

マイコプラズマ否定試験について

試験法の解説と関連製品のご紹介

2024年 4月 17日

島津ダイアグノスティクス株式会社

CC営業部 CC営業グループ

本日のトピックス

➤ マイコプラズマ否定試験について

➤ 関連製品について

マイコプラズマとは

特徴

- 細胞壁を持たず自己増殖能を有する最小の微生物。ろ過滅菌フィルター（0.22 μm）を通過する。
- ペニシリン系の薬剤は無効で、カナマイシンやゲンタマイシン等に耐性を持つものが多い。
- 動植物界に広く分布し、種に特異的な感染を示す。
- 培養細胞では血清などの試薬類、培養に携わる研究者等を介し、種を超えて感染する。
- 多くは培養細胞表面で細胞と共存して増殖する。細胞変性を生じず、培養液の混濁も認められないため、汚染に気づくことが極めて困難である。

多くの実験室で維持されている培養細胞でマイコプラズマの汚染が高頻度に見られるとの報告がある*。
⇒ 汚染細胞を用いて医薬品が製造された場合、重大な事態を招く可能性がある。

*小原ら, *Tiss. Cult. Res. Commun.* , 2007, 26, p.159-163



- ・ 医薬品製造に用いる細胞基材
- ・ 細胞・組織加工医薬品



安全性確保のために
適切なマイコプラズマ否定試験の実施が必要

なぜ、迅速なマイコプラズマ検査が必要なのか？

平成26年の法施行により、再生医療、及び製品の実用化に対応できるようになった。
あわせて再生医療等製品、細胞を用いた医薬品でマイコプラズマ否定試験が必須になっている。

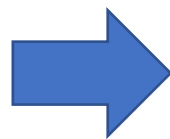
<再生医療等製品やバイオ医薬品の安全性検査>

- 無菌試験
- エンドトキシン検査
- マイコプラズマ否定試験



<安全性検査の課題>

- ・再生医療等製品は最終製品量に限りがあり、十分な検体量を検査に使うことができない。
- ・再生医療等製品は製造から使用までの期間が短いいため迅速な検査法が望まれていた。



第17改正日本薬局方：
マイコプラズマ否定試験に
迅速法として核酸増幅法が追加

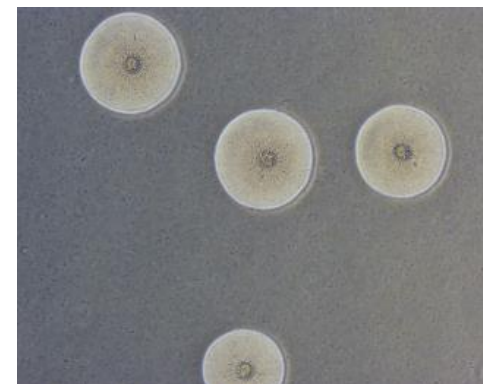


blog.goo.ne.jp/より

「マイコプラズマ否定試験」について

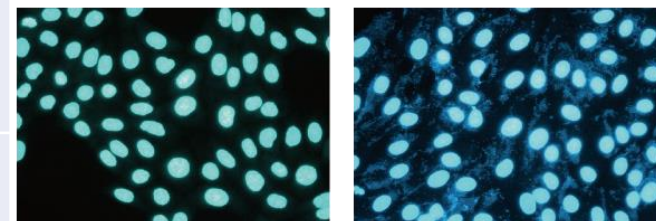
A : 培養法

マイコプラズマを直接培養して検出する方法で、マイコプラズマ特有の目玉焼き状のコロニー形成の有無により判定する。最終判定に28日間以上必要。



B : 指標細胞を用いたDNA染色法

指標細胞の存在下でマイコプラズマを培養して検出する方法で、核酸を染色することにより判定する。判定には熟練を要する



陰性細胞

陽性細胞

C : NAT(核酸増幅法)

NATは細胞懸濁液や培養上清から抽出した核酸中の、マイコプラズマに由来する核酸の存在の有無を高感度に検出する。少ない検体量、短時間で検出可能

「マイコプラズマ否定試験」の課題

	利点	課題
A法 (培養法)	陽性判定は生きたマイコプラズマの存在の証明になる	判定まで 28日間以上を要する
	理論的には 1CFU存在すれば検出可能	培養法では検出が困難な菌種も存在する
B法 (指標細胞を用いたDNA染色法)	培養法では検出できない菌種でも検出できる利点がある	指標細胞や培養の準備が必要
		細胞由来のDNA断片や他の細菌のDNAも染色されるため、 結果の判定には熟練を要する
C法 (NAT)	培養不要である (培養できないマイコプラズマ株でも検出可能)	感度や特異性は使用するプライマーに依存し、検出可能なマイコプラズマ種が限定されたり、マイコプラズマ以外の細菌が検出される可能性がある
	核酸の抽出から 数時間 で結果が得られる	NAT法での検出は目的とする塩基配列の存在を示すものであり、 必ずしも生きたマイコプラズマの存在を意味するものではない
	検体量が少なくても試験が可能	

