

(別紙1)

「薬事法関係事務の取扱いについて」(平成12年3月31日付け12動薬A第418号農林水産省動物医薬品検査所長通知)の別添8の「5-2 含湿度試験(VICH GL26)」の次に次のように加える。

5-3 マイコプラズマ否定試験(VICH GL34)

1 緒言

(1) ガイドラインの目的

本VICH(動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力会議)ガイドラインは、動物用医薬品の新製品認可のハーモナイゼーションを促進することを目的としている。動物用生物学的製剤は、連続した製造と最終製品の安全性を確保するために、マイコプラズマに汚染されていないことが重要である。マイコプラズマ汚染は、細胞培養及び卵由来の生物学的製剤においてはマスターシード、マスターセルシード(ストック)、動物由来の出発材料を介して、並びに生物学的材料の加工工程においては継代及び製品組立の間にもたらされる可能性がある。そのため、試験を実施して、最終製品、ワーキングシード、ワーキングセル及びハーベスト、並びにマスターシード、マスターセルシード及び動物由来成分などの出発材料に、試験法の検出限界の範囲内においてマイコプラズマが存在しないことを示す必要がある。本ガイドラインは、マイコプラズマ汚染の存在を検出するために試験を実施すべき製造工程と試験法を定めるものである。本ガイドラインは関係規制当局による試験資料の相互承認を促進する統一基準となる。科学的に認められた基準により本ガイドラインに示された方法と同等であると証明された方法の利用も認められる。

(2) 背景

マイコプラズマ汚染に対する現行の試験法は、日本の「動物用生物学的製剤基準(2002)」、欧州薬局方(第7版2011, 2.6.7.)、米国連邦規則(9 CFR 113.28)に記載されている。これらの基準は全て液体培地及び寒天培地を用いる方法によりマイコプラズマ汚染を試験することを求めているという点で類似している。しかし、これらの試験法は、マイコプラズマ汚染の検出に用いることが要求又は承認されている他の代替試験法と同様に、液体培地及び寒天培地を用いる試験法の細部に違いがある。

(3) ガイドラインの範囲

本ガイドラインでは、マイコプラズマ汚染がないことを確実にするために、細胞培養及び卵由来の動物用生物学的製剤におけるマイコプラズマ汚染を検出するために実施する試験方法について記載する。マスターシード、マスターセルシード(ストック)、ワーキングシード、ワーキングセル、動物由来成分、生ワクチンのためのハーベスト、生ワクチンの最終製品及び不活化製品のためのハーベストに対する試験が含まれる。マイコプラズマ試験培地で増える細菌製剤及びバリデートされたマイコプラズマ不活化処置によりマイコプラズマ汚染のリスクに対処している製剤については、本ガイドラインの適用対象外とみなされる。鶏群に対する適切な試験の実施により、製造に使用される卵がマイコプラズマに汚染されていないことを確認しているが、これについては本ガイドラインの対象外である。

(4) 試験法

本ガイドラインでは二つの試験法を記載する。

- 1) 液体培地で増殖し、寒天栄養培地上のコロニー形成により検出する方法
- 2) 細胞培養で増殖し、特徴的なデオキシリボ核酸 (DNA) 蛍光染色 (培養できない株の検出が可能な技術) により検出する方法

第 3 の試験法として、核酸増幅法 (NAT) が広く認知されているが、本ガイドラインには含まれていない。バリデートされた NAT 法の利用は、検出、確認及び株の同定のためのより迅速な方法として、現在、規制当局により承認又は検討が行われている。もし本ガイドラインに記載されている試験法に対して、少なくとも検出限界が同等であることが証明されるならば、適切にバリデートされた NAT 法は、液体/寒天培地法あるいは指示細胞培養法の代替法として利用してもよい。NAT 法で陽性と判定されたサンプルは、使用に不適當であると直ちに判断してよい。もし試験用材料の中に生存しているマイコプラズマの存在の確定が必要ならば、液体/寒天培地法又は指示細胞培養法を実施すべきである。NAT 法使用の評価は、試験法を更に発展させ、比較し、正確なものにするための並行試験として推奨されており、本ガイドラインの今後の改訂版に含まれる可能性がある。

2 マイコプラズマ汚染の試験のためのガイドライン

(1) マイコプラズマ汚染検出のための一般試験法

液体培地及び寒天培地を用いた培養法は、マイコプラズマを検出するための基本的な試験法である。固体培地と液体培地を用いる培養法は、ワクチンのハーベスト又は最終バッチ及び動物由来成分を試験する際には、固体培地と液体培地を用いる培養法を用いなければならない。マスターシード、マスターセルシード (ストック)、ワーキングシード及びセルロットは、固体培地及び液体培地を用いる培養法と DNA 染色による指示細胞培養法を併用して試験しなければならない。いずれかの方法による試験結果がマイコプラズマに対して陽性を示す場合、サンプルは陽性とみなされ、使用には不適當である。

材料	液体及び寒天培地による培養	DNA 染色
マスターシード及び マスターセルシード	必要	必要
ワーキングシード及び ワーキングセルシード	必要	必要
動物由来成分 ^{1,2}	必要	
ハーベスト	試験を必要とする場合 ³	
最終製品	試験を必要とする場合 ³	

¹ 卵を除く。

² バリデートされたマイコプラズマ不活化処置が適用された場合を除く。

³ 所管官庁はハーベストと最終製品の組合せが異なる場合に試験を要求する。

(2) 培養試験システムのバリデーション

試験施設のマイコプラズマ検出法の検出限界をバリデートするためには培養を実施しなければならない。次の 5 株のマイコプラズマについて低濃度の増殖を確実にするため、固体培地及び液体培地の両方を十分な数用いなければならない。

