

細胞医薬品の微生物学的安全性評価

大分ラボラトリー 藤井 清治 / 大阪ラボラトリー 西岡 由紀

細胞医薬品は生きた細胞等を用いるため、製造において最終滅菌法やろ過滅菌法にて製品を無菌化することができない。したがって、製造工程において製品に対する微生物汚染のリスクを低減させることが必要であり、製品の安全性を評価するために各種の微生物学的安全性試験が重要となる。当社は他社に先駆けて製薬会社や医療機関等からの委託を受け、細胞医薬品の微生物学的安全性試験を数多く実施してきた¹⁾。特に製造から投与までの期間が短いものは、早期に結果が求められることが多いため、当社は微生物迅速試験法の開発を行い、安全性評価に活用してきた。本稿では、当社で実施している無菌試験、微生物迅速試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、ウイルス否定試験について紹介する。

1 はじめに

細胞医薬品は、生きた細胞等を患者に移植することによる疾患治療法として利用される医薬品であり、従来の疾患治療法と比較して優れた治療効果を発揮することが期待されている。一方で、細胞医薬品は主に生きた細胞等を用いるため、製造工程において最終滅菌法や、ろ過滅菌法による無菌化工程を適用することができないという課題がある。細胞医薬品の無菌性を保証するためには第一に、製造における環境、原料および工程資材、操作方法等に関するリスク管理として工程管理を行い、製品に対する微生物汚染のリスクを低減させることが必要である。そのうえで、製品の安全性を評価するため、各種の微生物学的安全性試験が求められる。

微生物学的安全性試験は、原則として最終製品を試験検体に用いることが求められている。一方、最終製品はその試験結果を得た後に患者に投与できることが望ましい。しかしながら、試験期間に制約があることから日本薬局方に従った試験を適用できないケースがある。その場合、「再生医療等製品（ヒト細胞加工製品）の品質、非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンスについて²⁾」には、日本薬局方に厳格に従った試験方法を採用するのではなく、科学的に合理的な試験方法の採用が可能であると記載されており、品質管理試験の信頼性担保を前提として微生物迅速試験法を採用できる。

最近では、再生医療等安全性確保法の下で実施されている細胞外小胞等を用いた治療について、日本再生医療学会から「細胞外小胞等の臨床応用に関するガイダンス」が発表されている。その中では、細胞を含め原料等からのウイルス・細菌・真菌のような感染因子の混入の管理が重要と指摘されている³⁾。

以下に、当社で実施している微生物学的安全性評価試験の目的と概要を紹介する。

2 無菌試験

無菌試験とは、日本薬局方に規定された試験条件、例えば培地の種類、試験検体量、培養温度、培養期間に従って培養を行い、目視観察の結果、菌の増殖が認められない場合に、陰性と判定する試験法である。

しかしながら、日本薬局方 無菌試験法は、最終製品の製造量の10%あるいは最大20～40本といった限られた数量を使用する抜き取り試験であることから、製品の無菌性が完全に担保されるわけではない。より高い無菌性を保証するためには、無菌操作による一貫した製造工程を経て製造されることが重要であり、製造工程のペリフィケーションに加え、工程管理などでも無菌性の確認が求められている。

無菌試験法は、日米欧の薬局方で調和済みの試験法であり、2種の培地を使用することにより、好気性細菌、真菌、嫌気性細菌を網羅的に検出する手法である。微生物の増殖による培地の濁り等を目視により検出する方法であるため、14日間以上の培養期間が必須であり、細胞医薬品の出荷までに試験結果が得られないケースがある。万一、無菌試験で陽性と判定された場合、即座に報告し、製薬会社や医療機関等にて適切な対応がとられることになる。こうした事情を踏まえ、当該無菌試験法に加え、微生物迅速試験法の導入が規制当局から推奨されている。詳細は次項にて紹介する。

無菌試験を実施するにあたって重要な点は試験環境の管理である。無菌試験法の第1項「微生物汚染に対する予防措置」において、作業区域の適切な環境モニタリングと適切な汚染防止措置の実施が要求されている。

当社では清浄度グレードAで管理された無菌試験用アイソレータシステム（図1）の中で、閉鎖系のろ過器ユニットを用いて検体溶液をろ過処理する「メンブランフィルター法」および検体溶液を培地に直接添加する「直接法」を実施しており、試験環境



