cell-based Preparations. 2021
- 日本薬局方JP 参考情報 : 微生物迅速試験法

培養法については公定書。NAT法、フローサイトメーター法などは別途一般的な試験法として記載

- 各国の公定書（局方）：細胞治療製品（無菌化工程が適用できず、製造後すぐに投与される製品）を対象としてとして迅速無菌試験法を提案
- 各局とも迅速試験法の特徴や限界、実施にあたっての考慮点を記載
- 採用しようとする試験法の精度や感度などの評価のありかたにおける考え方を提案しているのはEPのみ：試験キットのサプライヤーの視点であり、エンドユーザーがそれをどのように考慮するかまでは記載がない

## 細胞加工物に対する無菌試験の実施と公定書

- 試験法の採用時：用いる試験法の特徴や限界（感度や精度）の重要性。試験実施にあたって、どの検体（検体採取量、検体本数を含む）を用いて無菌試験を実施した時にどれほどの確度で無菌性が担保できるのか（EP 5.1.6.の記載. USPはEPの考え方を引用）

## 再生医療を実施している医療機関

- 無菌検査を委託している場合も含め、どのような無菌試験を実施するか、採用する試験の特性や限界を考慮
- どのような無菌試験を採用するか：試験の特性に応じてどのように投与の可否と判断すべきか
- 細胞加工物の特性や工程から投与前に最終的な無菌試験の結果が得られない場合（e.g. 投与後の確認としての無菌試験の実施）、陽性となった場合の対応
- アルゴリズムの考え方

## 迅速試験法

- 無菌試験法の迅速代替法（EP5.1.6）
- 細菌増殖により代謝等の変化を検出：電気化学的検出、CO<sub>2</sub>ガス産生、蛍光法によるATP検出、カロリーメトリー、濁度測定
- 細菌の直接測定：膜上補足（蛍光検出）、フローサイトメトリー、細菌特異的脂肪酸検出、質量分析、核酸増幅法（16SrRNA or 23SrRNA genome）、ゲノムフィンガープリンティング

### 無菌試験として採用する際の考慮事項

- 迅速無菌試験のデザイン、正確性、精度、特異性、直線性、検出感度（LOD）、頑健性についての評価法：検査手法やキットの開発メーカーがバリデーションを実施
- エンドユーザー：検査を委託している場合も含め、どのような無菌試験を実施するか、採用する試験の感度等の確認

# 医療機関で迅速無菌試験法を採用する際の考慮事項

## 迅速培養法を適用する際の考慮事項

- 細菌増殖によるATP産生やCO<sub>2</sub>測定のための機器が市販
- 抗生物質を添加して製造している場合、抗生物質による抑制を回避する対策  
✓メンブランフィルター法や抗生物質吸着ビーズ
- 一定の期間の試験培養が必要 ⇒ 培養終了後に無菌接続等による細胞回収ができない場合には出荷判定試験を考慮すべき

## 細菌の直接測定を適用する場合の考慮事項

- フローサイトメーターや固相サイトメトリー：細菌に取込まれてする強い蛍光物質へ変化する試薬を指標：生細胞を検出、解析ボリュームの限界から感度が課題。一部の機器は非常に高額
- NAT：マルチコピー遺伝子である16SrRNAや23SrRNA遺伝子をターゲットとして増幅。迅速性と高感度のために培養後の投与判定に用いることも可能。死細胞や細菌DNAの汚染、キャリーオーバーなど擬陽性を排除するための判定アルゴリズムが重要。qPCRをはじめ多様な増幅法や増幅産物の検出法など、最も開発が進んでいる。EPへの適合性を標榜するキット
- ギムザやクリスタルバイオレットなどの染色法は感度が不十分。（目視のみでの確認では検出は不可能である。）

特にNAT法についてその感度・精度、さらに判定アルゴリズムの考え方

## NAT試験の設定に当たっての考慮事項

1. 採用するNAT法の妥当性を検証するためにどのような菌種が検出可能か
2. 被検液（液量も含め）の選択
3. 被検液からの抽出操作法・抽出量
4. 抽出した検体の核酸増幅法と増幅産物の検出法
5. 感度 = 採取量（被検疫量） × （検体数） × （増幅産物の検出感度）
6. キャリーオーバーなどの妨害要因の排除
7. 判定基準やアルゴリズム

1. 検出限界 LOD （増幅反応だけでなく検体からの検出を含む）
2. 検出（感度や精度）の頑健性
3. キットメーカーのバリデーションデータ（感度や精度）に基づいて、適用する細胞加工物を用いて感度や精度が得られるかの確認の重要性
4. 判定基準やアルゴリズム

※多くのクリニック等の医療機関では、院内でNAT試験を実施するための機器が整備されておらず、抽出操作を含めた精度や感度の確保が課題であり、外注検査で実施されることが多いと想定されることも考慮が必要。

## 迅速試験法としてのNAT

- 陽性カットオフ値
- キャリーオーバーへの対応（dUTP/Uracil DNA glycosylaseや構造施設）
- 死菌や菌由来DNA（培地添加物や操作を行う基材）による擬陽性 – propidium monoazide/UVによる分解
- 判定基準や判定アルゴリズム

## NATによるマイコプラズマ試験（局方参考情報）

- A法（培養法）B法（DNA染色法）に代えて、NATの適用
- 6種のマイコプラズマ（*Mycoplasma hyorhinis*、*Mycoplasma orale*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Mycoplasma salivarium*、*Acholeplasma laidlawii*、*Mycoplasma fermentans*、*Mycoplasma arginini*）が10CFU/ml（DNA染色法代替では100CFU/ml）が検出できること： 細胞懸濁液を用いた場合に感度が重要

## 中間工程での無菌試験

- 培養法（迅速培養法を含む）を中間工程検査で実施する場合や最終細胞加工物を凍結保存する場合（特に解凍後に直ぐに投与する場合）：抗生物質を添加している場合、汚染に気が付かず、かつ検査をしても陰性と誤って判定するリスク
- メンブランフィルター法を適用するなどして、抗生物質の影響を排除した検査が必要

## 細胞加工の工程

- 汚染を防止するための対応
  - ✓ 血液を原料とする場合に、初流血廃棄による皮膚常在菌汚染の低減化
- 培養等の生物由来原材料による汚染回避
  - ✓ 医薬品の使用や原材料の受入れ試験
- 環境モニタリング
  - ✓ 環境モニタリングで同定された菌種に対して十分な感度を持った無菌試験であること