マイコプラズマ否定試験 培養法について

日本薬局方に収載されている培養法の概略

① 事前準備

- 液体培地、カンテン平板培地の調製
- 培地の性能試験

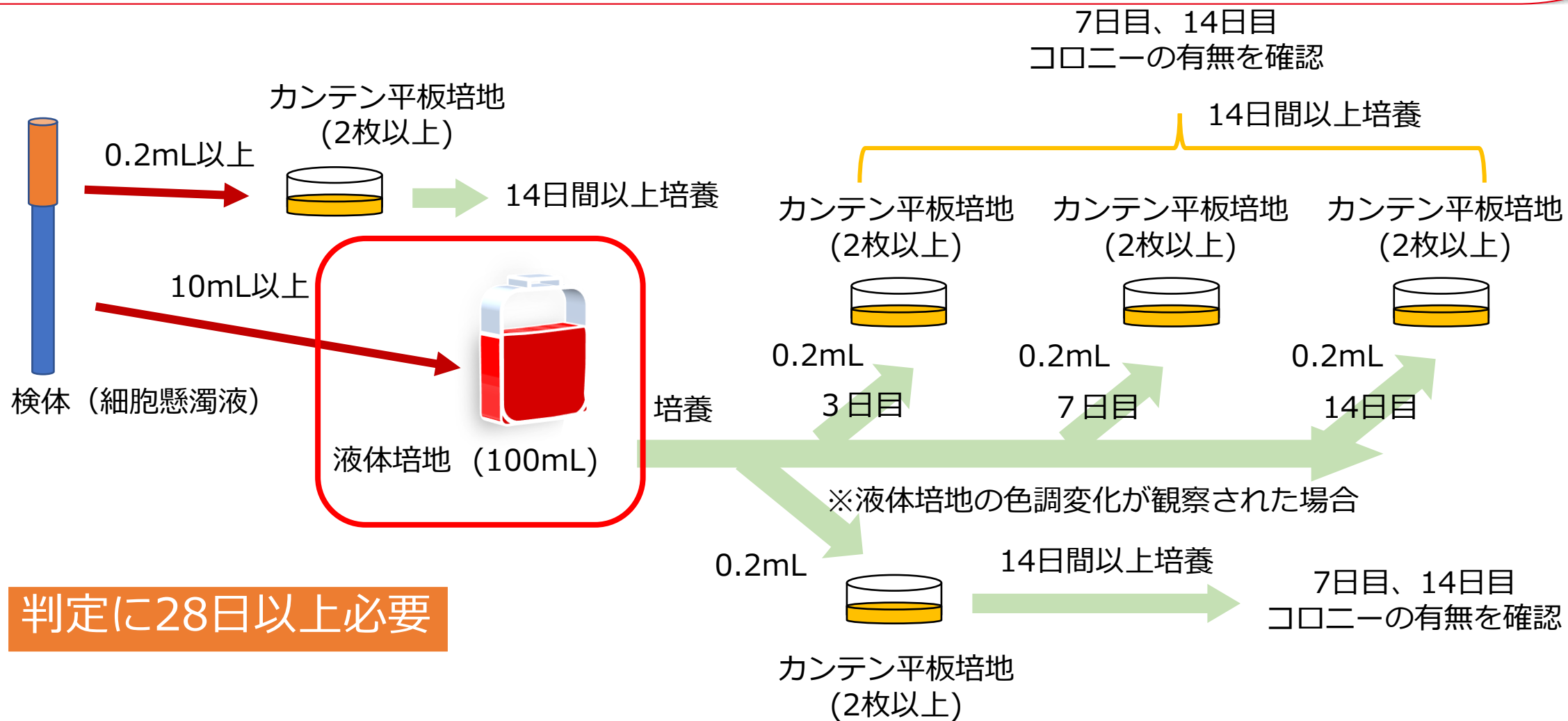
② 事前確認

- 検体中のマイコプラズマ発育阻害活性の試験

③ 試験

- 培養法によるマイコプラズマ否定試験の実施

A培養法：試験方法概要（日本薬局方）



判定に28日以上必要

全カンテン平板培地からコロニー形成が認められない場合、試験適合

マイコプラズマ否定試験 培養法について

日本薬局方に収載されているNATの概略

① 事前準備

- 市販キットの選定

② 事前確認

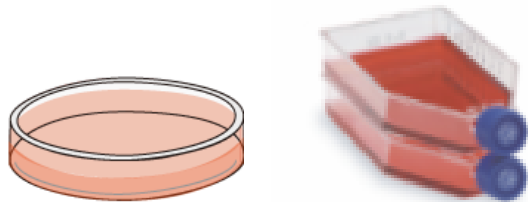
- 施設バリデーションの実施

③ 試験

- NATによるマイコプラズマ否定試験の実施

C NAT：試験方法概要(当社試薬を使用)

