

2017年2月27日

Myco Finder バリデーションデータ

日水製薬株式会社

研究部

1. 概要

マイコプラズマ遺伝子検出キット (Myco Finder) の性能を評価するために、下記ふたつの情報を参考にバリデーションデータを取得した。

1. 第十七改正日本薬局方 (平成 28 年 3 月 7 日厚生労働省告示 64 号)

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 p2395-2399

2. PHARM TECH JAPAN (2016) vol.32, No.1, 93-94

2. Myco Finder バリデーション内容と実験条件

リアルタイム PCR 装置にて行った実験条件を表 1 に、本バリデーションのマイコプラズマ情報を表 2 に示した。

表 1. Myco Finder バリデーション検出条件

DNA 抽出試薬	QIAGEN 社 : QIAamp UCP DNA Micro Kit
PCR 装置	BioRad 社 : CFX96
PCR 条件	95°C、10 秒 98°C、3 秒 } 45 サイクル 60°C、1 秒 } 蛍光検出波長 : FAM + ROX (又は FAM + HEX)
測定結果の判定	PCR 装置付属ソフト (CFX Manager™ ソフトウェア) にて実施 解析法 : Regression 法、Baseline Subtracted Curve Fit モード

表 2. バリデーションに用いたマイコプラズマ参照品

バリデーションには東京医科歯科大学再生医療研究センターの清水則夫准教授の下で作製された参照品を使用した。

菌種名	GC (copies/mL)*	CFU (CFU/mL)	GC/CFU
<i>A. laidlawii</i>	3.9 x 10 ⁹	3.5 x 10 ⁸	11.2
<i>M. arginini</i>	4.1 x 10 ⁹	2.2 x 10 ⁹	1.8
<i>M. fermentans</i>	1.3 x 10 ¹⁰	3.3 x 10 ⁹	3.9
<i>M. hyorhinis</i>	1.4 x 10 ⁹	4.2 x 10 ⁸	3.4
<i>M. orale</i>	1.3 x 10 ¹⁰	8.3 x 10 ⁸	16.3
<i>M. pneumoniae</i>	6.0 x 10 ⁸	2.9 x 10 ⁷	20.7
<i>M. salivarium</i>	4.2 x 10 ⁹	2.5 x 10 ⁹	1.7

*Copies/mL = [DNA contents (µg/mL)] x 10⁶ x (0.978 x 10⁹)/[genome size]

3. 特異性

3-1. 標的領域の特異的増幅

表 2 に示した 7 菌種の参照品から抽出した DNA をテンプレートとして Myco Finder で用いられるプライマーを使用した PCR を実施し、シーケンス解析を行った。その結果、Myco Finder のプライマーはマイコプラズマ 7 菌種を特異的に増幅できることが示された (表 3)。

表 3. シークエンス解析結果

菌種名	相同性
<i>A. laidlawii</i>	100%
<i>M. arginini</i>	99%*
<i>M. fermentans</i>	99%*
<i>M. hyorhinae</i>	99%*
<i>M. orale</i>	99%*
<i>M. pneumoniae</i>	100%
<i>M. salivarium</i>	99%*

*検出不能 (N) を含む

3-2. 他の生物種に対する交差反応

第十七改正日本薬局方に示されるバリデーション法には含まれていないが、検出系評価の一つとして表 4 に示す細菌 25 種、真菌 8 種、哺乳動物細胞 3 種のゲノム DNA を検体とした場合の交差反応性について評価を実施した。ゲノム DNA はいずれも 1 ng/反応以上になるよう添加した。試験の結果、表 4 に示されるいずれの種のゲノム DNA についても交差反応性は示さなかった。

表 4. 交差反応試験実施生物種一覧

細菌 25 種	真菌 8 種	哺乳動物細胞 3 種
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Raji Cell (ヒト)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	Mouse T lymphocyte (マウス)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Mucor circinelloides</i>	CHO cell (チャイニーズハムスター)
<i>Clostridium kluyveri</i>	<i>Cunninghamella echinulata</i>	
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Absidia corymbifera</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Scedosporium prolificans</i>	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		
<i>Lactobacillus casei</i>		
<i>Propionibacterium acnes</i>		
<i>Salmonella enterica</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
<i>Streptococcus mutans</i>		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
<i>Streptococcus bovis</i>		
<i>Streptococcus avermitilis</i>		
<i>Rhodococcus erythropolis</i>		
<i>Rothia dentocariosa</i>		
<i>Tetragenococcus halophilus</i>		
<i>Kocuria rhizophila</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

