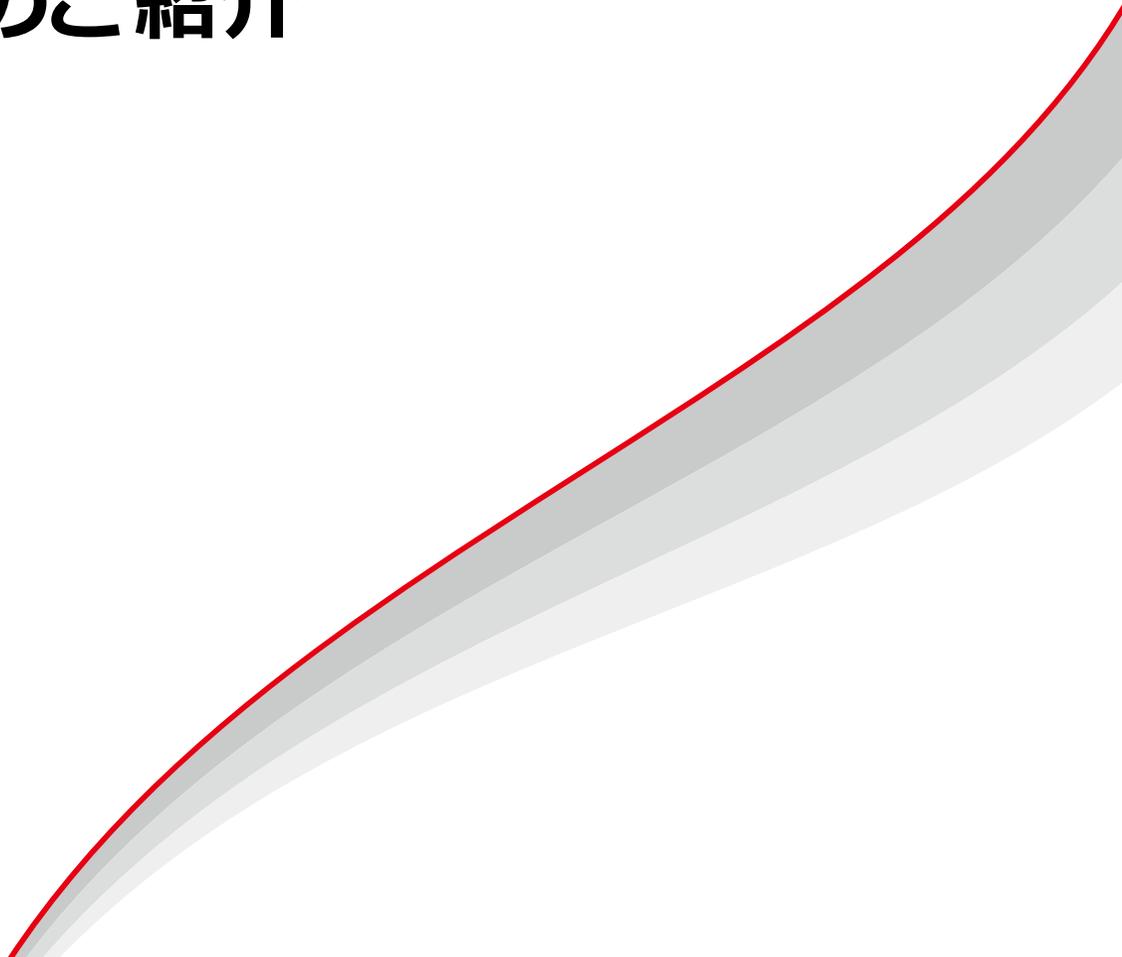


# 新製品 NATによる無菌試験試薬のご紹介

2023年10月25日

島津ダイアグノスティクス株式会社

製品開発部

A decorative graphic element consisting of a thick, curved line that starts from the bottom left and curves upwards and to the right, ending at the top right. The line is composed of a solid red outer edge and a lighter gray inner fill.