Acholeplasma laidlawii

Mycoplasma hyorhinis

Mycoplasma orale

Mycoplasma synoviae

Mycoplasma fermentans

これらの菌は、(試験におけるマイコプラズマ増殖の抑制を検出するために) 抗生物質感受性の(実用的な数値内での)幅、培養条件の複雑さ、増殖の速さ、汚染菌となる頻度の高さ、及び鳥類又はターゲットとなる哺乳動物に対する病原性を考慮して選択された。*Acholeplasma laidlawii* は細胞培養でよくみられる汚染菌で、動物由来であり、場合によっては環境由来も考えられる。*Mycoplasma hyorhinis* は培養条件が複雑な菌で、細胞培養でよくみられる動物由来の汚染菌であり、哺乳動物の病原体である。*Mycoplasma orale* は抗生物質に感受性があり、細胞培養でよくみられるヒト由来の汚染菌である。*Mycoplasma synoviae* は培養条件が複雑な菌で(ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド(DPN、NAD)とシステインを必要とする)、鳥類の病原体である。*Mycoplasma fermentans* は増殖が遅い菌で、細胞培養でよくみられるヒト由来の汚染菌である。

試験施設のマイコプラズマ汚染培養試験システムのバリデートに用いられるこれらの菌の参照株は、継代数が低く(15代以内)、基準培養株の分離菌と同系であると認められたものでなければならない(参照株に関する情報については本ガイドラインの3の(2)参照)。培養試験システムのバリデートに用いられる参照株は、試験対象製品(表参照)に対して適切なものとなる。*M. synoviae* についてのバリデーションは、鳥類由来の材料が開発及び製造のどこかの段階で用いられる場合に必要とされる。*M. hyorhinis* と *A. laidlawii* についてのバリデーションは、哺乳動物由来の材料が開発及び製造のどこかの段階で用いられる場合に必要とされる。*M. orale* についてのバリデーションは抗生物質が開発及び製造のどこかの段階で用いられる場合に必要とされる。作製された参照株は液体培地及び寒天培地の各作製ロットをバリデートするために用いられなければならない。試験ごとに少なくとも参照株1本を対照菌として用いなければならない。

製剤タイプ、試験法、抗生物質含有の有無別に必要とされる参照株

ワクチンのタイプ 抗生物質含有の有無 試験方法	<i>A. laidlawii</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. synoviae</i>	<i>M. fermentans</i>
鳥類の卵由来 ワクチン 抗生物質 無 液体/寒天培養法				X	X
鳥類の卵由来 ワクチン 抗生物質 有 液体/寒天培養法		X		X	X
鳥類の細胞培養由来 ワクチン 抗生物質 無 液体/寒天培養法	X			X	X
鳥類の細胞培養由来 ワクチン 抗生物質 有 液体/寒天培養法	X	X		X	X
哺乳動物の細胞培養 由来ワクチン 抗生物質 無 液体/寒天培養法	X		X		X
哺乳動物の細胞培養 由来ワクチン 抗生物質 有 液体/寒天培養法	X	X	X		X
抗生物質を含まない ワクチン DNA 染色法		X	X		
抗生物質を含む ワクチン DNA 染色法		X	X		

(3) 培養法

ア 培養条件

密栓された容器に入った液体培地を大気中で培養する。寒天培地は全て微好気条件下（CO₂ を 5-10%含む窒素ガス）で培養する。固体培地については寒天表面の乾燥を防ぐために十分な湿度のある空気環境を維持すること。

イ 培地の新しいバッチの栄養性状

培地は新しいロット（バッチ）ごとに栄養性状について試験が行われなければならない。その際本ガイドラインの2の（2）に規定された参照株を用いる。各試験機関は低濃度（100CFU（Colony Forming Units）以下）の各参照株から接種するものを決定しなければならない。固体培地に対しては60mm プレートにつき、液体培地に対しては100mLの容器当たり、それぞれ低濃度（100CFU以下）になるように接種する。各参照株につき、少なくとも寒天平板1枚と液体培地1個を使用する。寒天及び液体培地を培養し、規定された間隔で液体培地から寒天培地へ継代培養する。指定された全ての参照株について、得られる増殖が、接種に関して算出される値から5倍以上の差がないならば、その寒天培地のバッチは栄養性状に関する試験に適合していることとなる。指定された各参照株について、液体培地から寒天培地へ継代培養されたマイコプラズマの増殖が同様に達成されれば、その液体培地は栄養性状に関する試験に適合していることとなる。有効と判明した培地の組成は本ガイドラインの3の（1）に記載されている。

ウ 抑制物質

栄養性状に対する試験は、承認前の段階及びマイコプラズマ検出に影響する可能性があるような製造方法の変更があるときには必ず、試験対象製剤を含む場合と含まない場合の両方において実施しなければならない。もし参照株が試験対象製剤を含まない培地の方で製剤を含む培地よりも1継代以上早く増殖するなら、あるいは試験対象製剤を含むプレートへ直接接種された場合のコロニー形成が製剤を含まないプレートの1/5未満であるなら、試験対象製剤には抑制物質が含まれている。マイコプラズマ汚染試験を実施する前に、これらの物質を中和するか、又はその影響を打ち消す対策をとる必要がある。それには、例えば、抑制物質を含まない培地で継代するか、大量の培地で希釈する方法がある。希釈する方法としては、培地量を増やして用いるか接種量を複数の100mL フラスコに分割することができる。中和又はその他の方法の有効性は、中和後に抑制物質に対する試験を繰り返すことで確認できる。

エ 試験法

- ① それぞれの固体培地のプレートごとの接種量は試験対象製剤 0.2mL である。マイコプラズマ検査がマスターシード、ワーキングシード、マスターセル、ワーキングセル、及び動物由来成分に関するものであるときには、10mL 以上の未希釈の試料を各液体培地中で試験しなければならない。各液体培地中で試験されるべき最終製品の量は、販売承認を与える規制当局によって定められたとおりとする。それらは現在のところ日本と米国では1mL以上、EUでは10mL以上となっている。寒天培地のプレートは、35～38℃の微好気条件下で、表面の乾燥を防ぐために十分な湿度を保った空気環境下で10～14日間培養する。液体培地は、密栓された容器に入った状態で35～38℃の大気中で20～21日間培養する。同時に、液体培地及び寒天培地のプレートについて、