図1 無菌試験用アイソレータシステム（追加導入した2号機）



図2 無菌試験迅速測定装置（マイクロバイオμ3D™）

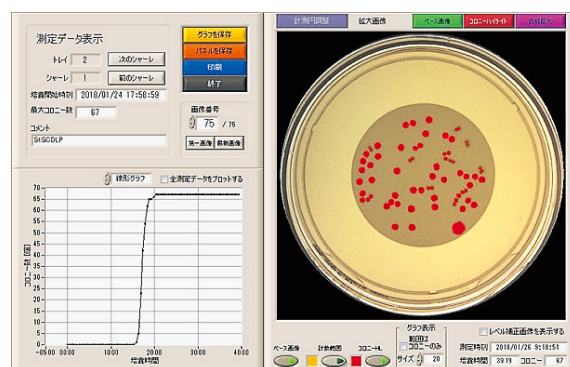


図3 測定モニター画面

および試験作業者に由来する微生物のコンタミネーションのリスク低減を図っている。2020年9月には無菌試験用アイソレータシステム2号機（図1）を追加導入することにより、定期点検やメンテナンスに伴って生じていた試験停止期間が解消され、お客様の要望される時期に試験を実施することが可能となった。また、試験作業者には無菌試験の操作技術の習得に加えて、微生物学的な知識教育も行っており、微生物に対する十分な知識を有する有資格者が試験に従事している。

3 微生物迅速試験法

製造から患者への投与までの期間が短い細胞医薬品の場合、迅速に微生物の混入の有無を確認しなければならない。複数の測定原理による微生物迅速試験法があるなか、当社では培養手法と高感度 CCD を組み合わせた「マイクロバイオ μ3D™」（図2）を用いたマイクロコロニー法と、培養手法と炭酸ガス検知を組み合わせた「バクテアラート™」を用いたガス測定法の試験を導入し受託してきた。

前者のマイクロコロニー法は、試験着手から3日以内に結果が判明する（図3）。この手法では、メンブランフィルター法を適用することにより、中間工程品（培養上清）など比較的多くの試験検体量（数 mL ～数百 mL）を確保できる場合に、用いる検体量を増やすことで、検出感度を向上させることができる。後者のガス測定法は、細胞医薬品の微生物迅速試験法として広く使用されている手法で、試験着手から7日以内に結果が判明する。

いずれの方法も試験過程に培養工程があることから、万一、菌の検出が認められた場合にも、菌を単離して菌種の同定を行うことにより（当社では外部試験機関を利用）、菌の混入経路の

調査や投与後の患者への対応方法などの情報を提供することができる。

以上のとおり、微生物迅速試験法は細胞医薬品の無菌性評価において、その迅速性と応用範囲の広さから今後大いに活用されるものとする。当社では報告までに必要な期間、各手法の原理や特徴に応じて、より適切な試験法で GMP および信頼性基準の規制に対応した試験が可能である。現在、さらなる試験期間短縮に向けて、新たな手法を準備中である。

4 エンドトキシン試験

細胞医薬品の品質管理項目の一つとして、エンドトキシン試験が求められる。エンドトキシンはグラム陰性桿菌に由来する発熱性物質であり、誤って一定量以上のエンドトキシンが混在する医薬品が投与され患者の血中に入った場合、強い発熱を引き起こす。いったん、製品に混入したエンドトキシンは完全な除去や不活化が困難であることから、最終製品の試験だけでなく、原料や製造用水を対象とした工程管理でのエンドトキシン試験が必要である。

エンドトキシン試験法は、無菌試験法と同様に日米欧の薬局方で調和済みの試験法である。測定手法にはゲル化法並びに



図4 エンドトキシン測定装置

光学法（比濁法および比色法）（図4）の3法があり、当社では、いずれの手法を用いることも可能である。

エンドトキシンの検出は、ライセート試薬の酵素反応を利用することから、試験検体に含まれる成分によっては試薬の反応経路に影響を及ぼし、結果として偽陰性や偽陽性などの反応

干渉作用を引き起こす場合がある。また、細胞医薬品では培養液や細胞保存液等に含まれる種々の成分により反応干渉作用を示すことがある。従って、当社では、試験法設定に際し、試験検体のロット間差も考慮して条件設定を行っている。

5 マイコプラズマ否定試験

細胞医薬品の品質管理項目として、マイコプラズマ否定試験が求められる。マイコプラズマは一部の菌種に病原性が確認されており、患者への健康被害防止の観点から、製品への混入を防止する必要がある。加えて、培養細胞のマイコプラズマ感染により細胞の増殖や特性に影響を与える可能性があることから、細胞医薬品の製造においてはマイコプラズマ汚染の防止が必須である。マイコプラズマ汚染は細胞培養液の濁りとして検出されない特徴があり、一般細菌と比べて汚染の発見が遅れる恐れがあることから、最終製品だけでなく、原材料や中間製品での管理を十分に行う必要がある。

