

マイコプラズマ否定試験試薬Myco Finder バリデーションデータに関して

島津ダイアグノスティクス株式会社
法人営業部 CC営業グループ

本日のトピックス

基本事項と日本薬局方

キットバリデーション

施設バリデーション

基本事項と日本薬局方

なぜ、マイコプラズマ検査が必要なのか？

平成24年の法改正（薬機法、再生医療等法）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。あわせて再生医療製品の安全性確保の検査としてマイコプラズマ検査が必須になっている。

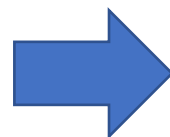
＜再生医療等製品やバイオ医薬品の安全性検査＞

- 無菌試験
- エンドトキシン検査
- ウィルス検査
- 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

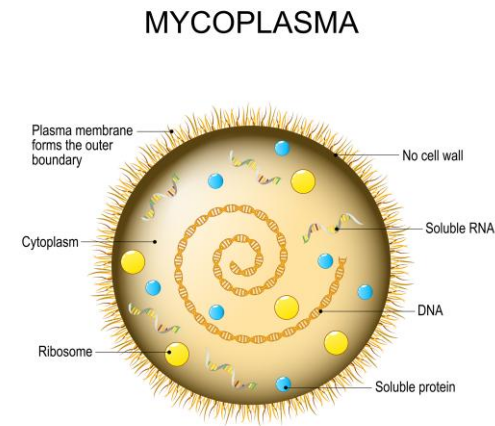
マイコプラズマとは？

マイコプラズマ属、ウレアプラズマ属、スピロプラズマ属、アコレプラズマ属等のモリキューテス綱の細菌

<特徴>

- 動植物界に広く分布し、種に特異的な感染を示す
- 培養作業従事者や培養に用いられる血清などを介して種を超えて感染する
- 抗生物質に耐性を持つものが多い
- 小ささゆえ、滅菌ろ過フィルター（0.22μm）を通過する
- マイコプラズマ汚染が生じてても細胞障害性を示さない

⇒**汚染に気づくことが難しい**



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

- ・ 医薬品製造に用いる細胞基材
- ・ 細胞・組織加工医薬品

適切なマイコプラズマ否定試験の実施が必要

国内の公的マイコプラズマ否定試験

- 日本産業規格 JIS K 3810-1、JIS K 3810-2、JIS K 3810-3
「マイコプラズマの検出法」
- 動物用生物学的製剤基準 一般試験法
「マイコプラズマ否定試験法」
- **生物学的製剤基準（生物基） 一般試験法**
「マイコプラズマ否定試験法」
- **日本薬局方（日局） 参考情報**
「バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対する
マイコプラズマ否定試験＜G3-14-170＞」

マイコプラズマ否定試験概要（生物学的製剤基準、日本薬局方）

公定書	生物学的製剤基準	日本薬局方
最新版 (告示年月日)	厚生労働省告示 第213号 (2026年5月11日)	第十九改正 (2026年4月10日)
試験対象	生物学的製剤(ヒト用ワクチン)	バイオ医薬品製造用細胞のMCB,WCB 医薬品製造工程中の培養細胞 (再生医療等製品や遺伝子治療用製品にも活用されている)
試験法	A. 培養法 B. 指標細胞を用いた核染色法 C. 核酸増幅法	A. 培養法 B. 指標細胞を用いたDNA染色法 C. 核酸増幅法(NAT)
試験法の選択	A法単独実施 B法、C法の併用も可能	A法、B法を実施 要件を満たしたC法はA法、B法の代替法として使用可能

製品のご紹介【Myco Finder（マイコファインダー）】

第19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！

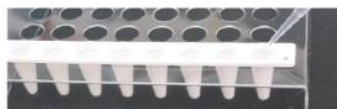
検出には白色と透明のストリップを選択可能！

サンプル前処理
(遠心濃縮→DNA抽出)



サンプルの採取

テストストリップAに25 μ L添加
試薬溶解



テストストリップA

テストストリップBに全量に移す
試薬溶解



テストストリップB

リアルタイムPCR装置
検出



フラットキャップ装着



- ✓ 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](#)

