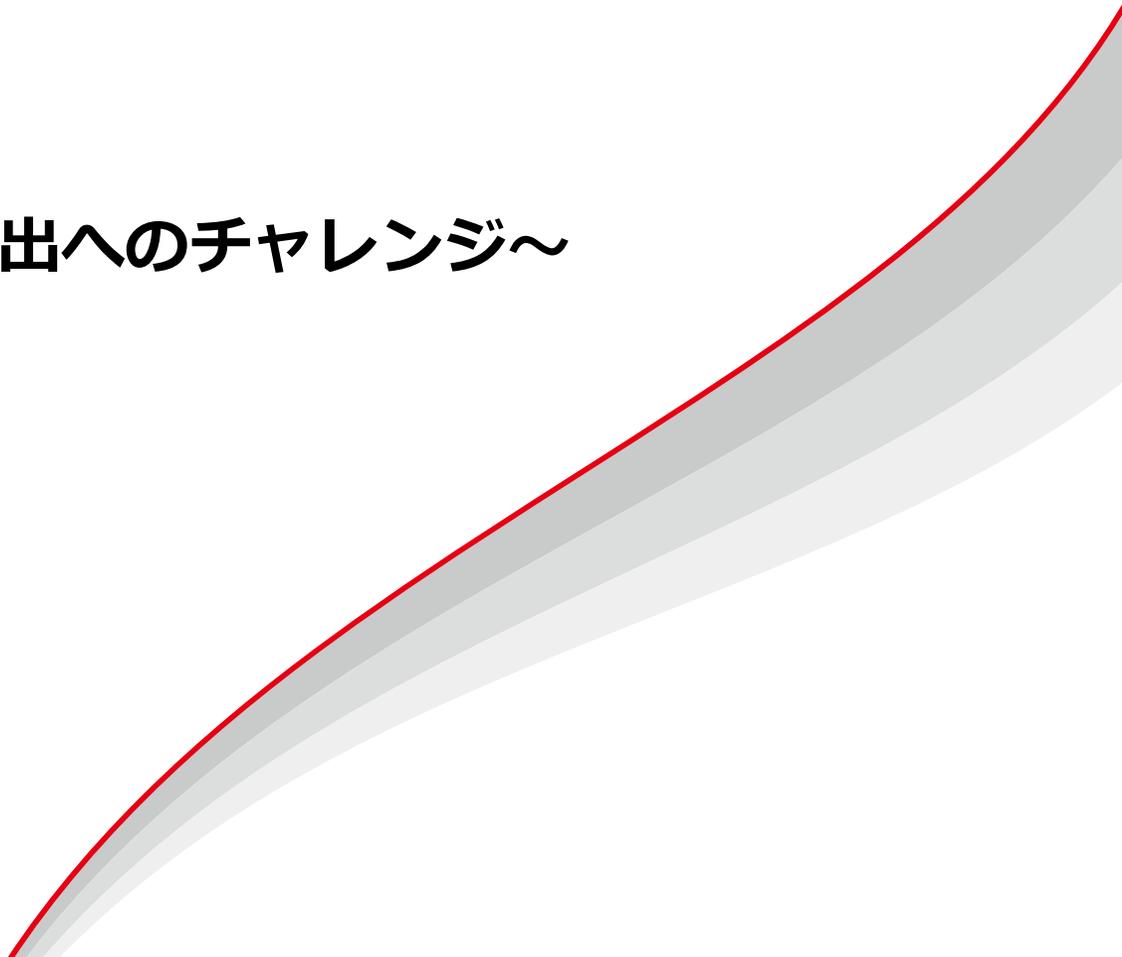


## 新しい迅速無菌試験試薬のご紹介～高感度検出へのチャレンジ～

島津ダイアグノスティクス株式会社



# 目次

---

1. 開発の背景
2. BactFinder™ / FungiFinder™
3. 試薬の性能確認
4. 高感度試験系
5. まとめ

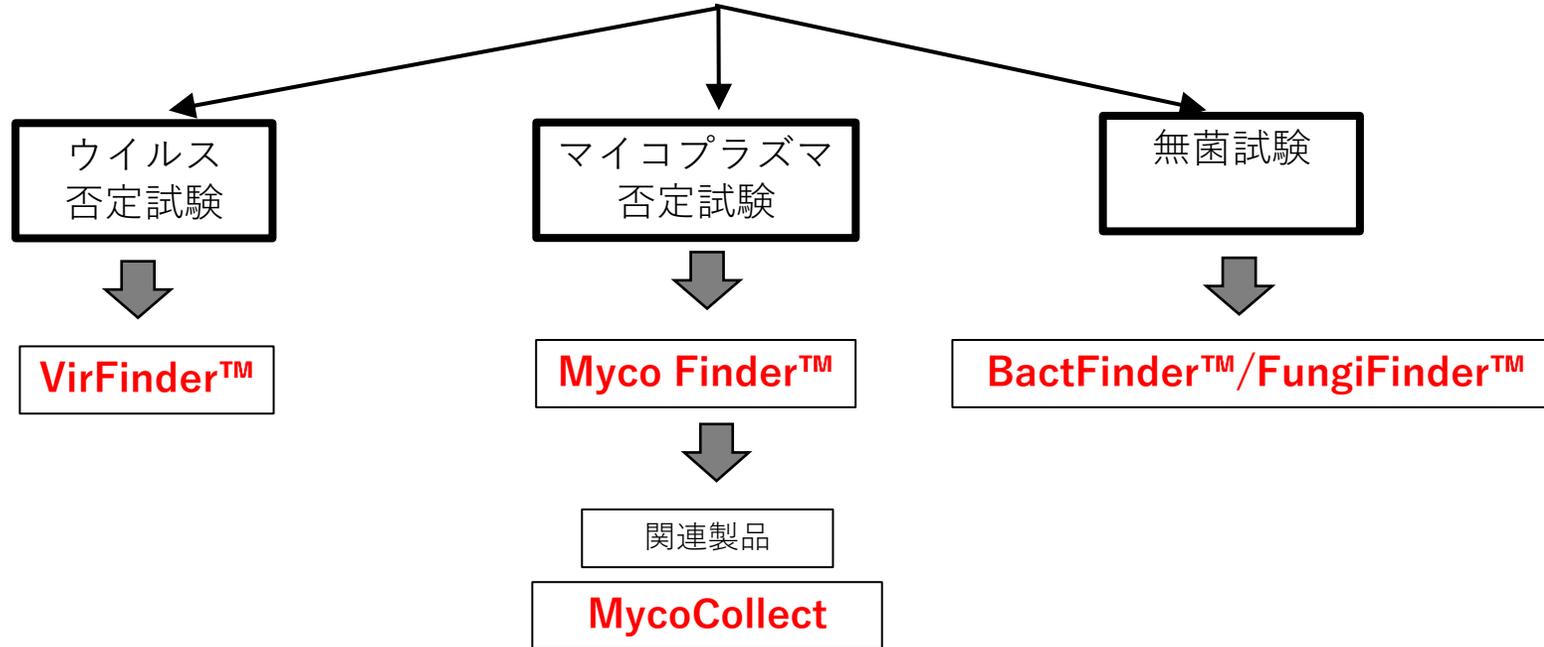
# 目次

---

1. 開発の背景
2. BactFinder™ / FungiFinder™
3. 試薬の性能確認
