

明 細 書

発明の名称：マイコプラズマの有無の検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、マイコプラズマの有無を検査する方法に関する。

背景技術

[0002] マイコプラズマは、培養細胞の代表的汚染微生物としてよく知られている。マイコプラズマとは、一般的にMollicutes綱に属する微生物を指し、細胞に寄生しなくても自己複製可能な微生物の中では最小であり、多形性・濾過性を示す。また、細胞壁を持たないため、ペニシリン等の β -ラクタム系抗生物質に耐性である。通常の顕微鏡観察で発見することは困難であり、また汚染を目視で判断することは難しく、汚染に気づかずに培養・継代が行われることが多い。マイコプラズマ汚染の影響としては、感染した培養細胞の代謝異常、サイトカインの誘導および染色体変異等がある。人体においては、マイコプラズマの細胞質膜表面タンパク質が抗原として働き、炎症性サイトカイン類を誘導する等、免疫系に影響を与えることが知られている。また、一部のマイコプラズマは肺炎、尿道炎、関節炎などの疾病を引き起す恐れもある。したがって、動物に由来する生体材料を用いて製造を行う、生きた細胞・組織を用いる再生医療、臓器や組織の再生を目的としない細胞治療（例えば、がん細胞免疫療法）、培養・活性化・分化誘導などの加工をする細胞・組織加工製品、細胞加工物、ワクチン及び抗体医薬などの分野において、マイコプラズマ否定試験は必要とされている。

[0003] 第十七改正日本薬局方には、マイコプラズマ否定試験として、A. 培養法、B. 指標細胞を用いたDNA染色法、C. 核酸増幅法（NAT）法が記載されている。培養法は、14日間の液体培地での培養に続く、14日間の寒天培地での培養の合計28日の長い培養期間が必要である。DNA染色法は、試験に必要な期間は7日程度であるが、感度が低く、検体は1 mL以上必要である。また核酸増幅法においては、試験に必要な期間は数日程度である

が、通常1～10 mL程度の検体を必要とする。その他の方法として、培養法における14日間の寒天培地での培養をPCR (Polymerase Chain Reaction; ポリメラーゼ連鎖反応) による検出に置き換えた方法が報告されている(非特許文献1)。しかしながら、当該方法においても、14日程度培養することが必要とされ、検体は1 mL程度必要である。

先行技術文献

非特許文献

- [0004] 非特許文献1: 「前培養とPCR法を組み合わせたマイコプラズマ生菌の検出」動薬検年報 第44号13-20 (2007)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、マイコプラズマの有無を検査する方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 再生医療等製品の製造においては、患者の自己の細胞を用いている場合など、製造可能な最終製品の量に限りがある場合がある。また、その製品の寿命は、一般的な医薬品と比較して、著しく短い。したがって、再生医療等製品においては、一般的な医薬品と異なり、品質試験に必要な検体の量が少量で、試験に必要な期間も短いことが望ましい。にもかかわらずマイコプラズマ否定試験においては、上述のとおり、培養法は試験期間に必要な期間が28日と、製品の寿命に比して長い期間が求められ、DNA染色法、核酸増幅法および改良された培養法は、1 mL以上と多量の検体が必要であり、いずれの方法も再生医療の分野において好ましい方法ではなかった。
- [0007] 本発明者らは、マイコプラズマの有無を検査する方法について研究する中で、核酸増幅法における核酸を増幅する工程の前にマイコプラズマを培養する工程を組み込むことにより、少量の検体からマイコプラズマの存在を検出することができることを見出し、再生医療等製品において有利に用い得る新たなマイコプラズマの検査方法を完成させた。かかる方法についてさらなる

研究を進めたところ、培養法やDNA染色法では問題とならない製品及びまたは試験材料に含まれる生物由来材料等からのマイコプラズマ核酸断片の試験系への混入が、偽陽性を生じさせる場合があるという新たな課題に直面した。かかる課題に対し、本発明者らは、核酸を増幅する工程の前に夾雑物を除去する工程を組み込むことで、偽陽性を減らすことができるという新たな知見を得た。そしてかかる知見に基づいてさらに研究を続けた結果、本発明を完成させた。

[0008] すなわち、本発明は以下に関する。

[1] 検体中のマイコプラズマの有無を検査するための方法であって、

(a) 検体を培養するステップ、および

(b) 培養した検体から核酸を抽出し、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを用いて核酸の増幅を行うステップ、
を含み、検体は、バイオテクノロジー関連製品またはその一部である、前記方法。

[2] 検体が、再生医療関連製品またはその一部である、[1]に記載の方法。

[3] 核酸の増幅を行うステップが、PCR (Polymerase Chain Reaction; ポリメラーゼ連鎖反応) 法により行われる、[1]または[2]に記載の方法。

[4] (c) ステップ(b)により得られた増幅産物の電気泳動を行うステップをさらに含む、[1]～[3]のいずれか一つに記載の方法。

[5] ステップ(a)において、嫌気培養を行うことを含む、[1]～[4]のいずれか一つに記載の方法。

[0009] [6] ステップ(a)において、2以上の検体をそれぞれ好気または嫌気で培養を行う、[1]～[4]のいずれか一つに記載の方法。

[7] ステップ(a)において培養される検体の量が、10 μ L～10mLである、[1]～[6]のいずれか一つに記載の方法。

[8] ステップ(a)において、培養が3～14日間行われる、[1]～[

7] のいずれか一つに記載の方法。

[9] ステップ (b) において核酸を抽出する前に、夾雑物を除去することをさらに含む、[1] ~ [8] のいずれか一つに記載の方法。

[10] 夾雑物を除去することが、検体をフィルター濾集することにより行われる、[1] ~ [9] のいずれか一つに記載の方法。

[0010] [11] フィルターの分画分子量が1000KDa以下である、またはフィルターの孔径が0.22 μ m以下である、[1] ~ [10] のいずれか一つに記載の方法。

[12] 再生医療関連製品が、加工が施された細胞、加工に供される細胞、加工や検査の際に用いられる試薬、細胞を培養するための培地、細胞を洗浄するための細胞洗浄液、および再生医療等製品を保存するための保存液から選択される少なくとも一つを含む、[1] ~ [11] のいずれか一つに記載の方法。

[13] バイオテクノロジー関連製品の品質を管理する方法であって、[1] ~ [12] に記載の方法によって、検体中のマイコプラズマの有無を検査するステップを含む、前記方法。

[14] [1] ~ [12] のいずれか一つに記載の方法に用いるためのキットであって、マイコプラズマを培養するための培地およびマイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを含む、前記キット。

[15] 夾雑物を除去するためのフィルターをさらに含む、[14] に記載のキット。

[0011] [1] 検体中のマイコプラズマの有無を検査するための方法であって、
(i) 検体を含む組成物から夾雑物を除去するステップ、および
(ii) 夾雑物が除去された検体を含む組成物から核酸を抽出し、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを用いて核酸の増幅を行うステップ、
を含む、前記方法。

[11] 核酸の増幅を行うステップが、PCR (Polymerase Chain Reaction

；ポリメラーゼ連鎖反応）法により行われる、〔Ⅰ〕に記載の方法。

〔ⅠⅠⅠ〕（ⅰⅰⅰ）ステップ（ⅰⅰ）により得られた増幅産物の電気泳動を行うステップをさらに含む、〔Ⅰ〕または〔ⅠⅠ〕に記載の方法。

〔ⅠⅤ〕ステップ（ⅰ）において、夾雑物を除去するステップが、検体をフィルター濾集することにより行われる、〔Ⅰ〕～〔ⅠⅠⅠ〕のいずれか一つに記載の方法。

〔Ⅴ〕フィルターの分画分子量が1000KDa以下である、またはフィルターの孔径が0.22μm以下である、〔Ⅰ〕～〔ⅠⅤ〕のいずれか一つに記載の方法。

[0012] 〔ⅤⅠ〕ステップ（ⅰⅰ）の前に検体を培養することを含む、〔Ⅰ〕～〔Ⅴ〕のいずれか一つに記載の方法。

〔ⅤⅠⅠ〕ステップ（ⅰ）の前に検体を培養することを含む、〔Ⅰ〕～〔ⅤⅠ〕のいずれか一つに記載の方法。

〔ⅤⅠⅠⅠ〕検体が、バイオテクノロジー関連製品またはその一部である、〔Ⅰ〕～〔ⅤⅠⅠ〕のいずれか一つに記載の方法。

〔ⅠⅩ〕検体が、再生医療関連製品またはその一部である、〔Ⅰ〕～〔ⅤⅠⅠⅠ〕のいずれか一つに記載の方法。

〔Ⅹ〕再生医療関連製品が、加工が施された細胞、加工に供される細胞、加工や検査の際に用いられる試薬、細胞を培養するための培地、細胞を洗浄するための細胞洗浄液、および再生医療等製品を保存するための保存液から選択される少なくとも一つを含む、〔Ⅰ〕～〔ⅠⅩ〕のいずれか一つに記載の方法。

