

資料No. 2

日本薬局方新規収載候補品目（案）について

平成21年4月21日  
日本薬局方部会

## 第十五改正日本薬局方第二追補以降の新規収載候補品目（案）について

### ○日本薬局方新規収載候補品目（案）について

平成20年10月から平成21年1月までに製造販売業者等から独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下「機構」という。）に対して、新規収載の要望があった5品目について、機構の日本薬局方原案審議委員会の総合委員会において、第十六改正日本薬局方作成基本方針（平成18年7月薬事・食品衛生審議会答申）に基づき審議されたところ。その結果、すべての品目について収載することが適当とされた。

### 日本薬局方新規収載候補品目（案）

No.	候補品目
1	バルサルタン錠
2	ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート
3	ロサルタンカリウム錠
4	エダラボン
5	エダラボン注射液

なお、本収載候補品目の名称については、別途、日本薬局方原案審議委員会にて審議を行う予定である。

### 新規収載候補品目の追加(化学薬品等)

	1	2	3	4	5
収載希望品目名	バルサルタン錠	ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート	ロサルタンカリウム錠	エダラボン	エダラボン注射液
販売名	ディオバン錠20 mg、40 mg、80 mg、160 mg		ニューロタン錠25、50 ニューロタン錠100 mg	ラジカット注30mg	ラジカット注30mg
承認年月日	2000.9.22 (20, 40, 80 mg) 2004.7.14 (160 mg)		1998.7 (25, 50 mg) * 100 mgは承認申請中 (2008.3.27)	2001.4	2001.4
後発品承認状況 (H19年8月 保険薬 事典調べ)	なし		なし	なし	なし
他剤型	なし		なし	バッグ製剤(追加申請中)	バッグ製剤(追加申請中)

### 三薬局方の収載状況

EP	なし	なし	あり	なし	なし
USP	原薬あり。錠剤はDiovan HCT錠(バルサルタン+ヒドロクロロチアジド錠)が収載。	National Formularyに収載(2005)	あり	なし	なし
JP		医薬品添加物規格2003に収載	原薬はJP15第二追補へ収載予定		

薬機発第 0331008 号

平成 21 年 3 月 31 日

厚生労働省医薬食品局審査管理課長 殿

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構理事長

日本薬局方新規収載候補品目（案）の報告について

独立行政法人医薬品医療機器総合機構法第 15 条第 1 項第 5 号ハの規定により、厚生労働省が制定する日本薬局方のための調査及び情報の整理等を行い、日本薬局方新規収載候補品目（案）を作成したので別添のとおり報告致します。

別添

## 日本薬局方新規収載候補品目（案）の作成に関する報告

第十五改正日本薬局方については平成18年3月に告示され、第十五改正日本薬局方第一追補については平成19年9月に告示されたところである。現在、第十五改正日本薬局方第二追補（平成21年9月に告示予定）及び第十六改正日本薬局方（平成23年3月に告示予定）に向けた改正作業が進められているところである。

日本薬局方は5年ごとの大改正及び2回の追補改正を行うことにより、医学薬学の進歩に応じて速やかに内容を改定するべく対応している。すなわち、平成18年8月に示された「第十六改正日本薬局方作成基本方針」には、日本薬局方の5本の柱の一つとして、「保健医療上重要な医薬品の全面的収載」が定められており、優先的に新規収載をすべき品目として、医療上汎用性があると考えられる医薬品等が掲げられている。

このような中、医薬品医療機器総合機構では、日本薬局方への収載要望に基づき、日本薬局方原案審議委員会の総合委員会の各委員の意見を聴したところである。今般、本審議結果に基づき、第十六改正日本薬局方以降の新規収載候補品目として別紙のとおり案をとりまとめたので報告する。

**資料No. 3**

## 日本薬局方の参考情報の改正（案）について

	ページ
参考情報改正案の概要	1
参考情報一覧表	2
参考情報新旧対照表	3
参考情報改正案	17

平成21年4月21日  
日本薬局方部会

## 第十五改正日本薬局方第二追補の参考情報（案）の概要

### 1. 以下の項目を新しく収載する。

#### (1) 近赤外吸収スペクトル測定法

物質の定性的又は定量的評価を行う分光学的方法のひとつとして近赤外吸収スペクトルを用いる試験法

#### (2) 蛍光染色による細菌数の迅速測定法

生理活性を持つ細菌を迅速に計数する手法として蛍光染色による試験法

#### (3) システム適合性

試験結果の信頼性を確保するために行うシステム適合性試験について意義、留意事項、分析システム変更時の考え方を収載

#### (4) 粉体の細かさの表示法

日米欧3薬局方で調和合意された内容を反映するもの

### 2. 以下の項目を改正する。

#### (1) 14. 第15改正日本薬局方における国際調和

日米欧3薬局方で調和合意された内容を反映するもの

#### (2) 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

培養法及びDNA染色法

[参考情報一覧表]