4. 高感度試験系
5. まとめ

# 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



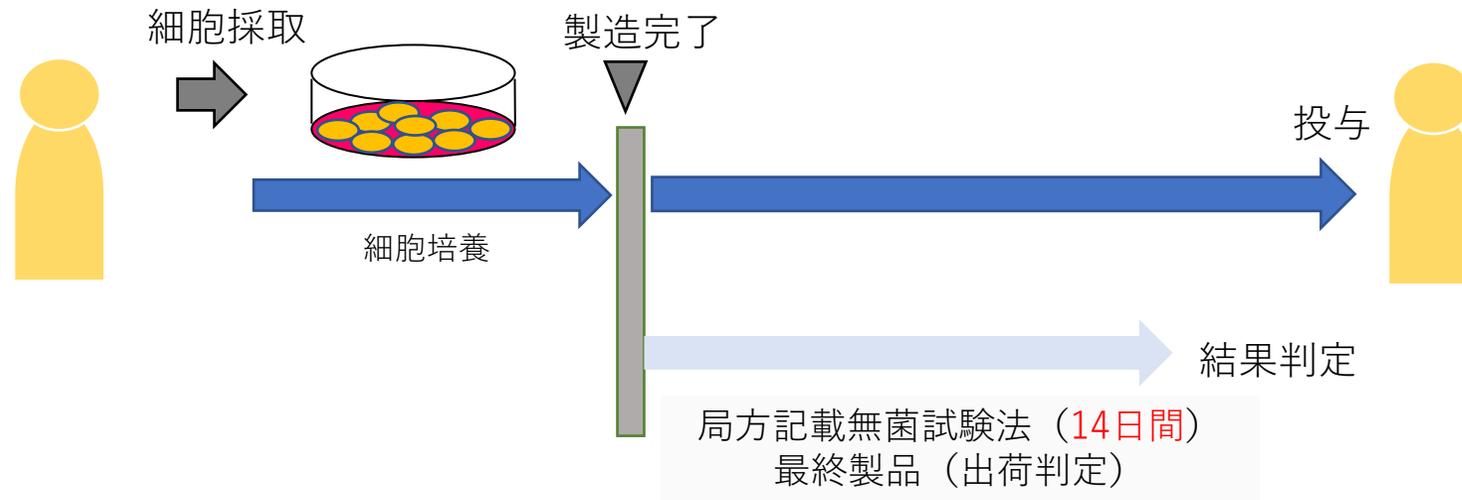
安全性試験に対応する試薬のラインナップを各種取り揃えている

# 再生医療における無菌試験の課題

※日本薬局方記載の無菌試験を実施した場合

## 迅速検査の必要性

凍結保存が困難な組織では  
安全性を十分に検証することが難しい



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

