マイコプラズマ qPCR 検出キット（プローブ法）

テクニカル

制品名：マイコプラズマ qPCR 検出キット（プローブ法）

商品番号：MY0001-50

プロダクトモデル：50T/box

カタログ

一、制品紹介

マイコプラズマ検査用キット（qPCR 法）は、蛍光定量 PCR 技術に基づき、マイコプラズマ DNA をマルチプレックス PCR 法で検出します。本キットは、柔膜菌綱（Mollicutes）に属する複数のマイコプラズマ、アコレステロプラズマ（Acholeplasma spp）、スピロプラズマ（Spiroplasma spp）など、多種多様なマイコプラズマを検出可能です。

配列照合により、100 種類以上のマイコプラズマ DNA 配列をカバーしており、検出性能が確認されています。欧州薬局方 EP2.6.7、日本薬局方<G3>、米国薬局方<63>、および「ヒト由来幹細胞製品に関するガイドライン 2023」の基準に基づき、マイコプラズマ・オラル（10 CFU/mL）、マイコプラズマ・ニューモニアエ、マイコプラズマ・ヒプノシス（5 GC/反応）、アコレステロプラズマ・レイ（0.5 fg/反応）、マイコプラズマ・フェルメンタンス（0.5 fg/反応）、マイコプラズマ・サリアリス（5 fg/反応）、マイコプラズマ・アルギニナム（5 fg/反応）、マイコプラズマ・ホミニスを含む 8 種類のマイコプラズマが検出可能です。また、マイコプラズマ生殖体、ウレアプラズマ・ウレアリティカム、ウレアプラズマ・パルバムの検出も可能です。本キットは高感度で特異性が高いという特徴があります。

本キットは、マイコプラズマの標的配列と内部参照を検出するために、FAM と HEX の 2 種類の蛍光プローブを使用します。FAM チャネルはマイコプラズマの特異的増幅を、HEX チャネルは内部参照の増幅を検出します。内部参照は PCR 反応中に加えることができ、サンプル中に PCR 抑制要素が含まれることによる偽陰性を防ぐために使用されます。また、サンプル抽出段階で添加し、抽出効果を評価し、抽出不良による偽陰性を排除するためにも使用可能です。

本製品は、当社開発の 2 種類のマイコプラズマ核酸抽出キットと組み合わせて使用することで、サンプル中のマイコプラズマ DNA を効率的に抽出し、異なるサンプルマトリックスの干渉を排除し、検査感度を向上させます。

二、目的用途

本キットは、マスター細胞バンク、ワーキング細胞バンク、ウイルスシードバッチ、コントロール細胞、および臨床治療用細胞のマイコプラズマ汚染の検出に使用できます。また、培地、細胞培養物、生物学的製品などのマイコプラズマ汚染を定性的に検出するためにも適用されます。

三、参照標準

『中国薬典 3301 マイコプラズマ検査法』
『中国薬典 9201 薬品微生物検査代替方法検証指導原則』
『欧州薬局方 EP2.6.7』
『日本薬局方<G3>』
『米国薬局方<63>』
「ヒト由来幹細胞製品に関するガイドライン 2023」

四、性能検証

『中国薬典 9201 薬品微生物検査代替方法検証指導原則』を参照し、試薬キットの専属性、検出限界、再現性と耐久性に対して検証を行いました。

4.1 検出限界

この検証により、友康マイコプラズマ健康検査キットの感度は、以下の基準で安定して検出できることが確認されました：10 CFU/mL の口腔マイコプラズマ、5 GC/反応のマイコプラズマ豚鼻標準品、0.5 fg/反応のライ式アコレステロプラズマゲノム DNA、0.5 fg/反応のマイコプラズマ唾液ゲノム DNA、5 fg/反応のマイコプラズマ発酵ゲノム DNA、および 5 fg/反応のマイコプラズマアルギニンゲノム DNA。

培養法と比較して、口腔マイコプラズマの検出感度は 10 倍向上しており、安定して 10 倍の感度で検出できます。例えば、10^-5 希釈の口腔マイコプラズマに対する本キットの検出結果は陽性でしたが、従来の培養法では 10^-4 で変色が確認され、10^-5 希釈では変色が見られませんでした。

さらに、バイオインフォマティクス分析により、本キットは 100 種類以上のマイコプラズマ DNA 配列をカバーできることが確認されています。

4.1.1 10CFU 口腔マイコプラズマ参照品の検証

1）方法

ドイツ MB 感度参考品 10CFU の口腔マイコプラズマ不活化乾燥粉末（商品番号：102-2003）を調達し、凍結乾燥粉末を 1mL の DMEM 培地（自作）及び当社培地製品である NK 細胞無血清培地 5.0（商品番号 NC0102）に 10CFU/mL 濃度で再溶解し、2 つの基質でそれぞれ 1CFU/mL に希釈して測定しました。

計 4 個のサンプルを、Youkang 核酸抽出試薬（磁気ビーズ法、商品番号：MK0103-50）で抽出した後、検査を行い、市販品と比較して結果を検証しました。

2）比較検証結果

2 種類の抽出方法で抽出した後、友康が自社開発した支原健康診断テスト剤キットと市販の支原健康診断テスト剤キット（組み合わせの抽出キット）を比較検証しました。結果、市販のキットの性能と一致し、友康が自社開発したマイコプラズマ健康診断試験剤キットは 1、10CFU/mL の口腔マイコプラズマを安定して検出することができ、3 回繰り返しの結果は一致しました。

検証データは次の表に示されます：

市販品検証結果 1(Ct 値)		
	マイコプラズマ	内参照対照
1CFU-NK5.0 マトリックス	**34.3**	30.42
10CFU-NK5.0 マトリックス	**32.1**	30.56
1CFU-DMEM マトリックス	**35.28**	30.3
10CFU-DMEM マトリックス	**33.17**	30.4

ユーコン製品検証結果 1(Ct 値)		
	マイコプラズマ	内参照対照
1CFU-NK5.0 マトリックス	**32.21**	28.69
10CFU-NK5.0 マトリックス	**30.16**	25.65
1CFU-DMEM マトリックス	**35.48**	25.31
10CFU-DMEM マトリックス	**31.28**	26.22

陽性対照	**24.66**	30.65
NTC	**NoCt**	NoCt

陽性対照	**27.89**	24.13
NTC	**NoCt**	NoCt

市販品検証結果 2（Ct 値）		
	マイコプラズマ	内参照対照
1CFU-NK5.0 マトリックス	**33.16**	29.98
10CFU-NK5.0 マトリックス	**31.32**	30.37
1CFU-DMEM マトリックス	**32.73**	30.24
10CFU-DMEM マトリックス	**32.02**	30.24
陽性対照	**23.13**	25.6
NTC	**NoCt**	NoCt