- **無菌試験試薬**  
製品概要、性能

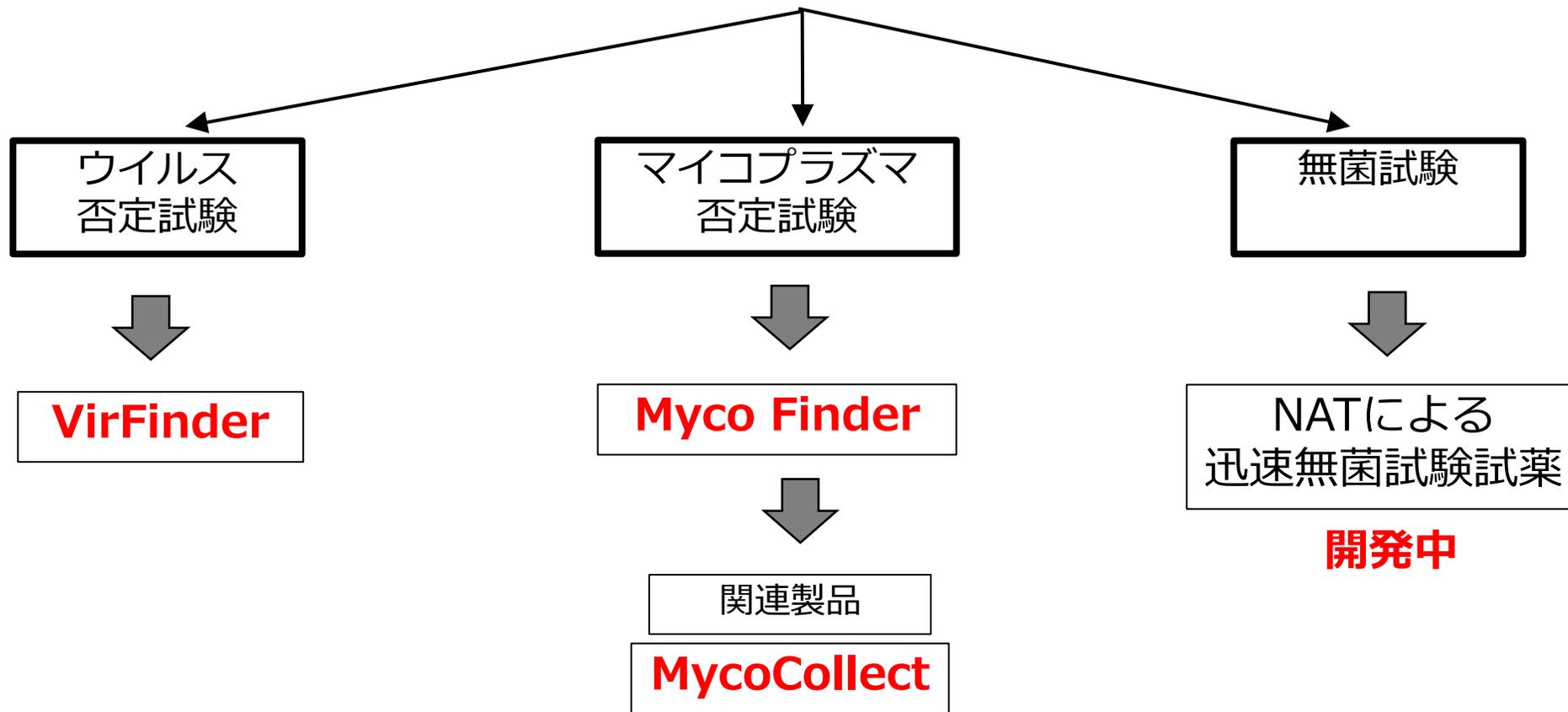
- **無菌試験試薬を利用した試験系**  
迅速試験系・高感度試験系

- **迅速無菌試験試薬**  
製品概要、性能

- **迅速無菌試験試薬を利用した試験系**  
迅速試験系・高感度試験系

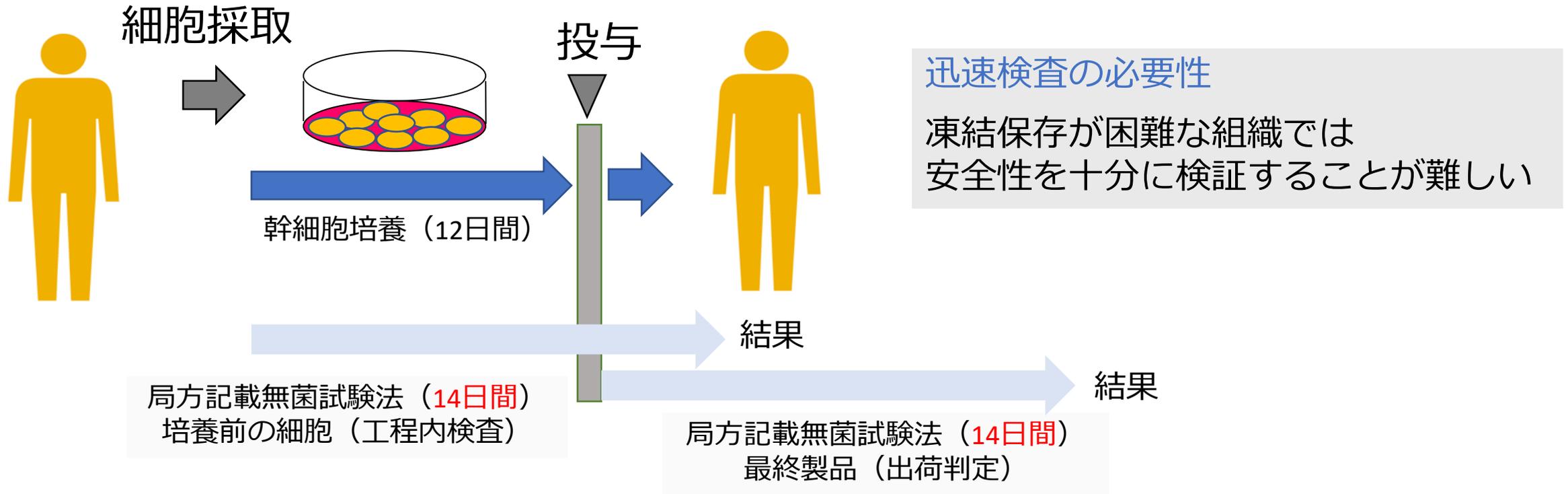
# 当社の安全性試験用試薬の展開

## 再生医療における安全性試験



安全性試験に対応する試薬のラインナップを各種取り揃えている

# 再生医療における無菌試験の課題



生きた細胞は**早期の投与**が望ましく、局方記載無菌試験法（培養法）では判定が間に合わない  
⇒ **迅速無菌試験法の導入が必要**

# 微生物迅速試験法における国内の動向

## 再生医療等安全性確保法の考え方（日本再生医療学会）

無菌試験はJPの無菌試験法（培養法）を基本とするが、検体量の限界や試験に要する時間等の制限から**必ずしも培養法を適用できない**場合が考えられる。その場合は**科学的に合理的な試験方法を採用することが可能**。