〔ⅩⅠ〕バイオテクノロジー関連製品の品質を管理する方法であって、〔Ⅰ〕～〔Ⅹ〕に記載の方法によって、検体中のマイコプラズマの有無を検査するステップを含む、前記方法。

〔ⅩⅠⅠ〕〔Ⅰ〕～〔Ⅹ〕のいずれか一つに記載の方法に用いるためのキットであって、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーおよび夾雑物を除去するためのフィルターを含む、前記キット。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、少量の検体からでも、短期間で、10cfu/mL以下の感度でマイコプラズマを検出することができる。試験に要する期間が短くてすみ、また試験に供する検体が少量ですむため、特に再生医療を含むバイオテクノロジーの分野において、本方法は極めて有用である。また、核酸を増幅する工程の前に夾雑物を除去する工程を組み込むことにより、偽陽性が減少した精度の高い試験を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、PCR産物の電気泳動像である。(A)において、Mは100bpラダーであり、レーン1はマイコプラズマを加えずにPCRを行ったものであり、レーン2は、陽性対照(マイコプラズマ(Acholeplasma laidlawii))を加えてPCRを行ったものである。(B)において、Mは100bpラダーであり、レーン1～3はマイコプラズマを加えずに、フィルター濾集後にPCRを行ったものであり、レーン4～6は、陽性対照(マイコプラズマ(Acholeplasma laidlawii))を加え、フィルター濾集後にPCRを行ったものである。

[図2]図2は、細胞検体におけるマイコプラズマの増殖性を表すグラフである。(A)は好気培養した結果、(B)は嫌気培養した結果を表す。縦軸は、マイコプラズマの濃度(cfu/mL、対数表示)を、横軸は、培養日数(日)を表す。

[図3]図3は、培地検体におけるマイコプラズマの増殖性を表すグラフである。(A)は好気培養した結果、(B)は嫌気培養した結果を表す。縦軸は、マイコプラズマの濃度(cfu/mL、対数表示)を、横軸は、培養日数(日)を表す。

[図4]図4は、洗浄液検体におけるマイコプラズマの増殖性を表すグラフである。(A)は好気培養した結果、(B)は嫌気培養した結果を表す。縦軸は、マイコプラズマの濃度(cfu/mL、対数表示)を、横軸は、培養日数(日)を表す。

[0015] [図5]図5は、細胞検体におけるマイコプラズマの増殖性と検出限界を表す。

縦軸は、マイコプラズマの濃度（c f u / m L、対数表示）を表す。図中、黒色は、7日間培養後のマイコプラズマの濃度を、灰色は、検出感度を表す。

[図6]図6は、培地検体におけるマイコプラズマの増殖性と検出限界を表す。

縦軸は、マイコプラズマの濃度（c f u / m L、対数表示）を表す。図中、黒色は、7日間培養後のマイコプラズマの濃度を、灰色は、検出感度を表す。

[図7]図7は、洗浄液検体におけるマイコプラズマの増殖性と検出限界を表す。

縦軸は、マイコプラズマの濃度（c f u / m L、対数表示）を表す。図中、黒色は、7日間培養後のマイコプラズマの濃度を、灰色は、検出感度を表す。

[図8]図8は、PCR産物の電気泳動像である。Mは100bpラダーであり、レーン1は陰性対照（水に対してPCRを行ったもの）であり、レーン2～4は陰性対照（検体の代わりにPBSを用いて好気培養し、PCRを行ったもの）であり、5～7は検体を好気培養し、PCRを行ったものであり、レーン8～10は陽性対照（検体にマイコプラズマ希釈液（Mycoplasma orale）を加えて好気培養し、PCRを行ったもの）であり、レーン11～13は陰性対照（検体の代わりにPBSを用いて嫌気培養し、PCRを行ったもの）であり、レーン14～16は検体を嫌気培養し、PCRを行ったものであり、レーン17～19は陽性対照（検体にマイコプラズマ希釈液（Mycoplasma salivarium）を加えて嫌気培養し、PCRを行ったもの）である。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書において別様に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。本明細書中で参照する全ての特許、出願および他の出版物や情報は、その全体を参照により本明細書に援用する。また本明細書において参照された出

版物と本明細書の記載に矛盾が生じた場合は、本明細書の記載が優先されるものとする。

[0017] 本発明は、検体中のマイコプラズマの有無を検査するための方法であって、検体から核酸を抽出し、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを用いて核酸の増幅を行うステップを含む、前記方法に関する。

[0018] 本発明において、「検体」とは、マイコプラズマの混入を検査したい任意の対象、もしくはマイコプラズマ汚染が懸念されるような対象、またはそれらの一部などであればとくに限定されない。非限定例としては、任意の生物由来の生体材料（例えば、組織、細胞、生物液体など）およびそれを原料として製造される製品（例えば、臓器の一部、融合細胞、生物由来の医薬品など）が挙げられる。具体的には、例えば、動物由来の生体材料およびそれを原料として製造される製品、動物由来の生体材料を用いて行われる試験または製造の用に供するものなどが挙げられる。動物由来の生体材料およびそれを原料として製造される製品としては、これに限定するものではないが、例えば、動物の細胞、組織、血液（全血、または全血の一部、例えば血清、血漿などを含む）、胎盤、尿、抗体、生物学的製剤（例えば、タンパク質、ポリペプチド、それらの誘導体およびそれらを構成成分とする医薬品、抗体医薬品、ワクチン、抗毒素、血液製剤など）、再生医療等製品、などが挙げられる。動物由来の生体材料を用いて行われる試験または製造の用に供するものとしては、これに限定するものではないが、例えば、動物由来の生体材料を用いて行われる試験または製造の用に供する器具（例えば細胞培養用容器など）、試薬、血清、抗体、培地、洗浄液などが挙げられる。

また、本発明の「検体」は、バイオテクノロジー関連製品とされるものや、再生医療関連製品とされるものであってもよい。

[0019] 本発明において、「バイオテクノロジー関連製品」とは、生物学的製剤、再生医療等製品またはそれらの製造に使用する製品などを含む。

本発明において、「生物学的製剤」とは、例えば、タンパク質、ポリペプ

チド、それらの誘導体およびそれらを構成成分とする医薬品、抗体医薬品、ワクチン、抗毒素、血液製剤などを含む。

本発明において、生物学的製剤の製造に使用する製品とは、組み換えタンパク質またはポリペプチドを産生する細胞、血液（全血、または全血の一部、例えば血清、血漿などを含む）、胎盤、尿、細胞を培養するための培地、細胞を洗浄するための細胞洗浄液、生物学的製剤を保存するための保存液、加工や検査の際に用いられる試薬（例えば緩衝液、検出試薬、血清、成長因子、酵母抽出液など）などを含む。

組み換えタンパク質またはポリペプチドを産生する細胞としては、例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞、ハイブリドーマ、動物細胞（例えばCHO細胞、Sp2/O細胞、NSO細胞など）、ヒト細胞などが挙げられる。本発明において、生物学的製剤の製造に使用する製品とは、ワクチンを含むことができるが、しかし生物学的製剤の製造に使用する製品からワクチンを除外することもできる。

[0020] 本発明において、「再生医療関連製品」とは、再生医療等製品またはその製造に使用する製品などを含む。

本発明において、「再生医療等製品」とは、（１）ヒト又は動物の細胞に培養等の加工を施したものであって、（イ）身体の構造・機能の再建・修復・形成するもの、もしくは（ロ）疾病の治療・予防を目的として使用するもの、または（２）遺伝子治療を目的として、ヒトの細胞に導入して使用するものである。「再生医療等製品」とは治療に用いられる細胞を本体として含み、例えば、加工が施された細胞や加工に供される細胞を含む。具体的には、非限定例として、造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病（急性GVHD）の治療に使用されるヒト（同種）骨髓由来間葉系幹細胞、重症心不全の治療において移植されるヒト（自己）骨格筋由来細胞シート、がん免疫療法に用いられる細胞（樹状細胞、NK細胞、Tリンパ球など）などが挙げられる。

本発明において、再生医療等製品の製造に使用する製品とは、加工や検査

の際に用いられる試薬（例えば緩衝液、検出試薬、血清、成長因子、酵母抽出液など）、細胞を培養するための培地、細胞を洗浄するための細胞洗浄液、再生医療等製品を保存するための保存液などを含む。

[0021] 本発明において、加工が施された細胞および加工に供される細胞は、動物細胞、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト細胞である。