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。

# 目次

---

1. 開発の背景
2. BactFinder™ / FungiFinder™
3. 試薬の性能確認
4. 高感度試験系
5. まとめ

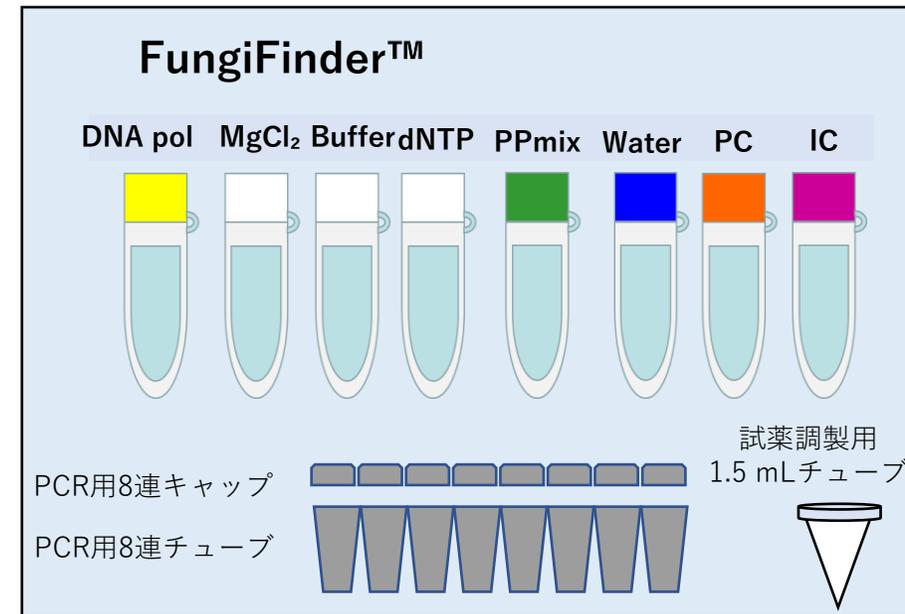
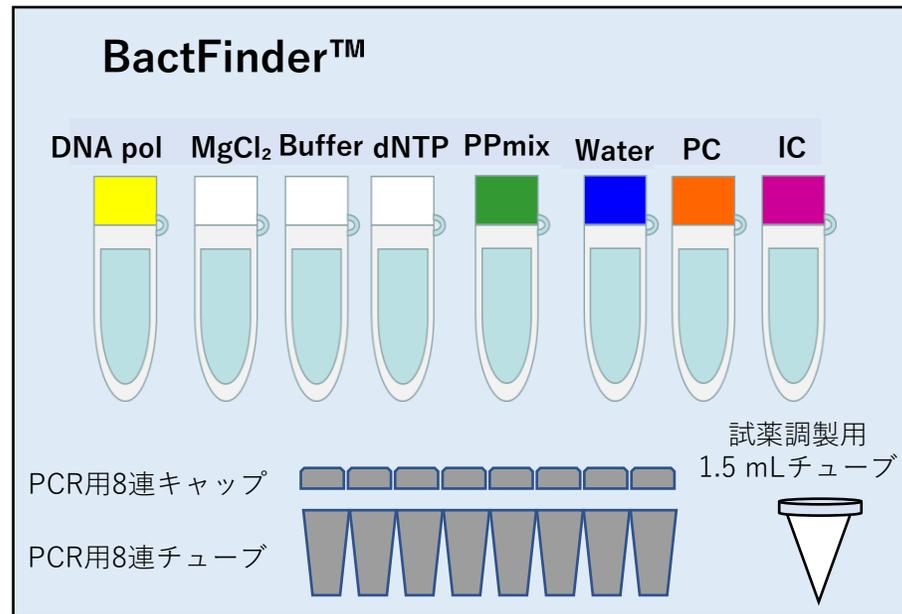
# BactFinder™ / FungiFinder™