より迅速な無菌試験の実施のため  
様々な代替法が検討されている

核酸増幅法

PCR法など

フローサイトメトリー

マイクロコロニー法

質量分析法

生物発光・蛍光法

・  
・  
・

従来法（直接法）  
では**14日間かかる**

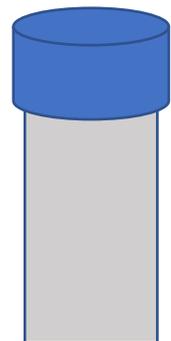
生菌の有無を  
より迅速に確認したい



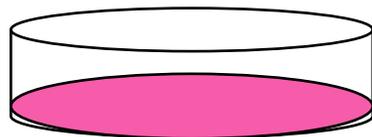
欧州薬局方でも**微生物迅速試験法**について記載されるようになった。

# 当社が開発した無菌試験試薬

## 検体

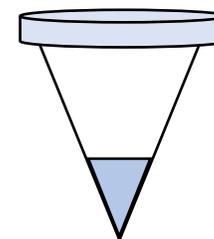


細胞懸濁液、細胞培養液など  
(細胞を含む)



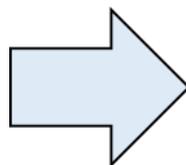
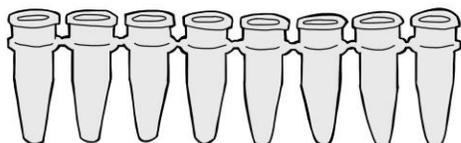
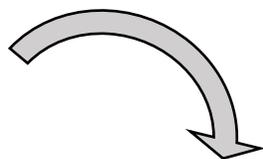
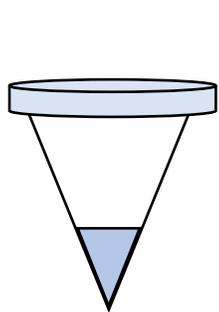
前処理