非接種の 100mL を陰性対照として培養する。もし試験対象製剤の添加により著しい pH の変化が生じた場合（これは承認前の段階で判定されるべきであるが）、その液体培地に水酸化ナトリウム又は塩酸の溶液を加えることにより元の pH に戻さなければならない。接種後第 2 日～第 4 日の間で、それぞれの液体培養から 0.2mL を、少なくとも各固体培地の 1 枚に接種する方法で継代培養し、その後 35～38℃の好気条件下で 10～14 日間培養する。この操作を試験の第 6 日～第 8 日の間、第 13 日～第 15 日の間、第 19 日～第 21 日の間に、それぞれ繰り返す。第 19 日、第 20 日又は第 21 日に接種された寒天培地のプレートは 7 日間培養する。液体培地は 2 日又は 3 日ごとに観察し、もし色に変化したら継代培養する。変色の検出にはフェノールレッドを培地に加える必要がある。

- ② もし液体培地に細菌又はカビによる汚染が認められた場合には、試験を反復する。各接種日につき最低 1 枚のプレートの判定ができない場合には、試験を反復しなければならない。
- ③ 試験には、寒天培地のプレート上及び液体培地中に少なくとも 1 種の参照株を低濃度（100CFU 以下）で接種することによって作製された陽性対照を含める。試験が繰り返し実施される場合には、この対照株は定期的に交替しなければならない。この対照株は、本ガイドラインの 2 の（2）に示されたように、試験を行う製剤のタイプによって定められたワーキング参照株を用いてバリデートされた培地を用いて行われる各試験に用いなければならない。

オ 培養法の判定

培養期間の終了時に、接種が行われた全ての固体培地を顕微鏡で検査し、マイコプラズマコロニーの存在を確認する。もし接種を行ったどの固体培地にもマイコプラズマコロニーが発育しない場合、試験対象製剤はマイコプラズマ汚染について陰性である。もし固体培地のどれかに典型的なマイコプラズマコロニーが発育した場合、この試験及び試験対象製剤はマイコプラズマ陽性とみなされる。もし陽性対照が、1 枚でも継代培養プレートでマイコプラズマの発育を示さない場合、又は陰性対照がマイコプラズマ汚染について陽性である場合には、この試験は無効となる。もしいずれの対照も無効となった場合は、試験を反復しなければならない。もし疑わしいコロニーが観察された場合、適切かつバリデートされた方法を用いてマイコプラズマ汚染を確認してもよい。

(4) 指示細胞培養法

培養細胞を DNA に結合する蛍光色素で染色する。細胞表面に現れる蛍光色の特徴的な粒子状又は糸状模様によってマイコプラズマが検出され、マイコプラズマ汚染が重度であれば周辺領域にも模様が認められる。細胞質のミトコンドリアも染色されることがあるが、マイコプラズマによる染色との識別はできるだろう。

ア 指示細胞培養法のバリデーション

Vero 細胞又は同等の能力を有する他の指示細胞を用い、100CFU 以下の菌数の適切な *M. hyorhinis* 及び *M. orale* の参照株を接種することによりこの検査法のバリデーションを行う。試験終了時に DNA 染色により染色されていた場合、これらの参照株は共に陽性である。

仮にウイルス培養上清のように、結果の判定が細胞変性効果の影響を受け

る場合、マイコプラズマに対する抑制作用を持たない特異抗血清を用いることによってウイルスを中和するか、又はウイルスが増殖できない別の細胞培養を用いることができる。血清が抑制作用を持たないことを示すには、中和作用がある抗血清が存在する状況で陽性対照試験を実施する。抗血清の効力判定は使用の都度実施するのではなく一度実施すればよい。

イ 試験法

- ① 指示細胞培養は、25cm²以上の細胞培養容器に、培養3日後に密生状態となるような濃度で（例：2×10⁴～2×10⁵個/mL、4×10³～2.5×10⁴個/cm²）播種する。指示細胞培養は、使用する前に抗生物質を用いずに継代培養されたものでなければならない。試験対象サンプルの1mLを細胞培養容器に接種し、35～38℃で培養する。
- ② 少なくとも3日間培養後、細胞が密生状態まで増殖したら、適当な容器に入れたカバーガラス上、又はこの試験方法に適した他の培養表面（チャンバースライド）上に継代培養する。第2継代培養では、培養後3～5日後に50%の密生度に達する程度の低密度で細胞を播種する。染色後のマイコプラズマの観察が困難になるため、完全な密生状態は避けなければならない。
- ③ カバーガラス又はチャンバースライドから培養液を取り除く。指示細胞の単層細胞をリン酸緩衝食塩液（PBS）で洗浄し、氷酢酸/メタノール液（1:3）又は他の適当な固定液を用いて固定する。
- ④ 固定液を取り除いて捨てる。固定液を滅菌水で洗浄し、もし1時間以上後に染色を行う場合は、スライドを完全に乾燥させる。
- ⑤ DNAと結合する適当な蛍光色素、例えば bisbenzimidazole 染色液（ヘキスト 33258, bisbenzimidazole, 5 μg/L）を加え、適切な時間染色する。
- ⑥ 染色液を取り除き、単層細胞を水で洗浄する。必要な場合には、カバーガラスをかぶせ、スライドガラスを蛍光顕微鏡により400倍又はそれ以上の倍率で検査する（bisbenzimidazole 染色を行った場合には、330nm/380nmの励起フィルター、LP440nmの遮光フィルターを用いる。）。
- ⑦ 試験培養の顕微鏡像と陰性対照及び参照株の顕微鏡像を比較し、核外蛍光を調べる。マイコプラズマは、指示細胞の細胞質を覆う微粒子状又は糸状の物質を産生する。また、マイコプラズマは細胞質においても微粒子状及び糸状の物質を産生することがある。複数の顕微鏡視野について（バリデーションで求められているとおり）検査を行わなければならない。