## 特徴

- ✓ 微生物核酸を検出するためのPCR試薬
- ✓ 核酸のバックグラウンドを低減したクリーンな試薬
- ✓ ターゲット特異的な検出が可能
- ✓ 幅広い環境菌、ヒト由来菌をカバー

# BactFinder™ / FungiFinder™



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

- ◆PCR試薬調製および反应用のチューブをキットに同封  
資材からのコンタミネーションを防ぐため
- ◆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

# 目次

---

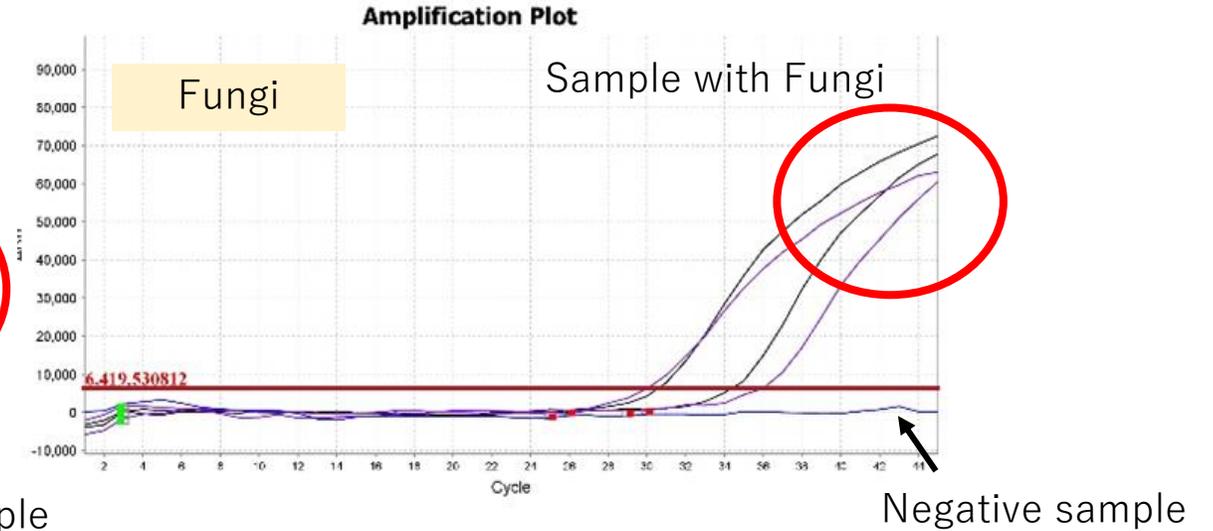
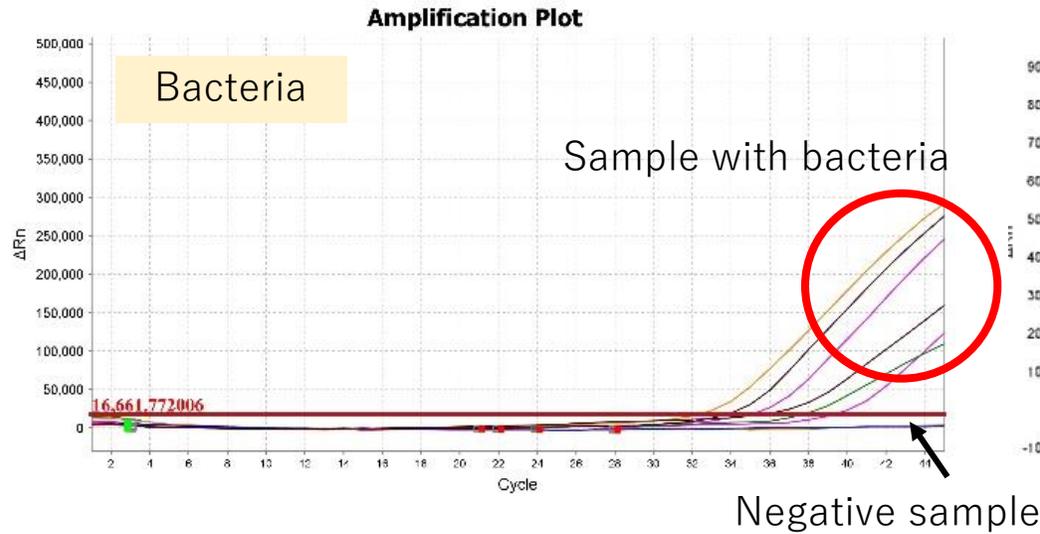
1. 開発の背景
2. BactFinder™ / FungiFinder™
3. 試薬の性能確認
4. 高感度試験系
5. まとめ