ユーコン製品検証結果 2（Ct 値）		
	マイコプラズマ	内参照対照
1CFU-NK5.0 マトリックス	**32.51**	28.77
10CFU-NK5.0 マトリックス	**30.18**	26.21
1CFU-DMEM マトリックス	**35.19**	24.27
10CFU-DMEM マトリックス	**31.76**	25.9
陽性対照	**28.63**	24.74
NTC	**NoCt**	NoCt

市販品検証結果 3（Ct 値）		
	マイコプラズマ	内参照対照
1CFU-NK5.0 マトリックス	**35.16**	29.98
10CFU-NK5.0 マトリックス	**31.12**	30.37
1CFU-DMEM マトリックス	**33.73**	30.24
10CFU-DMEM マトリックス	**32.32**	30.24
陽性対照	**23.13**	25.6
NTC	**NoCt**	NoCt

ユーコン製品検証結果 3（Ct 値）		
	マイコプラズマ	内参照対照
1CFU-NK5.0 マトリックス	**32.8**	NoCt
10CFU-NK5.0 マトリックス	**29.98**	27.02
1CFU-DMEM マトリックス	**35.22**	25.25
10CFU-DMEM マトリックス	**31.63**	26.59
陽性対照	**28.43**	25.72
NTC	**NoCt**	NoCt

また、友康急速核酸（DNA）抽出キット（商品番号：NM0003）は、NK 細胞無血清培地 5・0 基質の 10CFU/mL の口腔マイコプラズマに対して核酸抽出を行い、検査検証を行ったところ、安定して検出することができました。

結論：当社が開発したマイコプラズマ検査キットは、口腔マイコプラズマ検査の感度は 10CFU/mL に達することができました。

4.1.2 培養法との対比感度

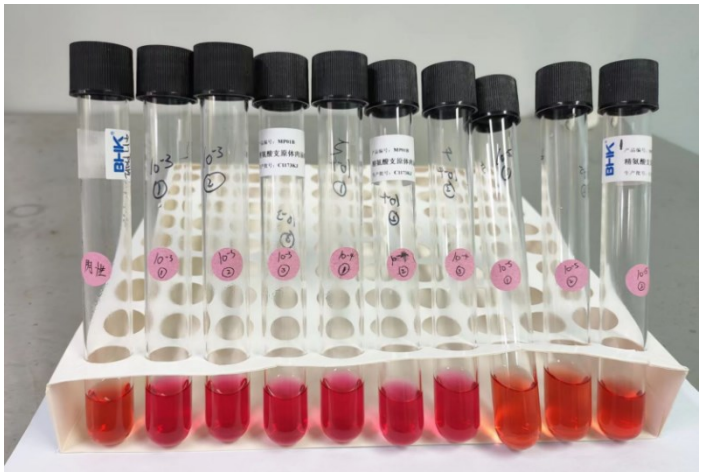
中国薬典 2020 版 3301 を参照し、対応するマイコプラズマ培地を調達して口腔マイコプラズマ（ATCC23714）を培養した。凍結乾燥粉末を蘇生させた後に培養し、2 世代の盲伝後、培養物を 10 に希釈した。、10、103 つの希釈倍数、それぞれ 3 チューブを用意し、37℃で 28 日間培養した結果 10 倍数の 3 管は陰性（変色なし）で、その他はすべて陽性でした。

接種後の異なる濃度のサンプルは、それぞれ検出キットで直接検出し、サンプル抽出後に検出した結果、抽出せずに直接検出した感度は培養法と一致し、10 でした。；サンプルを抽出した後、安定して 10 を検出することができます。倍数希釈したサンプルは、感

度が 10 倍向上しました。

1）培養法結果

2 世代の盲検伝達された口腔マイコプラズマは、10 に希釈されました。10、103 つの希釈倍数を 37℃で培養し、7 日目まで培養した結果は以下の図で、たった 10倍数希釈濃度は変色していない；28 日間まで培養を続け、結菓は 7 日目の結菓と一緻した。培養法の感度は 10 に達します、中国薬典の要求に合致しています。



口腔マイコプラズマ培養結果

培養前の異なる濃度の口腔マイコプラズマ培養物、直接検出データは以下の通りです。

異なる濃度の口腔マイコプラズマの直接検出結果（Ct 値）		
異なる希釈倍数	**マイコプラズマ**	内参照対照
10^{-3}	**34.50**	32.62
10^{-3}	**35.34**	32.71
10^{-3}	**35.86**	32.83
10^{-4}	**37.28**	32.82
10^{-4}	**38.61**	32.29
10^{-4}	**39.65**	32.45
10^{-5}	**41.90**	32.56
10^{-5}	**NoCt**	32.61
10^{-5}	**NoCt**	32.44
陽性対照	**31.65**	32.01
陰性対照	NoCt	NoCt

直接検出の感度は培養法と一緻し、10 に達することができます。

2）2 種類の抽出法を用いて 3 濃度の口腔マイコプラズマ培養物を抽出し、データは以下の通りです。

	口腔マイコプラズマ培養物抽出後の検査結果	
実験 1	磁気ビーズ法による抽出結果（Ct 値）	一体管抽出結果（Ct 値）

異なる希釈倍数	マイコプラズマ	内参照対照	マイコプラズマ	内参照対照
10^{-3}	**26.30/26.26**	26.48/26.58	**28.47/28.11**	32.58/32.43
10^{-4}	**29.84/30.01**	27.48/27.77	**31.97/32.23**	32.21/32.63
10^{-5}	**32.15/32.48**	27.06/27.46	**36.46/34.98**	32.91/33.14
実験 2	磁気ビーズ法による抽出結果（Ct 値）		一体管抽出結果（Ct 値）	
異なる希釈倍数	マイコプラズマ	内参照対照	マイコプラズマ	内参照対照
10^{-3}	**27.22/27.22**	27.07/27.19	**30.15/30.16**	33.53/33.56
10^{-4}	**30.38/30.37**	27.06/27.16	**34.16/33.10**	34.03/33.56
10^{-5}	**32.63/33.26**	26.97/27.07	**35.97/36.89**	33.04/33.11
陽性対照	**30.56/30.45**	31.55/31.70		
陰性対照	**NoCt**	NoCt		

培養前の異なる濃度の口腔マイコプラズマ培養物は、抽出後に各サンプルをそれぞれ複合孔を検査し、2 人が実験を繰り返しました。結果データは繰り返すことができ、2 種類の抽出方法で抽出したサンプルは、検出システムがいずれも安定して検出することができます。

4.1.3 マイコプラズマピノナス標準品の検証

1）方法

ドイツ MB からの定量的な Mycoplasma hynosis ゲノム DNA、ドライパウダー形態 10 の調達 ^{8}GC/vial（商品番号：52-0130）、Tris Buffer 100 μ L（pH8.5、10mM）で再溶解した后、濃度 10GC/μ L。10 倍の勾配に従って順次 1GC/μ L まで希釈して検証しました。