ウ 指示細胞培養法の判定

微粒子状又はフィラメント状の核外蛍光の形跡が認められなければ、試験対象製剤はマイコプラズマ汚染について陰性である。もし製剤が接種されたスライドに微粒子状又はフィラメント状の形跡つまりマイコプラズマを示す核外蛍光の形跡が認められた場合は、この試験及び試験対象製剤はマイコプラズマ汚染について陽性であると考えられる。陽性対照が参照菌に特有の核外蛍光を示さないか、又は陰性対照が核外蛍光を示す場合は、この試験は無効である。対照のいずれかが無効となった場合、試験を反復しなければならない。

3 付録

(1) 地域ごとの適切な液体培地及び寒天培地の組成

9 CFR マイコプラズマ液体培地

ハートインフュージョンブイヨン	62.5 g
プロテオースペプトン #3	25.0 g
酵母エキス	12.5 mL
1 % 酢酸タリウム	62.5 mL
1 % 塩化テトラゾリウム	13.75 mL
ペニシリン (100,000 単位/mL)	12.5 mL
加熱非働化馬血清	250 mL
水	2425 mL

全ての成分をよく混和し、10mol/L 水酸化ナトリウムにより pH を 7.9 に調整する。

0.2 μ フィルターでろ過滅菌して、滅菌済み試験容器に分注する。
使用前に DPN/L-システイン溶液を、培地 100mL 当たり 2mL 加える。

9 CFR マイコプラズマ寒天培地

ハートインフュージョン寒天	25 g
ハートインフュージョンブイヨン	10 g
プロテオースペプトン #3	10 g
1% 酢酸タリウム	25 mL
水	995 mL
加熱非働化馬血清	126 mL
酵母エキス	5 mL
ペニシリン (100,000 単位/mL)	5.2 mL
DPN/L-システイン	21 mL

ハートインフュージョン寒天及びハートインフュージョンブイヨン、プロテオースペプトン#3、酢酸タリウム及び水を混合し、沸騰するまで加熱後、冷却する。10mol/L 水酸化ナトリウムにより pH を 7.9 に調整する。121° C で 20 分間高圧滅菌する。その後、恒温槽で 56° C に冷却する。

無菌的に、馬血清、酵母エキス、ペニシリン及び DPN/L-システインを加える。
15×60 mm の滅菌シャーレに 12mL ずつを分注する。

DPN/L-システイン溶液

ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド(DPN, NAD)	5 g
水	総量 500 mL とする。

L-システイン	5 g
水	総量 500 mL とする。

各々の化学物質は別々に溶解する。
二つの溶液を混合し、ろ過滅菌する。

日本 マイコプラズマ用液体培地 基礎培地

1,000m L 中

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

0.22 μ m メンブランフィルターでろ過滅菌するか、121° C で 15 分間高压滅菌する。

滅菌後の培地の pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

基礎培地 77 mL に次の各成分を添加する。

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

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、添加物のうち高压滅菌可能なものは、高压滅菌してもよい。

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培地中の濃度が 0.02 w/v%となるように加えてもよい。

日本 マイコプラズマ用寒天培地

基礎培地	78 mL
寒天	1 g

121°C で 15 分間高压滅菌する。

添加物：

馬血清	10 mL
非働化豚血清	5 mL
25 w/v %新鮮酵母抽出液	5 mL
1 w/v % β -ニコチアミドアデニンヌクレオチド[酸化型]	1 mL
1 w/v %L-システイン塩酸塩試液	1 mL

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培地中の濃度が 0.02 w/v%となるように加えてもよい。

加温溶解した基礎/寒天培地に添加物を無菌的に加え、45 ~ 55 mm 滅菌シャーレに分注し、冷却し、凝固させる。

EP 推奨の ハイフリック培地 (マイコプラズマの一般的な検出用培地)

液体培地：

牛ハートインフュージョンブイヨン (注 1)	90 mL
馬血清(非加熱)	20 mL
酵母エキス (250 g/L)	10 mL
酢酸タリウム (10 g/L 溶液)	1 mL
フェノールレッド (0.6 g/L 溶液)	5 mL
ペニシリン (20,000 I.U. /mL)	0.25 mL
デオキシリボ核酸 (2 g/L 溶液)	1.2 mL

pH を 7.8 に調整する。

固体培地：

上記の液体培地と同様に作製し、牛ハートインフュージョンブイヨンの代わりに 15 g/L の寒天を含む牛ハートインフュージョン寒天を使用する。

EP 推奨のフライ培地 (*M. synoviae* 検出用培地)

液体培地：

牛ハートインフュージョンブイヨン (注 1)	90 mL
必須ビタミン (注 2)	0.025 mL
グルコース-水和物 (500 g/L 溶液)	2 mL
豚血清 (56°C、30 分間で非働化)	12 mL
β -ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド(10 g/L 溶液)	1 mL
塩酸システイン (10 g/L 溶液)	1 mL
フェノールレッド (0.6 g/L 溶液)	5 mL
ペニシリン (20,000 I.U. /mL)	0.25 mL

β -ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチドと塩酸システインの溶液を混合し、10 分後、他の添加物を追加する。pH を 7.8 に調整する。

固体培地：

牛ハートインフュージョンブイヨン (注 1)	90 mL
イオン寒天 (注 3)	1.4 g

pH を 7.8 に調整し、高圧滅菌後、以下を添加する。

必須ビタミン (注 2)	0.025 mL
グルコース-水和物(500 g/L 溶液)	2 mL
豚血清(非加熱)	12 mL
β -ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド(10g/L 溶液)	1 mL
塩酸システイン (10 g/L 溶液)	1 mL
フェノールレッド (0.6 g/L 溶液)	5 mL
ペニシリン (20,000 I.U. /mL)	0.25 mL

EP 推奨のフリース培地 (非鳥類由来マイコプラズマ検出用培地)