マイコプラズマ否定試験法は、A. 培養法、B. 指標細胞を用いた DNA 染色法、および C. 核酸増幅法（NAT）の3つの手法が日本薬局方に記載されている（A. ～ C. は日本薬局方の試験項目名称に含まれる表記である）。特に、C. NAT は測定の迅速性と高い検出感度に特徴があり、A. 培養法および B. 指標細胞を用いた DNA 染色法の代替法でもあることから、マイコプラズマ否定試験の第一選択として採用される。しかしながら、薬局方で厳格なメソッドバリデーションが要求されており、試験法設定においては、試料マトリクス下での試験菌 7 菌種の添加回収試験などが必要である。

一方、A. 培養法は液体培地および寒天培地を用い、マイコプラズマのコロニーを検出する方法であり、増殖可能なマイコプラズマを特異的に検出できる利点があるが、培養に要する日数が 28 日以上と長期間であるため、迅速性に欠ける。また、B. 指標細胞を用いた DNA 染色法も培養手法を用い、VERO 細胞に試験検体を接種して最長 6 日間培養して蛍光染色を行い、

VERO 細胞の核を取り巻くマイコプラズマ由来の微小な核外蛍光斑点の有無を確認する試験法であり、やや迅速性に欠ける。

なお、マイコプラズマ否定試験法は日米欧 3 局で調和されていないことから、各薬局方に応じて試験法を設定する必要があるが、当社では上述の A. 培養法および C. NAT について、日米欧それぞれの薬局方に従って実施可能である。

6 ウイルス否定試験（核酸増幅法（NAT））

細胞医薬品の原材料であるヒト細胞や、ヒト・動物由来の製造関連物質はウイルスに汚染されている可能性がある。また、製造工程中にウイルスが混入するリスクもある。一方、原材料となる細胞や製品は生きた細胞を含むことから、バイオ医薬品のように製造工程中でウイルスの不活化／除去を厳密に行うことは困難である。したがって、微生物学的評価として、原材料、中間製品および最終製品でウイルス否定試験を実施し、ウイルスに汚染されていないことを確認することが必要となる。再生医療等製品では、厚生労働省の「品質及び安全性の確保に関する指針」^{4) ～ 9)} において、自己由来細胞については、B 型肝炎ウイルス（HBV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）および成人 T 細胞白血病ウイルス（HTLV）に留意することとなっている。さらに、同種由来細胞については、上記 4 種類のウイルスおよびパルボウイルス B19 に加えて、必要に応じてサイトメガロウイルス（CMV）、EB ウイルス（EBV）およびウエストナイルウイルス（WNV）の混入が否定されることが求められている。また、改訂版の検討が進められている ICH ガイドライン Q5A（R2）には、推奨されるウイルス検出および同定法として、Molecular Methods が追加され、ウイルス否定試験として NAT が用いられるケースが増えてくると考えられる¹⁰⁾。

当社ではウイルス否定試験として、リアルタイム PCR（図5）を用いた NAT を実施している。測定には Virus Test KitTM（タカラバイオ株式会社）または VirFinderTM（島津ダイアグノスティクス株式会社）を用い、試験法設定の際は、試験検体ごとに核酸抽出液に Kit 付属のポジティブコントロール（各ウイルスの核酸配列）を添加してバリデーション（特異性および検出限界）を実施し試験法の妥当性を検証している（図6）。



図5 リアルタイムPCR
(Thermo Fisher Scientific
QuantStudio 7 Flex)