注：GC（ゲノムコピー数）と CFU（コロニー形成単位）の相関関係について、理論的には GC：CFU の比率は 1：1 であるべきです。理想的には、1 つの細胞ごとに GC を検出する必要があります。しかし、実際には、製剤中の死細胞 DNA の検出を防ぐために、マイコプラズマを早期の指数増殖期に収穫しても、この比率は達成されません。これは、多くのマイコプラズマ細胞が培地中でコロニーを形成せず、検出されないためです（すなわち、生きているが培養不可能な細胞）。さらに、マイコプラズマ細胞は凝集体を形成しやすく、複数の細胞が結合しているため、1 つの CFU として検出されても、実際には複数の GC が存在しています。

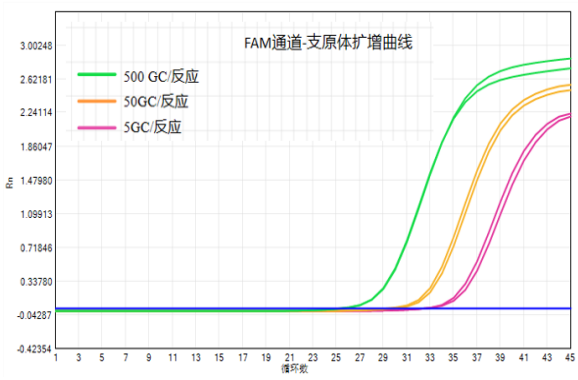
サドリスの検証報告によると、9 種類のマイコプラズマにおいて、1 CFU あたり約 9～68 個の GC が存在することが確認されています。詳細は次の図を参照してください。

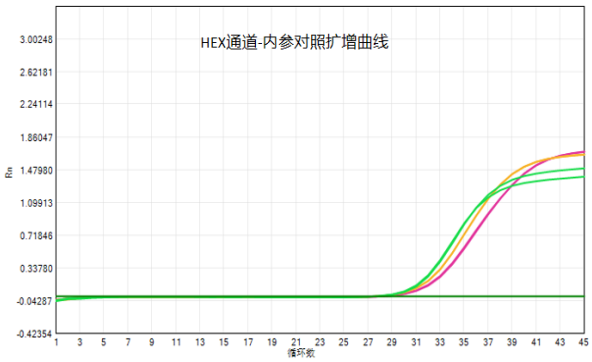
2）検証結果

友康が自社で開発した支原健康診断テスト剤キットで各濃度勾配を検出し、検出限界の検証を行った。このうち、FAM チャネルはマイコプラズマを検出し、HEX チャネルは内部参照を検出した。 実験を 3 回繰り返し検証し、キットは 5GC/反応を安定して検出することができました。

結論：マイコプラズマ豚の定量ゲノム DNA の検出限界は 5GC/反応に達することができます。

マイコプラズマピンの標準品検証データ		
濃度	マイコプラズマ	内参照対照
5×10^{2}GC/反応	27.84	30.96
	27.75	30.76
5×10^{1}GC/反応	31.90	31.22
	32.17	31.17
5GC/反応	35.04	31.64
	34.58	31.78
陽性対照	28.57	31.09
NTC	ノーCt	ノーCt





4.1.4 マイコプラズマゲノム DNA 検出感度検証

制品名	商品番号	仕様
コレステラプラズマレイの 10ng ゲノム DNA	51-0116	10ng±2ng/箱
10ng 発酵マイコプラズマゲノム DNA	51-0117	10ng±2ng/箱
10ng アルギニンマイコプラズマゲノム DNA	51-0129	10ng±2ng/箱
10ng マイコプラズマ唾液ゲノム DNA	51-0113	10ng±2ng/箱

1）方法

ドイツ MB からコレステラプラズマレイの 10ng ゲノム DNA、マイコプラズマ fermenta の 10ng ゲノム DNA を調達します

、マイコプラズマアルギニンゲノム DNA 10ng、マイコプラズマ唾液ゲノム DNA 10ng を 100 μ L の Tris-HCL 緩衝液（pH8.5、10mM）で再溶解した後、濃度 0.1ng/μL で用意しました。

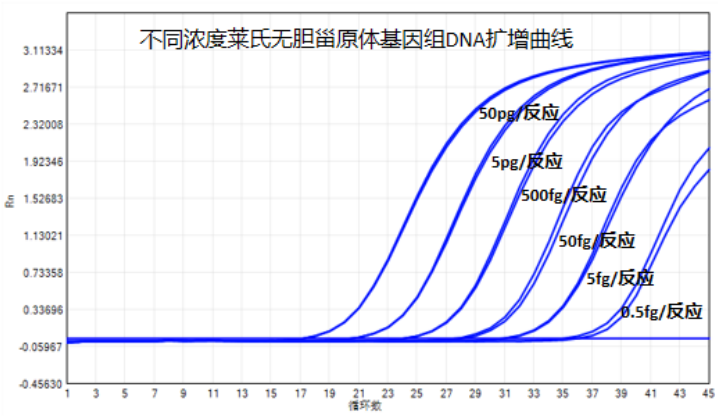
0.1ng/μ L の 4 種類のゲノム DNA を順次 10 倍希釈し、10-10 異なる濃度を直接測定系に添加して比較検証を行い、サンプルの添加量は 5 μ L であった。説明書に従って検査システムを調製し、増幅後に検査データをまとめて分析しました。

2）検証結果

友康支原健康診断テスト剤キットで各濃度勾配を検出し、検出限界の検証を行いました。このうち、FAM チャネルはマイコプラズマを検出し、分析すべき増幅データです。

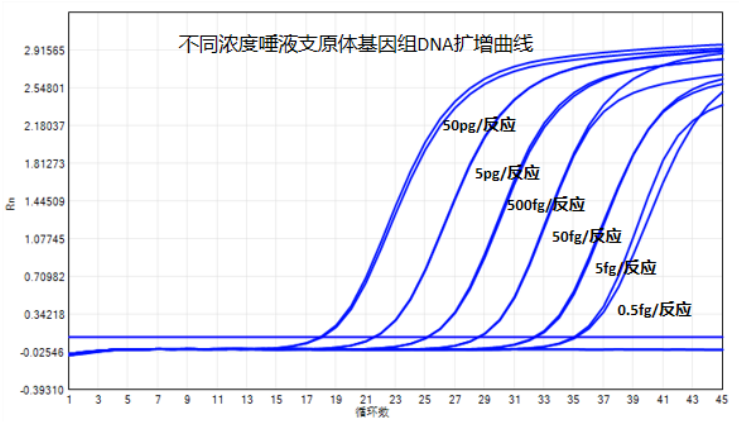
異なる濃度のコレステラプラズマレイのゲノム DNA 増幅データと曲線は次の図を参照して、0.05fg/反応増幅結果は陰性で、0.5fg/反応は安定して増幅することができて、結果は陽性です。