加工が施された細胞および加工に供される細胞の非限定例としては、例えば、体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、樹状細胞、リンパ球（NK（ナチュラルキラー）細胞、Tリンパ球、Bリンパ球）など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞（ES（embryonic stem）細胞）、iPS（induced pluripotent stem）細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などを含む。体細胞は、幹細胞、特にiPS細胞から分化させたものであってもよく、具体的には、iPS由来心筋細胞、iPS由来樹状細胞、iPS由来リンパ球（NK細胞、Tリンパ球、Bリンパ球）などが挙げられる。これらの細胞は遺伝子導入により修飾されていてもよく、そのような具体例としては、CAR-T（キメラ抗原受容体-T細胞）やTCR-T（T細胞受容体-T細胞）などが挙げられる。

加工が施された細胞とは、何らかの加工を施された後に得られる細胞であり、加工に供される細胞とは何らかの加工を施す前に準備される細胞である。加工は細胞に対して加えられる何らかの操作であれば限定されず、例えば、疾患を処置するための加工であってよい。このような細胞としては、具体的には、液体中で培養された細胞、ゲル内等の環境で培養された細胞、培養されたのちに細胞接着を介して三次元的に構成された細胞培養物、シート状細胞培養物、細胞密度を調整された細胞懸濁液、培養して増殖させた細胞、増殖させて凍結に供する細胞、凍結状態から融解した細胞、細胞の数や密度を調製した細胞、投与のために投与デバイスにセットされる細胞などが挙げられる。

[0022] このような細胞により処置される疾患としては、限定されずに、例えば、心疾患、肺疾患、肝疾患、脾臓疾患、腎臓疾患、大腸疾患、小腸疾患、脊髄疾患、中枢神経系疾患、骨疾患、眼疾患、または皮膚疾患などが挙げられる。疾患には血液がんや固形がんなどのがん（悪性新生物）が含まれる。使用される細胞が筋芽細胞や（i P S 由来の）心筋細胞である場合には、疾患として心筋梗塞（心筋梗塞に伴う慢性心不全を含む）、拡張型心筋症、虚血性心筋症、収縮機能障害（例えば、左室収縮機能障害）を伴う心疾患（例えば、心不全、特に慢性心不全）などが挙げられる。

[0023] 本発明の一態様において、再生医療関連製品は、加工が施された細胞、加工に供される細胞、加工や検査の際に用いられる試薬、細胞を培養するための培地、細胞を洗浄するための細胞洗浄液、および再生医療等製品を保存するための保存液から選択される少なくとも一つを含む。具体的には、シート状細胞培養物、シート状細胞培養物を製造するための細胞（例えば凍結保存細胞など）、シート調製培地、細胞洗浄液などが挙げられる。

本発明の一態様において、再生医療関連製品は、加工が施された細胞および加工に供される細胞から選択される少なくとも一つを含む。

本発明の一態様において、再生医療関連製品は、筋芽細胞および i P S 由来心筋細胞から選択される少なくとも一つを含む。

本発明の一態様において、再生医療関連製品は、間葉系幹細胞および線維芽細胞から選択される少なくとも一つを含む。

本発明の一態様において、再生医療関連製品は、樹状細胞、NK細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、CAR-TおよびTCR-Tから選択される少なくとも一つを含む。

[0024] 本発明において、シート状細胞培養物とは、細胞が互いに連結してシート状になったものをいう。細胞同士は、直接（接着分子などの細胞要素を介する細胞接着を含む）および／または介在物質を介して、互いに連結していてもよい。介在物質としては、細胞同士を少なくとも物理的（機械的）に連結し得る物質であれば特に限定されないが、例えば、細胞外マトリックスなど

が挙げられる。介在物質は、好ましくは細胞由来のもの、特に、細胞培養物を構成する細胞に由来するものである。細胞は少なくとも物理的（機械的）に連結されるが、さらに機能的、例えば、化学的、電氣的に連結されてもよい。シート状細胞培養物は、1の細胞層から構成されるもの（単層）であっても、2以上の細胞層から構成されるもの（積層体（多層）、例えば、2層、3層、4層、5層、6層など）であってもよい。

[0025] 本発明において、シート状細胞培養物は、ヒト又は動物の治療に用いられるものであり、シート状細胞培養物を構成する細胞は、動物細胞、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト細胞である。

本発明において、シート状細胞培養物を構成する細胞は、シート状細胞培養物を形成し得るものであれば特に限定されず、例えば、接着細胞（付着性細胞）を含む。接着細胞は、例えば、接着性の体細胞（例えば、心筋細胞、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、肝細胞、膵細胞、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、滑膜細胞、軟骨細胞など）および幹細胞（例えば、筋芽細胞、心臓幹細胞などの組織幹細胞、胚性幹細胞、iPS（induced pluripotent stem）細胞などの多能性幹細胞、間葉系幹細胞等）などを含む。体細胞は、幹細胞、特にiPS細胞から分化させたものであってもよい。

また、シート状細胞培養物を構成する細胞の非限定例としては、例えば、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など）、間葉系幹細胞（例えば、骨髄、脂肪組織、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、胎盤、臍帯血由来のものなど）、心筋細胞、線維芽細胞、心臓幹細胞、胚性幹細胞、iPS細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、上皮細胞（例えば、口腔粘膜上皮細胞、網膜色素上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞など）、内皮細胞（例えば、血管内皮細胞など）、肝細胞（例えば、肝実質細胞など）、膵細胞（例えば、膵島細胞など）、腎細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞等が挙げられる。シート状細胞培養物はこれらの細胞から構成され、具体的には、骨格筋芽細胞シートやiPS由来心筋細胞シート、間葉系幹細胞シート、線維芽細胞シー

トなどが挙げられる。

[0026] 本発明において、マイコプラズマとは、Mollicutes綱に分類される細菌であれば特に限定されない。具体的には、とくに限定されないが、例えば、Mycoplasmataceae科のMycoplasma属、Acholeplasmataceae科のAcholeplasma属、Spiroplasmataceae科のSpiroplasma属などの細菌などが挙げられる。より具体的には、Mycoplasma arginini、Mycoplasma salivarium、Mycoplasma pneumoniae、Mycoplasma fermentans、Mycoplasma orale、Mycoplasma hyorhinitis、Mycoplasma synoviae、Acholeplasma laidlawii、Spiroplasma citriなどが挙げられる。本明細書において、Mycoplasma argininiをM a、Mycoplasma salivariumをM s、Mycoplasma pneumoniaeをM p、Mycoplasma fermentansをM f、Mycoplasma oraleをM o、Mycoplasma hyorhinitisをM h、Acholeplasma laidlawiiをA lとも称する。

[0027] 本発明において、検体の量は、マイコプラズマが、本方法の検出感度を超える量に増殖するのに必要な量であればよく、当該技術分野において通常の知識を有するものであれば、最適な量を設定することができる。非限定例としては、10 μ L、15 μ L、20 μ L、25 μ L、30 μ L、35 μ L、40 μ L、45 μ L、50 μ L、55 μ L、60 μ L、65 μ L、70 μ L、75 μ L、80 μ L、85 μ L、90 μ L、95 μ L、100 μ L、110 μ L、120 μ L、130 μ L、140 μ L、150 μ L、160 μ L、170 μ L、180 μ L、190 μ L、200 μ L、250 μ L、300 μ L、350 μ L、400 μ L、450 μ L、500 μ L、550 μ L、600 μ L、650 μ L、700 μ L、750 μ L、800 μ L、850 μ L、900 μ L、950 μ L、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL、9 mL、10 mLなどが挙げられる。

[0028] 本発明において、検体の量の下限値は、マイコプラズマが、本方法の検出感度を超える量に増殖するのに必要な量であれば特に限定されない。非限定例としては、10 μ L以上、15 μ L以上、20 μ L以上、25 μ L以上、30 μ L以上、35 μ L以上、40 μ L以上、45 μ L以上、50 μ L以上

、55 μ L以上、60 μ L以上、65 μ L以上、70 μ L以上、75 μ L以上、80 μ L以上、85 μ L以上、90 μ L以上、95 μ L以上、100 μ L以上などが挙げられる。好ましくは、100 μ Lである。

[0029] 本発明において、検体の量の上限值は、特に限定されないが、本発明の方法を再生医療関連製品に用いる場合は、本方法の検出感度を達成することができる量の中なるべく少ない量が好ましい。非限定例としては、10 mL以下、9 mL以下、8 mL以下、7 mL以下、6 mL以下、5 mL以下、4 mL以下、3 mL以下、2 mL以下、1 mL以下、950 μ L以下、900 μ L以下、850 μ L以下、800 μ L以下、750 μ L以下、700 μ L以下、650 μ L以下、600 μ L以下、550 μ L以下、500 μ L以下、450 μ L以下、400 μ L以下、350 μ L以下、300 μ L以下、250 μ L以下、200 μ L以下、150 μ L以下、100 μ L以下などが挙げられる。