核酸抽出液



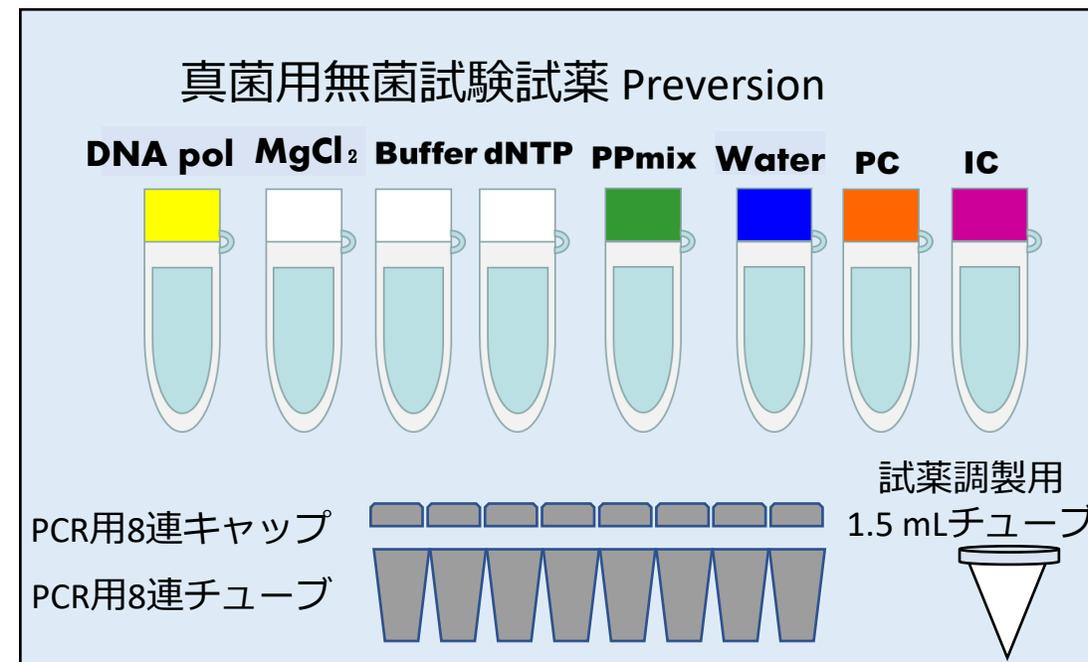
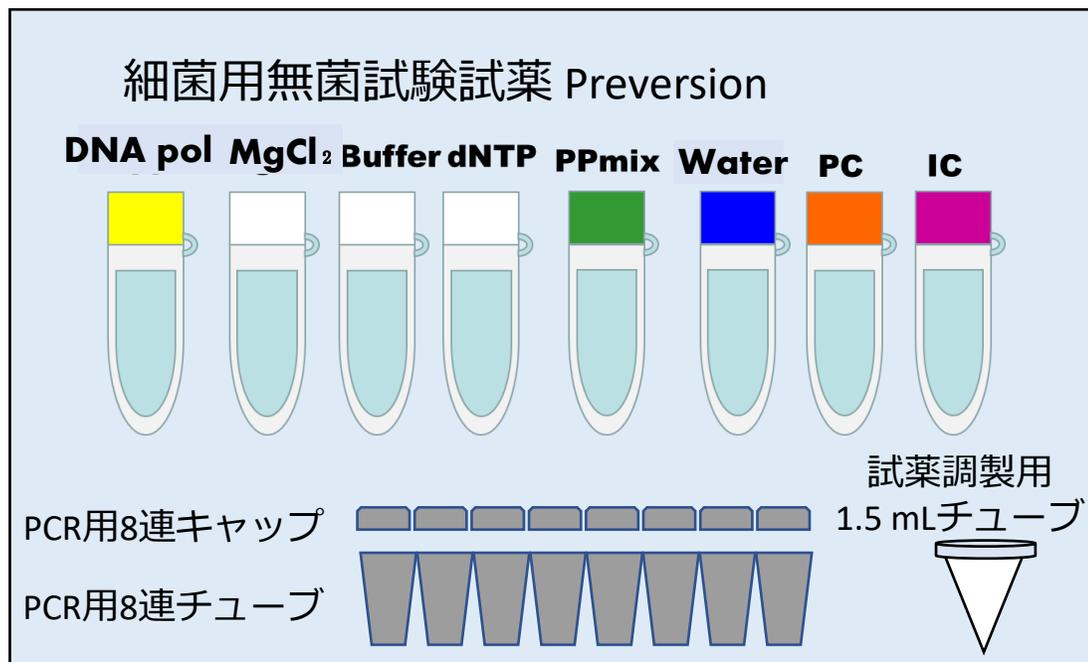
前処理を施し  
核酸抽出液の状態にする