液体培地：

ハンクス氏液 (改良) (注 4)	800 mL
水	67 mL
ブレインハートインフュージョン(注 5)	135 mL

PPLO 培養液	248 mL
酵母エキス (170 g/L)	60 mL
バシトラシン	250 mg
メチシリン	250 mg
フェノールレッド(5 g/L)	4.5 mL
馬血清	165 mL
豚血清	165 mL

pH を 7.40 ~ 7.45 に調整する。

固体培地：

ハンクス氏液 (改良) (注 4)	200 mL
DEAE-デキストラン	200 mg
イオン寒天(3)	15.65 g

よく混和し、高压滅菌した後、100° C に冷却し、上記の液体培地 1740 mL に添加する。

EP 培地付記

(注 1) 牛ハートインフュージョンブイヨン

牛心臓 (インフュージョン作製用)	500 g
ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	5 g
水	総量 1000 mL とする

高压滅菌する。

(注 2) 必須ビタミン

ビオチン	100 mg
パントテン酸カルシウム	100 mg
塩化コリン	100 mg
葉酸	100 mg
i-イノシトール	200 mg
ニコチンアミド	100 mg
塩酸ピリドキサーール	100 mg
リボフラビン	10 mg
塩酸チアミン	100 mg
水	総量 1000 mL とする

(注 3) イオン寒天

純度、透明度、ゲル強度に優れた製品を作製するイオン交換法により準備された、微生物学及び免疫学分野において使用する高度に精製された寒天である。

本品が含む成分はおよそ、以下のとおり：

水	12.2 %
灰	1.5 %

酸に不溶性の灰	0.2 %
塩素	0.0 %
リン酸 (P ₂ O ₅ として)	0.3 %
総チッ素	0.3 %
銅	8 ppm
鉄	170 ppm
カルシウム	0.28 %
マグネシウム	0.32 %

(注 4) ハンクス氏液 (改良)

塩化ナトリウム	6.4 g
塩酸カリウム	0.32 g
硫酸マグネシウム・7水和物	0.08 g
塩化マグネシウム・6水和物	0.08 g
無水塩化カルシウム	0.112 g
リン酸二水素ナトリウム・2水和物	0.0596 g
無水リン酸カリウム	0.048 g
水	総量 800 mL とする

(注 5) ブレインハートインフュージョン

子牛ブレインインフュージョン	200 g
牛ハートインフュージョン	250 g
プロテオースペプトン	10 g
グルコース	2 g
塩化ナトリウム	5 g
無水リン酸水素二ナトリウム	2.5 g
水	総量 1000 mL とする

(注 6) PPLO ブイヨン

牛ハートインフュージョン	50 g
ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	5 g
水	総量 1000 mL とする

DNA 染色用 Bisbenzimidazole 染色液

ヘキスト 33258 (bisbenzimidazole), 緩衝水溶液 1 リットル中 5 μg を含む。

注意：本溶液は遮光すること。

(2) マイコプラズマ参照株

試験施設間又は地域間の試験法の標準化は、地域内又は地域間で共通の参照株を用いることにより強化されるだろう。ただし、現在は、凍結乾燥した参照バッチの安定的な作製が困難であること及び凍結参照株の輸送の問題により、非現実的であることが示されている。それゆえ、各地域又は試験施設では、それぞれ自前の参照株が、継代数が少なく (15 回以下)、培養分離株の型との比較で同定され、安定で、本ガイドラインの内容に応じて、使用するのにおよそ適切とバリデートされた場合、自前の参照株を用いてもよい。国

実際的な承認のためには、EDQM 参照株（後述）との比較を、検出限界のバリデーションの中にも含めることを強く勧告する。各地域又は試験施設は、それぞれのバリデートされた参照株を作製してもよいし、あるいは以下に示すように EDQM によって作製され、ほぼバリデートされた参照株が、通常利用可能であるので、それを入手してもよい。

本ガイドラインの2の(2)にリストされた5株のマイコプラズマは、欧州連合の研究所が分離し、欧州薬局方委員会 (the European Department of the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM)) に提供された。EDQM は、本 VICH マイコプラズマ・ワーキンググループの3地域（日本、EU 及び米国）の規制当局の試験施設へ配布するのに十分な量のこれらの凍結参照株を作製し、地域内の EU バリデーション/安定性試験を実施した (C. Milne, A. Daas. Establishment of European Pharmacopoeia Mycoplasma Reference Strains. *Pharmeuropa Bio* 2006(1):57-72)。更なるバリデーション試験が、日本、アメリカ合衆国及びカナダの規制当局及び企業により完了し、それらの株が本ガイドラインの現状に照らして、非常に適切であることが確認された (VICH Collaborative Study on the Ph. Eur. Mycoplasma Reference Strains: EDQM Report Compiling and Analyzing the Data Set for the VICH Collaborative Study on the European Pharmacopoeia Mycoplasma Reference Strains, EDQM Administrator Representative, C. Milne, 2010.)。生物学的製剤検査法作業部会 (BQMEWG) は、これらの素晴らしい参照株を作製し、バリデートした EDQM のスタッフの労力と根気強さを高く賞賛する。

DNA 染色のバリデーションについては、次の株も有用となるかもしれない。

M. hyorhinis -- ATCC 29052

M. orale -- ATCC 23714

(3) 用語解説

動物由来の出発材料のバッチ (ロット、シリアル) (Batch (lot, serial) of starting material of animal origin)

固有の連続番号によって識別された均一な材料 (例えば細胞、血清) の総量。

セルシードシステム (Cell-seed system)

同一のマスターセルシード由来の細胞で培養することによってある製品の最終ロット (バッチ) が製造されるシステム。ワーキングセルシードを作製するためにマスターセルシードから分注された多数の容器が用いられる。

細胞株 (Cell lines)

原材料から10代以上の継代を行った細胞培養で、*in vitro* での高い増殖能力をもつもの。

最終製品、バッチ、ロット又はシリアル (Final product, batch, lot, or serial)

