

2017年10月26日

改訂 2024年6月30日

タカラバイオ株式会社

## TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit

### バリデーション試験データ

#### <注意事項>

- ・ TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kitでは、核酸抽出キットとしてNucleoSpin Mycoplasma DNA (製品コード 740860.50) を推奨しています。(2024年6月～)
- ・ 本バリデーション試験データ(2017年取得)では、核酸抽出キットとしてNucleoSpin Virus (製品コード740983.10/.50/.250)を使用しました。
- ・ NucleoSpin Mycoplasma DNAとNucleoSpin Virusの比較資料をご希望の方は、テクニカルサポートラインにお問い合わせください。( <https://www.takara-bio.co.jp/research/support/tsl/> )

## 1. 対象製品

TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit (製品コード:RR277A)

## 2. 実施日および実施場所

実施日:2017年5月~7月

実施場所:タカラバイオ株式会社

〒525-0058 滋賀県草津市野路東七丁目4番38号

## 3. 要約

TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit につき、第十八改正日本薬局方 参考情報の「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 C. 核酸増幅法 (NAT)」に記載された方法でのバリデーション試験を実施し、本製品の性能を示すデータを取得した。その結果、検出感度試験においては、試験に供した 7 菌種の *Mycoplasma* のすべてにつき 95% 陽性カットオフ値が 10 cfu/ml (または 10 ccu/ml) であることを確認した。検出網羅性確認試験においては、試験に供した 7 種の *Mycoplasma* がすべて良好に検出され、網羅性が高いことが確認された。検出特異性試験においては、試験に供した 13 種の細菌はいずれも検出限界以下となり、特異性が高いことが確認された。頑健性試験においては、反応組成がわずかに異なる場合や qPCR 機種や装置個体が異なる場合にもほぼ同等の結果が得られることが確認された。

## 4. 試験方法

### 4.1 試験材料

#### 4.1.1 Mycoplasma 標準品

##### 4.1.1.1 *Mycoplasma salivarium*

名称	<i>Mycoplasma salivarium</i> Strain H110
略称	<i>M. salivarium</i>
Lot No.	60171952
入手方法	ATCC No. 23064-TTR
Post-preservation titer	$1.67 \times 10^9$ cfu/mL
Genome copy	$3.80 \times 10^9$ genome copy/mL

4.1.1.2 *Mycoplasma arginini*

名称	<i>Mycoplasma arginini</i> Strain G230
略称	<i>M. arginini</i>
Lot No.	60224014
入手方法	ATCC No. 23838-TTR
Post-preservation titer	$3.70 \times 10^9$ cfu/mL
Genome copy	$8.93 \times 10^9$ genome copy/mL

4.1.1.3 *Mycoplasma fermentans*

名称	<i>Mycoplasma fermentans</i> Strain PG18
略称	<i>M. fermentans</i>
Lot No.	60316337
入手方法	ATCC No. 19989-TTR
Post-preservation titer	$1.00 \times 10^9$ cfu/mL
Genome copy	$8.61 \times 10^9$ genome copy/mL

4.1.1.4 *Acholeplasma laidlawii*

名称	<i>Acholeplasma laidlawii</i> Strain PG8
略称	<i>A. laidlawii</i>
Lot No.	60171953
入手方法	ATCC No. 23206-TTR
Post-preservation titer	$7.10 \times 10^8$ cfu/mL
Genome copy	$5.86 \times 10^9$ genome copy/mL

4.1.1.5 *Mycoplasma hyorhinis*

名称	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> Strain BTS-7
略称	<i>M. hyorhinis</i>
Lot No.	63478133
入手方法	ATCC No. 17981-TTR
Post-preservation titer	$8.77 \times 10^8$ cfu/mL
Genome copy	$1.23 \times 10^9$ genome copy/mL

#### 4.1.1.6 *Mycoplasma olare*

名称	<i>Mycoplasma olare</i> CH 19299
略称	<i>M. olare</i>
Lot No.	61060921
入手方法	ATCC No. 23714-TTR
Post-preservation titer	$3.08 \times 10^8$ cfu/mL
Genome copy	$1.54 \times 10^9$ genome copy/mL

#### 4.1.1.7 *Mycoplasma pneumoniae*

名称	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Strain FH
略称	<i>M. pneumoniae</i>
Lot No.	60171955
入手方法	ATCC No. 15531-TTR
Post-preservation titer	$1.00 \times 10^8$ ccu/mL
Genome copy	$5.82 \times 10^9$ genome copy/mL

### 4.1.2 細胞

#### 4.1.2.1 CHO 細胞

名称	CHO-DG44 細胞
略称	CHO 細胞
Lot No.	G-C-20-0040-160229
入手方法	Thermo Fisher Scientific 社より購入(製品番号: CBDG4WC1.FP、製造番号:2113-106247)後、タカラバイオ株式会社にて培養し、細胞ペレットとして保存したもの。

### 4.1.3 網羅性試験用 *Mycoplasma* DNA

#### 4.1.3.1 Genomic DNA from *Mycoplasma arthritidis*

名称	Genomic DNA from <i>Mycoplasma arthritidis</i> strain Preston
略称	<i>M. arthritidis</i> gDNA
Lot No.	3281281
入手方法	ATCC No. 19611D
Concentration	1 ng/ $\mu$ L

4.1.3.2 Genomic DNA from *Mycoplasma hominis*

名称	Genomic DNA from <i>Mycoplasma hominis</i> strain PG21
略称	<i>M. hominis</i> gDNA
Lot No.	63892630
入手方法	ATCC No. 23114D
Concentration	1 ng/μL