コレステラプラズマレイのゲノム DNA 検証データ	
ゲノム DNA 濃度	マイコプラズマ
50pg/反応	17.17
	17.16
5pg/反応	20.4
	20.47
0.5pg/反応	24.04
	24.09
50fg/反応	27.55
	28.02
5fg/反応	30.93
	30.75
0.5fg/反応	35.01
	35.96
0.05fg/反応	NoCt
	NoCt
陽性対照	29.71
	30.2
陰性対照	NoCt
	NoCt



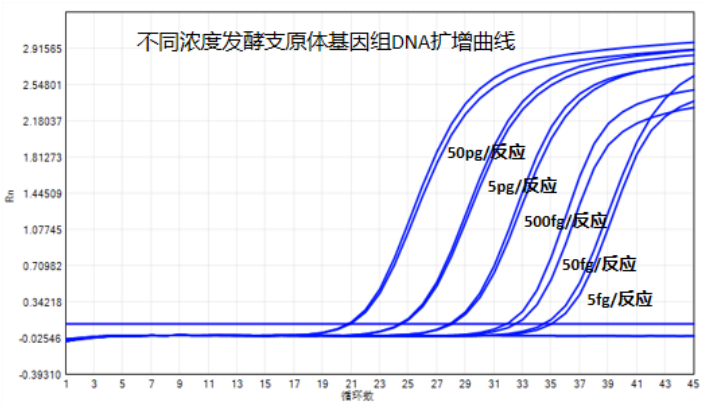
異なる濃度の唾液マイコプラズマゲノム DNA 増幅データと曲線は次の図を参照して、0.05 fg/反応増幅結果は陰性で、0.5 fg/反応は安定して増幅することができて、陽性増幅結果です。

マイコプラズマ唾液ゲノム DNA 検証データ	
ゲノム DNA 濃度	マイコプラズマ
50pg/反応	18.06
	17.93
5pg/反応	21.57
	21.55
0.5pg/反応	25.16
	25.15
50fg/反応	28.6
	28.57
5fg/反応	32.42
	32.31
0.5fg/反応	**35.16**
	35.04
0.05fg/反応	NoCt
	NoCt
陽性対照	29.98
	30.24
陰性対照	NoCt
	NoCt



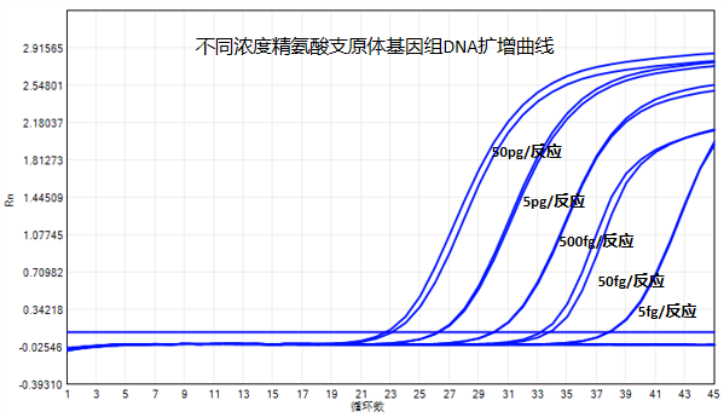
異なる濃度の発酵マイコプラズマゲノム DNA 増幅データと曲線は次の図を参照して、0・05fg/反応、0.5fg/反応増幅結果は陰性で、5fg/反応は安定して増幅することができて、陽性増幅結果です。

マイコプラズマ発酵ゲノム DNA 検証データ	
ゲノム DNA 濃度	マイコプラズマ
50pg/反応	20.76
	20.95
5pg/反応	24.49
	24.38
0.5pg/反応	28.05
	27.88
50fg/反応	32.48
	31.88
5fg/反応	**34.46**
	35.03
0.5fg/反応	NoCt
	NoCt
0.05fg/反応	NoCt
	NoCt
陽性対照	30.21
	30.25
陰性対照	NoCt
	NoCt



異なる濃度のマイコプラズマアルギニンゲノム DNA 増幅データと曲線は次の図を参照して、0.05fg/反応、0.5fg/反応増幅結果は陰性で、5fg/反応は安定して増幅することができて、陽性増幅結果です。

マイコプラズマアルギニンゲノム DNA 検証データ（Ct 値）	
ゲノム DNA 濃度	マイコプラズマ
50pg/反応	22.65
	23.08
5pg/反応	26.2
	26.26
0.5pg/反応	30.02
	30.04
50fg/反応	33.19
	33.77
5fg/反応	**37.80**
	37.87
0.5fg/反応	NoCt
	NoCt
0.05fg/反応	NoCt
	NoCt
陽性対照	30.21
	29.96
陰性対照	NoCt
	NoCt



結論：ライ式無コレステラプラズマ、唾液マイコプラズマの検出限界は 0.5fg/反応に達し、発酵マイコプラズマ、アルギニンマイコプラズマの検出限界は 5fg/反応に達しました。

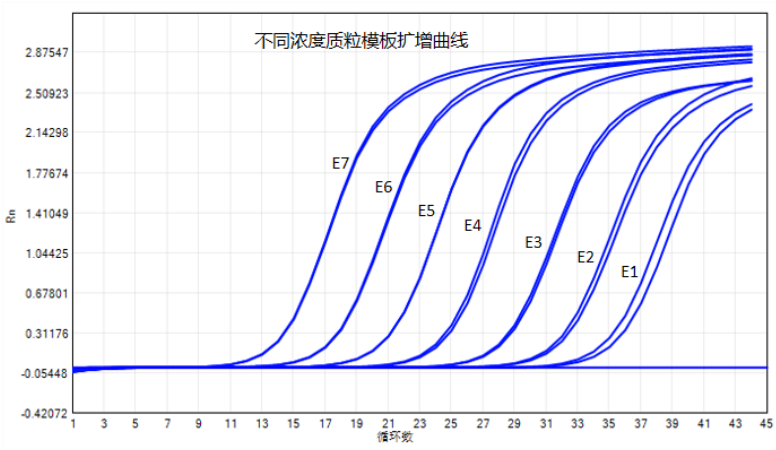
4.1.5 マイコプラズマ肺炎のプラズミドテンプレート感度の検証

1）方法

マイコプラズマ肺炎 16S 遺伝子配列を参照し、合成プラスミドテンプレートを設計し、元の濃度は E10）、10 倍希釈後 E9、順次 10 倍の勾配希釈を行いました。希釈後のプラスミドテンプレートは、被検査試料として検出される。システム調製は説明書に従って行い、サンプル量は 5μL としました。

2）検証結果

下図は E7 濃度の 10 倍勾配希釈から E1 濃度までの各濃度の増幅曲線データであり、E1 濃度で安定して増幅することができ、プラスミドテンプレートの検出限界は E1 濃度）。増幅曲線は以下の通りです。



