

第 8 章 細胞基材のマイコプラズマ試験

表 2 国内外の公定書に記載されているマイコプラズマ否定試験法

	JP (日局 15 第 2 追補 (2009))	JIS (2003)	生物学的 製剤基準 (2009)	EP 6.1 (2008)	FDA/PTC (1993)
適用対象	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で細胞バンクを基にするもの(MCB, WCB, 製造工程中の培養細胞)	培養細胞, 細胞培養に用いる試薬類, 細胞培養によって生産された製品	ウイルスワクチン(ろ過前, 不活化前)	MCB, WCB, コントロール細胞, ウイルスシードロット, ウイルスハーベスト, バルクワクチン, 最終ロット	MCB, 細胞基材, ワーキングセルストック, ウイルスシード, 製品ハーベスト濃縮液
試験法					
①培養法	○	○	○	○	○
② DNA 染色法	○	○	—	○	○
③ PCR 法/NAT	2 段 PCR を例示	2 段 PCR	—	NAT (概論とバリデーション法のみ)	—
実施すべき試験法の組合せ	①と② ②のみ陽性の場合, ③で否定できる	①又は②と③	①	①と②* ③は適切なバリデーションを実施すれば①又は②を代替できる	①と②

*細胞基材の場合

ためのバイオプロセスの標準規格としてのマイコプラズマ検出法が制定されている。なお、ICH Q5D「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」¹¹⁾によると、マイコプラズマの存在を否定するための試験は、MCB及びWCBで行うべきであり、一般的には、容器1本分の細胞を用いた試験で十分と考えられている。

日局には、①培養法、②指標細胞を用いたDNA染色法、③PCR法の試験の詳細とその利用の仕方が示されている。各試験法の概要と特徴を表3に示す。以下に、各試験法の原理と試験の実施法を日局の方法を中心に解説する。なお、日局には第13改正第2追補(1999年)からマイコプラズマ否定試験が参考情報として記載されているが、第15改正第2追補(2009年)でその内容が改訂されている。日局の参考情報は、医薬品の安全性や品質を担保するという目的で記載され、試験を実施する上で参考になると考えられる情報を例示したものであるが、必ずしも記載に従って実施しなければならないというものではない。

表3 マイコプラズマ否定試験法の比較

試験法	特徴	長所	短所
①培養法	人工培地（液体培地，寒天培地）に検体を接種してマイコプラズマを培養し，マイコプラズマ特有のコロニーを検出する 所要日数：28日以上 検出感度：1～10cfu/ml	・マイコプラズマの直接培養法	・判定まで非常に時間がかかる ・培養細胞を汚染するマイコプラズマは人工培地では増殖しないものもある
②指標細胞を用いたDNA染色法	指標細胞（Vero細胞）に検体を接種し，細胞に依存して増殖したマイコプラズマをDNA特異的蛍光色素で染色して細胞核外の微小なDNA蛍光斑点として検出する間接検出法 所要日数：4～7日 検出感度：10～100cfu/ml	・培養細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖しやすいため，培養法で検出されないマイコプラズマも検出できる	・DNAを蛍光染色する間接検出法であり，マイコプラズマDNAを特異的に検出するわけではない ・細胞由来DNAも染色されるため判定に熟練を要する
③PCR法	検体からDNAを抽出し，マイコプラズマ特異的プライマーを用いて増幅して検出する方法 所要日数：1～2日 検出感度：1～10 copy/reaction	・迅速に判定できる ・検出感度，特異性に優れている	・マイコプラズマの不活性菌，DNA断片も検出され，感染性のあるマイコプラズマを検出するとは限らない ・プライマーに依存して検出されるマイコプラズマ種が規定される ・キャリアオーバーによる偽陽性が出やすい

4 培養法

4.1 原理・特徴

培養法とはマイコプラズマを人工培地で培養し，マイコプラズマのコロニー形成の有無を観察することにより判定する，マイコプラズマの直接検出法である。EP⁸⁾ やFDA/PTC⁹⁾ でも従来より実績のある方法として採用されている。陽性の判定が得られた場合には，最も確実な証明といえる。また，理論的には1 mlあたり1～10コロニー形成単位（CFU）という低濃度のマイコプラズマも検出が可能である。しかし，試験には長期間の培養が必要であり，日局の方法では判定まで28日間以上かかる。また，細胞基材を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖する性質があり，*M. hyorhinae* のように培養細胞での汚染頻度は高いが人工培地では増殖しにくい菌種も存在するため，必ずしも細胞を汚染する全てのマイコプラズマを検出できるわけではないところが欠点である。

4.2 使用培地・陽性対照

培地はカンテン平板培地と液体培地の両方を使用する。抗生物質はマイコプラズマの増殖を阻害するため、培地にはペニシリン以外の抗生物質を用いてはならない。使用する培地はロット毎にマイコプラズマの発育性能試験を実施する必要がある。日局の場合、培地組成は生物学的製剤基準を参考にすることとあるが、培地の性能試験に適合すれば他の培地も使用できる（表4）。

培地の性能試験には、陽性対照としてデキストロース分解マイコプラズマ (*M. pneumoniae* ATCC15531 又は同等の種又は株) とアルギニン分解マイコプラズマ (*M. orale* ATCC23714 又は同等の種又は株) を 100CFU 以下又は 100 色調変化単位 (CCU) 以下接種し、検出できることを確認する。マイコプラズマは長期間の継代培養により性質が変化し、同じ菌株でも継代数や保存条件、供給元によっては試験に適さない可能性があるため、陽性対照となるマイコプラズマは公的又は適切と認められた機関より入手後、適切に管理された継代数の低いものを使用する必要がある。日局 15 第二追補の改訂により、指標菌株は ATCC のコード番号で表示されるようになり、適切な機関からの入手が容易になった。EP や FDA/PTC では、陽性対照マイコプラズマは野生から分離後 15 継代以内のものを使用し、-20℃ 以下または凍結乾燥して保存することが求められる。

表4 培養法の培地組成 (生物学的製剤基準¹⁰⁾ による)

	液体培地 I	液体培地 II	カンテン平板培地
基礎培地	ウシ心筋浸出液 (pH7.8~8.0) 75mL ブドウ糖 0.3g 0.5w/v% フェノールレッド溶液 0.5mL	ウシ心筋浸出液 (pH7.8~8.0) 75mL 塩酸アルギニン 0.3g 0.5w/v% フェノールレッド溶液 0.5mL	ウシ心筋浸出液 (pH7.8~8.0) 75mL カンテン 1.2g
添加物	ウマ血清 15mL 25% 新鮮酵母エキス (pH7.3~7.5) 10mL ペニシリン G カリウム 5万単位	ウマ血清 15mL 25% 新鮮酵母エキス (pH7.3~7.5) 10mL ペニシリン G カリウム 5万単位	ウマ血清 15mL 25% 新鮮酵母エキス (pH7.3~7.5) 10mL ペニシリン G カリウム 5万単位
pH	7.6~7.8	7.0~7.2	