4. 検出感度

表 2 に示した検出対象 7 菌種について、8 つの異なる 1、10、100 CFU/mL の希釈列を調整し、それぞれに CHO 細胞 DG44 株 1×10^6 cells/mL の細胞懸濁液を加え感度試験用検体とした。これらを用いて、別々の日に 3 回、合計 24 回の試験を実施した。陰性検体は上記の細胞懸濁液 (1×10^6 cells/mL) のみとした。

検出感度試験の結果を表 5~11 に示す。全ての菌種について、95%以上の確率で 10 CFU/mL を検出可能であった。このことから Myco Finder は培養法の代替法として求められる 10 CFU/mL を満たす感度を有することが示された。

表 5. 感度試験結果 (*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

8/8 は 8 回の試験の内、8 回検出されたことを表す。

表 6. 感度試験結果 (*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

8/8 は 8 回の試験の内、8 回検出されたことを表す。

表 7. 感度試験結果 (*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

8/8 は 8 回の試験の内、8 回検出されたことを表す。

表 8. 感度試験結果 (*M. hyorhinitis*)

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

8/8 は 8 回の試験の内、8 回検出されたことを表す。

表 9. 感度試験結果 (*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

8/8 は 8 回の試験の内、8 回検出されたことを表す。

表 10. 感度試験結果 (*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

8/8 は 8 回の試験の内、8 回検出されたことを表す。

表 11. 感度試験結果 (*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

8/8 は 8 回の試験の内、8 回検出されたことを表す。

5. 頑健性

検出機器間の違いが Myco Finder の性能に及ぼす影響について、LightCycler 480 (Roche 社) と GVP9600 (島津製作所) をリアルタイム PCR 装置として用いた場合の Myco Finder の性能を評価した。その結果、異なるリアルタイム PCR 装置を用いた場合でも、Myco Finder の検出性能に影響がないことが示された。

表 12. PCR 装置の違いが検出性能へ及ぼす影響

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. hyorhinitis</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

3/3 は 3 回の試験の内、3 回検出されたことを表す。

6. 同等性試験 ～培養法～

表 2 に示した検出対象 7 菌種 10 CFU/mL の検出と並行して、同検体 (10 CFU/mL) を用いて培養法での検出を実施した。培養法の代替としての条件 (10 CFU/mL) を満たし、培養法においても同検体が検出された。

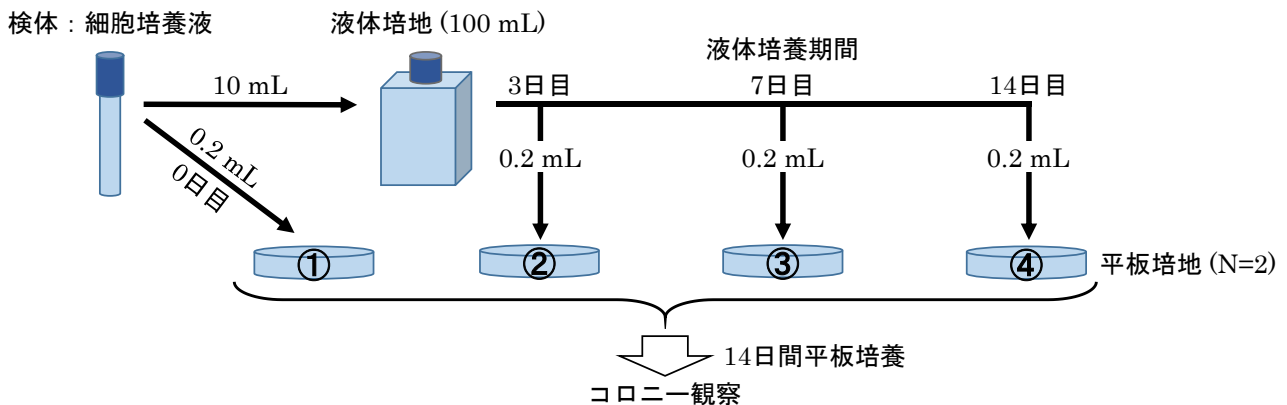


図 1. 培養法概要

1. マイコプラズマ 7 菌種についてマイコプラズマ参照品 10 CFU/細胞懸濁液 1 mL の検体を調製する。
2. 各検体 0.2 mL を平板培地に接種し、37°C で 14 日間培養する (①)。
3. 各検体 10 mL を Hayflick (Millipore) 液体培地 100 mL に接種し、37°C で培養する。培養 3 日目、7 日目、14 日目に各培養液から 0.2 mL を採り、平板培地に接種し 37°C で 14 日間培養する (②～④)。
4. ①～④の時点においてマイコプラズマコロニーの有無を確認する。