4.2 特異性

検出限界検証データと結合し、試薬キットは薬局方及び指導原則が要求する 8 種類のマイコプラズマを検出することができ、口腔マイコプラズマ、肺炎マイコプラズマ、豚鼻マイコプラズマ、ヒト型マイコプラズマ、ライ氏無コレステロプラズマ、発酵マイコプラズマ、唾液マイコプラズマとアルギニンマイコプラズマを含む。また、マイコプラズマ生殖体、ウレアプラズマウレアリタイム、ウレアプラズマミクロの検出も可能であることが検証されました。

検証の結果、マイコプラズマ進化樹に近い種（例えば、アセトブトノールクロスト

リジウム、ラクトバシルスアシドフィラス、肺炎連鎖球菌）とは交差反応がなく、他のよく見られる細菌（黄色ブドウ球菌、緑膿菌、枯草菌、スポリウム菌、大腸エシリーチア）、真菌（カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・ナイガー）及び細胞 DNA（NK 細胞、293 細胞及び幹細胞の DNA）とは交差反応がないことが示されました。

4.2.1 その他のマイコプラズマ検査

1）方法

ウレアプラズマミクロ、ウレアプラズマウレアリタイム、ヒト型マイコプラズマは中国食品薬品検定研究院が提供した第 2 世代ヒトウレアプラズマ核酸検査国家参考品のうち陽性参考品、陰性参考品であり、いずれも病原体サンプルです。 友康磁気ビーズ抽出キットの説明書に従ってサンプル核酸抽出を行い、抽出前に検査キットの内参照対照を加え、抽出産物を測定対象サンプルとし、友康支原健康診断試験剤キットの説明書に従って検査を行いました。

Mycoplasma genitalium は自家制 Mycoplasma genitalium プラズミドテンプレートを使用し、10 を使用した copies/反応濃度は、測定対象サンプルとして、直接測定系に添加して測定しました。

2）検証結果

本キットはマイコプラズマ人型、ウレアプラズマウレアリタイム、ウレアプラズマミクロとマイコプラズマ生殖体を検出することができ、各サンプルは複数の穴をテストし、増幅データと曲線は以下の通りです。

その他のマイコプラ検証結果（Ct 値）			
マイコプラズマの種類	濃度	マイコプラズマ	内参照対照
マイコプラズマヒモニタイプ	濃度不明	28.13	23.84
		28.11	23.91
ウレアプラズマウレアリタイム	1 × 106CCU/mL	25.16	24.19
		25.02	23.93
ウレアプラズマミクロ	1 × 106CCU/mL	25.12	23.46
		24.8	23.07
マイコプラズマ生殖器	106 コピー/反応	30.64	22.36
		30.12	22.58
陽性対照		29.43	24.19
		29.26	23.93
NTC		ノーCt	ノーCt
		ノーCt	ノーCt

2.42 近親株との交差反応検証

1）方法

EU 薬局方が検証することを推奨する 3 つの近親菌株の定値菌液を調達し、元の濃度は 10 である ^{9}CFU/mL、DMEM 培地で 10 に希釈した ^{4}-10^{2}CFU/mL その後、当社磁気ビーズ法核酸抽出キットを用いて抽出して検証しました。

使用菌種の詳細は以下の通りです。

菌種名	商品番号	オリジナル番号	濃度
ラクトバシルスアシドフィラ *(La Ct obacillus acidophilus)*	TS325096	CICC6085	10^9CFU/mL
クロストリジウムアセトブタノール菌 *(Clostridium acetobutylicum)*	TS275216	CICC8011	10^9CFU/mL
肺炎連鎖球菌 *(Streptococcus pneumoniae)*	TS274157	ATCC49619	10^9CFU/mL

2）検証結果

検証の結菓、3 つの近親者の菌株と交差反応がなく、キットの特異性が比較的に良いことがわかった。

詳細データは以下のとおりです。

FAM チャネルはマイコプラズマ増幅チャネルであり、3 種類の菌株の 3 濃度ではいずれも陰性結果を示し、交差反応はありませんでした。

マイコプラズマ検出系特異性検証結果(Ct 値)						
	肺炎連鎖球菌		ラクトバシルスアシドフィラ		クロストリジウムアセトブタノール菌	
濃度（単位：CFU/mL）	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
10^4	**ノーCt**	29.43	**ノーCt**	30.36	**ノーCt**	29.05
	ノーCt	29.8	**ノーCt**	30.09	**ノーCt**	29.3
10^3	**ノーCt**	28.76	**ノーCt**	30.07	**ノーCt**	28.84
	ノーCt	28.77	**ノーCt**	30.03	**ノーCt**	28.5
10^2	**ノーCt**	31.51	**ノーCt**	30.74	**ノーCt**	28.27
	ノーCt	31.6	**ノーCt**	30.40	**ノーCt**	28.01

4.2.3 細菌・真菌との交差反応の検証

1）方法

当社が保存している薬局方で要求された無菌検査に関連する 4 株及び 2 株の真菌株について、菌株を採取し、友康磁気ビーズ抽出キットの説明書に従ってサンプル核酸抽出を行い、抽出前に検査キットの内参照対照を加え、抽出物を測定対象サンプルとし、友康支原健康診断検査剤キットの説明書に従って検査を行いました。

2）検証結果

結菓：すべての菌株の増幅結菓はすべて陰性であり、マイコプラ健康診断テスト剤キットの特異性は比較的に良好です。増幅データは次の表に示されています。

その他の一般的な細菌、真菌の検証結果（Ct 値）				
シリアル番号	菌種名	菌種番号	マイコプラズマ	内参照対照
1	*黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus*	CMCC(B)26003	ノーCt	29.15

2	銅 グリーン フェイク シングル 細胞 *菌 Pseudomonas aeruginosa*	CCMCC (B) 10104	ノーCt	29.23
3	*枯草菌 Bacillus subtilis*	CMCC(B)63501	ノーCt	29.84
4	*大腸エシリチア菌 Escherichia coli*	CMCC(B)44102	ノーCt	28.56
5	ホワイト 色 読む ビーズ *Candida albicans*	CCMCC(F)98001	ノーCt	28.27
6	*アスペルギルスナイガーAspergillus niger*	CMCC(F)98003	ノーCt	29.32
陽性対照増幅データ		30.84		28.67
陰性対照増幅データ		ノーCt		ノーCt