ウシ心筋浸出液及び新鮮酵母エキスは、適当な品質の製品を用いてもよい。

ウマ血清は 56℃ で 30 分間、加熱処理したものを用いる。

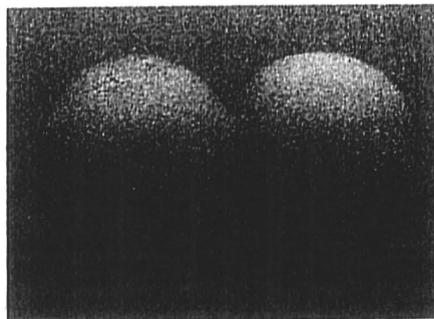
液体培地 I には、*M. pneumoniae* を、液体培地 II には、*M. orale* をそれぞれ 100CFU 未満接種して、35~37℃ で培養するとき、7 日以内に培地が明らかに変色しなければならない。

4.3 実験操作

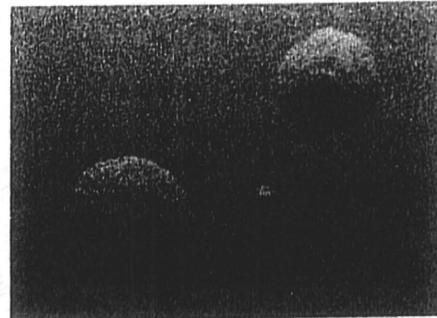
日局における培養法の試験操作法を表5に示す。判定はマイコプラズマのコロニー形成の有無

表5 日局培養法の試験操作法

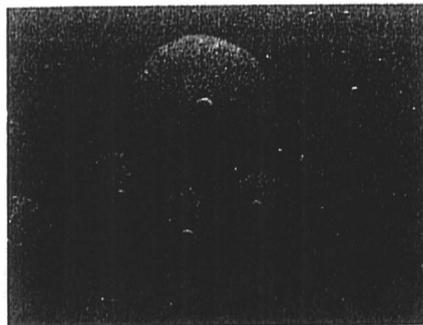
カンテン平板培地	① 検体（細胞懸濁液）0.2ml 以上を一検体あたりカンテン平板培地のプレート2枚以上に接種する。 ② 5~10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中（微好氣的条件）で、適切な湿度のもと $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で14日間以上培養する。
液体培地	① 一検体あたり100mlの液体培地を入れた容器1本以上に検体（細胞懸濁液）10ml以上を接種する。 ② $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養後、3日目、7日目及び14日目に液体培地1本から0.2mlずつを採取し、カンテン平板培地2枚以上に移植する。 ③ 移植したカンテン平板培地は微好氣的条件で、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で14日間以上培養する。
判定法	培養したカンテン平板培地全てについて、100倍以上の倍率の顕微鏡で観察し、マイコプラズマの集落（目玉焼き状のコロニー）の有無を判定する。



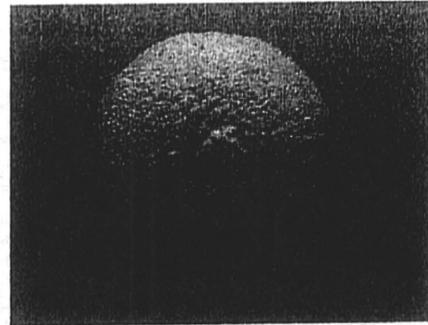
M. hyorhinis NBRC 14858



M. orale NBRC 14477



M. fermentans NBRC 14854



A. laidlawii NBRC 14400

Bar = 100 μm

図1 マイコプラズマのコロニー形態
 (写真提供：(株)製品評価技術基盤機構・特許微生物寄託センター 佐藤真則先生)

を顕微鏡で観察することで行う。菌種によってコロニーの形態は少し異なるが、いずれもマイコプラズマに特有の目玉焼き状のコロニーが観察される（図1）。

日局のマイコプラズマの培養条件は、従来はカンテン平板培地、液体培地とも嫌気（微好氣）

培養と好気培養を半数ずつ行うことが求められていた。しかし、大部分のマイコプラズマ菌種は通性嫌気性であり嫌気、好気の両方の条件で増殖できること、カンテン平板培地での発育は微好気培養が好気培養よりも優れていること、さらにEPやFDA/PTCの培養条件も考慮して、日局15第2追補よりカンテン平板培地の培養は微好気培養のみに変更され、液体培地の培養は気相条件の規定が削除された。

培養法は、検体に抗生物質などのマイコプラズマ発育阻止因子が含まれると正確な結果が得られない。そこで、培養法を実施する前に、マイコプラズマ発育阻止因子の有無をあらかじめ試験し、発育阻止因子を有する場合には、遠心処理や細胞の継代などの適切な方法により発育阻止因子を除去あるいは中和しておく必要がある。マイコプラズマ発育阻止因子の測定は、生物学的製剤基準¹⁰⁾に記載があるマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる。検体の培養細胞は、試験の前に抗生物質を除いた培地で2、3継代した後に測定する¹²⁾。また、マイコプラズマは一般に細胞表面で増殖するため、細胞をトリプシン処理するとマイコプラズマが検出不能となるので、接着細胞を接種する場合、検体の細胞懸濁液はスクレイパーなどで剥離したものをを用いる¹³⁾。

5 DNA 染色法（指標細胞培養法）

5.1 原理・特徴

DNA 染色法（指標細胞培養法）は、カバーガラス上に培養した指標細胞（Vero 細胞）に検体（細胞培養上清）を接種して数日間培養し、細胞表面でマイコプラズマを増殖させた後、DNA 特異的蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡を用いてマイコプラズマを細胞核外の微小な DNA 蛍光斑点として間接的に検出する方法である。試験は陰性対照及び2種類のマイコプラズマ陽性対照と比較することにより判定を行う（図2）。DNA 染色法はマイコプラズマに特異的な検出法ではな

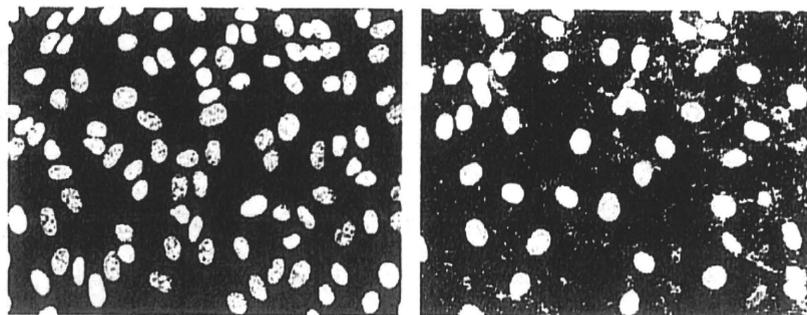


図2 マイコプラズマのDNA染色法による判定

（写真提供：㈱医薬基盤研究所・JCRB細胞バンク）

左：マイコプラズマ陰性 Vero 細胞，細胞核のみ蛍光染色されている

右：マイコプラズマ陽性 Vero 細胞，細胞核外にマイコプラズマ DNA が検出される

く、断片化した細胞由来 DNA や細菌の DNA も染色されるため、結果の判定には熟練を要するとされる。また、培養法と比べると検出感度は低い。しかし、細胞基材を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖する特性を有することが多く、培養法では増殖しにくいマイコプラズマでも検出できるという利点があり、国内外の公定書で採用されている。