4.1.3.3 Genomic DNA from *Mycoplasma bovis*

名称	Genomic DNA from <i>Mycoplasma bovis</i> strain Donetta PG45
略称	<i>M. bovis</i> gDNA
Lot No.	58473528
入手方法	ATCC No. 25523D
Concentration	1 ng/μL

4.1.3.4 Genomic DNA from *Mycoplasma hyopneumoniae*

名称	Genomic DNA from <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> strain J
略称	<i>M. hyopneumoniae</i> gDNA
Lot No.	59645693
入手方法	ATCC No. 25934D
Concentration	1 ng/μL

4.1.3.5 Genomic DNA from *Mycoplasma pirum*

名称	Genomic DNA from <i>Mycoplasma pirum</i> strain Guidice HRC/70-159
略称	<i>M. pirum</i> gDNA
Lot No.	3270163
入手方法	ATCC No. 25960D
Concentration	1 ng/μL

#### 4.1.3.6 Genomic DNA from *Spiroplasma citri*

名称	Genomic DNA from <i>Spiroplasma citri</i> strain Morocco-R8-A2, NCPPB 2647
略称	<i>S. citri</i> gDNA
Lot No.	62413952
入手方法	ATCC No. 27556D-5
Concentration	At least 5 µg in 1×TE buffer

#### 4.1.3.7 Genomic DNA from *Mycoplasma synoviae*

名称	Genomic DNA from <i>Mycoplasma synoviae</i> strain WVU 1853
略称	<i>M. synoviae</i> gDNA
Lot No.	62189193-029
入手方法	ATCC No. qCRM-25204D
Concentration	$1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ genome copies/µL

### 4.1.4 特異性試験用Bacteria DNA

#### 4.1.4.1 Genomic DNA from *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*

名称	Genomic DNA from <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> NBRC 14940
略称	<i>K. pneumoniae</i> gDNA
Lot No.	20140519KF
入手方法	NBRC No. 14940G
Concentration	about 1.6 µg

#### 4.1.4.2 Genomic DNA from *Pseudomonas aeruginosa*

名称	Genomic DNA from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC 106052
略称	<i>P. aeruginosa</i> gDNA
Lot No.	20151209MK
入手方法	NBRC No. 106052G
Concentration	about 1.6 µg

4.1.4.3 Genomic DNA from *Salmonella enterica subsp. enterica*

名称	Genomic DNA from <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> NBRC 13245
略称	<i>S. enterica</i> gDNA
Lot No.	20150525MK
入手方法	NBRC No. 13245G
Concentration	about 2.0 µg

4.1.4.4 Genomic DNA from *Staphylococcus aureus subsp. aureus*

名称	Genomic DNA from <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> NBRC 100910
略称	<i>S. aureus</i> gDNA
Lot No.	20151208MK
入手方法	NBRC No. 100910G
Concentration	about 1.5 µg

4.1.4.5 Genomic DNA from *Streptococcus mutans*

名称	Genomic DNA from <i>Streptococcus mutans</i> NBRC 13955
略称	<i>S. mutans</i> gDNA
Lot No.	20160307MK
入手方法	NBRC No. 13955G
Concentration	about 1.6 µg

4.1.4.6 Genomic DNA from *Bacillus subtilis subsp. subtilis*

名称	Genomic DNA from <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> NBRC 13719
略称	<i>B. subtilis</i> gDNA
Lot No.	20150409MK
入手方法	NBRC No. 13719G
Concentration	about 2.0 µg

4.1.4.7 Genomic DNA from *Brevibacillus brevis*

名称	Genomic DNA from <i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 100599
略称	<i>B. brevis</i> gDNA
Lot No.	20140515MK
入手方法	NBRC No. 100599G
Concentration	about 1.5 µg

4.1.4.8 Genomic DNA from *Clostridium acetobutylicum*

名称	Genomic DNA from <i>Clostridium acetobutylicum</i> NBRC 13948
略称	<i>C. acetobutylicum</i> gDNA
Lot No.	20141027MK
入手方法	NBRC No. 13948G
Concentration	about 2.6 µg

4.1.4.9 Genomic DNA from *Clostridium kluyveri*

名称	Genomic DNA from <i>Clostridium kluyveri</i> NBRC 12016
略称	<i>C. kluyveri</i> gDNA
Lot No.	20141027MK
入手方法	NBRC No. 12016G
Concentration	about 1.4 µg

4.1.4.10 Genomic DNA from *Escherichia coli*

名称	Genomic DNA from <i>Escherichia coli</i> NBRC 12713
略称	<i>E. coli</i> gDNA
Lot No.	20150709MK
入手方法	NBRC No. 12713G
Concentration	about 2.0 µg



#### 4.1.4.11 Genomic DNA from *Streptomyces avermitilis*

名称	Genomic DNA from <i>Streptomyces avermitilis</i> NBRC 14893
略称	<i>S. avermitilis</i> gDNA
Lot No.	20151020MK
入手方法	NBRC No. 14893G
Concentration	about 1.8 µg

#### 4.1.4.12 Genomic DNA from *Rhodococcus erythropolis* NBRC 100887

名称	Genomic DNA from <i>Rhodococcus erythropolis</i> NBRC 100887
略称	<i>R. erythropolis</i> gDNA
Lot No.	20140902KF
入手方法	NBRC No. 100887G
Concentration	about 1.5 µg