[0030] 本発明において、検体の量の範囲は、上記例示した上限値および下限値の任意の組み合わせなどが挙げられる。すなわち、例えば、10 μ L～10 mL、10 μ L～9 mL、10 μ L～8 mL、10 μ L～7 mL、10 μ L～6 mL、10 μ L～5 mL、10 μ L～4 mL、10 μ L～3 mL、10 μ L～2 mL、10 μ L～1 mL、10～900 μ L、10～800 μ L、10～700 μ L、10～600 μ L、10～500 μ L、10～400 μ L、10～300 μ L、10～200 μ L、10～100 μ L、100 μ L～10 mL、100 μ L～9 mL、100 μ L～8 mL、100 μ L～7 mL、100 μ L～6 mL、100 μ L～5 mL、100 μ L～4 mL、100 μ L～3 mL、100 μ L～2 mL、100 μ L～1 mL、100～900 μ L、100～800 μ L、100～700 μ L、100～600 μ L、100～500 μ L、100～400 μ L、100～300 μ L、100～200 μ Lなどが挙げられる。とくに好ましくは、100～1000 μ Lであり、さらに好ましくは100～500 μ Lである。

[0031] 本発明において、核酸とは、DNAまたはRNAであり、好ましくはDN

Aである。

本発明において、検体から核酸を抽出する方法としては、マイコプラズマの核酸を抽出することができるものであればとくに限定されず、当業者であれば適宜最適な手法を選択することができる。例えば、フェノール・クロロホルム抽出や、担体を用いて抽出する方法などであってもよい。市販されている核酸抽出のためのキットを用いて行ってもよい。

[0032] 本発明において、核酸を増幅する方法は、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるものであればとくに限定されず、当業者であれば適宜最適な手法を選択することができる。

本発明において、核酸を増幅する方法としては、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction; ポリメラーゼ連鎖反応) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification; ループ介在等温増幅) 法などが挙げられる。

本発明の一態様において、核酸の増幅を行うステップは、PCR (Polymerase Chain Reaction; ポリメラーゼ連鎖反応) 法により行われる。PCR法において、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマー、ポリメラーゼ、バッファ、PCR条件(温度、時間、サイクル数等)などは、適宜選択することができる。

本発明において、PCRは、例えば、通常のPCR、リアルタイムPCR、Nested PCR、逆転写PCRなどであってもよい。好ましくは通常のPCRである。

[0033] 上述のとおり、本発明においてプライマーは、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるものであればいかなるものを用いてもよい。マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーの非限定例は、以下の配列：

Forward : 5' -GGCGAATGGGTGAGTAACACG- 3'

Reverse : 5' -CGGATAACGCTTGCGACCTATG- 3'

を含む。

[0034] 本発明の一側面は、検体中のマイコプラズマの有無を検査するための方法

であって、

(a) 検体を培養するステップ、および

(b) 培養した検体から核酸を抽出し、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを用いて核酸の増幅を行うステップを含み、検体は、バイオテクノロジー関連製品またはその一部である、前記方法に関する。

[0035] 本発明の一態様において、検体は、再生医療関連製品またはその一部である。

本発明の一態様において、再生医療関連製品は、加工が施された細胞、加工に供される細胞、加工や検査の際に用いられる試薬、細胞を培養するための培地、細胞を洗浄するための細胞洗浄液、および再生医療等製品を保存するための保存液から選択される少なくとも一つを含む。具体的には、シート状細胞培養物、シート状細胞培養物を製造するための細胞（例えば凍結保存細胞など）、シート調製培地、細胞洗浄液などが挙げられる。

[0036] 本発明の一態様において、本方法は、(c) ステップ (b) により得られたPCR産物の電気泳動を行うステップをさらに含む。

本発明において、増幅産物の電気泳動は、増幅された核酸を検出することができる方法であればとくに限定されず、当業者であれば適宜最適な手法を選択することができる。例えば、アガロースゲルなどのゲルの調製方法、バッファの選択、バンドの確認方法は、当業者であれば適宜最適な手法を選択することができる。バンドを確認する方法としては、例えば、エチジウムブロマイドやSYBR（登録商標）Greenなどによる核酸の染色や、サザンブロッティング法などが挙げられる。

[0037] 本発明において、培養の条件は、マイコプラズマを増殖させることができる方法であればとくに限定されず、当業者であれば適宜最適な手法を選択することができる。例えば、培地の種類や組成、培養温度、雰囲気、CO₂濃度なども適宜選択することができる。

本発明において、培養は、好気培養で行っても嫌気培養で行ってもよく、

検査したいマイコプラズマの種類に応じて適宜選択することができる。例えば、Mycoplasma arginini、Mycoplasma pneumoniae、Mycoplasma fermentans、Mycoplasma orale、Acholeplasma laidlawiiの5種については、好気的条件下、嫌氣的条件下のいずれにおいても増殖することができるが、Mycoplasma salivariumは嫌氣的条件下でのみ増殖することができ、Mycoplasma hyorhinisについては好气的条件下でのみ増殖することができるため、Mycoplasma salivarium以外の6種については好气的条件下で培養し、Mycoplasma salivariumについては嫌氣的条件下で培養してもよい。7種全てについて検査を行うために、2以上の検体をそれぞれ好気または嫌気で培養を行うことができる。

本発明の一態様において、本方法は、ステップ（a）において、嫌気培養を行うことを含む。

本発明の一態様において、本方法は、ステップ（a）において、2以上の検体をそれぞれ好気または嫌気で培養を行う。

[0038] 本発明の一態様において、ステップ（a）において培養される検体の量は、10 μ L～10 mLである。

本発明の一態様において、ステップ（a）において培養される検体の量は、100 μ L～1 mLである。

本発明の一態様において、ステップ（a）において培養される検体の量は、100 μ L～500 μ Lである。

[0039] 本発明において、培養する期間は、マイコプラズマが、本方法により得られる検出感度を超える量に増殖するのに十分な期間であればよく、任意に設定することができる。培養する期間は、非限定例としては、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日である。培養する期間の範囲は、非限定例としては、1日～14日、1日～7日、3～14日、3日～7日、6～10日である。好ましくは3～14日、より好ましくは6～10日である。

本発明の一態様において、培養は6～10日間行われる。

また、本発明の一態様において、培養は3～7日間行われる。

[0040] 本発明の一態様において、本方法は、ステップ(b)において核酸を抽出する前に、夾雑物を除去することをさらに含む。

本発明において、夾雑物とは、例えば、マイコプラズマの菌体以外の物質であり、具体的には、核酸、タンパク質などであり、好ましくは、マイコプラズマの核酸断片である。

本発明において、夾雑物を除去することは、除去前と比較して、夾雑物が減少している方法であればよい。夾雑物を除去する方法としては、例えば、検体をフィルターにより濾過または濾集する方法や、遠心分離により集菌する方法などが挙げられる。

本発明において、夾雑物はフィルターを通過して除去されても、フィルターを通過せずにフィルター上に残ることで除去されてもよい。好ましくは、夾雑物はフィルターを通過して除去される。

本発明の一態様において、夾雑物を除去することは、検体をフィルター濾集することにより行われる。

[0041] 濾集のためのフィルターには、市販のフィルターを用いることができる。フィルターの孔径は、例えば、 $0.22\mu\text{m}$ 、 $0.1\mu\text{m}$ 、 $0.01\mu\text{m}$ 、 $0.005\mu\text{m}$ である。例えば、孔径が $0.1\mu\text{m}$ であるフィルターであれば、 $0.1\mu\text{m}$ 程度の物質、例えばウイルスなどを捕捉することができる。フィルターは特定の分子量の夾雑物を排除するように設計されているフィルターであってもよく、例えば、フィルターの分画分子量(MWCO)は、 1000KDa 、 100KDa 、 50KDa である。例えば、分画分子量が 100KDa であるフィルターは、 100KDa 程度の物質を捕捉することができるフィルターである。本発明において、フィルターの分画分子量は、 $50\sim 1000\text{KDa}$ であり、好ましくは、 $50\sim 100\text{KDa}$ である。

本発明において、夾雑物は、フィルターの分画分子量より小さく、フィルターを通過して除去されてもよく、またフィルターの分画分子量より大きく、フィルターを通過せずにフィルター上に残ることで除去されてもよい。好

ましくは、夾雑物は、フィルターの分画分子量より小さく、フィルターを通過する。

本発明の一態様において、フィルターの分画分子量は1000kDa以下である、またはフィルターの孔径は0.22 μ m以下である。

本発明の一態様において、フィルターの分画分子量は100kDa以下である。

[0042] 本発明の一側面は、バイオテクノロジー関連製品の品質を管理する方法であって、本発明の方法によって、検体中のマイコプラズマの有無を検査するステップを含む、前記方法に関する。