5.2 指標細胞・陽性対照

指標細胞としては、比較的多くのマイコプラズマを積極的に増殖させて検出感度を高めることが可能な Vero 細胞を用いる。被検細胞が単層培養細胞の場合、その細胞を直接培養して DNA 染色を行うことも可能であるが、細胞の種類によってはマイコプラズマが感染していてもあまり増殖しない場合があるので注意が必要である。Vero 細胞と同等以上の検出感度があることを示せば、Vero 細胞以外の細胞を指標細胞として用いてもよい。Vero 細胞はマイコプラズマ混入を避けて注意深く培養し、多数の種ストックを作製して、マイコプラズマの混入を否定した後、凍結保存する。試験にはこのストックを解凍し、6 継代以内のものを使用しなければならない。また、試験の前には抗生物質を除いた培地で継代しておく。

DNA 染色法の検出感度は、陽性対照として 2 種類のマイコプラズマ、*M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC23714 又は同等の種又は株) を 100CFU 以下又は 100CCU 以下接種したものを検出することが必要とされる。これら陽性対照のうち、*M. hyorhinis* は培養細胞を高頻度に汚染していることから陽性対照とされているが、とりわけ DBS1050 株 (ATCC29052) は細胞への依存性が高く人工培地でのコロニー形成が難しいことが知られ、コロニー形成に基づく「100CFU 以下」という指標菌の接種量の設定が困難なことがあるかもしれない¹²⁾。ATCC29052 のインフォメーションシートには DBS1050 株を培養可能な培地を記載した論文¹⁴⁾ が示されているので、これに従って培養すれば、陽性対照としての接種量の設定も可能であろう。また、日局 15 第 2 追補の改正により、同じ *M. hyorhinis* でも DBS 1050 株とは異なりカンテン平板培地で増殖しやすい BTS-7 株 (ATCC17981) が陽性対照の例に追加されたので、BTS-7 を陽性対照として用いることもできる。もう一種類の陽性対照である *M. orale* (ATCC23714 又は同等の種又は株) は *M. hyorhinis* と異なり細胞吸着性が弱く、100CFU を接種しても陽性反応を示さないことがあるかもしれない¹²⁾。これは継代を繰り返して人工培地に順化しすぎたことが一因と考えられる。培養法の項でも述べたように、マイコプラズマは長期間の継代培養により性質が変化し、同じ菌株でも継代数や保存条件、供給元によっては試験に適さない可能性があるため、DNA 染色法の陽性対照となるマイコプラズマは公的又は適切と認められた機関より入手後、適切に管理された継代数の低いものを使用する必要がある。

5.3 実験操作

日局における DNA 染色法の試験操作法を表6に示す。日局では 35mm 径の培養ディッシュを用いた操作法が示されているが、同等の容器（チャンバースライドなど）を用いてもよい。その場合、細胞密度が過剰になるとマイコプラズマ DNA の検出が難しくなることから、容器の大きさを考慮して細胞の接種数を調節する必要がある。JIS¹⁾には 35mm 径の培養ディッシュの他に、60mm 径シャーレと 15.5mm 径のマルチウェルプレートを用いる場合の接種細胞数が規定されており参考にできる。検体としては被検細胞ではなく細胞培養上清を用いるが、これは細胞を接種した場合、細胞密度が過剰となるためである。また、Vero 細胞の培養に用いる血清はマイコプラズマの存在をあらかじめ否定したものを使用する必要がある。DNA 染色に用いる蛍光色素はビスベンズイミダゾール (Hoechst 33258) 又は同等の染色剤を用いる。JIS では DAPI (4'-ジアミノ-2-フェニルインドール・2 塩酸) が用いられる。

表6 日局 DNA 染色法の試験操作法

細胞培養～ 検体接種	①細胞培養用ディッシュ（直径 35mm）に滅菌したカバーグラスを無菌的に置く。 ② 10%ウシ胎児血清（マイコプラズマが検出されないもの）を含むイーグルの最少必須培地を用いて Vero 細胞懸濁液 1×10^4 細胞/ml を調製する。 ③カバーグラスを沈めた各培養ディッシュに Vero 細胞懸濁液 2 mL を接種し、5%炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 1 日培養し、細胞をカバーグラスに接着させる。 ④培地を新鮮な培地 2 mL と交換した後、試験検体（細胞培養上清）0.5 mL を培養ディッシュ 2 枚以上に添加する。陰性対照（非接種）と 2 種類の陽性対照についても同じ操作を行う。 陽性対照： <i>M. hyorhinis</i> (ATCC29052, ATCC17981 又は同等の種又は株) 及び <i>M. orale</i> (ATCC23714 又は同等の種又は株) 100CFU 以下又は 100CCU 以下 ⑤ 5%炭酸ガスを含む空气中、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 3～6 日間培養する。
細胞固定～ 染色	⑥各ディッシュより培養液を除去し、固定液（メタノール：酢酸（3：1））2 mL を加え、5 分間おく。 ⑦各ディッシュより固定液を除去し、再度同量の固定液を加え 10 分間おく。 ⑧固定液を除去し、完全に風乾する。 ⑨各ディッシュにビスベンズアミド (bisbenzamide) 蛍光染色液 2 mL を加え、室温で 30 分間おく。 ⑩染色液を除去し、蒸留水 2 mL で 3 回洗浄後、カバーグラスを取り出し乾燥する。 ⑪カバーグラスを封入液で封入する。
判定	⑫蛍光顕微鏡（400～600 倍又はそれ以上）で検鏡する。 ⑬検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較し、マイコプラズマ汚染の有無を判定する。 ⑭細胞核を囲むように微小な核外蛍光斑点を持つ細胞が 1000 個のうち 5 個（0.5%）以上あれば陽性と判定する。

6 PCR法 (NAT法)

6.1 原理・特徴

PCR/NAT (Nucleic Amplification Test; 核酸増幅検査)法は、検体から抽出したマイコプラズマ DNA を、マイコプラズマに特異的なプライマーを用いて増幅することで高感度に検出する方法である。日局には、感度と特異性を増すための方法として2段PCR法(ネステッドPCR法)が例示されており、増幅したDNAはアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、エチジウムブロマイド染色後、UV照射により検出する。PCR法は1、2日程度の短時間で検出が可能であり、検出感度と特異性に優れた試験法としてウイルス等の感染性病原体の高感度検出に多用されている。マイコプラズマ否定試験としては比較的新しい方法で、日局とJISに記載されているが、FDA/PTCにはない。EPにはNAT法が記載されている(6.4項参照)。