#### 4.1.4.13 Genomic DNA from *Tetragenococcus halophilus*

名称	Genomic DNA from <i>Tetragenococcus halophilus</i> NBRC 12172
略称	<i>T. halophilus</i> gDNA
Lot No.	20150810MK
入手方法	NBRC No. 12172G
Concentration	about 1.2 µg

## 4.2 試験群構成

### 4.2.1 検出感度試験

4.2.1.1 10<sup>6</sup> 個/mL の CHO 細胞を用意し、そこに *Mycoplasma* 標準品を 1, 10, 100 cfu/ml となるように添加して、DNA 抽出および TaKaRa *Mycoplasma* qPCR Detection Kit による測定を行った。

4.2.1.2 *Mycoplasma* 標準品の段階希釈は 4 連で行った。10 cfu/ml の各希釈液では、DNA 抽出と qPCR は 6 回繰り返して行い、計 24 点の結果が得られた。1 cfu/ml と 100 cfu/ml の各希釈液では、DNA 抽出と qPCR は 2 回繰り返して行い、計 8 点の結果が得られた。

4.2.1.3 各 DNA 抽出液につき 2 反応の qPCR を行い、2 反応の内、両方または片方で Ct 値が算出された場合に、陽性判定とした。

4.2.1.4 95%以上の確率で陽性判定となる濃度(95%陽性カットオフ値)を確認した。

#### 4.2.2 検出網羅性確認試験

4.2.2.1 各種 Mycoplasma gDNA 約 10 pg を鋳型とし、TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit を用いて N=2 で測定を行った。

4.2.2.2 すべての種につき、検出されることを確認した。

#### 4.2.3 検出特異性確認試験

4.2.3.1 各種 Bacteria gDNA 約 100 pg を鋳型とし、TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit を用いて N=2 で測定を行った。

4.2.3.2 すべての種につき、不検出となることを確認した。

#### 4.2.4 頑健性確認試験 1(Probe qPCR Mix (2.5X)添加量)

4.2.4.1 Probe qPCR Mix (2.5X)添加量を標準プロトコルの-10%、-5%、0%、5%、10%の量として、200 cfu 相当の Mycoplasma gDNA (7 種)を鋳型とし、N=3 で測定を行った。

4.2.4.2 0%のコントロールと比較して、Ct 値が±1 以内に収まることを確認した。

#### 4.2.5 頑健性確認試験 2(qPCR 機種)

4.2.5.1 Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900) 2 台および Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950) 2 台で、200 cfu 相当の Mycoplasma gDNA (7 種)を鋳型とし、N=3 で測定を行った。

4.2.5.2 機種間および個体差が、Ct 値で±1 以内であることを確認した。

### 4.3 実験手順

#### 4.3.1 Mycoplasma 標準品の希釈

4.3.1.1 Mycoplasma 標準品を終濃度 0.05%の Tween-20 を添加した生理食塩水により 10<sup>4</sup> cfu/μL まで段階希釈した。

4.3.1.2  $10^4$  cfu/ $\mu$ L に希釈したものをさらに  $10^3$  cfu/ $\mu$ L から 0.1 cfu/ $\mu$ L まで段階希した。この希釈操作は、計 4 連で実施し、希釈には終濃度 0.05% の Tween-20 を添加した生理食塩水を使用した。

4.3.1.3 1 cfu/ $\mu$ L の段階希釈液は-70°C以下で保存し、6 回分の試験に用いた。

#### 4.3.2 CHO 細胞への Mycoplasma 標準品の添加

4.3.2.1 CHO 細胞  $10^7$  個を生理食塩水 1 mL に懸濁し、200  $\mu$ L ( $2 \times 10^6$  個) ずつ分注した。

4.3.2.2 「4.3.2.1」に Mycoplasma 標準品の希釈液 (0.1, 1, 10 cfu/ $\mu$ L) を 20  $\mu$ L と生理食塩水 1780  $\mu$ L を添加し、計 2 mL とした。これを供試検体とした。

#### 4.3.3 DNA 抽出

4.3.3.1 供試検体 2 mL を 15000 rpm で 15 分間遠心分離した。

4.3.3.2 上清 1800  $\mu$ L を除去し、200  $\mu$ L を残した。(以降の操作には、NucleoSpin Virus を使用した。)