# BactFinder™/FungiFinder™の性能一覧

## 確認している試薬の性能一覧

想定する検体	培養上清、細胞懸濁液
検出感度	100 CFU
試薬のバックグラウンド	限りなく少ない
特異性	ターゲット特異的に検出
機種間差	3つの機種に対応することを確認済
検出時間	約 4 時間
網羅性	局方6菌種のほか 幅広い環境菌、ヒト由来菌をカバー
試験環境	無菌操作が可能な環境で実施

# 検出感度



Microorganism strain	Cq	
	10 CFU	100 CFU
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	35.4	33.7
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	N/A	32.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	N/A	37.6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	39.3	34.9

Microorganism strain	Cq	
	10 CFU	100 CFU
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	35.9	30.0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	34.4	30.6

※全てのサンプルは $1.0 \times 10^6$  cellsのJurkat細胞を含む

表は各サンプルのCq値を示している  
N/A：Cq値の検出なし

## ヒト細胞存在下で100 CFUの検出感度を示すことを確認した

# 試薬のバックグラウンド

製造した3ロットの試薬について、キット中のDNA Free Waterをサンプルと置いてPCRにて測定した

試験条件: DNA Free Water

検体数: 各条件 N = 16

	BactFinder™
1st Lot	0/16
2nd Lot	0/16
3rd Lot	1/16

	FungiFinder™
1st Lot	1/16
2nd Lot	1/16
3rd Lot	0/16

- ✓ PCR試薬のBGはほとんど検出されなかった
- ✓ 一部、検出されたサンプルのCq値も非常に高い数値で陰性とほとんど差がなかった

**核酸のバックグラウンドが非常に少ない試薬**

# 特異性

ゲノムDNAを2濃度添加し、PCR産物のDNA配列を解析して配列が一致することを確認した

DNA添加量: 100 cp, 10 cp

検体数: 各濃度 N = 3

Microorganism strain	Positive result	
	100 cp	10 cp
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	3/3	3/3
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3/3	3/3
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	3/3	3/3
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	3/3	3/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3/3	3/3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	3/3	3/3