PCR法による検出の感度と特異性は使用するプライマーやDNA抽出条件、PCR反応条件に依存するため、多くの菌種を特異的に検出可能なプライマーの選択や反応条件の最適化が重要である。PCR法によるマイコプラズマの検出は、精製したゲノムに対しては感度が高く1-10コピーを検出可能であることが報告されているが、PCR反応にかけられるサンプル量が少ないこともあり、培養細胞中のマイコプラズマの検出感度は培養法やDNA染色法と比べて必ずしも高いとはいえないようである¹⁵⁾。また、PCR法は血清等に含まれるマイコプラズマの不活性菌(死菌)やマイコプラズマのゲノム断片も検出されるため、必ずしも生きたマイコプラズマを検出するとは限らない。日局には、感染性のある生きたマイコプラズマのDNAをPCRで高精度に検出する方法として、Vero細胞を用いて検体中のマイコプラズマを増殖させた後にPCRを実施する方法も例示されている。

6.2 プライマーの選択とPCR反応条件

プライマーはマイコプラズマに特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマに良く保存されている領域を対象にしたものを用いる必要がある。マイコプラズマのゲノムは異種間で良く保存されているrRNAオペロンを共有していることが知られている。そのため、比較的多くのマイコプラズマを検出する領域としてrRNAオペロン内の16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域^{2, 16)}、あるいは16S rRNA遺伝子領域^{15, 17)}から、広範囲のマイコプラズマ種に相溶性のある領域を選択したプライマーが使用される。日局には、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域を増幅する2段PCR用プライマーが例示されている。表7に日局例示のプライマー配列と、このプライマーを用いて代表的なマイコプラズマから検出される増幅断片のサイズを示す。マイコプラズマの菌種により2段PCRで得られる増幅断片のサイズは異な

第8章 細胞基材のマイコプラズマ試験

表7 日局例示の2段PCR法プライマーと代表的なマイコプラズマ菌種より検出されるPCR増幅断片^{7, 16)}

アウタープライマー

F1 : 5'-ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT-3'

R1 : 5'-CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAGGCAT-3'

インナープライマー

F2 : 5'-GTG(G/C)GG(A/C)TGGATCACCTCCT-3'

R2 : 5'-GCATCCACCA(A/T)A(A/T)AC(C/T)CTT-3'

菌種名	2段PCRによる増幅断片のサイズ
<i>M. arginini</i>	236bp
<i>A. laidlawii</i>	430bp, 223bp
<i>M. orale</i>	290bp
<i>M. fermentans</i>	365bp
<i>M. hyorhinae</i>	315bp
<i>M. salivarium</i>	269bp
<i>M. hominis</i>	236bp
<i>M. pirum</i>	323bp

り、さらに制限酵素消化を行うと細胞を汚染したマイコプラズマ菌種を推定することが可能である²⁾。日局例示の2段PCR用プライマーは培養細胞への汚染が知られているマイコプラズマの95%以上を検出できること、他の一般細菌とは交差反応しないことが確認されており、日本の公的細胞バンクの検査でも使用されている。JIS¹⁾も同様に16S-23S rRNA遺伝子間スペーサー領域のプライマーを用いた2段PCR法を規定しているが、局方とJISではF2プライマーが異なるため、得られる増幅断片のサイズは異なる。また、JISはマイコプラズマ用とは別にアコレプラズマ用のプライマーセットも規定している。一方、16S rRNA遺伝子領域を標的としたプライマーセットを用いた1段PCRにより、培養細胞を汚染するマイコプラズマを十分高感度に検出可能であるとの報告もある^{12, 15)}。

日局の2段PCR法の試験操作例を表8に示す。方法は、プライマーも含めて一例を示したものである。試薬や反応条件については、適切であることが確認されていれば、例示に限らずそれを使用してもよい。検体としては細胞懸濁液を用いる。テンプレートDNAの抽出はフェノール法が例示されているが、細胞からのDNA抽出が可能な方法であれば市販のDNA抽出キットを利用することも可能であろう。また、用いた方法の妥当性が立証され、感度と特異性など方法の詳細が示されれば、他のプライマーを用いることや、2段PCRではなく1段PCRとすることも可能である。PCR法によるマイコプラズマ測定用のキットも市販されているが、妥当性が検証

表8 日局2段PCR法の試験操作法例

テンプレートの調製	<p>①被験細胞懸濁液 600 μL をチューブにとり、細胞を 0.1% SDS 等で溶かし、同量の TE 緩衝液飽和フェノールを加え、混合する。</p> <p>②室温で 15000rpm, 5 分間遠心する。</p> <p>③上清 400 μL を別のチューブに移し、3 mol/L 酢酸ナトリウム 10 μL, 95% エタノール 1 mL を加え、十分に攪拌する。</p> <p>④ 15 分間水冷後、4 $^{\circ}$C で 15000rpm, 10 分間遠心する。</p> <p>⑤上清を除去し、沈殿を 80% エタノール 200~300 μL で 1~2 回洗浄する。</p> <p>⑥ 4 $^{\circ}$C で 15000rpm, 10 分間遠心後、上清を完全に除去し、沈殿を乾燥する。</p> <p>⑦沈殿を精製水 40 μL に溶解する。</p> <p>⑧陽性対照, 陰性対照についても同様の処理を行う。</p>
1 段目 PCR	<p>⑨一段目の PCR 反応液を混合し、1 本のチューブに 90 μL ずつ分注する。</p> <p>⑩調製したテンプレート 10 μL をとり、⑨のチューブ 1 本ずつに加える。</p> <p>⑪ 94 $^{\circ}$C で 30 秒間の変性, 55 $^{\circ}$C で 2 分間のアニーリング, 72 $^{\circ}$C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返し DNA 増幅を行う。</p>
2 段目 PCR	<p>⑫ 2 段目の PCR 反応液を混合し、1 本のチューブに 99 μL ずつ分注する。</p> <p>⑬ 1 段目の PCR を終了したチューブから、それぞれの生成物 1 μL をとり、⑫のチューブ 1 本ずつに加える。</p> <p>⑭ 94 $^{\circ}$C で 30 秒間の変性, 55 $^{\circ}$C で 2 分間のアニーリング, 72 $^{\circ}$C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返し DNA 増幅を行う。</p>
アガロースゲル電気泳動	<p>⑮ 1 段目及び 2 段目の PCR 生成物 10 μL を、泳動用色素液 2 μL と混合し、1% アガロースゲルで電気泳動を行う。</p> <p>⑯ゲルをエチジウムブロマイド染色し、紫外線照射条件下で写真撮影する。</p> <p>⑰ DNA バンドが検出された場合、陽性と判定する。</p>

PCR 反応液

	[1 段目]	[2 段目]
dNTP 溶液 (各 1.25mol)	16 μ L	16 μ L
Forward プライマー (10pmol/ μ L)	F1 2 μ L	F2 2 μ L
Reverse プライマー (10pmol/ μ L)	R1 2 μ L	R2 2 μ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (1U/ μ L)	2 μ L	2 μ L
反応緩衝液		
25mmol/L 塩化マグネシウム	8 μ L	8 μ L
10 倍緩衝液*	10 μ L	10 μ L
滅菌精製水	50 μ L	59 μ L
* 10 倍緩衝液の組成		
2-amino-2-hydroxymethyl-1,3,propandiol/HCl (pH8.4)		100mmol/L
塩化カリウム		500mmol/L
塩化マグネシウム		20mmol/L
ゼラチン		0.1g/L