4.3.3.3 Proteinase K 溶液 5  $\mu$ L を添加した。

4.3.3.4 Buffer VL 200  $\mu$ L を添加し、ボルテックスで混合した。

4.3.3.5 Carrier RNA 5.6  $\mu$ L を添加し、緩やかに混合した。

4.3.3.6 室温で 3 分間以上放置した。

4.3.3.7 エタノール (96~100%) 200  $\mu$ L を添加し、よく混合した。

4.3.3.8 室温で 5 分間放置した。

4.3.3.9 NucleoSpin Virus Column を Collection Tube にセットした。

4.3.3.10 「4.3.3.8」の溶液をカラムに添加し、4,000 $\times$ g、3 分間遠心した。

4.3.3.11 すべての溶液がカラムを通過しなかった場合は、追加で 15,000 $\times$ g、1 分間遠心した。

- 4.3.3.12 ろ液、コレクションチューブを捨てた。
- 4.3.3.13 NucleoSpin Virus Column を新しい Collection Tube にセットした。
- 4.3.3.14 Buffer VW1 400  $\mu\text{L}$  をカラムに添加し、11,000 $\times g$  で1分間遠心した。
- 4.3.3.15 ろ液、コレクションチューブを捨てた。
- 4.3.3.16 NucleoSpin Virus Column を新しい Collection Tube にセットした。
- 4.3.3.17 Buffer VW2 400  $\mu\text{L}$  をカラムに添加し、11,000 $\times g$  で1分間遠心した。
- 4.3.3.18 ろ液、コレクションチューブを捨てた。
- 4.3.3.19 NucleoSpin Virus Column を新しい Collection Tube にセットした。
- 4.3.3.20 Buffer VW2 200  $\mu\text{L}$  をカラムに添加し、20,000 $\times g$  で5分間遠心した。
- 4.3.3.21 ろ液、コレクションチューブを捨てた。
- 4.3.3.22 NucleoSpin Virus Column を新しいマイクロチューブにセットした。
- 4.3.3.23 チューブの蓋を開けて 56 $^{\circ}\text{C}$  で5分間乾燥させた。
- 4.3.3.24 RNase free 水 34  $\mu\text{L}$  をシリカメンブレンの中央へ添加し、室温で3分間インキュベートした後、20,000 $\times g$  で3分間遠心した。
- 4.3.3.25 溶出した DNA を当日中に使用しない場合は、-20 $^{\circ}\text{C}$  以下で保存した。

#### 4.3.4 リアルタイム PCR

4.3.4.1 下記の反応液組成のうち Template を除いた混合液 (Master mix)を必要反応数+1 反応分調製した。

1 反応当り	
Probe qPCR Mix (2.5X)	10 $\mu$ l
12.5X Primer/Probe Mix (Myco)	2 $\mu$ l
<u>Template</u>	<u>(13 <math>\mu</math>l)</u>
Total	25 $\mu$ l

4.3.4.2 Master mix 12  $\mu$ l を qPCR 用純正の Plate または Tube へ分注した。

4.3.4.3 各 Template を 13  $\mu$ l 添加し、シールまたは Tube の蓋をした。

4.3.4.4 Plate または Tube を軽くスピンドウンした。

4.3.4.5 Thermal Cycler Dice Real Time System にセットした。

4.3.4.6 以下の反応条件で qPCR を実施した。

Hold: 1 cycle  
95°C、30 秒  
2 step PCR: 5 cycles  
95°C、5 秒  
60°C、1 分  
2 step PCR: 40 cycles  
90°C、1 秒  
60°C、1 分 (FAM 検出)

#### 4.4 結果および考察

(結果の表記に関する注意事項)

TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit によるリアルタイム PCR では、初期の 5 サイクルでは蛍光検出を行わず、その後の 40 サイクルで蛍光検出を行うので、Ct 値は実際の PCR サイクル数より 5 小さい値として算出される。本項の結果は、算出された Ct 値に 5 を加えて実際のサイクル数の値で記載している。

##### 4.4.1 検出感度試験

10<sup>6</sup> 個/mL の CHO 細胞を用意し、そこに Mycoplasma 標準品を 1, 10, 100 cfu/ml となるように添加

して、DNA 抽出およびTaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit による測定を行った。Mycoplasma 標準品の段階希釈は4連で行った。10 cfu/ml の各希釈液では、DNA 抽出とqPCR は6回繰り返して行い、計24点の結果が得られた。1 cfu/ml と100 cfu/ml の各希釈液では、DNA 抽出とqPCR は2回繰り返して行い、計8点の結果が得られた。以下にその結果を示す。

(表中の用語の説明)

Ct1, Ct2: 1 検体当り 2 反応の各 Ct 値

判定: 陽性判定=1、陰性判定=0

Positive: 陽性判定の検体数、Average of Ct: Ct 値の平均値、SD of Ct: Ct 値の標準偏差

Mycoplasma 標準品 100 cfu/ml 添加の結果

*M. arginini*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	32.9	32.9	1
a2	32.9	32.7	1
b1	32.5	33.0	1
b2	33.1	33.3	1
c1	32.5	32.6	1
c2	33.4	33.2	1
d1	32.6	32.7	1
d2	33.6	33.5	1

Positive: 8

Average of Ct: 33.0

SD of Ct: 0.356

*M. fermentas*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	32.0	32.1	1
a2	31.6	32.3	1
b1	31.8	31.7	1
b2	32.1	32.2	1
c1	31.3	31.3	1
c2	32.4	32.3	1
d1	31.5	31.3	1
d2	32.0	31.9	1

Positive: 8

Average of Ct: 31.9

SD of Ct: 0.385

*M. salivarium*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	33.0	33.1	1
a2	34.4	34.3	1
b1	33.4	33.4	1
b2	33.4	34.1	1
c1	32.8	32.4	1
c2	33.1	33.2	1
d1	33.2	33.1	1
d2	33.3	33.2	1

Positive: 8

Average of Ct: 33.3

SD of Ct: 0.532

*M. orale*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	33.9	33.7	1
a2	33.8	34.1	1
b1	33.9	34.0	1
b2	34.3	34.1	1
c1	33.4	33.2	1
c2	33.5	33.7	1
d1	33.7	33.4	1
d2	33.8	33.6	1

Positive: 8

Average of Ct: 33.8

SD of Ct: 0.293

*M. hyorhinis*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	30.6	30.3	1
a2	31.6	31.4	1
b1	30.9	31.4	1
b2	31.4	31.5	1
c1	31.8	31.5	1
c2	31.3	31.5	1
d1	31.4	31.2	1
d2	31.7	31.8	1

Positive: 8

Average of Ct: 31.3

SD of Ct: 0.402

*A. laidlawii*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	30.9	30.9	1
a2	29.6	29.7	1
b1	30.2	30.2	1
b2	30.9	30.7	1
c1	31.0	31.2	1
c2	31.3	31.3	1
d1	30.5	30.6	1
d2	30.6	30.8	1