核酸抽出液 + PCR試薬 (当社製)



リアルタイムPCRにて  
菌の核酸を検出

# 無菌試験試薬の製品概要



- ◆ 容量：細菌PCR試薬：50回分、真菌PCR試薬：50回分  
1.5mLチューブと8連チューブは50回分以上同封している
- ◆ Internal Control DNA (IC) を導入  
核酸抽出の成否やPCR阻害をモニタリングできる試薬

資材からのコンタミネーションを防ぐため、PCR試薬調製および反応用のチューブをキットに同封している

# 無菌試験試薬の性能一覧

性能	
検体の種類	1.0×10 <sup>6</sup> cellsまでの細胞を含む検体
検出感度	100 CFU/検体
検出時間	約 4 時間
試験環境	無菌操作が可能な環境で実施

迅速にサンプル中の菌由来核酸の検出が可能

➤ 無菌試験試薬  
製品概要、性能

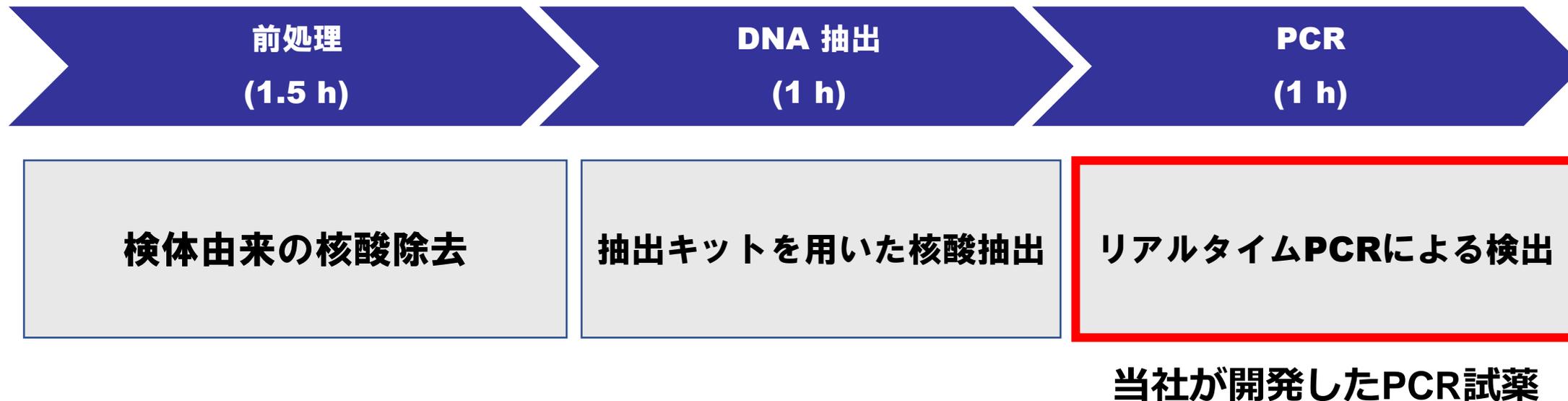
➤ 無菌試験試薬を利用した試験系  
迅速試験系・高感度試験系