キットバリデーション

バリデーションの内容

特異性試験

感度試験

同等性試験

頑健性試験

使用菌種一覧

検討に用いたマイコプラズマ参照品 自社調製株

菌種名	Genome size (bp)	GC (copies/mL)	CFU (CFU/mL)	GC/CFU
<i>A. laidlawii</i>	1,496,992	3.9×10^9	3.5×10^8	11.2
<i>M. arginini</i>	615,621	4.1×10^9	2.2×10^9	1.8
<i>M. fermentans</i>	1,004,014	1.3×10^{10}	3.3×10^9	3.9
<i>M. hyorhinae</i>	835,925	1.4×10^9	4.2×10^8	3.4
<i>M. orale</i>	713,526	1.3×10^{10}	8.3×10^8	16.3
<i>M. pneumoniae</i>	814,886	6.0×10^8	2.9×10^7	20.7
<i>M. salivarium</i>	710,549	4.2×10^9	2.5×10^9	1.7

検討に用いたマイコプラズマ参照品 ATCC購入株

菌種名	Lot No.	GC (copies/mL)	CFU (CFU/mL)	GC/CFU
<i>A. laidlawii</i>	70023819	5.5×10^9	1.3×10^9	4.2
<i>M. arginini</i>	70018034	1.0×10^{10}	1.7×10^{10}	0.6
<i>M. fermentans</i>	70015063	7.5×10^9	7.0×10^9	1.1
<i>M. hyorhinae</i>	70015024	1.5×10^9	1.9×10^9	0.8
<i>M. orale</i>	70027393	1.1×10^{10}	1.8×10^{10}	0.6
<i>M. pneumoniae</i>	70022921	7.0×10^9	1.0×10^9	7.0
<i>M. salivarium</i>	70025854	1.2×10^{10}	8.6×10^9	1.4

* GC/CFUとは

- ・ GC（ゲノムコピー数）と CFU（コロニー形成単位）の比
- ・ 値が1に近いほど核酸増幅法の検出が CFUを反映していることになる
- ・ 核酸増幅法ではGC/CFU $\leq$ 100の参照品の使用が望ましい。

参考：月刊BIOINDUSTRY 2016年9月号
『再生医療・細胞治療製品のマイコプラズマ検査』 内田恵理子先生

日局特異性試験-1

検出可能菌種一覧 (in silico 解析)