Positive: 8

Average of Ct: 30.6

SD of Ct: 0.512

*M. pneumoniae* 標準品 10 ccu/ml 添加の結果

*M. pneumoniae*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	33.8	33.7	1
a2	33.5	33.3	1
b1	32.8	32.6	1
b2	33.8	33.3	1
c1	33.1	33.0	1
c2	32.8	33.1	1
d1	32.5	33.1	1
d2	32.9	33.3	1

Positive: 8

Average of Ct: 33.2

SD of Ct: 0.397



Mycoplasma 標準品 10 cfu/ml 添加の結果

*M. arginini*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	36.1	35.9	1
a2	35.2	36.1	1
a3	35.2	35.4	1
a4	38.1	36.1	1
a5	35.8	35.7	1
a6	36.2	36.2	1
b1	35.6	35.8	1
b2	36.0	36.2	1
b3	36.7	35.6	1
b4	35.5	35.5	1
b5	37.4	37.1	1
b6	35.2	36.5	1
c1	37.6	35.3	1
c2	36.1	35.5	1
c3	35.2	36.2	1
c4	35.8	36.7	1
c5	35.6	36.3	1
c6	37.0	37.4	1
d1	35.6	35.2	1
d2	37.3	35.5	1
d3	35.8	35.7	1
d4	41.0	36.5	1
d5	36.1	36.9	1
d6	35.9	35.8	1

Positive: 24

Average of Ct: 36.2

SD of Ct: 0.995

*M. fermentas*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	34.5	35.9	1
a2	37.0	36.8	1
a3	34.9	34.8	1
a4	35.8	35.1	1
a5	34.9	35.2	1
a6	34.7	34.6	1
b1	35.1	35.3	1
b2	35.2	34.8	1
b3	34.7	34.4	1
b4	35.6	35.6	1
b5	36.9	37.0	1
b6	37.2	36.1	1
c1	34.5	34.9	1
c2	36.2	36.3	1
c3	36.1	34.8	1
c4	35.1	35.7	1
c5	36.0	35.7	1
c6	36.3	34.9	1
d1	35.8	35.5	1
d2	35.1	35.1	1
d3	34.0	34.2	1
d4	36.2	37.1	1
d5	35.4	35.4	1
d6	36.0	36.5	1

Positive: 24

Average of Ct: 35.5

SD of Ct: 0.828

*M. salivarium*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	36.5	36.9	1
a2	36.3	37.9	1
a3	37.6	36.5	1
a4	36.4	--	1
a5	39.1	37.1	1
a6	36.7	36.2	1
b1	35.9	38.5	1
b2	37.7	36.8	1
b3	36.5	38.3	1
b4	37.3	35.6	1
b5	36.6	37.3	1
b6	39.5	36.6	1
c1	36.9	36.9	1
c2	36.4	35.1	1
c3	36.8	36.3	1
c4	36.6	37.6	1
c5	37.3	37.4	1
c6	36.8	36.4	1
d1	37.5	36.5	1
d2	35.8	36.5	1
d3	--	36.5	1
d4	37.6	37.0	1
d5	37.8	37.2	1
d6	38.1	37.2	1

Positive: 24

Average of Ct: 37.0

SD of Ct: 0.857

*M. orale*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	38.0	37.9	1
a2	38.2	37.3	1
a3	37.8	38.0	1
a4	38.0	37.4	1
a5	35.8	--	1
a6	37.6	38.0	1
b1	36.5	37.7	1
b2	38.5	40.0	1
b3	36.3	36.6	1
b4	--	37.9	1
b5	39.2	37.9	1
b6	38.7	--	1
c1	37.1	36.9	1
c2	--	41.6	1
c3	40.8	36.7	1
c4	38.5	35.5	1
c5	40.5	39.4	1
c6	--	38.2	1
d1	38.8	40.9	1
d2	--	36.7	1
d3	38.8	37.5	1
d4	37.5	38.8	1
d5	36.7	38.2	1
d6	37.9	38.6	1

Positive: 24

Average of Ct: 38.1

SD of Ct: 1.336

*M. hyorhinis*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	35.6	35.1	1
a2	36.4	35.3	1
a3	34.9	35.1	1
a4	36.1	35.2	1
a5	35.0	34.7	1
a6	34.5	34.4	1
b1	35.1	36.1	1
b2	36.3	35.7	1
b3	35.2	34.9	1
b4	35.3	35.6	1
b5	35.6	35.8	1
b6	35.6	35.4	1
c1	36.1	34.5	1
c2	34.9	35.3	1
c3	35.0	35.7	1
c4	36.0	35.5	1
c5	34.9	35.6	1
c6	35.8	36.6	1
d1	35.7	35.8	1
d2	34.9	34.5	1
d3	35.0	35.7	1
d4	34.8	35.2	1
d5	36.1	35.4	1
d6	36.1	36.3	1

Positive: 24

Average of Ct: 35.4

SD of Ct: 0.550

*A. laidlawii*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	42.4	41.7	1
a2	35.4	35.6	1
a3	36.6	35.0	1
a4	34.9	34.6	1
a5	33.2	32.7	1
a6	34.7	33.8	1
b1	35.1	35.2	1
b2	34.5	33.7	1
b3	34.4	34.1	1
b4	34.8	35.2	1
b5	37.1	35.0	1
b6	35.9	36.3	1
c1	35.3	34.9	1
c2	33.8	33.1	1
c3	33.1	32.4	1
c4	34.4	34.2	1
c5	35.3	34.6	1
c6	35.6	37.9	1
d1	33.0	33.0	1
d2	35.2	35.0	1
d3	36.1	34.8	1
d4	35.9	35.0	1
d5	34.5	34.2	1
d6	38.2	36.3	1