# 迅速無菌試験試薬を利用した各試験系の概要

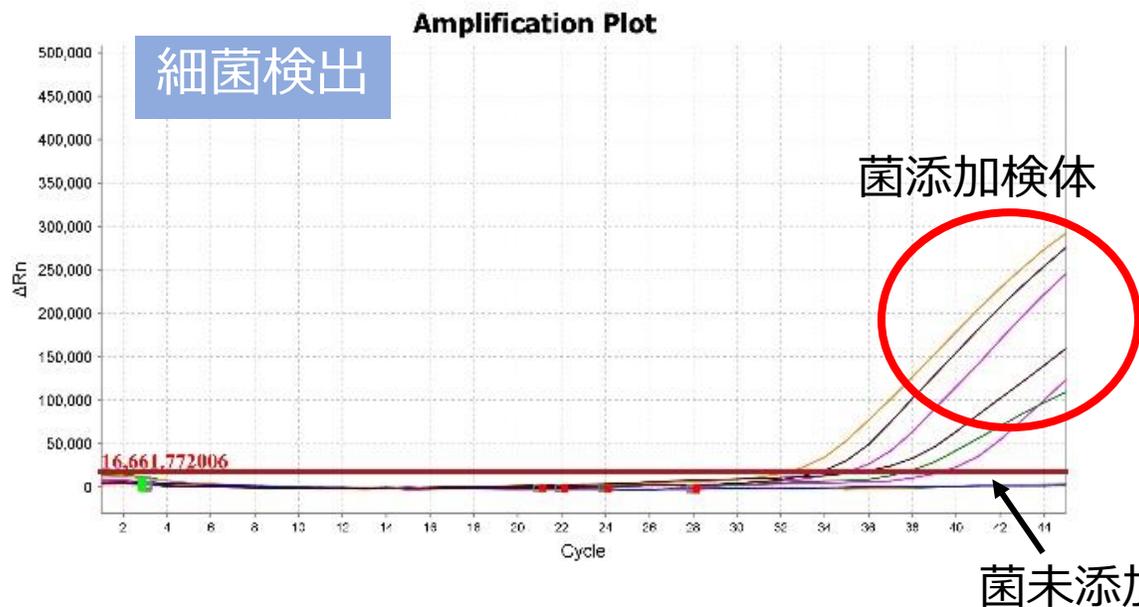
現在開発している迅速無菌試験法は2タイプあり、それぞれに特徴がある。

	迅速試験系	高感度試験系
方法 (測定目的)	前処理 & 核酸抽出	前培養
	リアルタイム PCR	前処理 & 核酸抽出
	検体中の <b>微生物核酸の有無</b> を見る	リアルタイム PCR
判定方法	Cq値	増殖による <b>微生物核酸量の変化</b> を見る 培養前後のCq値の差 ( $\Delta Cq$ )
試験時間	~4h (試験当日に判定)	一定時間の培養 + 4 h (PCR)
検出感度	100 CFU/Sample	1 CFU (<10 CFU)/Sample
メリット	試験当日に結果が得られる	検体や環境由来の偽陽性が発生しにくい 死菌の影響を受けない
デメリット	検体や環境由来の核酸で偽陽性が発生しやすい 死菌を検出する可能性がある	前培養があるため試験当日に結果が出ない