されていればこれらのキットを利用することも可能であろう。使用方法の妥当性の検証、検出感度の検討にあたっては、マイコプラズマゲノム DNA の検出感度だけでなく、DNA 抽出効率等も含めて検体（細胞懸濁液）中のマイコプラズマの検出感度として検討する必要がある。

6.3 PCR 法による検出の注意点

PCR 法は非常に高感度な方法で数コピーから数十コピーの遺伝子を検出できるため、増幅産物による汚染等には細心の注意を払う必要がある。汚染を避けるため、DNA の抽出、試薬の保管・調製、PCR 増幅、増幅産物の検出は可能な限り独立した施設・設備を用い、増幅前の試料を取り扱う部屋と増幅産物を取り扱う部屋を区別することが望ましい。また試料に含まれる PCR 反応の阻害物質により偽陰性となる可能性にも注意が必要である。従って試験には必ず陰性対照と陽性対照を用いる。PCR 法の実施にあたっての一般的な注意点や PCR 法の妥当性の検証は、「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン」¹⁸⁾ や EP の NAT ガイドライン⁸⁾ を参考にできる。

6.4 EP のマイコプラズマ否定試験 NAT 法と NAT ガイドライン

EP には、培養法と DNA 染色法に加えて、2007 年に発行された Ver5.8 から NAT が新たにマイコプラズマ否定試験として追加された。NAT には様々な方法があるが、EP は NAT の具体的な試験法を規定する代わりに、マイコプラズマ検出のための NAT のバリデーション法に関するガイドラインを収載しており、用いる NAT はこのガイドラインに従って適切にバリデートされたものでなければならないとしている。NAT は細胞毒性のある試料の試験や工程管理試験として使用することができる。また、ガイドラインに従って適切なバリデーションが実施され、比較試験を行った方法であれば、培養法又は DNA 染色法の代替法として用いることも可能としている。

NAT のバリデーションでは、以下の点がポイントとなる。

- ① 特異性：NAT 検出の特異性はプライマー、プローブの選択に依存する。用いるプライマー、プローブが広範なマイコプラズマを検出し、マイコプラズマ以外の細菌類は検出しないことを示すことが求められる。特に、系統発生上マイコプラズマと近縁にあたる *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* を検出しないことを示す必要がある。
- ② 検出限界：マイコプラズマ標準品を用いて検出限界（陽性カットオフ値）を求める。培養細胞での汚染の出現頻度と系統発生上の観点から、検出限界のバリデーションに用いる最適な菌種の組み合わせを表 9 に示す。これらを用いて、10 倍希釈列を独立して 3 回以上作成し、各希釈段階について 24 回以上の試験を実施して、95% 以上の確率で陽性となるマイコ

表9 EPにおけるNATのバリデーションに用いるマイコプラズマ種の組合せ

- <i>A. laidlawii</i>
- <i>M. fermentans</i>
- <i>M. hyorhinae</i>
- <i>M. orale</i>
- <i>M. pneumoniae</i> 又は <i>M. gallisepticum</i>
- <i>M. arginini</i>
- <i>M. synoviae</i> (製造工程で鳥類由来製品の利用, 接触がある場合)
- <i>Spiroplasma citri</i> (製造工程で昆虫または植物由来製品の利用, 接触がある場合)

プラズマの量 (CFU 又はコピー数) を統計値として算出する。

- ③ 比較試験：NAT を培養法又は DNA 染色法の代替法として用いるには、表9のマイコプラズマ標準品を使用して培養法又は DNA 染色法と NAT との比較試験を実施する。培養法の代替法として用いるには、検出限界として 10CFU/ml (もしくはこれに相当するコピー数) を検出できること、DNA 染色法 (指標細胞培養法) の代替法として用いるには、100CFU/ml (もしくはこれに相当するコピー数) を検出できることを示す必要がある。

なお、NAT によるマイコプラズマの検出は多くの経験が積み重ねられているわけではなく、試薬メーカーにより一定の評価がなされた市販のキットを用いる場合でも、基本的には使用目的に応じたキットの検出限界、頑健性、交差反応性などについては使用者が評価を行うことが必要である。

NAT のコントロールとしては、内部標準と外部標準を用いる必要がある。内部標準は反応阻害がないことを確認するためのもので、適切な核酸配列を使用し、試料から核酸を抽出する前に添加して抽出、増幅、検出の全過程のコントロールとすることが望ましいとされる。外部標準としては、陰性対照とコピー数又は単位の定まった陽性対照を1種類以上用いることが必要である。

7 試験法の選択

これまで述べてきたように、培養法、DNA 染色法、PCR/NAT の各試験はいずれも長所と短所があり、単独の試験ではマイコプラズマの存在を否定するには十分ではなく、判定には複数の試験を併用することが必要である。医薬品の製造に用いる細胞基材、MCB、WCB、製造用細胞バンクのマイコプラズマ否定試験として、日局では、基本的には従来より実績のある培養法と DNA 染色法による試験の実施を求めている。しかし、DNA 染色法はマイコプラズマ以外の DNA も検出するため、DNA 染色法のみ陽性を示した場合には、PCR 法によりマイコプラズマの存在を否定することができるとしている。このようなバンク化された細胞では、試験に十分な

時間が取れることから特に迅速法を採用する必要はないと考えられる。EPやFDA/PTCも、細胞基材のマイコプラズマ否定試験としては複数の試験の実施を求めており、日局と同様、培養法とDNA染色法の併用を求めている（表2）。但し、6.4項で述べたように、EPではEP記載のNATガイドラインに従って適切にバリデートされた方法であれば、NATを培養法又はDNA染色法の代替法として使用することも可能としている。我が国においても、NAT法によるマイコプラズマ検出の十分なバリデーションが実施されれば、NATを培養法又はDNA染色法の代替法として使用しても差し支えないものと考えられる。なお、JISでは培養法又はDNA染色法とPCR法の併用を求めている。

一方、細胞治療に用いられる細胞・組織加工医薬品や、遺伝子治療において *ex vivo* で遺伝子導入を行った細胞を投与する場合にも、培養工程でのマイコプラズマ汚染の可能性があることからマイコプラズマ否定試験の実施が求められる。これらの細胞では、医薬品製造用の細胞基材とは異なり、細胞の調製から投与まで十分な時間がないことが多く、試験に時間がかかる培養法やDNA染色法によりマイコプラズマ否定試験を実施してから投与することは難しいと思われる。このような場合には、PCR法などの迅速検査によりマイコプラズマの存在を否定した上で投与することが現実的な対応である場合が多い。しかし、結果は投与後に得られることになるとしても、培養法などの複数の試験を併用することが望ましい。一方、細胞・組織加工医薬品等では、ロットあたりの細胞数が少なく、日局の記載のとおり検体を接種することが困難な場合もあるかもしれない。日局の培養法やDNA染色法は検体が大量に調製される細胞基材を対象として作成されており、少量の細胞培養しか行わないようなケースにまで適用することはむしろ妥当性でない場合があり、適宜製品の特徴に合わせた試験を実施することが合理的である。また、培養細胞のルーチンのモニタリングとしてマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、PCR法などの迅速検査が適している場合が多いと考えられる。