本発明の一側面は、再生医療関連製品の品質を管理する方法であって、本発明の方法によって、検体中のマイコプラズマの有無を検査するステップを含む、前記方法に関する。

[0043] 本発明の一側面は、検体中のマイコプラズマの有無を検査するための方法であって、

(i) 検体を含む組成物から夾雑物を除去するステップ、および

(ii) 夾雑物が除去された検体から核酸を抽出し、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを用いて核酸の増幅を行うステップ、

を含む、前記方法に関する。

[0044] 本発明において、検体を含む組成物とは、例えば、検体に加えて、マイコプラズマの有無を検査するために用いられる培地、試薬などを含む組成物である。

本発明において、夾雑物とは、例えば、マイコプラズマの菌体以外の物質であり、具体的には、核酸やタンパク質などであり、好ましくは、マイコプラズマの核酸断片である。

本発明において、夾雑物を除去することは、除去前と比較して、夾雑物が減少している方法であればよい。夾雑物を除去する方法としては、例えば、検体をフィルターにより濾過または濾集する方法や、遠心分離により集菌す

る方法などが挙げられる。

本発明において、夾雑物はフィルターを通過して除去されても、フィルターを通過せずにフィルター上に残ることで除去されてもよい。好ましくは、夾雑物はフィルターを通過して除去される。

本発明の一態様において、ステップ (i) において、夾雑物を除去するステップは、検体をフィルター濾集することにより行われる。

[0045] 濾集のためのフィルターには、市販のフィルターを用いることができる。フィルターの孔径は、例えば、 $0.22\ \mu\text{m}$ 、 $0.1\ \mu\text{m}$ 、 $0.01\ \mu\text{m}$ 、 $0.005\ \mu\text{m}$ である。例えば、孔径が $0.1\ \mu\text{m}$ であるフィルターであれば、 $0.1\ \mu\text{m}$ 程度の物質、例えばウイルスなどを捕捉することができる。フィルターは特定の分子量の夾雑物を排除するように設計されているフィルターであってもよく、例えば、フィルターの分画分子量 (MWCO) は、 1000KDa 、 100KDa 、 50KDa である。例えば、分画分子量が 100KDa であるフィルターは、 100KDa 程度の物質を捕捉することができるフィルターである。本発明において、フィルターの分画分子量は、 $50\sim 1000\text{KDa}$ であり、好ましくは、 $50\sim 100\text{KDa}$ である。

本発明において、夾雑物は、フィルターの分画分子量より小さく、フィルターを通過して除去されてもよく、またフィルターの分画分子量より大きく、フィルターを通過せずにフィルター上に残ることで除去されてもよい。好ましくは、夾雑物は、フィルターの分画分子量より小さく、フィルターを通過する。

本発明の一態様において、フィルターの分画分子量は 1000KDa 以下である、またはフィルターの孔径は $0.22\ \mu\text{m}$ 以下である。

本発明の一態様において、フィルターの分画分子量は 100KDa 以下である。

[0046] 本発明の一態様において、本方法は、(iii) ステップ (ii) により得られた増幅産物の電気泳動を行うステップをさらに含む。

本発明において、増幅産物の電気泳動は、増幅された核酸を検出すること

ができる方法であればとくに限定されず、当業者であれば適宜最適な手法を選択することができる。例えば、アガロースゲルなどのゲルの調製方法、バッファの選択、バンドの確認方法は、当業者であれば適宜最適な手法を選択することができる。バンドを確認する方法としては、例えば、エチジウムブロマイドやSYBR（登録商標）Greenなどによる核酸の染色や、サザンブロッティング法などが挙げられる。

[0047] 本発明において、培養の条件は、マイコプラズマを増殖させることができる方法であればとくに限定されず、当業者であれば適宜最適な手法を選択することができる。例えば、培地の種類や組成、培養温度、雰囲気、CO₂濃度なども適宜選択することができる。

本発明において、培養は、好気培養で行っても嫌気培養で行ってもよく、検査したいマイコプラズマの種類に応じて適宜選択することができる。

例えば、Mycoplasma arginini、Mycoplasma pneumoniae、Mycoplasma fermentans、Mycoplasma orale、Acholeplasma laidlawiiの5種については、好气的条件下、嫌气的条件下のいずれにおいても増殖することができるが、Mycoplasma salivariumは嫌气的条件下でのみ増殖することができ、Mycoplasma hyorhinisについては好气的条件下でのみ増殖することができるため、Mycoplasma salivarium以外の6種については好气的条件下で培養し、Mycoplasma salivariumについては嫌气的条件下で培養してもよい。7種全てについて検査を行うために、2以上の検体をそれぞれ好気または嫌気で培養を行うことができる。

本発明の一態様において、本方法は、ステップ（ii）の前に検体を培養することを含む。

本発明の一態様において、本方法は、ステップ（i）の前に検体を培養することを含む。

[0048] 本発明において、培養する期間は、マイコプラズマが、本方法により得られる検出感度を超える量に増殖するのに十分な期間であればよく、任意に設定することができる。培養する期間は、非限定例としては、例えば、1日、

2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日である。培養する期間の範囲は、非限定例としては、1日～14日、1日～7日、3～14日、3日～7日、6～10日である。好ましくは3～14日、より好ましくは6～10日である。

[0049] 本発明の一態様において、検体は、バイオテクノロジー関連製品またはその一部である。

本発明の一態様において、検体は、再生医療関連製品またはその一部である。

本発明の一態様において、再生医療関連製品は、加工が施された細胞、加工に供される細胞、加工や検査の際に用いられる試薬、細胞を培養するための培地、細胞を洗浄するための細胞洗浄液、および再生医療等製品を保存するための保存液から選択される少なくとも一つを含む。具体的には、シート状細胞培養物、シート状細胞培養物を製造するための細胞（例えば凍結保存細胞など）、シート調製培地、細胞洗浄液などが挙げられる。

[0050] 本発明の一側面は、バイオテクノロジー関連製品の品質を管理する方法であって、本発明の方法によって、検体中のマイコプラズマの有無を検査するステップを含む、前記方法に関する。

本発明の一側面は、再生医療関連製品の品質を管理する方法であって、本発明の方法によって、検体中のマイコプラズマの有無を検査するステップを含む、前記方法に関する。

[0051] 本発明の一側面において、マイコプラズマの有無を検査する方法に用いるためのキットであって、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを含む、キットに関する。

本発明のキットは、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーに加え、マイコプラズマを培養するための培地、および／または夾雑物を除去するためのフィルターを含む。

本発明のキットは、例えば、マイコプラズマを培養するための器具、核酸の抽出に用いる試薬または器具、核酸の増幅に用いる試薬、その他の器具類

、使用方法に関する指示をさらに含んでいてもよい。

[0052] マイコプラズマを培養するための器具としては、例えば、プレート、チューブなどが挙げられる。核酸の抽出に用いる器具または試薬としては、例えば、フェノール、クロロホルム、イソプロパノール、エタノール、PEGなどを含む試薬や、シリカビーズ、シリカメンブレンが充填されたカラム、陰イオン交換カラムなどが挙げられる。核酸の増幅に用いる試薬としては、例えば、ポリメラーゼ、dNTP、バッファなどが挙げられる。その他の器具類としては、例えば、ピペット、スポイト、ピンセット、チューブなどが挙げられる。使用方法に関する指示としては、例えば、使用説明書、製造方法や使用方法に関する情報を記録した媒体、例えば、フレキシブルディスク、CD、DVD、ブルーレイディスク、メモリーカード、USBメモリーなどが挙げられる。

[0053] 本発明の一態様において、本発明のキットは、マイコプラズマを培養するための培地およびマイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを含む。

本発明の一態様において、本発明のキットは、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーおよび夾雑物を除去するためのフィルターを含む。

本発明の一態様において、本発明のキットは、マイコプラズマを培養するための培地、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマー、および夾雑物を除去するためのフィルターを含む。

実施例

[0054] 本発明を以下の例を参照してより詳細に説明するが、これらは本発明の特定の具体例を示すものであり、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0055] 1. 材料