<i>M. adleri</i>	<i>M. caviae</i>	<i>*M. fermentans</i>	<i>M. lagogenitalim</i>	<i>M. pullorum</i>	<i>M. testudineum</i>	<i>S. kunkelii</i>	<i>S. sp. XW0801</i>
<i>M. agalactiae</i>	<i>M. citelli</i>	<i>M. flocculare</i>	<i>M. leoharyngis</i>	<i>M. pulmonis</i>	<i>M. testudinis</i>	<i>S. melliferum</i>	<i>S. sp. YY0801</i>
<i>M. agassizii</i>	<i>M. cloacale</i>	<i>M. gallinaceum</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>*M. salivarium</i>	<i>M. verecundum</i>	<i>S. penaei</i>	
<i>M. alkalescens</i>	<i>M. collis</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>*M. lipophilum</i>	<i>M. simabae</i>	<i>M. vulturii</i>	<i>S. phoeniceum</i>	
<i>M. alligatoris</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>*M. gallisepticum</i>	<i>M. maculosum</i>	<i>M. sp.1220</i>	<i>M. zalophi</i>	<i>S. poulsonii</i>	
<i>M. alvi</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. gallopavonis</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. sp.1449</i>	<i>M. zalophidermidis</i>	<i>S. sp. BE0801</i>	
<i>M. amphoriforme</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. gateae</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. sp.2371A</i>	<i>U.cati</i>	<i>S. sp. CH-1</i>	
<i>M. anaatis</i>	<i>M. conjunctivae</i>	<i>*M. genitalium</i>	<i>M. moatsii</i>	<i>M. sp2F1A</i>	<i>U. canigenitalium</i>	<i>S. sp. CNA-1</i>	
<i>M. anseris</i>	<i>M. corogypsi</i>	<i>M. glycyphilum</i>	<i>M. mobile</i>	<i>M. sp. A1802</i>	<i>U. felinum</i>	<i>S. sp. CNR-1</i>	
<i>*M. arginini</i>	<i>M. cricetuli</i>	<i>M. gypis</i>	<i>M. molare</i>	<i>M. sp. HRC689</i>	<i>U. gallorale</i>	<i>S. sp. CNR-2</i>	
<i>M. arthritis</i>	<i>M. crocodyli</i>	<i>*M. hominis</i>	<i>M. muris</i>	<i>M. sp.Phocoena C-269</i>	<i>U. parvum</i>	<i>S. sp. CR-1</i>	
<i>M. auris</i>	<i>M. cynos</i>	<i>M. hyopharyngis</i>	<i>*M. orale</i>	<i>M. sp. VJC358</i>	<i>*U. urealyticum</i>	<i>S. sp. M10</i>	
<i>M. bovigenitalium</i>	<i>M. dispar</i>	<i>M. hyopneimoniae</i>	<i>M. ovipneumoniae</i>	<i>M. sp.Zaradi2</i>	<i>U. sp. ES2783-GEN</i>	<i>S. sp. MF0801</i>	
<i>M. bovis</i>	<i>M. edwardii</i>	<i>*M. hyorhinis</i>	<i>M. oxoniensis</i>	<i>M. spermatophilum</i>	<i>U. sp. CSL7743-GEN</i>	<i>S. sp. MF0802</i>	
<i>M. bovoculi</i>	<i>M. elehantis</i>	<i>M. hyosynoviae</i>	<i>M. phocicerebrale</i>	<i>M. sphenisci</i>	<i>U. sp. CSL7644-GEN</i>	<i>S. sp. MSRO ITS1</i>	
<i>*M. buccale</i>	<i>M. equigenitaliumm</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. phocidae</i>	<i>M. spumans</i>	<i>*A. laidlawii</i>	<i>S. sp. MUF0901</i>	
<i>M. buteonis</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. imitans</i>	<i>M. phocirhinis</i>	<i>M. sturni</i>	<i>A. pleciae</i>	<i>S. sp. QYF0901</i>	
<i>M. californicum</i>	<i>M. falconis</i>	<i>M. indiense</i>	<i>M. pirum</i>	<i>M. sualvi</i>	<i>*S. citri</i>	<i>S. sp. STF0901</i>	
<i>M. canadense</i>	<i>*M. faucium</i>	<i>M. iners</i>	<i>*M. pneumoniae</i>	<i>M. suddolum</i>	<i>S. endosymbiont</i>	<i>S. sp. STF0902</i>	
<i>M. canis</i>	<i>M. felifaucium</i>	<i>M. iowae</i>	<i>*M. primum</i>	<i>*M. synoviae</i>	<i>S. insolitum</i>	<i>S. sp. WM0801</i>	

*MycoFinderを用いて実験的に検出確認済み

黄色：日局7菌種

緑：欧米局方記載菌種

計142種類

日局特異性試験-2

- 検出対象 7 種のマイコプラズマが特異的に検出されることを確かめるために、以下の 2 つの実験を行った

参照品(7 種)由来ゲノムDNAテンプレートとしてPCR
PCR産物をシーケンス解析



PCR産物のDNA配列は由来する
マイコプラズマの遺伝子と99%以上の相同性



キットのプライマーはマイコプラズマ
遺伝子を増幅することを確認

検体(細胞懸濁液+マイコプラズマ参照品)由来の
DNAを用いて感度試験を実施。



7 菌種について10 CFU/mLの検出を確認



細胞由来DNA存在下 (～2μg) でも
マイコプラズマ遺伝子の特異的に検出可能

本キットが **7 種のマイコプラズマ** を特異的に検出できることが確認された

日局特異性試験-3

細菌25種、真菌8種、哺乳動物細胞3種にて交差反応性がないことを確認した

細菌25種

<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium kluyveri</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	<i>Streptococcus avermitilis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Tetragenococcus halophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Kocuria rhizophila</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