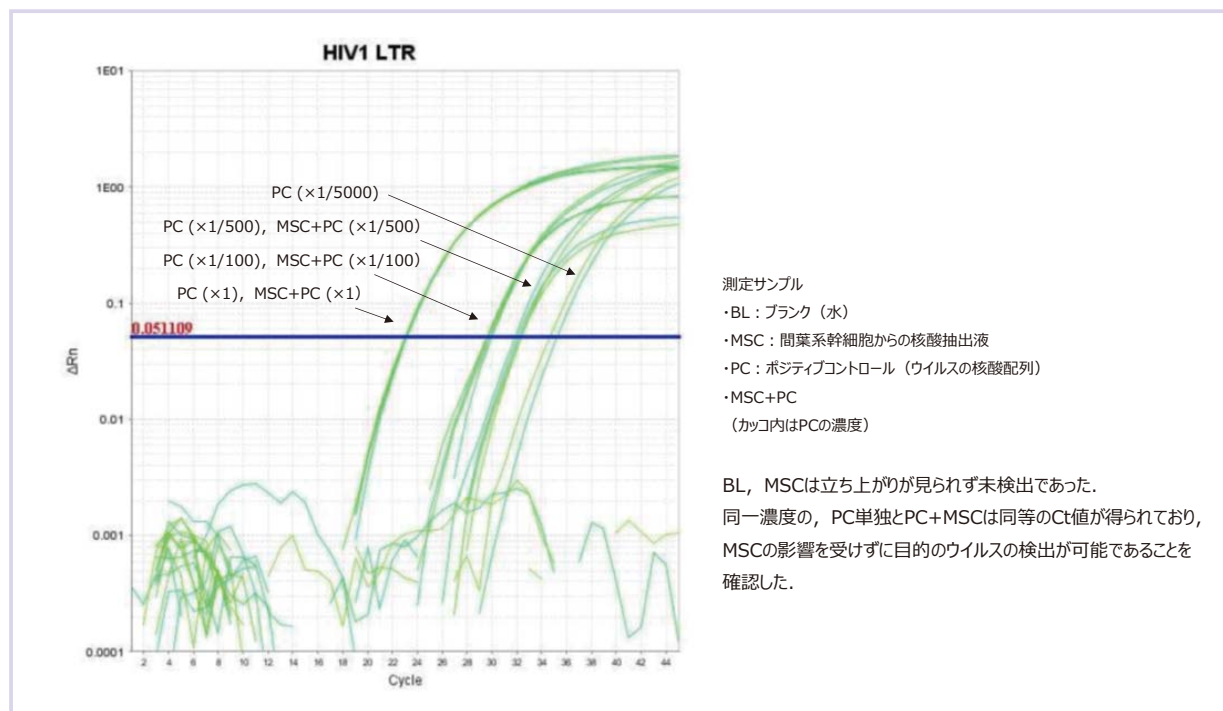


図6 測定チャート

7 おわりに

当社は細胞・組織加工製品をはじめとする細胞医薬品について、他社に先駆けて2014年から品質評価サービスを提供してきた。細胞医薬品の微生物学的試験の特徴として、試験法設定や品質試験の際、陽性対照に生菌を用いる必要がある。製造施設内での試験実施は、生菌を持ち込むため、製品への生菌混入リスクが懸念される。このような背景から、外部試験機関への委託を希望されるケースも多く、(当社は)これまでに40社以上のお客様より950件以上の試験をご依頼いただいている。

また、細胞医薬品は安定性などの理由による品質管理の時間的制限がある。当社はこれに対応するため、微生物迅速試験法などの技術開発についても積極的に進めてきた。現在もこうしたご要望にお応えするため、より試験期間の短い新たな手法の微生物迅速試験の提供に向け準備を進めている。

再生医療を待ち望む患者のため、今後さらに技術を磨き続け、品質の高い評価サービスを提供することにより、再生医療の発展に貢献していきたい。

文 献

- 1) 藤井清治: SCAS NEWS 2018-II, **48**, 3 (2018) .
- 2) 厚生労働省: 平成28年6月14日 薬機発第0614043号, “再生医療等製品(ヒト細胞加工製品)の品質, 非臨床試験及び臨床試験の実施に関する技術的ガイダンスについて”(2016) .
- 3) 一般社団法人日本再生医療学会: “細胞外小胞等の臨床応用に関するガイダンス(第1版)(令和6年4月30日)” (2024) .
- 4) 厚生労働省: 平成20年2月8日 薬食発第0208003号, “ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について”(2008) .
- 5) 厚生労働省: 平成20年9月12日 薬食発第0912006号, “ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について”(2008) .
- 6) 厚生労働省: 平成24年9月7日 薬食発0907第2号, “ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について”(2012) .
- 7) 厚生労働省: 平成24年9月7日 薬食発0907第3号, “ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について”(2012) .
- 8) 厚生労働省: 平成24年9月7日 薬食発0907第4号, “ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について”(2012) .
- 9) 厚生労働省: 平成24年9月7日 薬食発0907第5号, “ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について”(2012) .
- 10) 医薬品規制調和国際会議: “ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品等のウイルス安全性評価 ICH Q5A (R2) (ドラフト版 承認日2022年9月29日)” (2024) .



藤井 清治
(ふじい せいじ)
大分ラボラトリー



西岡 由紀
(にしおか ゆき)
大阪ラボラトリー