8 その他のマイコプラズマ検査法

マイコプラズマのPCR/NATを利用した検査法としては、2段PCR法以外にタッチダウンPCR法やリアルタイムPCR法などを利用した方法が開発されている。また、その他の検査法としてDNA-RNAハイブリダイゼーション法、ELISA法、電子顕微鏡法についてはJIS¹⁾に簡単な解説があるので参照されたい。一方、マイコプラズマ特有の酵素活性を基にした方法が簡易迅速検査法として研究用に市販され、培養細胞の汚染調査に使用されている⁶⁾。本法は、培養上清中のマイコプラズマの膜を溶解し、放出されるマイコプラズマ特有の酵素が特異的な基質に作用してADPからATPを産生することを利用し、産生されたATP量をルシフェリン・ルシフェラー

ゼ発光系により測定することで生きたマイコプラズマを検出する。本法はPCR法よりもさらに迅速・簡便であるが、感度はあまり高くないようであり、培養細胞のルーチンのモニタリングとして高度に汚染された細胞を迅速に発見するには有効な方法だと思われるが、あくまでも研究用としての用途に限られるようである。

局方で推奨されている細胞基材のマイコプラズマ検出手法は長期にわたる試験期間が必要であり、より迅速な検出手法とするために新たな手法がこれからも開発されてくると思われるが、既に市販されている手法も含め細胞基材の品質管理試験として利用するには厳密な妥当性の検証が求められる。

文 献

- 1) 日本規格協会, マイコプラズマの検出法-第1部:培養による直接検出法 JIS K 3810-1;第2部:DNA蛍光染色による間接検出法 JIS K3810-2;第3部:2段階PCRによる検出法 JIS K3810-3 (2003)
- 2) 原沢亮ほか, 蛋白質核酸酵素, 40, 2361 (1995)
- 3) 厚生省薬務局長, 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について(薬発第1062号 1995年11月15日, 厚生労働省医薬局長通知医薬発第0329004号 2002年3月29日改正, 薬食発第1228004号 2004年12月28日一部改正)
- 4) 厚生労働省医薬食品局長, ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について(薬食発第0912006号 2008年9月12日)
- 5) 厚生労働省医薬食品局長, ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について(薬食発第0208003号 2008年2月8日)
- 6) 小原有弘ほか, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 26, 159 (2007)
- 7) 厚生労働省, 第15改正日本薬局方第2追補, p222 (2009)
- 8) *European Pharmacopoeia* 6.1, 2.6.7. Mycoplasmas, p3317 (2008)
- 9) Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals, Attachment #2 : Recommended procedures for detection of mycoplasma contamination in biological products produced in cell substrates (1993)
- 10) 厚生労働省, 生物学的製剤基準, p278 (2009)
- 11) 厚生省医薬安全局審査管理課長, ICH Q5D「生物製品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来, 調製及び特性解析」(医薬審第873号, 平成12年7月14日)
- 12) 佐々木次雄ほか, 医薬品研究, 39 (5), 299 (2008)
- 13) 水澤博, バイオ医薬品及び産生細胞の品質・安全性評価法, p78, エル・アイ・シー (1992)

第8章 細胞基材のマイコプラズマ試験

- 14) R. S. Gardella *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1976 (1995)
- 15) J. A. Eldering *et al.*, *Biologicals*, **32**, 183 (2004)
- 16) R. Harasawa *et al.*, *Res. Microbiol.*, **144**, 489 (1993)
- 17) F. J. M. van Kuppeveld *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 149 (1994)
- 18) 厚生労働省医薬食品局長, 血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドラインについて (薬食発第 0803002 号平成 16 年 8 月 3 日)

JPTI 2010

The Japanese Pharmacopoeia Technical Information 15th Edition Supplement 1-2

日本薬局方 技術情報 2010 第十五改正第一追補/第二追補対応

財団法人 日本公定書協会 編

「日本薬局方技術情報 2010」の記述について

- 1 「日本薬局方技術情報 (JPTI)」は日本薬局方の規格、試験方法等の解釈及び試験操作上の注意事項等の技術的情報を掲載しています。2010年版では第十五改正日本薬局方の第一追補、第二追補及び一部改正を中心に技術的情報が必要な項目を選択してまとめています。なお、参考として技術情報の前には第十五改正以降の改正を反映させた条文を掲載しています。
- 2 通則、製剤総則、一般試験法、参考情報に関する技術情報としては、解説・解釈・試験操作上の注意点・考え方等を掲載しています。
- 3 医薬品各条については、生薬、添加物及びその他の必要な品目の情報のみに限定して関連する技術情報を掲載しています。特に確認試験、純度試験、定量法の項目ではご協力をお願いした企業から提供された実測データを掲載しています。
- 4 適否の判定に必要な情報として一部の生薬の鏡検写真を掲載し、また色調での判定の際の参考に供するために一部の生薬及び漢方処方エキス剤の確認試験の TLC データを掲載しています。
- 5 各記述については、原理・原則は簡潔な記載に留めてあります。
- 6 薬局方における国際調和の動向を記述しています。
- 7 本書に記述されている「商品名」などは、試験などを行う際の参考に示したものであり、特定の商品を推奨したり、代替可能な同等以上の他の商品を排除するものではありません。試験担当者の専門的な知識による裁量により、試験などを実施してください。

編 集 委 員	大久保恒夫	川西 徹	合田 幸広	小嶋 茂雄
	棚元 憲一	柘植 英哉	○寺尾 允男	徳永 裕司
	早川 堯夫	松田 芳久	四方田千佳子	
執筆者及び校閲者	青柳 伸男	内田恵理子	大内 正	大橋 史明
	岡田 敏史	川崎 ナナ	川原 信夫	木内 文之
	菊地 祐一	合田 幸広	小嶋 茂雄	小松かつ子
	近藤 健児	佐々木次雄	嶋田 康男	関口 道子
	棚元 憲一	徳永 裕司	那須 正夫	早川 堯夫
	淵野 裕之	松田 芳久	森口 展明	山口 進康
	山本 恵一	山本 恵司	山本 藤輔	四方田千佳子

○日本薬局方技術情報編集委員長

20. 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

局方条文

本文書は、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使用する細胞基材で細胞バンクを基にするものに対し、現段階で実施すべきと考えられるマイコプラズマ否定試験について述べたものである。

試験方法としては、A. 培養法、B. 指標細胞を用いたDNA染色法、C. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法が挙げられる。