表 13. 培養法の結果と NAT との比較

菌種名	液体培養日数				判定	NAT (Myco Finder 使用)
	① 0 日目	② 3 日目	③ 7 日目	④ 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. hyorhinitis</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	+	+

+: 陽性

いずれかの培養期間中において、平板培地上に 1 個以上のコロニーが認められた場合は陽性と判断した。

M. arginini、*M. orale* は 7 日目以降の結果が陰性となったが、これは液体培養期間が長く、増殖した菌が全て死滅した結果であると推測した。

以上

2021年9月29日

Myco Finder バリデーションデータ 追加データ

日水製薬株式会社

研究部

1. 概要

マイコプラズマ遺伝子検出キット (Myco Finder) の性能を評価するために、下記2つの情報を参考にバリデーションデータを取得した。2021年2月～2021年8月に頑健性のデータを新たに取得したため、追加データとして報告する。

1. 第十七改正日本薬局方 (平成28年3月7日厚生労働省告示64号)

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 p2395-2399

2. PHARM TECH JAPAN (2016) vol.32, No.1, 93-94

2. 実験条件

リアルタイムPCR装置にて行った実験条件を表1に、本バリデーションのマイコプラズマ情報を表2に示した。

表1. Myco Finder バリデーション検出条件

DNA抽出試薬	株式会社キアゲン: QIAamp UCP DNA Micro Kit 関東化学株式会社: シカジーニーストータルDNAプレップキット (組織用)
PCR装置	バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社: CFX Connect、CFX Opus
PCR条件	95℃、10秒 98℃、3秒 } 45サイクル 60℃、1秒 } 蛍光検出波長: FAM + ROX (又は FAM + HEX)
測定結果の判定	PCR装置付属ソフト (CFX Manager™ ソフトウェア) にて実施 解析法: Regression 法、Baseline Subtracted Curve Fit モード

表2. バリデーションに用いたマイコプラズマ参照品

追加データの取得には ATCC より購入した参照品を使用した。

菌種名	菌株	Lot No.	GC (copies/mL)*	CFU (CFU/mL)	GC/CFU
<i>A. laidlawii</i>	ATCC 23206-TTR	70023819	5.5 x 10 ⁹	1.3 x 10 ⁹	4.2
<i>M. arginini</i>	ATCC 23838-TTR	70018034	1.0 x 10 ¹⁰	1.7 x 10 ¹⁰	0.6
<i>M. fermentans</i>	ATCC 19989-TTR	70015063	7.5 x 10 ⁹	7.0 x 10 ⁹	1.1
<i>M. hyorhinae</i>	ATCC 17981-TTR	70015024	1.5 x 10 ⁹	1.9 x 10 ⁹	0.8
<i>M. orale</i>	ATCC 23714-TTR	70027393	1.1 x 10 ¹⁰	1.8 x 10 ¹⁰	0.6
<i>M. pneumoniae</i>	ATCC 15531-TTR	70022921	7.0 x 10 ⁹	1.0 x 10 ⁹	7.0
<i>M. salivarium</i>	ATCC 23064-TTR	70025854	1.2 x 10 ¹⁰	8.6 x 10 ⁹	1.4

*Copies/mL = [DNA contents (µg/mL)] x 10⁶ x (0.978 x 10⁹) / [genome size]

3. 頑健性 追加データ

3-1. 検出機器間差の検証

検出機器間の違いが Myco Finder の性能に及ぼす影響について、CFX Connect と CFX Opus をリアルタイム PCR 装置として用いた場合の Myco Finder の性能を評価した。その結果、CFX Connect および CFX Opus を用いた場合でも、Myco Finder の検出性能に影響がないことが示された。

表 3. PCR 装置の違いが検出性能へ及ぼす影響①

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. hyorhinis</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

3/3 は 3 回の試験の内、3 回検出されたことを表す。

表 4. PCR 装置の違いが検出性能へ及ぼす影響②

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. hyorhinis</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

3/3 は 3 回の試験の内、3 回検出されたことを表す。

3-2. DNA 抽出試薬の検証

DNA 抽出試薬の違いが Myco Finder の性能に及ぼす影響について、シカジーニラストータル DNA プレップキットを DNA 抽出試薬として使用した場合の Myco Finder の性能を評価した。その結果、シカジーニラストータル DNA プレップキットを使用した場合でも、Myco Finder の性能に影響がないことが示された。

表 5. DNA 抽出試薬の違いが検出性能へ及ぼす影響

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. hyorhina</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

3/3 は 3 回の試験の内、3 回検出されたことを表す。

以上