真菌8種

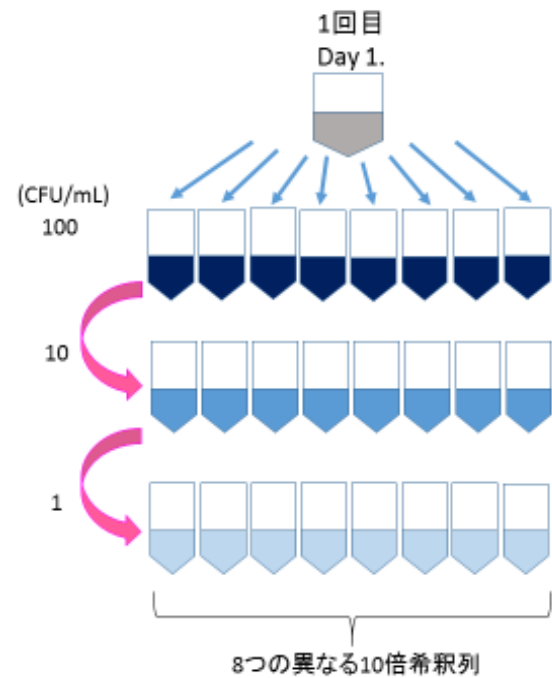
Cryptococcus neoformans
Candida albicans
Mucor circinelloides
Cunninghamella echinulata
Rhizomucor pusillus
Absidia corymbifera
Scedosporium prolificans
Pneumocystis carinii

哺乳動物3種

Raji Cell (ヒト)
Mouse T lymphocyte (マウス)
CHO cell (ハムスター)

日局感度試験-1

1、10、100 CFU/mLの試験を行い、統計学的に10 CFU/mLが95%以上の確率で検出可能であることを確認している



× 3日間
⇒ 合計24の試験を実施

A. laidlawii

Spike (CFU/mL)	Run			Total	Positive rate (%)
	1	2	3		
100	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
10	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
1	6/8	7/8	8/8	21/24	87.5

M. arginini

Spike (CFU/mL)	Run			Total	Positive rate (%)
	1	2	3		
100	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
10	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
1	4/8	5/8	4/8	13/24	54.2

M. fermentans

Spike (CFU/mL)	Run			Total	Positive rate (%)
	1	2	3		
100	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
10	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
1	3/8	5/8	7/8	15/24	62.5

日局感度試験-2

1、10、100 CFU/mLの試験を行い、統計学的に10 CFU/mLが95%以上の確率で検出可能であることを確認している

M. hyorhinis

Spike (CFU/mL)	Run			Total	Positive rate (%)
	1	2	3		
100	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
10	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
1	1/8	3/8	4/8	8/24	33.3

M. orale

Spike (CFU/mL)	Run			Total	Positive rate (%)
	1	2	3		
100	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
10	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
1	4/8	4/8	4/8	12/24	50.0

M. pneumoniae

Spike (CFU/mL)	Run			Total	Positive rate (%)
	1	2	3		
100	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
10	7/8	8/8	8/8	23/24	95.8
1	3/8	2/8	5/8	10/24	41.7

M. salivarium

Spike (CFU/mL)	Run			Total	Positive rate (%)
	1	2	3		
100	8/8	8/8	8/8	24/24	100.0
10	7/8	8/8	8/8	23/24	95.8
1	5/8	3/8	2/8	10/24	41.7