Positive: 24

Average of Ct: 35.2

SD of Ct: 1.908

*M. pneumoniae* 標準品 1 ccu/ml 添加の結果

*M. pneumoniae*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	38.2	37.5	1
a2	42.1	36.4	1
a3	37.5	36.1	1
a4	38.5	36.8	1
a5	37.2	36.4	1
a6	37.8	37.0	1
b1	35.7	36.0	1
b2	36.6	36.2	1
b3	36.0	34.7	1
b4	36.4	36.7	1
b5	36.1	36.2	1
b6	35.4	34.6	1
c1	35.9	35.8	1
c2	35.8	35.8	1
c3	35.4	35.4	1
c4	37.0	35.9	1
c5	37.2	35.9	1
c6	36.0	36.7	1
d1	37.0	35.9	1
d2	36.2	36.2	1
d3	35.9	36.1	1
d4	35.9	35.9	1
d5	36.6	36.2	1
d6	37.2	36.6	1

Positive: 24

Average of Ct: 36.5

SD of Ct: 1.132

Mycoplasma 標準品 1 cfu/ml 添加の結果

*M. arginini*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	38.2	--	1
a2	44.0	--	1
b1	--	39.3	1
b2	39.8	--	1
c1	38.8	38.8	1
c2	--	38.6	1
d1	--	--	0
d2	--	--	0

Positive: 6

Average of Ct: 39.7

SD of Ct: 2.003

*M. fermentas*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	--	39.8	1
a2	38.8	39.7	1
b1	37.8	37.2	1
b2	--	--	0
c1	--	--	0
c2	--	38.3	1
d1	39.6	39.0	1
d2	--	--	0

Positive: 5

Average of Ct: 38.8

SD of Ct: 0.952

*M. salivarium*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	--	--	0
a2	--	37.5	1
b1	--	38.2	1
b2	37.4	--	1
c1	37.6	38.9	1
c2	39.2	39.2	1
d1	--	--	0
d2	42.7	41.6	1

Positive: 6

Average of Ct: 39.2

SD of Ct: 1.853

*M. orale*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	--	37.8	1
a2	--	--	0
b1	--	--	0
b2	--	38.7	1
c1	39.4	39.5	1
c2	39.6	39.5	1
d1	--	--	0
d2	39.4	--	1

Positive: 5

Average of Ct: 39.1

SD of Ct: 0.650

*M. hyorhinis*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	--	37.4	1
a2	39.0	38.2	1
b1	37.9	38.6	1
b2	37.4	38.6	1
c1	41.1	39.9	1
c2	37.9	--	1
d1	44.0	43.3	1
d2	38.4	44.4	1

Positive: 8

Average of Ct: 39.7

SD of Ct: 2.470

*A. laidlawii*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	39.5	--	1
a2	38.5	--	1
b1	37.7	--	1
b2	--	38.0	1
c1	39.1	--	1
c2	--	37.5	1
d1	41.7	--	1
d2	41.2	--	1

Positive: 8

Average of Ct: 39.2

SD of Ct: 1.585

*M. pneumoniae* 標準品 0.1 ccu/ml 添加の結果

*M. pneumoniae*

ID	Ct1	Ct2	判定
a1	--	--	0
a2	38.4	38.7	1
b1	--	--	0
b2	--	--	0
c1	--	--	0
c2	40.5	--	1
d1	42.5	--	1
d2	--	--	0

Positive: 3

Average of Ct: 40.0

SD of Ct: 1.898

以上の結果の内、Ct 値の平均値と標準偏差および陽性判定となった検体数の情報を下表にまとめる。

	Average of Ct			SD of Ct		
	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml
<i>M. arginini</i>	33.0	36.2	39.7	0.356	0.995	2.003
<i>M. fermentas</i>	31.9	35.5	38.8	0.385	0.828	0.952
<i>M. salivarium</i>	33.3	37.0	39.2	0.532	0.857	1.853
<i>M. orale</i>	33.8	38.1	39.1	0.293	1.336	0.650
<i>M. hyorhinis</i>	31.3	35.4	39.7	0.402	0.550	2.470
<i>A. laidlawii</i>	30.6	35.2	39.2	0.512	1.908	1.585

	Average of Ct			SD of Ct		
	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml
<i>M. pneumoniae</i>	33.2	36.5	40.0	0.397	1.132	1.898

	Positive No.			Positive%		
	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml
<i>M. arginini</i>	8	24	6	100.0	100.0	75.0
<i>M. fermentas</i>	8	24	5	100.0	100.0	62.5
<i>M. salivarium</i>	8	24	6	100.0	100.0	75.0
<i>M. orale</i>	8	24	5	100.0	100.0	62.5
<i>M. hyorhinis</i>	8	24	8	100.0	100.0	100.0
<i>A. laidlawii</i>	8	24	8	100.0	100.0	100.0

	Positive No.			Positive%		
	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml
<i>M. pneumoniae</i>	8	24	3	100.0	100.0	37.5