密閉された最終容器又はその他の最終用量単位の集まりで、均一であり、最終製剤の分注又は調製間の汚染リスクに関して同等であることが期待されるもの。用量単位は同一の最終バルクワクチンから分注されるか、もしそうでなければ調製され、同時に凍結乾燥され (該当する場合には)、一連の作業行程の間に密閉されたものである。それぞれ最終ロット (バッチ、シリアル) を示す固有の番号又はコードが表示される。最終バルクワクチンの分注と凍結乾燥の両方又はいずれか一方が幾つかの別々の工程で行われる場合、1組の関連がある最終ロット (バッチ、シ

リアル) が作られることになり、それらは固有の番号又はコードの一部に共通部分を用いることによって識別されることが通例である。これらの関連する最終ロット (バッチ、シリアル) はサブバッチ、サブシリアル、サブロット又は充填ロットと呼ばれることもある。マイコプラズマ試験の実施に関しては1つのサブバッチはそのバッチ全体を代表するものとみなしてよい。

ハーベスト (Harvests)

同一のワーキングシードのロットを接種された単一の製造用培養から1回以上の回数採取された材料 (単一ハーベスト)、又は、混合された材料で微生物若しくは抗原の単一の株若しくは型を含んだもので、同時に処理が行なわれる多数の卵、細胞培養容器等から得られたもの (一価の混合されたハーベスト)。

マスターセルシード (ストック) (Master cell seed (stock))

製剤の調製に用いられる単一継代レベルの細胞 (初代培養又は細胞株) の小分けの一まとまりで、1回限りの操作で容器に分注され、均一性と安定性を確実にし汚染を防ぐように同時に処理と保存が行われる。マスターセルシードは通常 -70°C 又はそれ以下の温度で保存される。

マスターシード (Master seed)

目的とする動物用生物学的製剤の全てのバッチの製造に用いられる単一継代レベルの微生物の培養が密閉された容器の集まりで、均一性と安定性を確実にし汚染を防ぐように1回限りの操作で単一のバルクから容器への分注と処理が同時に行われる。

微好気条件 (Microaerophilic condition)

5 ~ 10%の二酸化炭素と寒天プレートの乾燥を防ぐのに十分な湿度を含む窒素ガスの環境。

継代 (Passage)

該当する細胞又は微生物に通常用いられる培養期間によって細胞又は微生物が1回植え継がれること。

初代培養細胞の培養 (Primary cell cultures)

採取された動物の組織に存在している状態から基本的に変化がない細胞の培養で、動物組織から最初に調製されたときから試験レベル時まで *in vitro* での継代が10回以下しか行われていないもの。最初の *in vitro* での培養は第1代とみなされる。

シードロットシステム (Seed-lot system)

ある製品の連続したバッチが同一のマスターシードウイルスから得られるシステム。ルーチンの製造のために、マスターシードウイルスからワーキングシードウイルスを作製することができる。

ワーキングセルシード (ストック) (Working cell seed (stock))

マスターセルシード由来の細胞の小分けの一まとまりで、継代レベルで製造用細胞培養の調製に用いられる。ワーキングセルシードは容器に分注され、マスターセルシードの項の記述と同様に処理及び保存される。

プロダクションセルシードを含む。

ワーキング参照株 (Working References)

試験を実施する施設で対照株として用いるために本文書で規定された参照株としての要件を満たすようにマイコプラズマの参照株を継代して作製されたもの。

ワーキングシード (Working seed)

マスターシードウイルス由来の微生物の小分けの一まとまりで、製品の製造に用いられる継代レベルのもの。ワーキングシードウイルスは容器に分注され、マスターシードウイルスの項の記述と同様に保存される。プロダクションシードを含む。

5-4 動物用不活化ワクチンの対象動物バッチ安全試験省略要件 (VICH GL50)

1 序言

VICH の参加地域における免疫学的な動物用医薬品 (IVMP) のバッチ販売のためには、対象動物又は実験動物を用いたバッチ安全試験データの提出が必要とされている。VICH 運営委員会は、異なる国の規制当局に対し個々に試験を実施する必要性を最小限にするために、地域全体のバッチ安全試験の統一化を目指すことを決定している。しかし、地域間の要求事項に大きな相違があるため、第一段階として、安全試験が要求される地域の不活化ワクチンに対する対象動物バッチ安全試験 (TABST) を省略するために要求される資料の基準を統一化するという段階的取組を採用するとの結論を下した。

このガイドラインは、VICH の原則の下で作成され、TABST の省略を受け入れる政府規制当局のために統一基準を提示する。地域限定の流通製品に対して類似の取組をするためには、この VICH ガイドラインの使用が強く奨励されるが、あくまで地域の規制当局の判断による。さらに、代替法を実施する科学的に正当な理由があるときは、このガイドラインに必ずしも従う必要はない。

世界的に TABST を省略することで、通常バッチ販売のために供試される動物数が減少するため、奨励されるべきである。

(1) ガイドラインの目的

このガイドラインの目的は、安全試験が要求される地域の不活化 IVMP の TABST を省略するために要求される資料の基準に対して国際的に協調した勧告を与えることである。

ア 背景

実験動物及び/又は対象動物を用いる最終製品に対する大半のバッチ安全試験は、一般安全試験として考えることができる。これは幅広い IVMP のグループに適用され、製品が対象動物に対して安全であるという一定の保証を与える。すなわち「異常な局所又は全身性反応」(欧州薬局方)、「生物学的製剤に起因する好ましくない反応」(9CFR (米国))又は「異常な変化がないこと」(動物用生物学的製剤基準 (日本))を検出する。

この 20 年にわたって、バッチ安全試験の妥当性は、規制当局及びワクチン製造業者によって疑問視されている (Sheffield and Knight, 1986 年 ; van der Kamp, 1994 年 ; Roberts and Licken, 1996 年 ; Zeegers ら, 1997 年 ; Pastoret ら, 1997 年 ; Cussler, 1999 年 ; Cussler ら, 2000 年 ; AGAATI, 2002 年 ; Cooper, 2008 年)。特に、GMP 及び GLP (OECD, 1998 年)、又はワクチン製造に関する地域の要求に適合した同様の品質保証システムの導入が、バッチ製造の一貫性を非常に高め、それによって、これらの安全性と品質を非常に向上させている。また、これは IVMP に対する (主に *in vivo* 試験に基づく) 従来のバッチ管理から、主に *in vitro* 技術に基づく製造の一貫性に重点を置く方向へと、品質管理に対する考え方に影響を与えている (Lucken, 2000 年 ; Hendriksen ら, 2008 年 ; de Mattia ら, 2011)。