本マイコプラズマ否定試験の対象は、マスター・セル・バンク(MCB)、ワーキング・セル・バンク(WCB)及び医薬品製造工程中の培養細胞である。これらに対して、A法とB法による試験を実施する。ただし、B法はマイコプラズマ由来以外のDNAも検出するので、B法のみ陽性を示した場合はC法によりマイコプラズマの存在を否定することも考えられる。この場合、C法に用いるプライマーその他の試薬や反応条件を含めた試験方法の選択、方法の感度と特異性及び検体調製の妥当性を含め、マイコプラズマの存在を否定できると判定した合理的な理由を示す必要がある。

マイコプラズマ否定試験を実施する前には、検体がマイコプラズマ発育阻止因子を有するかどうか試験しておく必要がある。発育阻止因子が含まれる場合には、遠心分離、細胞の継代などの適切な方法により発育阻止因子を中和あるいは除去する。

検体を採取後24時間以内に試験するときは2～8℃で、24時間を超える場合は-60℃以下で保存する。

マイコプラズマが検出された場合、種を同定するための試験を行えば混入の原因を推定するのに役立つ可能性がある。

A. 培養法

1. 培地

培養法にはカンテン平板培地と液体培地の両方を使用する。両培地にはペニシリン以外の抗生物質を使用してはならない。使用する培地としては、生物学的製剤基準に記載されているものを参考にすること。ただし、2.の培地の性能試験に適合するものであれば他の培地でもよい。

2. 培地の性能試験

試験に用いる培地については、各ロットごとにマイコプラズマの発育性能に関し、適性であるか否かの試験を実施する。そのためには、少なくとも2種類の既知の菌株、デキストロース分解マイコプラズマ(*M. pneumoniae* ATCC 15531又は同等の種又は株)とアルギニン分解マイコプラズマ(*M. orale* ATCC 23714又は同等の種

又は株)を陽性対照として加えた培地での試験をその都度実施し、これらの既知のマイコプラズマが検出できることを確認しておく必要がある。陽性対照試験に使用するマイコプラズマ株は、公的又は適切と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いもので、100 CFU(コロニー形成単位)以下又は100 CCU(色調変化単位)以下で培地に接種する。

3. 培養及び観察

1) カンテン平板培地1枚当たり検体(細胞懸濁液)0.2 mL以上を、プレートに均等に広がるように接種する。カンテン平板培地は1検体当たり2枚以上とする。検体を接種した後、カンテン平板培地表面を乾燥し、5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中(微好氣的条件)で、適切な湿度のもと36±1℃で14日間以上培養する。

2) 液体培地1本当り検体(細胞懸濁液)10 mL以上を、100 mLの液体培地を入れた容器に接種する。液体培地は1検体当たり1本以上とし、36±1℃で培養する。

被検細胞の培養液中に抗生物質などのマイコプラズマ発育阻止因子が含まれているような場合には発育阻止因子を除去する必要があるが、遠心処理などはそうした目的に適している。マイコプラズマ発育阻止因子の測定は、生物学的製剤基準に記載されているマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる。

3) 2)での培養開始後3日目、7日目及び14日目の計3回にわたり、それぞれ各液体培地より0.2 mLずつを採取し、カンテン平板培地各2枚以上に接種する。カンテン平板培地での培養は微好氣的条件で、36±1℃で14日間以上培養する。

4) 全カンテン平板培地を対象に7日目と14日目に100倍以上の倍率の顕微鏡でマイコプラズマの集落の有無を調べる。

B. 指標細胞を用いたDNA染色法

試験操作法の妥当性についてあらかじめ検討するため、培養Vero細胞に100 CFU以下又は100 CCU以下の*M. hyorhinis*(ATCC 29052, ATCC 17981又は同等の種又は株)及び*M. orale*(ATCC 23714又は同等の種又は株)を接種する。

マイコプラズマ汚染の検出に関して既知のものと同様以上の検出感度があることを示すデータがある場合は上記以外の指標細胞やマイコプラズマ菌株を本試験に使用することもできる。マイコプラズマ菌株は、公的又は適切と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いものにつき、接種単位をあらかじめ設定した上で使用しなければならない。細胞は適切と認められた細胞保存機関からマイコプラズマが検出されていないことを確認したデータと共に入手しなければならない。入手した細胞は、マイコプラズマ混入を避けて注意深く培養し、多数の種ストックを作製して、本文書で示すいずれか一つ以上の方法でマイコプラズマの混入を否定した後、凍

結保存する。試験にはこのストックを解冻し、6継代以内のものを使用しなければならない。

カバーグラスを沈めた培養ディッシュ又は同等の容器に指標細胞を接種し、1日増殖させる。この培養ディッシュ2枚以上に試験検体（細胞培養上清）1 mL以上を接種する。

試験には、陰性（非接種）対照及び2種類のマイコプラズマ陽性対照をおく。陽性対照には、例えば *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC 23714 又は同等の種又は株) 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下を使用する。

細胞は5%炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で3~6日間培養する。

カバーグラス上の培養細胞を固定後、ビスベンズイミダゾール (bisbenzimidazole) 又は同等の染色剤により DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡 (倍率 400~600 倍又はそれ以上) でマイコプラズマの存在を鏡検する。陰性対照及び陽性対照と検体を比較しマイコプラズマ汚染の有無を判定する。

方法

1) 細胞培養用ディッシュ (直径 35 mm) に滅菌したカバーグラスを無菌的に置く。

2) 10%ウシ胎児血清 (あらかじめマイコプラズマがないことを確認しておく) を含むイーグルの最少必須培地中に Vero 細胞が 1 mL 当たり 1×10^4 細胞となるように細胞懸濁液を調製する。

3) Vero 細胞懸濁液 2 mL を各培養ディッシュに接種する。このときカバーグラスを培地中に完全に沈め、培地表面に浮かないように注意する。細胞がカバーグラスに接着するよう 5% 炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で1日培養する。

4) 培地を新鮮な培地 2 mL と交換した後、試験検体 (細胞培養上清) 0.5 mL を培養ディッシュ2枚以上に添加する。陰性対照と陽性対照 (*M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC 23714 又は同等の種又は株) 等の2種類のマイコプラズマ) についても同じ操作を行う。

5) 培養液を5%炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で3~6日間培養する。

6) 各ディッシュより培養液を除去し、メタノール/酢酸 (100) 混液 (3:1) (固定液) 2 mL をそれぞれに加え、5分間放置する。

7) 各ディッシュより固定液を除去し、再度各ディッシュに同量の固定液を加え10分間放置する。

8) 固定液を除去し、すべてのディッシュを完全に風乾する。

9) 各ディッシュにビスベンズアミド (bisbenzamide) 蛍光染色液 2 mL を加え、ディッシュに蓋をして室温で30分間静置する。

10) 各ディッシュより染色液を吸引除去し、ディッシ

ュを蒸留水 2 mL で3回洗浄する。カバーグラスを取り出し乾燥する。

11) カバーグラスに封入液を滴加して封入する。余分な封入液をカバーグラスの端より吸い取る。

12) 400~600倍又はそれ以上の倍率の蛍光顕微鏡で観察する。

13) 検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較する。

14) 細胞核を囲むように微小な核外蛍光斑点を持つ細胞が1000個のうち5個 (0.5%) 以上あれば陽性と判定する。

C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法

PCR 法は、非常にわずかな量のマイコプラズマ DNA を特異的に検出することが可能な方法として現在ではよく知られており、細胞のマイコプラズマ汚染の検査法として、近年広く利用されてきている。しかし、その感度と特異性は採用した方法に依存し、また PCR で陽性反応を得てもそれは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。