ターゲットとする核酸のみを検出

# BactFinder™/FungiFinder™の性能一覧

想定する検体	培養上清、細胞懸濁液
検出感度	100 CFU/検体
試薬のバックグラウンド	限りなく少ない
特異性	ターゲット特異的に検出
機種間差	3つの機種に対応することを確認済
検出時間	約 4 時間
網羅性	局方6菌種のほか 幅広い環境菌、ヒト由来菌をカバー
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

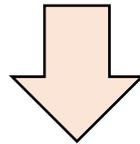
# 目次

---

1. 開発の背景
2. BactFinder™ / FungiFinder™
3. 試薬の性能確認
4. 高感度試験系
5. まとめ

## BactFinder™ / FungiFinder™

- ✓ 約4時間で判定 → 当日判定が可能
- ✓ 100 CFUの感度 → より少ない微生物を検出したい
- ✓ バックグラウンドが稀に発生 → 偽陽性が発生しない試験がいい

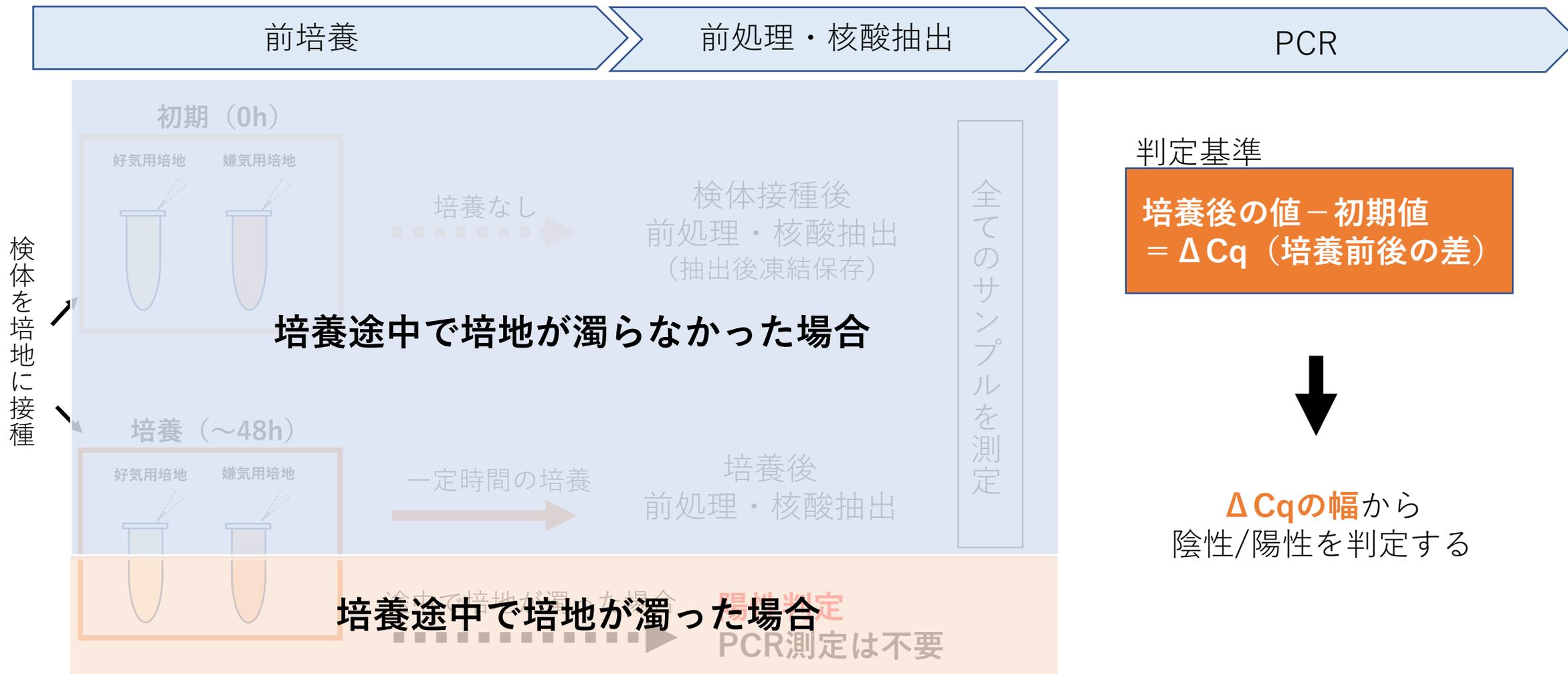


高感度かつ偽陽性リスクを低減させた  
『高感度試験系』を開発した

# 高感度試験系の特徴

	高感度試験系
想定される使用目的	出荷試験、工程内検査
試験系の構成	前培養
	前処理+核酸抽出
	リアルタイムPCR (BactFinder™/ FungiFinder™を使用)
検出感度	1 CFU
試験時間	48h程度の培養+4h
試験系の利点	偽陽性が発生しにくい 死菌の影響を受けない判定

# 高感度試験系の概要



# 試験項目

高感度試験系の性能を評価するため以下の項目について検証した

試験項目	内容
検出限界	複数の濃度に調製した微生物を使用し高感度試験系の検出限界を評価した
同等性	14日間の培養による公定法を実施し、高感度試験系と結果を比較した
菌種の網羅性	複数の菌種をサンプルとして使用し、高感度試験系の適用範囲を検証した
特異性	微生物を含まないサンプルを高感度試験系で検出し、偽陽性の発生頻度を検証した

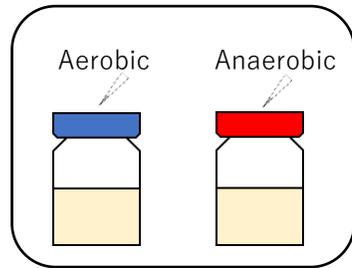
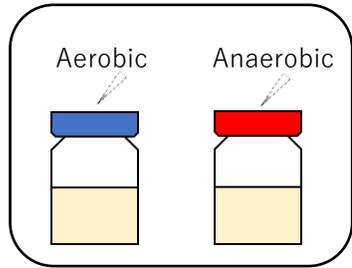
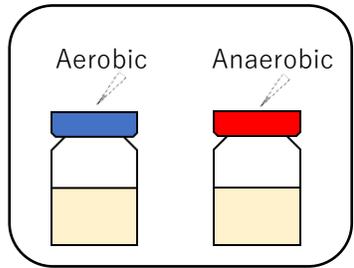
# 検証方法

各N = 3

30 CFU

3 CFU

0.3 CFU



※全てのサンプルは $1.0 \times 10^6$  cellsのJurkat細胞を含む

培地の濁りなし



前処理→核酸抽出→PCR

判定基準