異なる VICH 地域において要求される資料及び第 21 回 VICH 運営委員会

におけるコメントを調査したところ、バッチ安全試験に対する取組方及び結果として要求される試験手順が地域間で著しく異なることが明らかになった。このことで、試験の要求事項及び試験性能の統一化が困難かつ時間を要する仕事となる。

したがって、地域全体の対象動物バッチ安全試験を省略するための基準統一化のための第一段階として、不活化 IVMP の VICH ガイドラインの作成を開始することが決定された。

2 ガイドライン

(1) 範囲

このガイドラインは、不活化 IVMP の TABST を省略するために要求される事項に関する基準に限定される。

(2) 地域の要求事項

ア 一般バッチ安全試験

現在、以下の試験手順(表 1)がこのガイドラインで対象となる不活化 IVMP のバッチ安全試験のために要求されている。

表 1:

VICH 地域	要求事項	備考
<p>ヨーロッパ： 2013年3月31日まで - 欧州薬局方:通則 5.2.9.章 動物用ワクチン及び免疫血清 のバッチの安全性 - 動物用ワクチンに関する一 般モノグラフ (0062) 及び各 条モノグラフ 2013年4月1日から 対象動物バッチ安全試験は削 除される。</p>	<p>対象動物種(2頭の哺乳動物、 10匹の魚類、10羽の鳥類)、2 倍量、推奨される投与経路、最 低14日間の観察</p>	<p>別々の最終バルクからの少なく とも10の連続バッチが試験さ れ、製品が試験に適合するなら ば、省略することができる。</p> <p>-欧州薬局方：通則 -動物用ワクチンに関する一般 モノグラフ(0062)に附則が追 加される。 附則：個別な状況(例えば製造 工程の変更、野外における想定 外の副作用発生の報告があった 場合あるいは申請時と同等のデ ータが得られない場合など)に は、当局との合意の上又は当局 の要求により安全試験を特別に 実施する必要がある。</p>
<p>米国： - 9CFR - 不活化細菌ワクチ</p>	<p>マウス(113.33)</p>	

<p>ンに関する一般要求事項 (113.100)</p>	<p>又は</p> <ul style="list-style-type: none"> - マウスに本質的に致命的である場合はモルモット (113.38) - 家禽ワクチンである場合は家禽 - 魚類ワクチン又は他の水生種である場合は魚類 - 爬虫類ワクチンである場合は爬虫類 <p>113.38 - 2匹のモルモット、2mL 筋肉内又は皮下接種、7日間の観察</p>	
<p>不活化ウイルスワクチンに関する一般 要求事項(113.200)</p>	<p>モルモット(113.38) マウス(113.33)</p> <p>113.38 - 2匹のモルモット、2mL 筋肉内又は皮下接種、7日間の観察</p> <p>113.33a - 8匹のマウス、0.03mL 脳内接種、7日間の観察；8匹のマウス、0.5mL 腹腔内接種、7日間の観察</p>	<p>家禽ワクチンに関しては適用されない。</p>
<p>日本： 動物用生物学的製剤基準</p>	<p>a) 対象動物</p> <p>哺乳動物：2～4頭の動物、1～5倍量、承認された投与経路、10～14日間の観察</p> <p>鳥類：10羽、1倍量、承認された投与経路、2～5週間の観察</p> <p>魚類：15～120尾、1倍量、承認された投与経路、2～3週間の観察</p> <p>b) 異常毒性否定試験</p> <p>モルモット：2匹、5mL 腹腔内接種、7日間観察</p> <p>マウス：10匹、0.5mL 腹腔内接種、7～10日間の観察</p> <p>c) 毒性限度確認試験</p> <p>マウス：10匹、0.5mL 腹腔内</p>	

	接種、7日間観察 モルモット：5匹、5mL 腹腔 内接種、7日間観察	
--	--	--

イ その他の関連した要求事項

① 品質システム

GMP 及び同様の品質システムは、動物用医薬品を含む医薬品の製造と検査を管理するために VICH に参加する国・地域で確立されている。これらの品質システムは、市販される製品が一貫した適切な方法で製造されていることを保証する。

② 医薬品安全性監視

VICH の中で獣医学分野における医薬品安全性監視(医薬品の市販後調査)並びに要求事項及び方法の統一化を徐々に進めている。これは、野外における低品質ワクチンに関連する安全性に関わる問題の早期の発見につながる。したがって、医薬品安全性監視は、製剤の TABST で常に得られるとは限らない安全性について、特別の情報を提供する。

(3) 対象動物バッチ安全試験の省略のための要求資料

ア 緒言

TABST は、十分な数の連続したバッチが生産され、試験への適合が明らかにされ、製造工程の一貫性が実証された場合、規制当局により免除されることができる。

一般的には、追加の補助試験を必要とすることなく、通常のパッチ品質管理及び医薬品安全性監視データから入手できる既存の情報を評価することで十分である。TABST の省略を申請する製造業者が添付すべきデータを以下に示す。しかし、これを完全なリストとして捉えるべきでない。全ての場合、TABST を省略するための申請は、製剤の安全性が維持されていることを保証する全てのデータの要約とその結論が添付されるべきである。

例外的なケースとして、製造工程の重要な変更は、製品の安全性分析の一貫性を再構築するために、TABST の再実施が要求されるかもしれない。TABST の実施により避けることができていた、予期されていなかった副作用の発生やその他の医薬品安全性監視上の問題が発生した場合は、TABST の再実施となるかもしれない。安全性の点で危険性を内在する製剤は、各バッチでの TABST を実施し続ける必要があるかもしれない。