当社キットを用いたマイコプラズマ試験の全体の流れ



検体：培養細胞

⇒医薬品製造に用いる細胞基材
細胞・組織加工医薬品 など



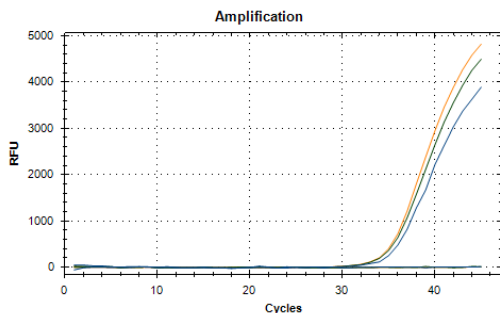
遠心濃縮



核酸抽出

⇒QIAGEN社キットなど

その日のうちに結果判定可能



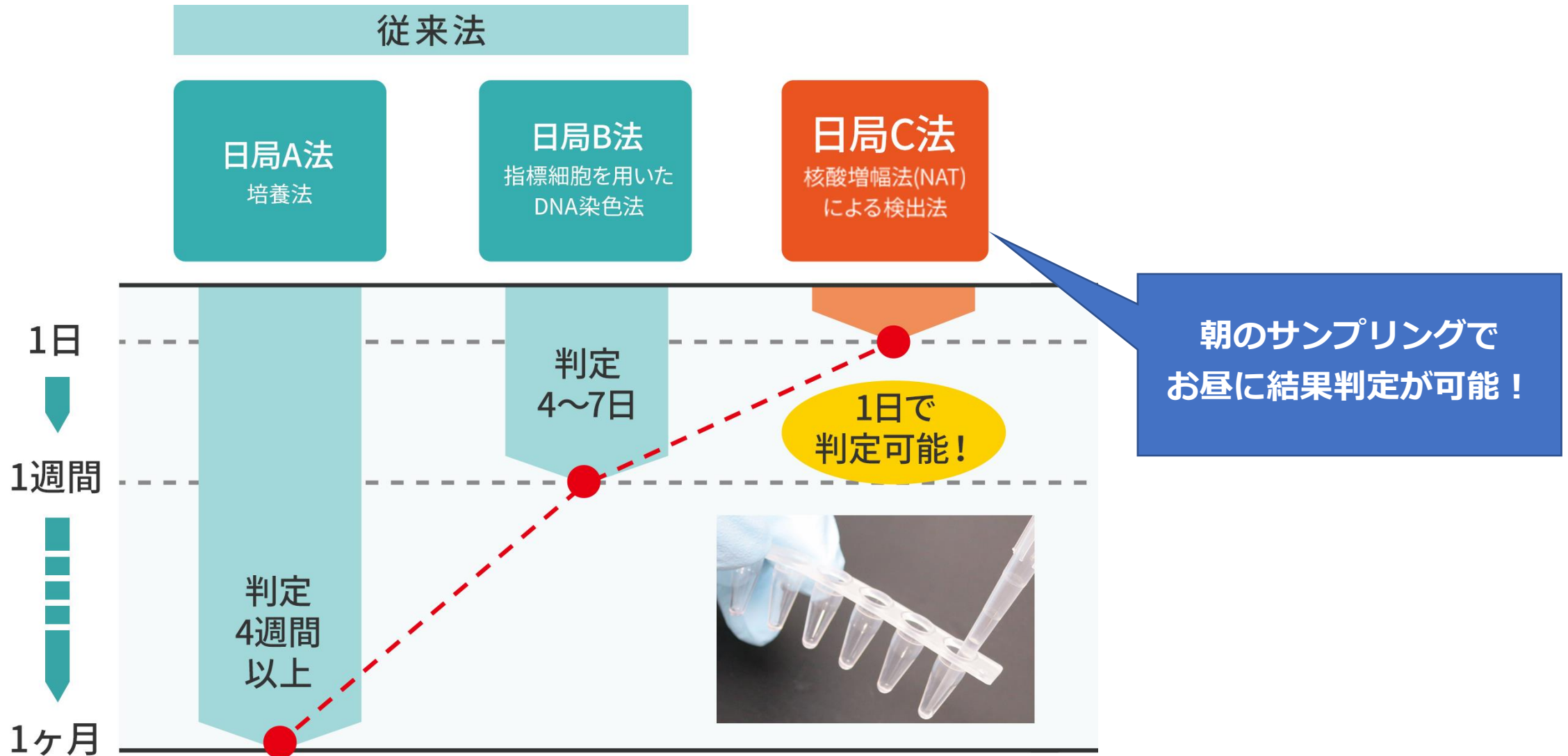
リアルタイムPCR



試薬調製(検出)⇒Myco Finder

判定（解析ソフトを用いて自動判定可）

A法(培養法)、B法(指標細胞を用いたDNA染色法)とC法(NAT)