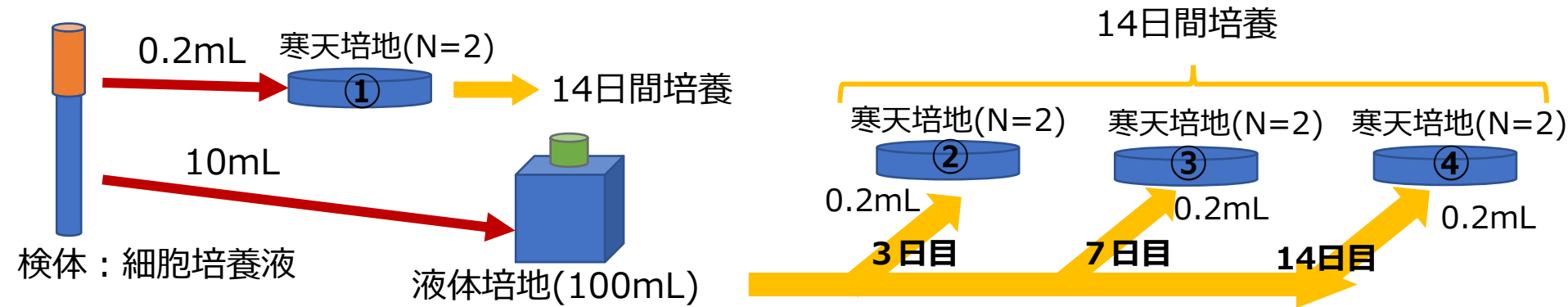
95%の確率で検出されるマイコプラズマの濃度*1

菌種名	CFU/mL
<i>A. laidlawii</i>	10 >
<i>M. arginini</i>	10 >
<i>M. fermentans</i>	10 >
<i>M. hyorhinis</i>	10 >
<i>M. orale</i>	10 >
<i>M. pneumoniae</i>	8.98
<i>M. salivarium</i>	8.98

*1プロビット解析による算出

日局同等性試験（培養法）

感度試験と同じ検体(細胞懸濁液+参照品)を用いて培養法を実施した



菌種名	液体培養日数				判定	NAT (Myco Finder使用)
	①	②	③	④		
	0日目	3日目	7日目	14日目		
<i>A. laidlawii</i>	有	有	有	有	+	+
<i>M. arginini</i>	有	有	無	無	+	+
<i>M. fermentans</i>	有	有	有	有	+	+
<i>M. hyorhinis</i>	有	有	有	有	+	+
<i>M. orale</i>	有	有	無	無	+	+
<i>M. pneumoniae</i>	無	無	有	有	+	+
<i>M. salivarium</i>	無	有	有	有	+	+

7 菌種全てが10CFU/mLの検体で陽性となることが確認された
⇒感度試験と培養法で感度が同等であることが示された

頑健性試験-1 検出機器間差

リアルタイムPCR装置の機種によって検出性能に影響がないことを確認している

LightCycler 480及びGVP9600

菌種名	PCR 装置	陽性数 (10 CFU/mL)
<i>A. laidlawii</i>	LightCycler 480	3/3
	GVP9600	3/3
<i>M. arginini</i>	LightCycler 480	3/3
	GVP9600	3/3
<i>M. fermentans</i>	LightCycler 480	3/3
	GVP9600	3/3
<i>M. hyorhinae</i>	LightCycler 480	3/3
	GVP9600	3/3
<i>M. orale</i>	LightCycler 480	3/3
	GVP9600	3/3
<i>M. pneumoniae</i>	LightCycler 480	3/3
	GVP9600	3/3
<i>M. salivarium</i>	LightCycler 480	3/3
	GVP9600	3/3

※数値は抽出した検体中で陽性判定となった検体数を示す。

CFX Connect

菌種名	PCR 装置	陽性数 (10 CFU/mL)
<i>A. laidlawii</i>	CFX Connect	3/3
<i>M. arginini</i>	CFX Connect	3/3
<i>M. fermentans</i>	CFX Connect	3/3
<i>M. hyorhinae</i>	CFX Connect	3/3
<i>M. orale</i>	CFX Connect	3/3
<i>M. pneumoniae</i>	CFX Connect	3/3
<i>M. salivarium</i>	CFX Connect	3/3

CFX Opus

菌種名	PCR 装置	陽性数 (10 CFU/mL)
<i>A. laidlawii</i>	CFX Opus	3/3
<i>M. arginini</i>	CFX Opus	3/3
<i>M. fermentans</i>	CFX Opus	3/3
<i>M. hyorhinae</i>	CFX Opus	3/3
<i>M. orale</i>	CFX Opus	3/3
<i>M. pneumoniae</i>	CFX Opus	3/3
<i>M. salivarium</i>	CFX Opus	3/3