PCR 法では培養細胞から得た DNA を特異的なプライマーを用いて増幅することによって目的 DNA の有無を検出する。試験の検出感度と特異性を高めるには2段 PCR 法 (ネステッド PCR 法) を用いることが望ましい。試験は陽性対照 (例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株)) と陰性対照を置き実施する。

細胞又は細胞培養液に含まれるマイコプラズマ DNA を増幅するにはマイコプラズマに共通な DNA 配列に対応するプライマーを用いる。増幅に際しては耐熱性 DNA ポリメラーゼのような適切なポリメラーゼを用い適切な条件下で反応を行う。増幅した DNA をアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射により検出する。

本法で重要な点は、マイコプラズマに特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマによく保存されている塩基配列に対応するプライマーを用いることである。例えばマイコプラズマの 16S-23S リボソーム遺伝子間のスペーサー領域等に対応するプライマーがある。

1次 PCR で陰性となった場合には、感度と特異性を高めるためネステッドプライマーを用いる2段 PCR 法を実施することが望ましい。

2次 PCR に用いるプライマーは内側配列部分のネステッドプライマーを選択する。アウトター及びインナープライマーは実験的又は文献的に有効性と特異性が証明されていなければならない。

なお、Vero 細胞を用いて検体中に存在する可能性があるマイコプラズマの増殖を図った後に PCR を行い、感染性マイコプラズマ由来の DNA の検出精度を高める方法もある。

以下に2段 PCR 法の例を示す。試薬や反応条件につ

いては、例示に限らず、適切であることが確認されている場合にはそれを使用してもよい。他の方法を使用する場合は、用いた方法の妥当性が立証され、その詳細が記載されていないと認められない。その中に方法の感度と特異性が示されていないと認められない。

操作法の例

1. テンプレートの調製

1) 被験細胞懸濁液（必要ならば Vero 細胞により継代する）600 μ L をチューブにとり、細胞を 0.1% SDS 等で溶かし、同量の TE 緩衝液（10 mmol/L トリス-塩酸（pH 8.0）、1 mmol/L EDTA）を飽和したフェノールを加え、混合する。

2) 室温で 15000 rpm、5 分間遠心する。

3) 上清 400 μ L を別のチューブに移し、3 mol/L 酢酸ナトリウム 10 μ L を加える。

4) エタノール（95）1 mL（2.5 倍量）を加え、十分に攪拌する。15 分間氷冷した後、4 $^{\circ}$ C で 15000 rpm、10 分間遠心する。

5) 上清を除去し、沈殿を 80% エタノール 200～300 μ L で 1～2 回洗浄し、洗液はピペットで除去する。4 $^{\circ}$ C で 15000 rpm、10 分間遠心後、上清を完全に除去し、沈殿を乾燥する。

6) 沈殿を精製水 40 μ L に溶解する。

2. 陽性対照、陰性対照についても同様の処理を行う。

3. 1 段階 PCR

1) 耐熱性 DNA ポリメラーゼ、dNTP 溶液、アウタープライマー、反応緩衝液（Mg イオンを含む）を混合し、1 本のチューブに 90 μ L ずつ分注する。

2) 調製したテンプレートより 10 μ L をとり、1 段階の PCR 反応液（90 μ L）を入れたチューブ 1 本ずつに加える。

3) 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の変性、プライマーに適した温度（例示のプライマーの場合は 55 $^{\circ}$ C）で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返して DNA 増幅を行う。

4. 2 段階 PCR

1) 耐熱性 DNA ポリメラーゼ、dNTP 溶液、インナープライマー、反応緩衝液（Mg イオンを含む）を混合し、1 本のチューブに 99 μ L ずつ分注する。

2) 1 段階の PCR を終了したチューブから、それぞれの生成物（1 μ L）をとり、2 段階の PCR 反応液（99 μ L）を入れたチューブ 1 本ずつに加える。

3) 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の変性、プライマーに適した温度（例示のプライマーの場合は 55 $^{\circ}$ C）で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返して DNA 増幅を行う。

5. アガロースゲル電気泳動

1) 1 段階及び 2 段階の PCR 生成物（10 μ L）を、泳動の先端を確認するための適当な色素液（2 μ L）と混合し、1% アガロースゲル電気泳動を行う。

2) アガロースゲルをエチジウムブロマイドにより染色し、紫外線照射条件下で写真撮影する。

3) DNA バンドが検出された場合、陽性と判定する。

[プライマーの例示]

・マイコプラズマ検出用

アウタープライマー

F1: 5'-ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT-3'

R1: 5'-CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCA
AGG-CAT-3'

インナープライマー

F2: 5'-GTG(G/C)GG(A/C)TGGATCACCTCCT-3'

R2: 5'-GCATCCACCA(A/T)A(A/T)AC(C/T)
CTT-3'

() は混合

[PCR 反応液]

	[1 段階目]	[2 段階目]
dNTP 溶液（各 1.25 mol）	16 μ L	16 μ L
プライマー（10 pmol/ μ L）	F1 2 μ L	F2 2 μ L
プライマー（10 pmol/ μ L）	R1 2 μ L	R2 2 μ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ （1 U/ μ L）	2 μ L	2 μ L
反応緩衝液		
25 mmol/L 塩化マグネシウム	8 μ L	8 μ L
10 倍緩衝液*	10 μ L	10 μ L
滅菌精製水	50 μ L	59 μ L

*10 倍緩衝液の組成

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル- 1,3-プロパンジオール・塩酸 （pH 8.4）	100 mmol/L
塩化カリウム	500 mmol/L
塩化マグネシウム	20 mmol/L
ゼラチン	0.1 g/L

[Vero 細胞中でマイコプラズマを増殖させる方法]

1) 試験検体、陽性対照及び陰性対照について、それぞれ 2 枚以上のディッシュを使用する。

2) 細胞培養用ディッシュ（直径 35 mm）に、10% ウシ胎児血清（PCR によりあらかじめマイコプラズマ DNA が検出されないことを確認しておく）を含むイーグル最少必須培地を用いて調製した Vero 細胞懸濁液（ 1×10^4 細胞/mL）を 2 mL ずつ加え、5% 炭酸ガスを含む空气中、 36 ± 1 $^{\circ}$ C で 1 日培養する。

3) 古い培地を新鮮な培地と交換し、試験検体（細胞培養上清）0.5 mL を Vero 細胞の培養ディッシュ 2 枚以上に接種する。陽性対照（例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis*（ATCC 29052、ATCC 17981 又は同等の種又は株））と陰性対照についても同じ操作を行う。

4) 試験検体、陽性対照並びに陰性対照を接種した