A法に使用可能な当社製品（液体培地）

マイコプラズマ否定試験用液体培地 I マイコプラズマ否定試験用液体培地 II

寒天培地についてはお問い合わせください

- 生物学的製剤基準を参照した国立感染症研究所処方
- 生物学的製剤基準・日本薬局方の培地性能試験に適合
- 100mLのボトル分注品を滅菌袋で2次包装（日本薬局方の試験に直接使用）

製品仕様

製品名	マイコプラズマ否定試験用 液体培地 I	マイコプラズマ否定試験用 液体培地 II
製品コード	69207	69208
容量	100 mL	100 mL
包装	125mL PETGボトルに充填 滅菌袋で2次包装	125mL PETGボトルに充填 滅菌袋で2次包装
形態	凍結	凍結
保管温度	-20℃以下	-20℃以下
使用期限	12ヶ月	12ヶ月

マイコプラズマ
否定試験用液体培地 I



マイコプラズマ
否定試験用液体培地 II



[マイコプラズマ液体培地製品情報](#)

C法に使用可能な当社製品（NAT試薬）

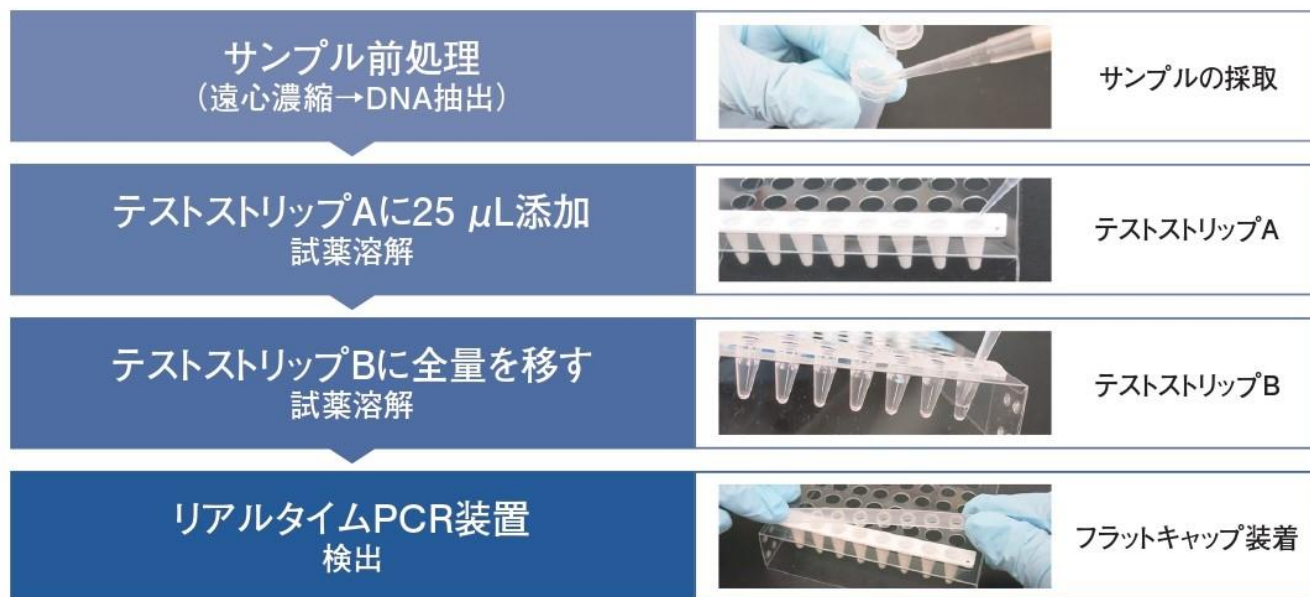
第18改正日本薬局方に対応！

マイコプラズマ否定試験試薬

Myco Finder（マイコファインダー）

操作は4ステップで完了！

検出には白色と透明のストリップを選択可能！



- ✓ 試薬調製が不要
- ✓ 短時間での検出が可能
- ✓ 冷所保管が可能（2～8℃）

※細胞不含検体でも対応可能です

[Myco Finder製品情報](#)