1. マイコプラズマ株

第17改正日本薬局方参考情報に基づき、以下の7種類のマイコプラズマを用いた。なお、いずれも公的な保管機関より入手後、5継代以内のものを

用いた。

Mycoplasma arginini ATCC23838

Mycoplasma salivarium NBRC14478

Mycoplasma pneumoniae NBRC14401

Mycoplasma fermentans NBRC14854

Mycoplasma orale NBRC14477

Mycoplasma hyorhinis NBRC14858

Acholeplasma laidlawii NBRC14400

[0056] 2. マイコプラズマ否定試験用液体培地

終濃度で、Heart Infusion Broth 18.75 g/L、ブドウ糖3.0 g/L、塩酸アルギニン3.0 g/L、フェノールレッド0.025 g/Lとなるよう混合した後、121℃で15分間オートクレーブ滅菌を行った。これに、終濃度でウマ血清15%、酵母抽出液10%、ペニシリンGカリウム25万単位/Lとなるよう添加した。

[0057] 3. マイコプラズマ増殖用寒天培地

終濃度で、Heart Infusion Broth 17.5 g/L、カンテン10 g/Lとなるよう混合した後、121℃で15分間オートクレーブ滅菌を行った。これに、終濃度でウマ血清20%、酵母抽出液10%となるよう添加した。

[0058] 4. 検体

検体には、凍結保存細胞、シート調製培地、および細胞洗浄液を用いた。凍結保存細胞は、骨格筋芽細胞を 3.0×10^7 個/mLの濃度で凍結保存液に懸濁させ、凍結したものである。以下の実験においては、37.0℃設定の水浴中で穏やかに振り混ぜ、融解したものを試験に供した。シート調製培地は、DMEM/F12培地と20% (v/v) 量のヒト由来血清を混合したものである。細胞洗浄液は、Hanks's平衡塩液 (HBSS (-)) と0.5% (v/v) 量のヒト血清アルブミンを混合したものである。以後、「凍結保存細胞」を単に「細胞」、「シート調製培地」を単に「培地」、および「細胞洗浄液」を単に「洗浄液」とも称する。

[0059] 1. 方法および結果

1. 夾雑物除去工程の設定

マイコプラズマ否定試験用液体培地 2 mL に、陰性対照としてマイコプラズマ生菌の混入がないことが確認された細胞 100 μ L を加え、36℃、5% CO₂ 条件下で 7 日間好気培養した。また、陽性対照として、マイコプラズマ否定試験用液体培地 2 mL に、細胞 100 μ L と 7500 cfu/ μ L の Acholeplasma laidlawii を含むマイコプラズマ希釈液を 10 μ L 加えたものを好気培養した。

[0060] MagNA Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume (Roche) を用いて DNA 抽出を行い、最終的に 200 μ L の DNA 抽出液とした。DNA 抽出液 10 μ L に、PCR 反応液 (Takara Ex taq) 90 μ L 加え、PCR を行った。PCR は、40℃ 5 分を 1 サイクル、94℃ 10 分を 1 サイクル、94℃ 30 秒、70℃ 30 秒、72℃ 45 秒のサイクルを 20 サイクル (70℃ の部分が 2 サイクル毎に 1℃ ずつ低下。61℃ まで)、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 45 秒のサイクルを 25 サイクル、72℃ 4 分を 1 サイクルで PCR を実施した。プライマーには、以下の配列を用いた。

プライマー配列：

Forward : 5' -GGCGAATGGGTGAGTAACACG- 3'

Reverse : 5' -CGGATAACGCTTGCGACCTATG- 3'

PCR 後の反応液をアガロースゲルにて電気泳動後、DNA バンドの有無を確認した。

[0061] 結果を図 1 (A) に示す。M は 100 bp ラダーであり、レーン 1 はマイコプラズマを加えずに PCR を行ったものであり、レーン 2 は、陽性対照 (マイコプラズマを加えて PCR を行ったもの) である。マイコプラズマを加えていないもの (レーン 1) においても、マイコプラズマを加えた場合 (陽性対照、レーン 2) と同じサイズのバンドが現れた。検体には、マイコプラズマ生菌の混入がないことが確認された細胞を用いていることから、この試験系においてマイコプラズマの核酸断片が混入していると考えられた。

[0062] 試験系からマイコプラズマの核酸断片を除去するために、遠心式限外濾過フィルターによるマイコプラズマの捕集を検討した。

マイコプラズマ否定試験用液体培地 2 mL に、陰性対照としてマイコプラズマ生菌の混入がないことが確認された細胞 100 μ L を加え、36℃、5% CO₂ 条件下で 7 日間好気培養した。また、陽性対照として、マイコプラズマ否定試験用液体培地 2 mL に、細胞 100 μ L と 7500 cfu/ μ L の Acholeplasma laidlawii を含むマイコプラズマ希釈液を 10 μ L 加えたものを好気培養した。

4℃、400×g、5 分間遠心した上清 500 μ L を分画分子量 100 KDa の遠心式限外濾過フィルター (Merck Millipore、Amicon Ultra 100KDa) に移し、4℃、14,000×g、10 分間遠心した。PBS 500 μ L を加え、4℃、14,000×g、10 分間遠心した後、さらに PBS 500 μ L を加え、激しくピペティングを行い、溶液を回収した。PCR 後の反応液をアガロースゲルにて電気泳動後、DNA バンドの有無を確認した。

[0063] 結果を図 1 (B) に示す。M は 100 bp ラダーであり、レーン 1～3 はマイコプラズマを加えずにフィルター濾集後に PCR を行ったものであり、レーン 4～6 は、陽性対照 (マイコプラズマを加え、フィルター濾集後に PCR を行ったもの) である。陰性対照としたもの (レーン 1～3) においては、バンドが現れず、マイコプラズマを加えた場合 (陽性対照、レーン 4～6) にのみ、バンドが現れた。以上より、遠心式限外濾過フィルターによって、試験系からマイコプラズマの DNA 断片の除去が可能であることが示された。

[0064] 2. フィルターの選定

マイコプラズマを捕集するための遠心式限外濾過フィルターの検討を行った。遠心式限外濾過フィルターは分画分子量 100 KDa (Merck Millipore、Amicon Ultra 100KDa)、孔径 0.1 μ m (Merck Millipore、Ultrafree 0.1 μ m)、孔径 0.22 μ m (Merck Millipore、Ultrafree 0.22 μ m) の 3 種

類を用い、マイコプラズマには Mycoplasma pneumoniae と Acholeplasma laidlawii を用いた。検体として、細胞、培地および洗浄液を用いた。検体が細胞の場合は、マイコプラズマ否定試験用液体培地を $2000\mu\text{L}$ 、検体を $100\mu\text{L}$ 、 20000cfu/mL のマイコプラズマ希釈液を $100\mu\text{L}$ 加えた。 4°C 、 $400\times g$ 、5分間遠心した上清 $500\mu\text{L}$ をフィルターに移し、 4°C 、 $14,000\times g$ 、10分間遠心した。検体が培地または洗浄液の場合は、マイコプラズマ否定試験用液体培地を $2000\mu\text{L}$ 、検体を $500\mu\text{L}$ 、 20000cfu/mL のマイコプラズマ希釈液を $100\mu\text{L}$ 加えた。 $500\mu\text{L}$ をフィルターに移し、 4°C 、 $14,000\times g$ 、10分間遠心した。PBS $500\mu\text{L}$ を加え、 4°C 、 $14,000\times g$ 、10分間遠心した後、さらにPBS $500\mu\text{L}$ を加え、激しくピペティングを行い、フィルターにトラップされたマイコプラズマを回収した。陰性対照として、マイコプラズマ希釈液を加えない条件で同様の操作を行った。

[0065] フィルター回収液から、MagNA Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume (Roche) を用いてDNAを抽出し、最終的に $200\mu\text{L}$ のDNA抽出液とした。

PCR反応液 (Takara Ex taq) $90\mu\text{L}$ にDNA抽出液 $10\mu\text{L}$ 加え、 40°C 5分を1サイクル、 94°C 10分を1サイクル、 94°C 30秒、 70°C 30秒、 72°C 45秒のサイクルを20サイクル (70°C の部分が2サイクル毎に 1°C ずつ低下。 61°C まで)、 94°C 30秒、 60°C 30秒、 72°C 45秒のサイクルを25サイクル、 72°C 4分を1サイクルで実施した。プライマーには、以下の配列を用いた。

プライマー配列：

Forward : $5' -\text{GGCGAATGGGTGAGTAACACG}-3'$

Reverse : $5' -\text{CGGATAACGCTTGCGACCTATG}-3'$

PCR後の反応液をアガロースゲルにて電気泳動後、DNAバンドの有無を確認した。フィルター回収液においてマイコプラズマのDNAバンドが確認できたものについて、捕集可能であると判断した。結果を表1に示す。Myc

oplasma pneumoniaeについては、いずれの検体においても0.22 μ mのフィルターで、捕集が可能であった。Acholeplasma laidlawiiについては、洗浄液検体においては0.22 μ mのフィルターで、培地検体においては、0.1 μ mのフィルターで、細胞検体においては、100 kDaのフィルターで捕集が可能であった。すべての検体において2種類のマイコプラズマを捕集可能であったのは、100 kDaのフィルターのみであった。