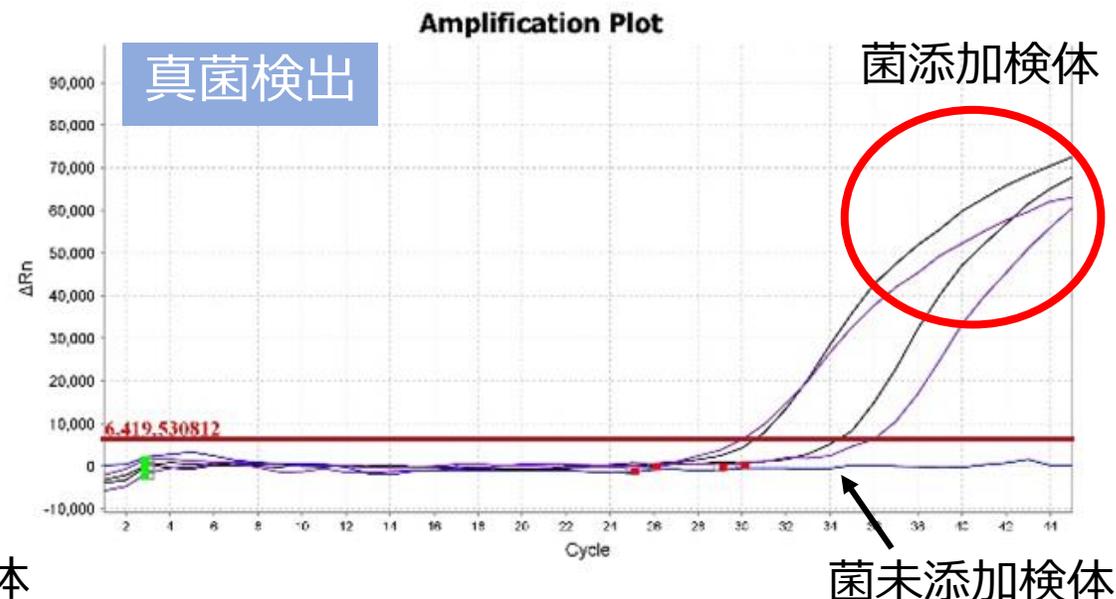
# 迅速試験系の概要



# 迅速試験系の検出データ例



菌種	Cq	
	10 CFU	100 CFU
<i>B. subtilis</i>	35.4	33.7
<i>C. sporogenes</i>	Undetermined	32.3
<i>P. aeruginosa</i>	Undetermined	37.6
<i>S. aureus</i>	39.3	34.9



菌種	Cq	
	10 CFU	100 CFU
<i>A. brasiliensis</i>	35.9	30.0
<i>C. albicans</i>	34.4	30.6

菌を含む検体ではCq curveの検出がみられた

# 迅速試験系の性能評価データ

日本薬局方収載の6菌種における性能評価結果を示す

菌種	第20回再生医療学会報告	
	10 CFU/検体	100 CFU/検体
<i>B. subtilis</i>	1/2	2/2
<i>C. sporogenes</i>	1/2	2/2
<i>P. aeruginosa</i>	1/2	2/2
<i>S. aureus</i>	1/2	2/2
<i>A. brasiliensis</i>	2/2	2/2
<i>C. albicans</i>	2/2	2/2

## 【試験条件】

### ○サンプル

ヒト由来細胞  $1.0 \times 10^6$  cells + 菌希釈液 1 mL

### ○供試菌種

日本薬局方収載の6菌種

### ○判定

C<sub>q</sub>値の検出あり：陽性

C<sub>q</sub>値の検出なし：陰性

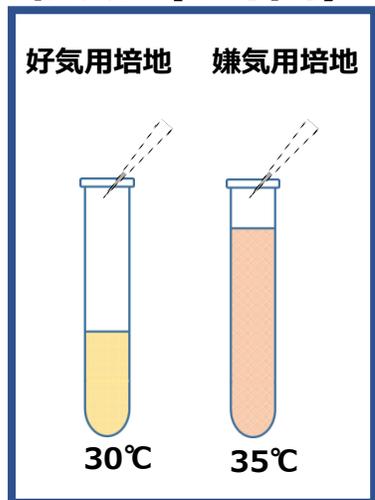
※全試験サンプルのうち陽性判定であったサンプル数を示す

**細胞を含む検体から安定して100 CFUの検出が可能であることを確認した**

# 高感度試験系の概要

本プロトコールは検討中の内容です

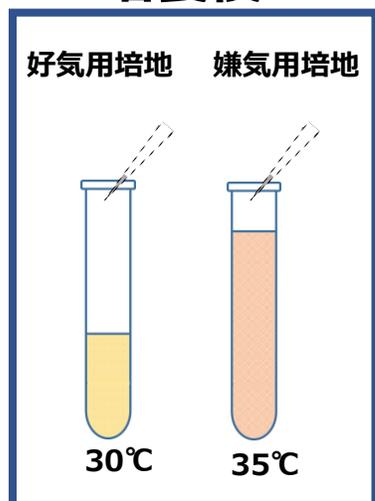
## 初期 (0時間)



サンプル調製・測定



## 培養後



一定時間培養



サンプル調製・測定



以下の菌種で <10 CFU検体の性能を確認済

菌種	ATCC No.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 14452
<i>Cutibacterium acnes</i>	ATCC 11827
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 11437
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
<i>Penicillium rubens</i>	ATCC 9783

# 迅速無菌試験試薬のまとめ



**迅速試験系** : 検体中の微生物核酸の有無を検出 試験当日に判定可能

**高感度試験系** : 培養前後の微生物核酸量の変化を検出 <10 CFUの高感度な系