$$\text{Culture } Cq - 0h \text{ } Cq = \Delta Cq$$

$$\Delta Cq \leq -6 \quad \text{Positive}$$

$$\Delta Cq > -6 \quad \text{Negative}$$

48時間培養



培地が濁った

**Positive**

PCR測定なし

- ✓ TSB and TGC used in the compendial method were cultured for 14 days (各N = 1)



14日後培地の濁りを確認

高感度試験系と結果を比較

# 検出限界

30~0.3 CFUの48時間後の結果一覧

Microorganism strain	30 CFU						3 CFU						0.3 CFU								
	Turbidity			PCR			Positive	Turbidity			PCR			Positive	Turbidity			PCR			Positive
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	■	■	■	/	/	/	3/3	■	■	■	/	/	/	3/3							0/3
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	■	■	■	/	/	/	3/3	■	■	■	/	/	/	3/3	■	■		/	/		2/3
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	■	■	■	/	/	/	3/3	■	■	■	/	/	/	3/3							0/3
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	■	■	■	/	/	/	3/3	■	■		/	/		2/3							0/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	■	■	■	/	/	/	3/3	■	■	■	/	/	/	3/3	■			/		■	2/3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	■	■	■	/	/	/	3/3	■	■		/	/	■	3/3				■	■		2/3

/ : No PCR detection due to turbidity  
 ■ : Turbidity or  $\Delta Cq$  positive

- ✓ 48時間でおおよそ3 CFUまで検出可能だった
- ✓ 菌種によっては0.3 CFUを検出できることもある
- ✓ 菌数が少ない場合、培地の濁りに先行して $\Delta Cq$ で陽性判定が可能であった