[0066] [表1]

表1 各フィルターにおけるマイコプラズマの捕集可否

フィルター	検体	Negative Control	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
AmiconUltra 100kDa	細胞	-	+	+
	培地	-	+	+
	洗浄液	-	+	+
Ultrafree 0.1 μ m	細胞	-	-	+
	培地	-	+	+
	洗浄液	-	+	+
Ultrafree 0.22 μ m	細胞	-	+	+
	培地	-	-	+
	洗浄液	-	+	+

+: 捕集可能、-: 捕集不可能

[0067] 3. マイコプラズマの増殖性の確認

細胞、培地、洗浄液の各検体に10 c f u / m L以下となるようマイコプラズマを加え培養したときに、どの程度マイコプラズマが増殖するか、7種類のマイコプラズマについて確認した。

[0068] 検体が凍結保存細胞の場合において、ウェルに、マイコプラズマ否定試験用液体培地2 mL、検体100 μ L、所望のマイコプラズマを含むように調製されたマイコプラズマ希釈液10 μ Lを加えた。マイコプラズマは、ウェルあたり、Mycoplasma argininiについて試験する場合0.80 c f u、Mycoplasma salivariumについて試験する場合0.54 c f u、Mycoplasma pneumoniaeについて試験する場合0.68 c f u、Mycoplasma fermentansについて試験する場合0.60 c f u、Mycoplasma oraleについて試験する場合0.60 c f u、Mycoplasma hyorhinitisについて試験する場合0.74 c f u、Acholeplasma laidlawiiについて試験する場合0.84 c f u含むように

加えた。すなわち、マイコプラズマは、検体100 μ L当たり、Mycoplasma argininiについて試験する場合0.80cfu/100 μ L (8.0cfu/mL)、Mycoplasma salivariumについて試験する場合0.54cfu/100 μ L (5.4cfu/mL)、Mycoplasma pneumoniaeについて試験する場合0.68cfu/100 μ L (6.8cfu/mL)、Mycoplasma fermentansについて試験する場合0.60cfu/100 μ L (6.0cfu/mL)、Mycoplasma oraleについて試験する場合0.60cfu/100 μ L (6.0cfu/mL)、Mycoplasma hyorhinisについて試験する場合0.74cfu/100 μ L (7.4cfu/mL)、Acholeplasma laidlawiiについて試験する場合0.84cfu/100 μ L (8.4cfu/mL)となるように加えた。

- [0069] 検体がシート調製培地または細胞洗浄液である場合において、ウェルに、マイコプラズマ否定試験用液体培地2mL、検体500 μ L、所望のマイコプラズマを含むように調製されたマイコプラズマ希釈液50 μ Lを加えた。マイコプラズマは、ウェルあたり、Mycoplasma argininiについて試験する場合4.0cfu、Mycoplasma salivariumについて試験する場合2.7cfu、Mycoplasma pneumoniaeについて試験する場合3.4cfu、Mycoplasma fermentansについて試験する場合3.0cfu、Mycoplasma oraleについて試験する場合3.0cfu、Mycoplasma hyorhinisについて試験する場合3.7cfu、Acholeplasma laidlawiiについて試験する場合4.2cfu含むように加えた。すなわち、検体500 μ L当たり、マイコプラズマは、Mycoplasma argininiについて試験する場合4.0cfu/500 μ L (8.0cfu/mL)、Mycoplasma salivariumについて試験する場合2.7cfu/500 μ L (5.4cfu/mL)、Mycoplasma pneumoniaeについて試験する場合3.4cfu/500 μ L (6.8cfu/mL)、Mycoplasma fermentansについて試験する場合3.0cfu/500 μ L (6.0cfu/mL)、Mycoplasma oraleについて試験する場合3.0cfu/500 μ L (6.0cfu/mL)、Mycoplasma hyorhinisについて試験する場合3.7

c f u / 5 0 0 μ L (7 . 4 c f u / m L) 、 Acholeplasma laidlawii について試験する場合 4 . 2 c f u / 5 0 0 μ L (8 . 4 c f u / m L) となるように加えた。

[0070] Mycoplasma salivariumを除く 6 種類のマイコプラズマについては 3 6 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ 条件下で好気培養し、Mycoplasma salivariumを 3 6 $^{\circ}$ C 条件下で嫌気培養した。培養の 3 日後、7 日後に各ウェルから培養液を抜き取り、菌数測定を行った。

結果を図 2 ~ 4 に示す。7 日間培養後のマイコプラズマの量は、菌種により異なるが 1 5 0 0 ~ 1 0 ⁹ c f u / m L に増殖しており、この前培養工程において、少量のマイコプラズマから十分な量に増殖することが確認された。

[0071] 4. 検出限界の算出

細胞、培地、洗浄液の各検体において、7 種類のマイコプラズマの検出限界を算出した。

[0072] 検体が凍結保存細胞である場合において、マイクロチューブに、マイコプラズマ否定試験用液体培地 8 5 2 μ L、検体 4 8 μ L を加え、所望のマイコプラズマを含むように調製されたマイコプラズマ希釈液 1 0 0 μ L を加えた。マイコプラズマは、マイクロチューブあたり、1 0 0 0 c f u、5 0 0 c f u、1 0 0 c f u、5 0 c f u となるように加えた。すなわち、マイクロチューブ中の全容量に対して、1 0 0 0 c f u / m L、5 0 0 c f u / m L、1 0 0 c f u / m L、5 0 c f u / m L となるように加えた。

[0073] 検体がシート調製培地または細胞洗浄液である場合において、マイクロチューブに、マイコプラズマ否定試験用液体培地 5 2 5 μ L、検体 1 5 0 μ L、所望のマイコプラズマを含むように調製されたマイコプラズマ希釈液 7 5 μ L を加えた。マイコプラズマは、マイクロチューブあたり、7 5 0 c f u、3 7 5 c f u、7 5 c f u、3 7 . 5 c f u となるように加えた。すなわち、マイクロチューブ中の全容量に対して、1 0 0 0 c f u / m L、5 0 0 c f u / m L、1 0 0 c f u / m L、5 0 c f u / m L となるように加えた。

[0074] 検体が凍結保存細胞である場合において、4℃、400×gで5分間遠心分離した上清500μLを分画分子量100kDaの遠心式限外濾過フィルター（Merck Millipore）に移し、4℃、14,000×g、10分間遠心した。

検体が培地または洗浄液である場合において、500μLを分画分子量100kDaの遠心式限外濾過フィルター（Merck Millipore）に移し、4℃、14,000×g、10分間遠心した。PBS 500μLを加え、4℃、14,000×g、10分間遠心した後、さらにPBS 500μLを加え、激しくピペティングを行い、フィルターにトラップされたマイコプラズマを回収した。

[0075] MagNA Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume (Roche) を用いて、夾雑物除去後の回収液全量からDNAを抽出し、最終的に200μLのDNA抽出液とした。

[0076] PCR反応液（Takara Ex taq）90μLにDNA抽出液10μL加え、40℃5分を1サイクル、94℃10分を1サイクル、94℃30秒、70℃30秒、72℃45秒のサイクルを20サイクル（70℃の部分が2サイクル毎に1℃ずつ低下。61℃まで）、94℃30秒、60℃30秒、72℃45秒のサイクルを25サイクル、72℃4分を1サイクルでPCRを実施した。プライマーには、以下の配列を用いた。

プライマー配列：

Forward : 5' -GGCGAATGGGTGAGTAACACG- 3'

Reverse : 5' -CGGATAACGCTTGCGACCTATG- 3'

PCR後の反応液をアガロースゲルにて電気泳動後、DNAバンドの有無を確認した。

[0077] 1000cfu/mL、500cfu/mL、100cfu/mL、50cfu/mLの各マイコプラズマ濃度について24回行い、マイコプラズマ濃度と陽性数（マイコプラズマに特異的なDNAバンドが確認された数）の割合から、国立感染症研究所統計解析支援ソフトBioassay Assistを用い、プ

ロビット解析を行い、95%検出感度を算出した。結果を表2に示す。各マイコプラズマの検出限界は、92～5647cfu/mLであった。

[0078] [表2]

表2 検出限界

検体	<i>M. arginini</i>	<i>M. salivarium</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. fermentans</i>
細胞	132cfu/mL	202cfu/mL	1043cfu/mL	176cfu/mL
培地	335cfu/mL	474cfu/mL	542cfu/mL	124cfu/mL
洗浄液	473cfu/mL	104cfu/mL	502cfu/mL	92cfu/mL
検体	<i>M. orale</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>A. laidlawii</i>	
細胞	1365cfu/mL	1068cfu/mL	3044cfu/mL	
培地	751cfu/mL	1091cfu/mL	2579cfu/mL	
洗浄液	633cfu/mL	544cfu/mL	5647cfu/mL	