- 7 菌種の Mycoplasma 標準品すべてにつき 95%陽性カットオフ値が少なくとも 10 cfu/ml (*M. pneumoniae* については 1 ccu/ml) 以下であり、日本薬局方記載の A 法(培養法)の代替法とする場合の検出感度を満たすことを確認した。
- なお、*M. hyorhinis* と *A. laidlawii* については、1 cfu/ml でも 100%の確率で検出されたが、Ct 値の分布から推測すると、24 連の試験を実施した場合には検出率が 95%未満となる可能性がある。

#### 4.4.2 検出網羅性確認試験

各種 Mycoplasma gDNA 約 10 pg を鋳型とし、TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit を用いて N=2 で測定を行った結果を下表に示す。

No.	Species	ATCC No.	1 反応当り	Ct1	Ct2	平均値
1	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	19611D	10 pg	27.4	27.4	27.4
2	<i>Mycoplasma bovis</i>	25523D	10 pg	24.4	24.5	24.4
3	<i>Mycoplasma hominis</i>	23114D	10 pg	23.2	23.2	23.2
4	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	25934D	10 pg	24.0	24.0	24.0
5	<i>Mycoplasma pirum</i>	25960D	10 pg	26.4	26.4	26.4
6	<i>Mycoplasma synoviae</i>	qCRM-25204D	10 <sup>4</sup> copies	23.5	23.4	23.4
7	<i>Spiroplasma citri</i>	27556D-5	10 pg	25.9	26.0	25.9

- いずれの種も良好に検出することができ、網羅性が高いことが確認された。

#### 4.4.3 検出特異性確認試験

各種 Bacteria gDNA 約 100 pg を鋳型とし、TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit を用いて N=2 で測定を行った結果を下表に示す

No.	Species	NBRC No.	1 反応当り	Ct1	Ct2
1	<i>Bacillus subtilis</i>	13719G	100 pg	--	--
2	<i>Brevibacillus brevis</i>	100599G	100 pg	--	--
3	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	13948G	100 pg	--	--
4	<i>Clostridium kluyveri</i>	12016G	100 pg	--	--
5	<i>Escherichia coli</i>	12713G	100 pg	--	--
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14940G	100 pg	--	--
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	106052G	100 pg	--	--
8	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	13245G	100 pg	--	--
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	100910G	100 pg	--	--
10	<i>Streptococcus mutans</i>	13955G	100 pg	--	--
11	<i>Streptomyces avermitilis</i>	14893G	100 pg	--	--
12	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100887G	100 pg	--	--
13	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	12172G	100 pg	--	--

- いずれの種も検出されず、特異性が高いことが確認された。



#### 4.4.4 頑健性確認試験 1 (Probe qPCR Mix (2.5X)添加量)

Probe qPCR Mix (2.5X)添加量を標準プロトコルの-10%、-5%、0%、5%、10%の量として、200 cfu 相当 (*M. pneumoniae* は 20 ccu 相当)の *Mycoplasma* gDNA (7 種)を鋳型とし、N=3 で測定を行った結果を下表に示す。試験は 2 回に分けて実施し、1 回目は-10%、-5%、0%、2 回目は 0%、5%、10% につき実施した。

##### 1 回目

A (-10%)	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD	dCt
<i>M. arginini</i>	33.0	32.6	32.7	32.8	0.207	0.1
<i>M. fermentas</i>	30.4	30.5	30.4	30.4	0.025	0.0
<i>M. salivarium</i>	32.7	32.0	32.1	32.3	0.356	0.2
<i>M. orale</i>	33.6	33.5	33.3	33.5	0.150	0.0
<i>M. hyorhinitis</i>	31.0	31.2	31.0	31.1	0.154	0.0
<i>A. laidlawii</i>	29.9	30.0	29.8	29.9	0.095	0.1
<i>M. pneumoniae</i>	29.8	29.7	29.7	29.7	0.090	0.0

B (-5%)	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD	dCt
<i>M. arginini</i>	33.0	32.8	32.6	32.8	0.196	0.1
<i>M. fermentas</i>	30.5	30.3	30.6	30.5	0.140	0.1
<i>M. salivarium</i>	32.4	32.3	32.4	32.3	0.053	0.2
<i>M. orale</i>	33.9	33.2	33.6	33.5	0.359	0.1
<i>M. hyorhinitis</i>	31.1	31.1	31.1	31.1	0.036	0.1
<i>A. laidlawii</i>	29.9	29.9	29.8	29.9	0.052	0.1
<i>M. pneumoniae</i>	29.6	29.8	29.7	29.7	0.121	0.0

C (0%)	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD
<i>M. arginini</i>	32.7	32.8	32.6	32.7	0.096
<i>M. fermentas</i>	30.3	30.5	30.4	30.4	0.125
<i>M. salivarium</i>	32.3	32.1	32.0	32.1	0.135
<i>M. orale</i>	33.7	33.3	33.5	33.5	0.200
<i>M. hyorhinitis</i>	30.9	31.2	31.0	31.0	0.121
<i>A. laidlawii</i>	29.7	29.9	29.8	29.8	0.067
<i>M. pneumoniae</i>	29.8	29.6	29.7	29.7	0.078

Ct1, Ct2, Ct3: N=3 の Ct 値、Ave: Ct 値の平均値、SD: Ct 値の標準偏差  
dCt: Control (0%)との Ct 値の差