4.2.4 細胞 DNA との交差反応の検証

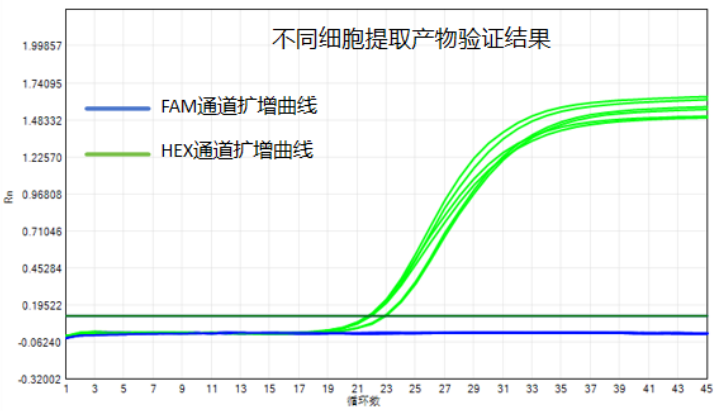
1）方法

当社培養した NK 細胞、293 細胞及び幹細胞を収集し、いずれも当社培地製品を使用して培養した細胞であり、友康磁気ビーズ抽出キットの説明書に従ってサンプル核酸抽出を行い、抽出前に検査キットの内参照対照を加え、抽出産物を測定対象サンプルとして、友康支原健康診断テスト剤キットの説明書に従って検査を行います。

2）検証結果

その結果、3 種類の細胞の DNA はいずれもキットと交差反応しなかった。増幅データと曲線は以下のとおりです。

異なる細胞 DNA 交差反応の検証結果		
	マイコプラズマ	内参照対照
NK 細胞抽出物	NoCt	21.76
	NoCt	21.94
293 細胞抽出物	NoCt	22.83
	NoCt	22.83
幹細胞抽出	NoCt	21.72
	NoCt	21.93
陽性対照	28.43	24.19
	29.06	23.93
NTC	NoCt	NoCt
	NoCt	NoCt



4.3 再現性

4.3.1 実験条件の検証

同じロットのマイコプラ健康診断テスト剤キットを使用し、3 人が 3 種類の異なる環境下で、同じサンプルに対して抽出検証を行った結果、一致性が比較的良好であり、検査試薬の再現性に問題がないことを示しています。

1）アプローチ

分子グループは検査試薬と検査対象サンプルを提供し、公衆衛生グループは磁気ビーズ抽出キットを提供し、分子グループ、公衆衛生グループ及び材料グループはそれぞれ自分の実験室でサンプル抽出検証を行い、データをまとめて比較します。

2）検証結果

検証データから、異なる人員が異なる環境でサンプルの検査を行い、増幅 Ct 値は比較的に近く、陰陽性対照は要求に符合し、検査試薬の再現性は比較的に良いことがわかります。

異なる人員が異なる実験室で検査した異なる濃度のマイコプラズマ豚鼻の比較検証結果（Ct 値）						
	材料群検証結果		公衆衛生グループ検証結果		分子群検証結果	
	マイコプラズマ	内部参照	マイコプラズマ	内部参照	マイコプラズマ	内部参照
低濃度	28.19/28.21	25.33/25.42	28.03/28.08	25.39/25.62	29.55/29.42	27.88/26.89
中濃度	25.42/25.39	25.49/25.63	25.96/25.96	26.03/26.03	25.57/25.56	25.37/25.78
高濃度	21.30/21.26	24.77/24.88	21.81/21.84	25.78/25.68	21.8/21.36	25.13/25.48
陽性対照	30.7/31.06	31.23/31.17	29.88/30.12	31.05/31.06	30.1/30.44	31.76/31.24
陰性対照	NoCt/NoCt	NoCt/NoCt	NoCt/NoCt	NoCt/NoCt	NoCt/NoCt	NoCt/NoCt

4.3.2 異なるロット検査試薬の比較検証

連続して 3 ロットの検査試薬を生産し、感度検証実験の結果を参考にし、3 ロットの検査試薬キットによる豚鼻マイコプラズマ標準品の検査感度の違いを比較検証しました。

1）アプローチ

凍結保存の 10 を取ります。GC/μ L の豚鼻マイコプラズマ標準品を 10 倍勾配で 100、10、1GC/μL に希釈し、測定対象サンプルとし、連続生産 3 ロットの検査試薬の検査感度の差を比較した結果、3 ロットの試薬キットはいずれも 5GC/反応を安定して検出でき、感度は一致しました。

2）検証結果

当社マイコプラズマ検査キットのバッチ間差異検証結果（Ct 値）						
マイコプラズマ豚の鼻標準品	ロット 20240129		ロット 20240204		ロット 20240301	
	マイコプラズマ	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
500GC/反応	**26.56**	30.26	**26.75**	30.86	**26.63**	31.02
	26.68	30.06	**26.79**	30.66	**26.82**	31.06
50GC/反応	**30.16**	30.95	**30.43**	30.75	**30.07**	31.25
	30.35	30.96	**30.34**	30.68	**30.05**	31.17
5GC/反応	**33.88**	31.14	**33.79**	30.88	**33.33**	31.34

	33.53	31.18	**33.83**	30.79	**34.38**	31.28
陽性対照	**29.05**	31.09	**28.91**	30.55	**29.11**	31.29
	28.69	30.89	**28.9**	30.26	**28.77**	31.25
NTC	ノーCt	ノーCt	ノーCt	ノーCt	ノーCt	ノーCt
	ノーCt	ノーCt	ノーCt	ノーCt	ノーCt	ノーCt

4.4 耐久性

本部分の内容は 3 つの方面から試薬キットの耐久性を検証し、増幅サイクル中のアニール温度を変更し、異なるマイコプラズマ及び異なるサンプルマトリックスを検査し、検査試薬の性能に影響を与えず、試薬キットの耐久性が比較的に良いことを説明しました。

4.4.1 異なるアニール温度による検出限界への影響

1）方法

凍結保存の 10 を取ります。GC/μ L のピンマイコプラズマ標準品を 10 倍勾配で 100、10、1GC/μL に希釈し、測定対象サンプルとし、3 つの異なるアニール温度が検出試薬の感度に与える影響を比較した結果、3 つの温度で安定して 2GC/反応を検出することができ、異なるアニール温度は検出試薬の感度に影響を与えませんでした。

2）検証結果

異なる焼鈍温度での比較検証結果（Ct 値）						
	58℃		60℃		63℃	
	マイコプラズマ	内部参照	**マイコプラズマ**	内部参照	**マイコプラズマ**	内部参照
2GC/反応	**34.01**	30.63	**34.74**	31.44	**35.19**	30.82
	33.96	31.16	**34.27**	31.05	**35.41**	30.27
20GC/反応	**30.52**	31.05	**32.02**	31.44	**32.3**	30.73
	30.48	31.12	**32.93**	32	**32.07**	30.75
200GC/反応	**28.37**	30.87	**29.62**	31.56	**30.1**	30.53
	28.19	30.8	**29.58**	31.41	**30.18**	30.51
陽性対照	**29.16**	30.91	**31**	31.55	**30.66**	30.77
陰性対照	**NoCt**	NoCt	**NoCt**	NoCt	**NoCt**	NoCt