[0079] 5. マイコプラズマの検出性

細胞、培地、洗浄液の各検体において、前培養において増殖したマイコプラズマの量と本方法における検出感度を比較し、最終的な試験方法としてマイコプラズマ汚染を高感度に検出可能であるか検証した。前培養において増殖したマイコプラズマの量と本方法における検出感度を表3および図5～7に示す。7種のマイコプラズマ全てにおいて、3. で算出した前培養において増殖したマイコプラズマの量は、4. で算出した検出感度を超えるものであった。したがって、7種のマイコプラズマ全てにおいて、細胞検体については、1cfu以下のマイコプラズマを含む100μLの検体から、培地および洗浄液検体については、5cfu以下のマイコプラズマを含む500μLの検体から、10cfu/mL以下の感度でマイコプラズマを検出することが可能であることが検証された。

[0080]

[表3]

表 3 マイコプラズマの検出性

検体	マイコプラズマ	検体 1mL 当たりの マイコプラズマ 汚染 (cfu/mL)	前培養後の 培養液 (A) (cfu/mL)	検出感度 (B) (cfu/mL)	検出可否 (可能:A>B) (不可:A<B)
細胞	<i>M. arginini</i>	8.0	5.79×10^9	132	可能
	<i>M. salivarium</i>	5.4	3.53×10^8	202	可能
	<i>M. pneumoniae</i>	6.8	1.54×10^3	1043	可能
	<i>M. fermentans</i>	6.0	5.43×10^5	176	可能
	<i>M. orale</i>	6.0	1.17×10^9	1365	可能
	<i>M. hyorhinis</i>	7.4	1.58×10^8	1068	可能
	<i>A. laidlawii</i>	8.4	3.62×10^7	3044	可能
培地	<i>M. arginini</i>	8.0	1.00×10^9	335	可能
	<i>M. salivarium</i>	5.4	6.18×10^7	474	可能
	<i>M. pneumoniae</i>	6.8	6.77×10^3	542	可能
	<i>M. fermentans</i>	6.0	1.24×10^{11}	124	可能
	<i>M. orale</i>	6.0	2.56×10^7	751	可能
	<i>M. hyorhinis</i>	7.4	6.20×10^7	1091	可能
	<i>A. laidlawii</i>	8.4	4.98×10^7	2579	可能
洗浄液	<i>M. arginini</i>	8.0	4.82×10^8	473	可能
	<i>M. salivarium</i>	5.4	6.22×10^7	104	可能
	<i>M. pneumoniae</i>	6.8	4.85×10^3	502	可能
	<i>M. fermentans</i>	6.0	3.38×10^8	92	可能
	<i>M. orale</i>	6.0	2.71×10^9	633	可能
	<i>M. hyorhinis</i>	7.4	1.84×10^7	544	可能
	<i>A. laidlawii</i>	8.4	1.44×10^{11}	5647	可能

[0081] 6. マイコプラズマ否定試験

6. 1. 前培養

マイコプラズマ否定試験用液体培地 2 mL に、検体として洗浄液 500 μ L を加え、36℃、5%CO₂条件下で7日間好気培養した。同様に、マイコプラズマ否定試験用液体培地 2 mL に、検体として洗浄液 500 μ L を加えた後、36℃条件下で7日間嫌気培養した。陰性対照は、検体の代わりにPBSを加え、同様の操作を行った。また、陽性対照として、1500 cfu/ μ L の *Mycoplasma orale* を含むマイコプラズマ希釈液を 50 μ L 加えたものを好気培養し、また、1500 cfu/ μ L の *Mycoplasma salivarium* を含むマイコプラズマ希釈液を 50 μ L 加えたものを、嫌気培養した。

6. 2. 夾雑物除去

培養液 500 μ L を分画分子量 100 kDa の遠心式限外濾過フィルター

(Merck Millipore) に移し、4℃、14,000×g、10分間遠心した。PBS 500μLを加え、4℃、14,000×g、10分間遠心した後、さらにPBS 500μLを加え、激しくピペティングを行い、フィルターにトラップされたマイコプラズマを回収した。

[0082] 6. 3. DNA抽出

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume (Roche) を用いて、夾雑物除去後の回収液全量からDNAを抽出し、最終的に200μLのDNA抽出液とした。

6. 4. PCRと電気泳動

PCR反応液 (Takara Ex taq) 90μLにDNA抽出液10μL加え、40℃5分を1サイクル、94℃10分を1サイクル、94℃30秒、70℃30秒、72℃45秒のサイクルを20サイクル (70℃の部分が2サイクル毎に1℃ずつ低下。61℃まで)、94℃30秒、60℃30秒、72℃45秒のサイクルを25サイクル、72℃4分を1サイクルでPCRを実施した。プライマーには、以下の配列を用いた。

プライマー配列：

Forward : 5' -GGCGAATGGGTGAGTAACACG- 3'

Reverse : 5' -CGGATAACGCTTGCGACCTATG- 3'

PCR後の反応液をアガロースゲルにて電気泳動後、DNAバンドの有無を確認した。

6. 5. 結果

結果を図8に示す。Mは100bpラダーであり、レーン1は陰性対照（水に対してPCRを行ったもの）であり、レーン2～4は陰性対照（検体の代わりにPBSを用いて好気培養し、PCRを行ったもの）であり、5～7は検体を好気培養し、PCRを行ったもの、レーン8～10は陽性対照（検体にマイコプラズマ希釈液 (*Mycoplasma orale*) を加えて好気培養し、PCRを行ったもの）であり、レーン11～13は陰性対照（検体の代わりにPBSを用いて嫌気培養し、PCRを行ったもの）であり、レーン14～16

は検体を嫌気培養し、PCRを行ったものであり、レーン17～19は陽性対照（検体にマイコプラズマ希釈液（Mycoplasma salivarium）を加えて嫌気培養し、PCRを行ったもの）である。陽性対照であるレーン8～10および17～19にバンドが現れ、陰性対照であるレーン2～4および11～13にはバンドが現れなかった。検体を流したレーン5～7および14～16においてもバンドが現れなかったことから、検体中にはマイコプラズマが存在していないことが確認された。

[0083] 本明細書に記載された本発明の種々の特徴は様々に組み合わせることができ、そのような組み合わせにより得られる態様は、本明細書に具体的に記載されていない組み合わせも含め、全て本発明の範囲内である。また、当業者は、本発明の精神から逸脱しない多数の様々な改変が可能であることを理解しており、かかる改変を含む均等物も本発明の範囲に含まれる。したがって、本明細書に記載された態様は例示にすぎず、これらが本発明の範囲を制限する意図をもって記載されたものではないことを理解すべきである。

請求の範囲

- [請求項1] 検体中のマイコプラズマの有無を検査するための方法であって、
(a) 検体を培養するステップ、および
(b) 培養した検体から核酸を抽出し、マイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを用いて核酸の増幅を行うステップ、
を含み、検体は、バイオテクノロジー関連製品またはその一部である、前記方法。
- [請求項2] 検体が、再生医療関連製品またはその一部である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 核酸の増幅を行うステップが、PCR (Polymerase Chain Reaction; ポリメラーゼ連鎖反応) 法により行われる、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] (c) ステップ(b)により得られた増幅産物の電気泳動を行うステップをさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] ステップ(a)において、嫌気培養を行うことを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] ステップ(a)において、2以上の検体をそれぞれ好気または嫌気で培養を行う、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] ステップ(a)において培養される検体の量が、10 μ L～10 mLである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] ステップ(a)において、培養が3～14日間行われる、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] ステップ(b)において核酸を抽出する前に、夾雑物を除去することをさらに含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 夾雑物を除去することが、検体をフィルター濾集することにより行われる、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] フィルターの分画分子量が1000 kDa以下である、またはフィ

ルターの孔径が0.22 μm 以下である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

[請求項12] 再生医療関連製品が、加工が施された細胞、加工に供される細胞、加工や検査の際に用いられる試薬、細胞を培養するための培地、細胞を洗浄するための細胞洗浄液、および再生医療等製品を保存するための保存液から選択される少なくとも一つを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

[請求項13] バイオテクノロジー関連製品の品質を管理する方法であって、請求項1～12に記載の方法によって、検体中のマイコプラズマの有無を検査するステップを含む、前記方法。

[請求項14] 請求項1～12のいずれか一項に記載の方法に用いるためのキットであって、マイコプラズマを培養するための培地およびマイコプラズマ由来の核酸配列を増幅することができるプライマーを含む、前記キット。

[請求項15] 夾雑物を除去するためのフィルターをさらに含む、請求項14に記載のキット。