2 回目

E (+10%)	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD	dCt
<i>M. arginini</i>	32.5	32.7	32.5	32.6	0.083	-0.1
<i>M. fermentas</i>	30.2	30.4	30.4	30.3	0.118	-0.1
<i>M. salivarium</i>	32.2	32.0	32.1	32.1	0.103	0.1
<i>M. orale</i>	33.2	33.5	33.6	33.4	0.197	0.1
<i>M. hyorhinis</i>	31.0	30.9	31.1	31.0	0.110	0.0
<i>A. laidlawii</i>	29.5	29.3	29.3	29.4	0.099	-0.4
<i>M. pneumoniae</i>	29.6	29.5	29.7	29.6	0.075	-0.1

D (+5%)	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD	dCt
<i>M. arginini</i>	33.0	32.7	32.7	32.8	0.171	0.2
<i>M. fermentas</i>	30.4	30.4	30.2	30.3	0.078	-0.1
<i>M. salivarium</i>	32.1	32.1	32.2	32.1	0.061	0.1
<i>M. orale</i>	33.5	33.5	33.4	33.5	0.072	0.2
<i>M. hyorhinis</i>	31.0	31.0	31.1	31.0	0.051	0.0
<i>A. laidlawii</i>	29.6	29.7	29.4	29.6	0.137	-0.2
<i>M. pneumoniae</i>	29.7	29.5	29.6	29.6	0.106	-0.1

C (0%)	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD
<i>M. arginini</i>	32.5	32.9	32.5	32.6	0.211
<i>M. fermentas</i>	30.4	30.4	30.3	30.4	0.042
<i>M. salivarium</i>	32.1	32.1	31.9	32.0	0.112
<i>M. orale</i>	33.2	33.2	33.4	33.3	0.147
<i>M. hyorhinis</i>	30.9	31.0	31.0	31.0	0.089
<i>A. laidlawii</i>	29.8	29.7	29.8	29.7	0.047
<i>M. pneumoniae</i>	29.7	29.7	29.7	29.7	0.047

Ct1, Ct2, Ct3: N=3 の Ct 値、Ave: Ct 値の平均値、SD: Ct 値の標準偏差

dCt: Control (0%)との Ct 値の差

- 0%のコントロールと比較して、Probe qPCR Mix (2.5X)添加量を-10%～10%に変化させた場合にも、Ct 値が±1 以内に収まることを確認した。

#### 4.4.5 頑健性確認試験 2 (qPCR 機種)

Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900) 2 台および Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950) 2 台で、200 cfu 相当 (*M. pneumoniae* は 20 ccu 相当) の *Mycoplasma* gDNA (7 種) を鋳型とし、N=3 で測定を行った結果を下表に示す。

A: TP900-1	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD
<i>M. arginini</i>	32.4	32.5	32.2	32.4	0.191
<i>M. fermentas</i>	30.2	30.4	30.1	30.3	0.153
<i>M. salivarium</i>	32.2	31.8	32.4	32.1	0.281
<i>M. orale</i>	32.9	33.3	33.2	33.2	0.186
<i>M. hyorhinis</i>	30.8	30.5	30.1	30.5	0.370
<i>A. laidlawii</i>	29.9	29.9	29.8	29.8	0.085
<i>M. pneumoniae</i>	29.0	29.1	29.0	29.0	0.059

B: TP900-2	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD	dCt
<i>M. arginini</i>	32.5	32.5	32.3	32.4	0.116	0.1
<i>M. fermentas</i>	30.4	30.0	30.5	30.3	0.236	0.0
<i>M. salivarium</i>	32.1	32.0	31.9	32.0	0.115	-0.2
<i>M. orale</i>	33.4	33.1	32.9	33.1	0.246	0.0
<i>M. hyorhinis</i>	30.7	30.6	30.6	30.6	0.059	0.2
<i>A. laidlawii</i>	30.3	30.3	30.4	30.3	0.030	0.5
<i>M. pneumoniae</i>	29.2	29.0	29.4	29.2	0.160	0.2

C: TP950-1	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD	dCt
<i>M. arginini</i>	32.5	33.0	32.9	32.8	0.269	0.4
<i>M. fermentas</i>	30.8	30.6	30.5	30.6	0.140	0.4
<i>M. salivarium</i>	32.2	32.2	32.0	32.1	0.118	0.0
<i>M. orale</i>	33.5	33.6	33.7	33.6	0.098	0.5
<i>M. hyorhinis</i>	31.2	30.8	31.2	31.1	0.188	0.6
<i>A. laidlawii</i>	29.8	29.7	29.9	29.8	0.104	-0.1
<i>M. pneumoniae</i>	29.5	29.6	29.9	29.6	0.193	0.6

D: TP950-2	Ct1	Ct2	Ct3	Ave	SD	dCt
<i>M. arginini</i>	32.7	32.6	32.7	32.6	0.042	0.3
<i>M. fermentas</i>	30.8	30.4	30.4	30.5	0.185	0.3
<i>M. salivarium</i>	32.0	32.1	31.9	32.0	0.115	-0.1
<i>M. orale</i>	33.2	33.6	33.1	33.3	0.279	0.1
<i>M. hyorhinis</i>	31.0	31.0	30.7	30.9	0.180	0.4
<i>A. laidlawii</i>	29.3	29.7	29.4	29.4	0.208	-0.4
<i>M. pneumoniae</i>	29.6	29.5	29.5	29.5	0.042	0.5

Ct1, Ct2, Ct3: N=3 の Ct 値、Ave: Ct 値の平均値、SD: Ct 値の標準偏差

dCt: TP900-1 との Ct 値の差

- 使用する qPCR 装置の機種や個体が異なる場合にも、Ct 値が±1 以内に収まることを確認した。

以上

お問い合わせ先  
タカラバイオ株式会社  
テクニカルサポートライン  
TEL: 077-565-6999