4.4.2 異なるマイコプラズマの検出状況

マイコプラズマ pneumoniae（ATCC 15531）、マイコプラズマ hynosis（ATCC 23714）を調達し、まずマイコプラズマスープ培地で再溶解し、その後、NK 細胞無血清培地 5.0（品目番号：NC0102）で高、中、低の 3 つの濃度に希釈し、サンプルを直接検出し、抽出後に検出する；すべての濃度サンプルを検出することができます。

1）サンプルの直接検査結果は以下の通りです。

その他マイコプラズマ培養物の直接検出結果（Ct 値）		
	マイコプラズマ	内参照対照
マイコプラズマ肺炎-低	**35.17**	30.2
マイコプラズマ肺炎-中	**32.62**	30.28

マイコプラズマ肺炎-高	**29.9**	33.18
ピンマイコプラズマ-低	**35.63**	33.33
マイコプラズマピン-中	**31.74**	33.32
マイコプラズマピンハイ	**29.61**	30.51
陽性対照	**30.24**	31.15
陰性対照	NoCt	NoCt

2）サンプルを抽出した後の検査結果は以下の通りです。

他のマイコプラズマ培養物の抽出後の検査結果（Ct 値）				
実験 1	磁気ビーズ抽出結果		一体管抽出結果	
異なる濃度のサンプル	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
ピンマイコプラズマ-低	**30.20/30.30**	26.02/25.89	**33.03/33.25**	33.58/32.02
マイコプラズマピン-中	**27.05/27.14**	26.00/26.03	**29.66/29.38**	33.12/31.30
マイコプラズマピンハイ	**23.85/23.54**	26.12/25.99	**26.38/26.22**	30.60/29.86
マイコプラズマ肺炎-低	**31.27/31.00**	26.18/25.43	**35.20/33.59**	34.60/31.50
マイコプラズマ肺炎-中	**27.88/27.88**	25.84/25.88	**31.05/30.63**	34.46/31.14
マイコプラズマ肺炎-高	**24.55/24.51**	27.11/26.83	**28.18/27.93**	30.98/30.03
	磁気ビーズ抽出結果		一体管抽出結果	
実験 2	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
ピンマイコプラズマ-低	**32.17/32.24**	26.41/26.15	**33.42/33.23**	31.7/31.62
マイコプラズマピン-中	**29.35/29.31**	28.3/28.4	**30.48/30.24**	30.56/30.45
マイコプラズマピンハイ	**25.59/26.02**	28.23/28.17	**28.46/27.56**	31.98/31.78
マイコプラズマ肺炎-低	**31.82/31.78**	26.83/26.81	**33.35/33.16**	33.24/33.47
マイコプラズマ肺炎-中	**28.87/28.68**	27.43/27.32	**30.48/30.24**	32.55/32.47
マイコプラズマ肺炎-高	**25.55/25.14**	29.09/28.78	**27.04/27.09**	30.5/31.16
陽性対照	**30.11/30.62**	31.14/31		
陰性対照	**NoCt**	NoCt		

抽出ごとに 2 つの複合穴をテストし、2 人が繰り返し抽出する。2 種類の抽出方法で抽出したサンプルは、いずれも安定して検出することができます。

4.4.3 異なるサンプルマトリックスによる干渉検証

友康支原健康診断テスト剤キットを使用して、サンプルの直接検査、抽出後の検査を推奨して、抽出試薬は友康核酸抽出試薬（磁気ビーズ法、商品番号：MK0103-50）或いは迅速核酸(DNA)抽出試薬キット（商品番号：NM0003）を推奨してサンプルの核酸抽出を行います。

サンプルマトリックスを使用して会社のいくつかの培地製品を選択して、NK 細胞無血清培地 5・0（品目番号 NC0102）、以下 NK5.0 と略記する；GMP 級間葉系幹細胞無血清培地（品目番号 NC0106）、以下幹細胞 GMP と略記する；間葉系幹細胞無血清培地基礎（品目番号 NC0103）、以下幹細胞培地と略記する；3 種類の培地に対応する血清、添加剤を添加して完全培地として使用します。

1）アプローチ

口腔マイコプラズマ培養物を異なるマトリックスで10に希釈する$^{-3}$、10^{-4}、10^{-5}の3つの希釈倍数濃度は、検査システムが直接サンプルを検査し、2種類の抽出方法でそれぞれ抽出して検査した。結果はすべての濃度サンプルを安定して検出することができるが、異なるサンプル基質が検出体系、抽出方法に対して異なる影響が存在することができます。

2）検証結果

直接検査データ：異なる基質が同じサンプルを希釈し、同じ濃度で異なる大きさのCt値を検査し、異なるサンプル基質が検査システムに異なる影響があることを説明しました。

異なるサンプル基質希釈口腔マイコプラズマの直接検査結菓（Ct値）		
	マイコプラズマ	内参照対照
10^{-5}-NK5.0	**31.6**	29.72
10^{-4}-NK5.0	**27.82**	29.7
10^{-3}-NK5.0	**24.72**	29.39
10^{-5}-幹細胞GMP	**35.06**	30.82
10^{-4}-幹細胞GMP	**32.37**	30.39
10^{-3}-幹細胞GMP	**29.35**	30.52
10^{-5}-幹細胞培地	**36.14**	31.2
10^{-4}-幹細胞培地	**32.99**	31.44
10^{-3}-幹細胞培地	**29.66**	30.82
陽性対照	**30.16**	30.96
陰性対照	**NoCt**	NoCt

サンプルは検査データを抽出した：異なる基質に対して2名を配置し、それぞれ繰り返し試験を行い、各サンプルについては2つの反復孔で検査を実施しました。抽出後に得られたCt値が小さくなったことから、抽出操作がサンプル中の不純物の干渉を除去し、濃縮の効果があったことが示されました。また、同じサンプルを異なる抽出方法で処理した際にCt値に差が見られ、異なるサンプル基質が2種類の抽出方法に対してそれぞれ異なる干渉を示すことが確認されました。

具体的な検査結果は以下の表に示します。

マトリックスサンプルとしてNK細胞無血清培地5.0抽出検証結果（Ct値）				
	磁気ビーズ抽出結果		一体管抽出結果	
実験1	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
10^{-5}-NK5.0	**28.82/2856**	26.01/26.35	**30.16/30.45**	29.73/29.56
10^{-4}-NK5.0	**22.52/22.45**	28.07/28.46	**24.48/24.19**	30.24/30.18
10^{-3}-NK5.0	**19.49/19.54**	27.07/28.14	**20.49/20.35**	29.35/29.66
実験2	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
10^{-5}-NK5.0	**31.38/31.21**	27.15/26.68	**29.66/29.36**	29.48/29.78
10^{-4}-NK5.0	**23.41/23.35**	26.82/26.56	**23.44/23.12**	28.92/29.56
10^{-3}-NK5.0	**19.83/19.68**	26.62/26.89	**21.43/21.87**	29.56/28.78
陽性対照	**30.56/30.45**	30.78/30.89		