① 製品及びその製造の特徴

製造業者は、製品が品質原則に従って製造されること、すなわち製品が一貫した適切な方法で製造されていることを実証しなければならない。

in vivo バッチ試験が安全試験以外(例えば、力価試験)のために対象動物を用いて実施される状況であって、それらの試験が安全性情報(例えば、死亡率)の収集を含むものである場合には、製造業者が対象動物種におけるワクチンの安全性の追加データを得るためにこれらの試験を使用するこ

とが推奨される。

② 現行のバッチ安全試験に関して入手できる情報

製造業者は、安全性と一貫した製造が確立されていることを実証するため、十分な数のバッチの実施記録を提出すべきである。当該製剤の利用できる情報から規制当局が偏見を持たずに判断するには、多くの製剤で 10 の連続したバッチの試験資料で十分であるように思われる。製造業者は、TABST の成績で観察された局所及び全身反応の変動性、並びにこれら反応の性質を、製品の登録又は承認申請時に提出された開発試験で観察されたものと関連させて精査すべきである。製造業者は、所見のまとめとその考察を準備すべきである。

TABST の実施は、試験が実施された時点での地域の要求事項に従うべきである。合意された数の連続バッチが試験された期間に、TABST に不適合であるいずれのバッチも詳細に検査すべきである。この情報は、不適合の理由についての説明とともに、規制当局に提出すべきである。

③ 医薬品安全性監視データ

VICH ガイドラインに従った医薬品安全性監視システムは、利用できる地域においては、当該データが提出されるバッチが販売されていた期間中、機能していることが必要である。

医薬品安全性監視及び TABST からの安全性情報は、根本的に異なる性質のものであるが、互いに補完的である。

野外におけるワクチンの一貫した安全性能を実証するために利用可能な医薬品安全性監視データは、当該期間の最新の定期的安全性報告に従って提出されなければならない。

イ TABST を省略するための手順

報告は、製品の安全性の一貫性を総合的に評価したものであって、製造したバッチ数、製品の販売年数、販売数量、対象動物種での全ての副反応の頻度及び重大性、並びにこれら現象を説明しうる原因の調査が含まれるべきである。

3 用語集

GLP (Good Laboratory Practices)

非臨床試験のデザイン、実施、モニタリング、記録、監査、解析及び報告の基準。この基準を遵守することで、データ及び報告された結果が完全で、正しくかつ正確であり、試験動物の福祉と試験に関わる試験担当者の安全性が確保され、環境並びに人間及び動物のフードチェーンが保護されることが保証される (OECD, 1998)。

GMP (Good Manufacturing Practices)

動物用医薬品を含む医薬品の製造と試験を含む品質システムの一部である。GMP は、医薬品の生産中の生産プロセス及び生産の環境の質を保証する、製品の品質に影響する製造及び試験について概略した指針である。

免疫学的な動物用医薬品 (IVMP, Immunological veterinary medicinal product)

動物に投与して、能動又は受動免疫を惹起させるか、免疫の状態を診断するための全ての動物用医薬品。

生産バッチ (Production Batch)

均一であると予期し得る 1 回のプロセス又は連続したプロセスで加工された出発材料、包装資材又は製品の規定量。

注記 特定の製造段階を完了するために、バッチを多くのサブバッチに分割することが必要となり得るが、これらは最終的に均一なバッチにするために後でまとめられる。連続製造の場合、バッチは、意図した均一性により特徴付けられる、生産の規定された画分と一致していなければならない。

TABST (Target Animal Batch Safety Test)

対象動物バッチ安全試験；全ての IVMP 又は製品群(例えば、不活化ウイルスワクチン)に対するルーチンの最終製品バッチ試験として実施される対象動物における安全試験。

対象動物 (Target Animal)

IVMP の使用が意図される動物である特定の動物種、クラス及び品種。

4 参考文献

- AGAATI (2002) The Target Animal Safety Test - Is it Still Relevant? *Biologicals* 30, 277-287
- Cooper J (2008). Batch safety testing of veterinary vaccines - potential welfare implications of injection volumes. *ATLA* 36, 685-694
- Cussler (1999) A 4R concept for the safety testing of immunobiologicals. *Dev. Biol. Standard.* 101, 121-126
- Cussler K, van der Kamp MDO & Possnecker A (2000) Evaluation of the relevance of the target animal safety test. In: *Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation*, pp. 809-816. Eds M Balls, A-M van Zeller and ME Halder. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V.
- De Mattia et al (2011). The consistency approach for quality control of vaccines e A strategy to improve quality control and implement 3Rs. *Biologicals* 39, 59-65.
- Hendriksen C.F.M. et al. (2008). The consistency approach for the quality control of vaccines. *Biologicals* 36, 73-77
- Lucken R (2000). Eliminating vaccine testing in animals - more action, less talk. *Developments in Animal and Veterinary Sciences* 31, 941-944
- OECD (1998). Document ENV/MC/CHEM(98)17: Principles on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring
http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html
- Pastoret PP, Blancou J, Vannier P, Verschuereen C. (1997) *Veterinary Vaccinology*. Amsterdam, Elsevier Science B.V.
- Roberts B, Lucken RN (1996). Reducing the use of the target animal batch safety test for veterinary vaccines. In: Brown F, Cussler K, Hendriksen C (eds) *Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of*

- biological products. Basel, S. Karger, AG, pp. 97-102.
- Sheffield FW, Knight PA (1986). Round table discussion on abnormal toxicity and safety tests. *Dev. Biol. Standard.* 64, 309
- Van der Kamp M. (1994). Ways of replacing, reducing and refining the use of animals in the quality control of veterinary vaccines. Institute of Animal Science and Health, Lelystad.
- Zeegers JJW, de Vries WF, Remie R. (1997) Reducing the use of animals by abolishment of the safety test as routine batch control test on veterinary vaccines. In: Van Zutphen LFM, Balls M (eds) *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Amsterdam, Elsevier Science B.V., pp. 1003-1005.