# 同等性

Microorganism strain	30 CFU		3 CFU		0.3 CFU	
	Highly sensitive test system	compendial method	Highly sensitive test system	compendial method	Highly sensitive test system	compendial method
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	3/3	+	3/3	+	0/3	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3/3	+	3/3	+	2/3	+
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	3/3	+	3/3	+	0/3	—
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	3/3	+	2/3	—	0/3	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3/3	+	3/3	+	2/3	—
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	3/3	+	3/3	+	2/3	+

+ : Turbidity of TGC or TSB  
 — : No turbidity in TGC or TSB

- ✓ 高感度試験系は従来法と同等以上の検出精度を示した
- ✓ 公定法より正確に微生物を検出したサンプルもあった

# 菌種の網羅性

コンタミネーションのリスクが高く、公定法の検出に時間がかかるアクネ菌を48時間と72時間の培養で高感度試験系にて検出した

	48h						72h					
	29 CFU		5 CFU		0.3 CFU		29 CFU		5 CFU		0.3 CFU	
	Turbidity	PCR										
<i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 11827												
Positive	0/3		1/3		0/3		3/3		3/3		0/3	
compendial method							+		+		-	

: Turbidity or  $\Delta Cq$  positive  
 + : Turbidity of TGC or TSB  
 - : No turbidity in TGC or TSB

- ✓ 48時間の培養ではほとんどのサンプルが検出不可であった
- ✓ 72時間の培養で5 CFUまでの検出が可能であった
- ✓ 菌数が少ない場合、培地の濁りに先行して $\Delta Cq$ で陽性判定が可能であった

# 菌種の網羅性

Microorganism strain
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Brevibacterium casei</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Enterococcus hirae</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella Typhimurium</i>
<i>Methylobacterium extorquens</i>
<i>Corynebacterium suicordis</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Kocuria rosea</i>
<i>Kocuria rhizophila</i>
<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Paenibacillus gluconolyticus</i>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>
<i>Corynebacterium propinquum</i>
<i>Corynebacterium striatum</i>
<i>Corynebacterium resistens</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285

他にも左の菌株で高感度試験法にて結果が得られることを確認している

詳細なデータは現在取得中

EP 2.6.27 特有の菌株

# 特異性

試験条件: 好気用、嫌気用培地 + Jurkat  $1.0 \times 10^6$  cells

培養時間: 48h

検体数: N = 12

BactFinder™		
Sample No.	Turbidity	PCR ( $\Delta$ Cq)
1	—	—
2	—	—
3	—	—
4	—	—
5	—	—
6	—	—
7	—	—
8	—	—
9	—	—
10	—	—
11	—	—
12	—	—
<b>Positive</b>	<b>0/12</b>	<b>0/12</b>

FungiFinder™		
Sample No.	Turbidity	PCR ( $\Delta$ Cq)
1	—	—
2	—	—
3	—	—
4	—	—
5	—	—
6	—	—
7	—	—
8	—	—
9	—	—
10	—	—
11	—	—
12	—	—
<b>Positive</b>	<b>0/12</b>	<b>0/12</b>

— : Turbidity or  $\Delta$  Cq negative  
+ : Turbidity or  $\Delta$  Cq positive

細菌、真菌ともに偽陽性を示す結果は得られなかった

## 高感度試験系

- ✓ 48時間以内に1 CFU～生菌を検出する高感度な試験系  
※菌種によっては72hの培養が必要
- ✓ バックグラウンドの影響を受けない偽陽性リスクの少ない系

現在、初期バリデーションデータ取得中

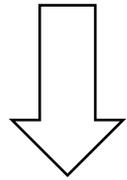
# 目次

---

1. 開発の背景
2. BactFinder™ / FungiFinder™
3. 試薬の性能確認
4. 高感度試験系
5. まとめ

# まとめ

## BactFinder™/FungiFinder™ (近日上市予定)



高感度試験系：1 CFUから2-3日以内に生菌を検出する高感度な系

無菌試験の目的や用途により  
PCR試薬を利用した  
試験の選択的な利用を提案する