陰性対照	**NoCt**	NoCt		

表 1 マトリックスサンプルとして NK 細胞無血清培地 5.0 の抽出検証結果

GMP 級間葉系幹細胞無血清培地をマトリックスサンプル抽出検証結果（Ct 値）				
	磁気ビーズ抽出結果		一体管抽出結果	
実験 1	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
10^{-5}-幹細胞 GMP	**28.92/28.98**	26.05/26.10	**31.12/31.06**	30.42/30.37
10^{-4}-幹細胞 GMP	**26.31/26.23**	26.07/26.07	**27.54/27.51**	29.67/29.56
10^{-3}-幹細胞 GMP	**23.10/23.08**	25.76/25.73	**25.09/25.09**	29.37/29.45
実験 2	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
10^{-5}-幹細胞 GMP	**29.11/29.20**	26.84/26.89	**31.33/31.55**	31.31/31.77
10^{-4}-幹細胞 GMP	**25.92/26.03**	26.26/26.64	**27.56/27.36**	30.22/29.76
10^{-3}-幹細胞 GMP	**23.22/23.12**	26.71/26.48	**24.69/24.63**	29.48/29.55
陽性対照	**30.60/30.00**	30.72/31.15		
陰性対照	**NoCt**	NoCt		

表 2 基質サンプルとして GMP 級間葉系幹細胞無血清培地抽出検証結果

間葉系幹細胞無血清培地ベースをマトリックスとしたサンプル抽出検証結果（Ct 値）				
	磁気ビーズ抽出結果		一体管抽出結果	
実験 1	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
10-5-幹細胞培地	**31.16/31.20**	28.33/28.02	**31.58/31.55**	31.18/31.07
10-4-幹細胞培地	**28.31/28.39**	27.88/27.88	**28.42/28.49**	30.40/30.37
10-3-幹細胞培地	**25.08/25.20**	27.66/27.88	**26.19/25.98**	30.23/29.94
実験 2	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
10-5-幹細胞培地	**31.14/31.6**	28.38/28.38	**32.87/32.69**	31.82/31.54
10-4-幹細胞培地	**28.76/28.93**	29/29.09	**28.89/29.07**	30/30.19
10-3-幹細胞培地	**25.6/25.5**	28.96/28.68	**26.22/26.22**	31/31.13
陽性対照	**30.66/30.82**	31.27/31.21		
陰性対照	**NoCt**	NoCt		

表 3 間葉系幹細胞無血清培地ベースをマトリックスとしたサンプル抽出検証結果

まとめ：

当社の支原健康診断テスト剤キットを使用すれば､サンプルを直接検査することが可能です。しかし、直接検査を行う際は、サンプル基質の干渉を排除する必要があります。核酸抽出には、当社推奨の核酸抽出試薬（磁気ビーズ法、商品番号：MK0103-50）や急速核酸（DNA）抽出キット（商品番号：NM0003）を使用することをお勧めします。この抽出方法を用いることで、培養法と比較してサンプル抽出後の検査感度は少なくとも 10 倍向上します。また、抽出物を被測定サンプルとして検出系に加えることで、異なるサンプルマトリックスの干渉を効果的に排除できます。

サンプルが異なる方法で処理された後の検出特徴の比較			
異なる方法	直接検出	核酸抽出試薬(磁気ビーズ法)	急速核酸(DNA)抽出キット

特徴	速く、便利です。 感度は培養法と一致した。	高感度、安定することができます 操作手順が多いですが、熱インキュベーション設備を備える必要があります。	高い感度; 抽出方法は便利で、操作は簡単である。

4.5 応用例

当社の他の部門の同僚は、細胞株を購入してマイコプラズマ検査を行う時、市販のマイコプラズマ検査剤キットと比較して、当社が開発したキットはすべての陽性サンプルを検出することができて、市販のキットとの判定結果の一致性は 100%に達します。

1) アプローチ

9 個の細胞株を購入し、市販品と自社マイコプラスチック検査剤キットでそれぞれ検査した結果、陰陽性も完全に一致しました。

2) 検証結果

市販のマイコプラズマ検査キットの検査結果が陽性であったサンプルは、当社開発のマイコプラズマ検査キットの増幅結果がいずれも陽性であった(マイコプラズマ増幅 Ct＜40)、検証結果が陰性であったサンプルの増幅結果も一致しました。

陽性疑いサンプル検証結果 (Ct 値)				
	当社テストキット		市販の検査キット	
サンプル番号	**マイコプラズマ**	内参照対照	**マイコプラズマ**	内参照対照
MB49	**25.44**	26.16	**28.68**	29.75
BT549	**22.74**	26.15	**24.31**	29.69
468	**19.16**	26.24	**20.91**	29.56
PC12	**NoCt**	26.26	**NoCt**	29.52
2647	**NoCt**	26.21	**NoCt**	29.54
COVCO-2	**NoCt**	26.18	**NoCt**	29.62
AGCF121	**NoCt**	26.19	**NoCt**	29.34
A375	**NoCt**	26.23	**NoCt**	29.45
陽性対照	30.56	30.23		
陰性対照	NoCt	NoCt		

5 参考文献

1. 中国薬典 2020 版 4 部：3301 マイコプラズマ検査法
2. 中国薬典 2020 版三部：9201 薬品微生物検査代替方法検証指導原則
3. 『ヒト幹細胞製品の薬学研究及び評価技術指導原則（試行）』
4. 『免疫細胞治療製品の薬学研究及び評価技術指導原則（試行）』
5. ヨーロッパ薬局方 EP2.6.7：Mycoplasmas
6. 米国薬局方 USP<63>：マイコプラスマテスト
7. 日本薬局方 JP G3-14-170：生物工学/生物工学製品の製造用に使用されたセル原料のマイコプラスマテスティング (Mycoplasma Testing for Cell Substrates for the Production of Biotechnological/Biological Products)
8. FDA,Guidance for Industry：Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral

Vaccines for Infectious Disease Indications
9. 桂馨ら.細胞培養過程におけるマイコプラズマ汚染の検出と予防.同済大学学報(医学版):第34巻第3期2013年6月.
10. 薛少華ら.豚マイコプラズマ鼻の検出に対する液体培養法とqPCR法の感度の比較.広東畜産獣医科:2023(第48巻)第2号.
11. Karin Janetzko Gabi Rink.A Single-Tube Real-Time PCR Assay for Mycoplasma Detection as a Routine Quality of Cell Therapeutics.Transfus Med Hemother 201441:83-89.
12. Julia Sung,J.Ross Hawkins.A highly sensitive internally-controlled real-time PCR assay for mycoplasma detection in cell cultures.Biologicals,Elsevier Ltd:https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.007.