No.	項目名	新規	改正
1	アミノ酸分析法		
2	アリストロキア酸について		
3	胃腸薬のpH試験法		
4	遺伝子解析による微生物の迅速同定法		
5	医薬品の残留溶媒ガイドライン、残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例		
6	SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法		
7	エンドキシン規格値の設定		
8	キャピラリー電気泳動法		
9	固体又は粉体の密度		
10	最終滅菌医薬品の無菌性保証		
11	最終滅菌法及び滅菌指標体		
12	錠剤の摩損度試験法		
13	製薬用水の品質管理		
14	第15改正における国際調和		○
15	たん白質定量法		
16	中心静脈栄養剤中の微量アルミニウム試験法		
17	等電点電気泳動法		
18	日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件		
19	日局通則40等に規定する動物由来医薬品起源としての動物に求められる要件		
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		○
21	培地充てん試験法		
22	微生物殺滅法		
23	非無菌医薬品の微生物学的品質特性		
24	プラスチック製医薬品容器		
25	分析法バリデーション		
26	粉体の流動性		
27	ペプチドマップ法		
28	保存効力試験法		
29	無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法		
30	レーザー回折法による粉体粒度測定		
31	遺伝子情報を利用する生薬の純度試験		
32	近赤外吸収スペクトル測定法	○	
33	蛍光染色による細菌数の迅速測定法	○	
34	システム適合性	○	
35	粉体の細かさの表示法	○	
付録1	原子量表(2004年)について		



## 参考情報 新旧対照表

### 14. 第十五改正日本薬局方における国際調和

新		備考
14. 第十五改正日本薬局方における国際調和の条に次を加える。		
調和年月：2008年6月 (Rev. 1)		
薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考
Bulk Density and Tapped Density of Powders	3.01 かさ密度及びタップ密度測定法  (前書き)  かさ密度 第1法(メスリンダーを用いる方法)  操作法 第2法(ポリュメーターを用いる方法)  装置 操作法 第3法(容器を用いる方法) 装置 操作法	日本薬局方独自記載事項： 当該測定法に関する説明
Bulk density Method 1: Measurement in a graduated cylinder Procedure Method 2: Measurement in a volumeter Apparatus Procedure Method 3: Measurement in a vessel Apparatus Procedure	タップ密度 第1法 装置 操作法 第2法 操作法 第3法 操作法	
Tapped density Method 1 Apparatus Procedure Method 2 Procedure Method 3 Procedure	粉体の圧縮性の尺度	
Measures of powder compressibility		
調和年月：2007年5月		
薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考
Gas Pycnometric Density of Solids (Introduction)	3.03 粉体の粒子密度測定法 (前書き)	日本薬局方独自記載事項： 測定法の対象を記載 測定温度の部分は操作法に記載
Apparatus  Method Expression of the results	1. 装置 装置の校正 2. 操作法 2. 操作法	
調和年月：2006年10月		
薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考
Rice Starch Definition Identification A Identification B	コメデンプン 基原 確認試験 (1) 確認試験 (2)	

Identification C pH Iron Loss on drying Sulphated ash Oxidising substances Sulphur dioxide	確認試験 (3) pH 純度試験 (1) 鉄 乾燥減量 強熱残分 純度試験 (2) 酸化性物質 純度試験 (3) 二酸化イオウ								
<p>昭和年月：2007年5月</p> <table border="1"> <tr> <td>薬局方調和事項</td> <td>第十五改正日本薬局方 (第二追補)</td> <td>備考</td> </tr> <tr> <td>Powder Fineness</td> <td>参考情報 粉体の細かさの表示法</td> <td></td> </tr> </table>				薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考	Powder Fineness	参考情報 粉体の細かさの表示法	
薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考							
Powder Fineness	参考情報 粉体の細かさの表示法								

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

新	旧	備考
<p>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</p> <p>次のように改める。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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</p>	<p>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</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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</p>	

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。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

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。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* 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  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で 14 日間以上培養する。

2) 液体培地 1 本当たり検体 (細胞懸

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* FH 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* CH-19299 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もので、100 CFU 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4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、半数のカンテン平板培地は5 ~ 10%の炭酸ガスを含む空気中 (好氣的条件) で、残りの半数は5 ~ 10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中 (嫌氣的条件) で、いずれも適切な湿度のもと  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  において14 日間以上培養する。

2) 液体培地 1 本当たり検体 (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°C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気的条件下, 36±1°C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* (ATCC29052, ATCC17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale*

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 2 本とし, 各々 1 本ずつを好気的条件下及び嫌気的条件下で培養する。

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。

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に際しては, 好気培養した液体培地から植え継いだものは好気的条件下, 嫌気培養した液体培地から植え継いだものは嫌気的条件下, それぞれ 36±1°C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 以下の *M. hyorhinis* DBS-1050 又は *M. orale* CH-19299を接種する。

(ATCC23714 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、公的又は適当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。細胞は適当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凍し、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* (ATCC29052, ATCC17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC23714 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

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、公的又は適当と認められた機関より入手後適切に管理されたものでなければならない。細胞は適当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凍し、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* -(DBS-1050)及び *M. orale*-(CH-19299) 100 CFU以下を使用する。

細胞は 5%炭酸ガスを含む空气中 36

±1°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  $1 \times 10^4$  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. hyorhina* (ATCC29052, ATCC17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC23714 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% 炭酸ガスを含む空気

±1°Cにおいて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  $1 \times 10^4$  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. hyorhina* 及び *M. orale* 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% 炭酸ガスを含む空気

中 36±1℃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

中 36±1℃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



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* (ATCC29052, ATCC17981 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 16 S - 23 S 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。

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 以下の *M. hyorhinis*) 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