対応装置

当社で販売中！

PCR 装置名	Myco Finder検出 ^{*1}	PCR時間 ^{*2}
Bio-rad		
CFX Connect	○	～35分
CFX 96 Touch ^{*3}	○	～35分
CFX Opus 96	○	～35分
Thermo Fisher Scientific		
7500	○	～1時間
7500FAST	○	～40分
StepOne Plus	○	～35分
QuantStudio5	○	～35分
Roche		
Light Cycler 96	○	～40分
Light Cycler 480	○	～40分
Light Cycler 480II	○	～40分
Shimadzu		
GVP-9600	○	～1時間
その他の装置で試す場合		
PCR program: 95°C 10s, (98°C 5s, 60°C 15～30s)x 45、Detection dye: FAM, ROX		

^{*1}日局7菌種のプラスミドDNA10コピーを用いた検証 ^{*2}各装置に最適化したPCRプログラムで実施した場合

^{*3}バリデーションデータ取得装置



頑健性試験-2 DNA抽出試薬

シカジーニアスTOTAL DNAプレップキット（関東化学株式会社）を用いた場合でも MycoFinderの検出性能に差がないことを確認している

表. 10 CFU/mLの検出

菌種名	陽性数		
	作業者 A	作業者 B	作業者 C
<i>A. laidlawii</i>	3/3	3/3	3/3
<i>M. arginini</i>	3/3	3/3	3/3
<i>M. fermentans</i>	3/3	3/3	3/3
<i>M. hyorhinis</i>	3/3	3/3	3/3
<i>M. orale</i>	3/3	3/3	3/3
<i>M. pneumoniae</i>	3/3	3/3	3/3
<i>M. salivarium</i>	3/3	3/3	3/3

※数値は抽出した検体中で陽性判定となった検体数を示す。

施設バリデーション

なぜバリデーションが必要なのか？

ユーザーは自施設でフルバリデーションを実施しなければならないのか？

⇒JP19には「市販キットをNAT試験に使用する場合、製造業者のフルバリデーションデータを使用者の代替として用いることが可能」との記述

メーカーバリデーションのデータがあればユーザーはフルバリデーション不要

しかし！



検体の細胞種、抽出方法、検出機器等の違いが感度・再現性に影響する可能性がある。
よって、ユーザー施設での性能確認試験は必要

ユーザーは自施設でメーカーが示したバリデーション通りの結果が得られることを確認する必要がある

施設バリデーションについて

JP19の内容から考えられる施設バリデーションについて：

- Myco Finderのバリデーションデータ結果との比較を行う必要がある
- 施設バリデーションでは、**検出感度**、**再現性**を確認する必要がある
 - ✓ 培養法の代替とするために、検出感度の確認には最低でも10 CFU/mL（7菌種のスパイクサンプル）の感度試験の実施が必要
 - ✓ 再現性を検証するために試験数は最低N=3は必要であると考えられる
- 採用する手法や当該機器の妥当性の確認は**感度試験**で代用可能



- 使用目的にかなっているかは**ユーザー判断**
- 施設ごとに基準を設け運用する

まとめ

1) 第19改正日本薬局方に準拠

⇒日局7菌種の検出限界は10 CFU/mL未満

⇒マイコプラズマ以外の生物との交差反応性なし

⇒固相化試薬のため、煩雑な操作がなく、溶かすだけでPCR可能

⇒サンプリングから1時間程度で判定可能、トータルコストの削減に寄与

2) 各社リアルタイムPCR装置で測定可能

3) ユーザーは自施設でメーカーが示したバリデーション通りの結果が得られることを確認する必要がある

4) バリデーションデータのweb版は当社再生医療分野細胞培養関連サイトよりダウンロード可能

関連製品のご紹介【初期導入サポートサービス】

安全性試験試薬の導入をお考えの方におすすめのプランです

こんなお悩みはございませんか？

● 導入評価に自信が無い

- ✓ NATの経験がない
- ✓ リアルタイムPCR装置がない
- ✓ 試験環境が整っていない
- ✓ 生菌が取り扱えない

● プロトコルを改善したい

- ✓ 生菌を使用した評価
- ✓ DNA抽出の改善評価
- ✓ 培地との比較評価
- ✓ 集菌試薬を用いた評価

● 施設バリデーションってどうしたらいいんだろう…

お悩み・お困りごとの解決の
お手伝いをさせていただきます！

