

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4987469号
(P4987469)

(45) 発行日 平成24年7月25日(2012.7.25)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04
G O 1 N	21/78	(2006.01)	G O 1 N 21/78 C

請求項の数 39 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2006-506133 (P2006-506133)	(73) 特許権者	503215619
(86) (22) 出願日	平成16年4月16日 (2004.4.16)		キャンプレックス・バイオ・サイエンス・ ノッティンガム・リミテッド
(65) 公表番号	特表2006-523450 (P2006-523450A)		イギリス・ノッティンガム・NG1・1G F・ペニーフット・ストリート・(番地なし) ・バイオシティー・ノッティンガム・ リミテッド
(43) 公表日	平成18年10月19日 (2006.10.19)	(74) 代理人	100064908
(86) 国際出願番号	PCT/GB2004/001647		弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開番号	W02004/094656	(74) 代理人	100089037
(87) 国際公開日	平成16年11月4日 (2004.11.4)		弁理士 渡邊 隆
審査請求日	平成19年3月13日 (2007.3.13)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	0308829.1		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成15年4月17日 (2003.4.17)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 実広 信哉
(31) 優先権主張番号	60/463,323		
(32) 優先日	平成15年4月17日 (2003.4.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酢酸キナーゼまたはカルバメートキナーゼ活性を測定することによる、マイコプラズマを検出するためのアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試験試料中の汚染性マイコプラズマの存在を検出する方法であって、

(i) マイコプラズマが存在するかわからない試験試料を用意すること、

(ii) 前記試験試料中の酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼの活性(B)を検出および/または測定することであって、前記活性が汚染性マイコプラズマの存在を示すこと、および

(iii) ステップ(ii)中の前記活性の検出および/または測定に基づいて、試験試料をマイコプラズマで汚染されていると確認すること

を含む方法。

【請求項2】

ステップ(ii)の後であるが、ステップ(iii)の前に実施される以下のステップ:

(iia) 対応する対照試料中で検出および/または測定した、酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼ活性の情報(A)を得るステップ、および

(iib) 試験試料中で検出および/または測定した活性(B)と、対照試料中の活性(A)を比較するステップ

をさらに含み

ステップ(ii)において試験試料中で検出および/または測定した活性(B)が、ステップ(iia)における対照試料中の活性(A)より大きい場合、すなわち、比B/Aが1より大きい場合、ステップ(iii)において前記試験試料をマイコプラズマで汚染されていると確認する、

請求項1に記載の方法。

【請求項3】

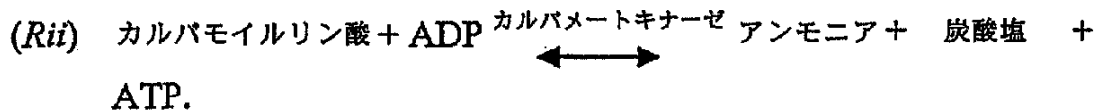
ステップ(ii)における前記試験試料中の酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼの活性(B)の検出および/または測定、ならびに/あるいはステップ(ia)における対応する対照試料中の酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼ活性の情報(A)の入手が、以下の反応:

【数1】



10

【数2】



の1つもしくは複数の基質および/または1つもしくは複数の生成物の出現および/または消失を、検出および/または測定することを含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

マイコプラズマ溶解剤で前記試験試料を処理することによって、マイコプラズマ細胞内容物を前記試料中に放出させる、ステップ(i)の後であるが、ステップ(ii)の前に実施するステップをさらに含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項5】

前記溶解剤が界面活性剤である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記界面活性剤による溶解処理が、細菌細胞を溶解することができない、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記対応する対照試料が、マイコプラズマ溶解処理前の前記試験試料と同じである、請求項4から6のいずれかに記載の方法。

30

【請求項8】

前記対応する対照試料が前記試験試料と同じであるが、前記試験試料活性に関する検出/測定の情報の入手を、前記対照試料に関する検出/測定の情報の入手後のある時間間隔後に行う、請求項2から4のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記時間間隔が少なくとも30分である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記検出および/または測定ステップが、ATPを検出および/または測定することを含む、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

前記ATPを発光反応によって検出および/または測定する、請求項10に記載の方法。

40

【請求項12】

前記発光反応が生物発光反応である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記検出および/または測定ステップ(ii)の前に、ADPを前記試験試料に加える、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

マイコプラズマ基質(MS)試薬を、前記検出および/または測定ステップ(ii)の前に前記試験試料に加え、前記MS試薬がアセチルリン酸もしくはその前駆体、および/またはカルバモイルリン酸もしくはその前駆体を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法

50

- 。
- 【請求項 1 5】
前記アセチルリン酸の前駆体がアセチルCoAである、請求項14に記載の方法。
- 【請求項 1 6】
前記カルバモイルリン酸の前駆体がシトルリンおよび/またはアンモニアである、請求項14に記載の方法。
- 【請求項 1 7】
前記対照試料は、マイコプラズマ試薬が加えられていない、前記試験試料の全体または分量である、請求項13から16のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 1 8】 10
前記対照試料が、別の方法によってマイコプラズマを含まないことが示されている、請求項2から7、または9から17のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 1 9】
前記対照試料が、PCR試験、DNA蛍光染色またはマイコプラズマ培養法の1つまたは複数によって、マイコプラズマを含まないことが示されている、請求項18に記載の方法。
- 【請求項 2 0】
前記試験試料および/または対照試料が、細胞培養物試料である、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 2 1】 20
前記細胞培養物試料中の前記細胞が、哺乳動物細胞、好ましくはVero、MRC5、HUVEC、B SMC、NHEK、MCF-7、AoSMC、A549、HepG2、FM3A、PC12、ARPE-19、CHOおよびCOS細胞などの付着細胞、および/または動物源から単離した初代付着細胞である、請求項20に記載の方法。
- 【請求項 2 2】
K562、U937、HL-60、Cem-7、およびJurkats、ならびに白血病芽細胞などの初代細胞型などの、前記細胞培養試料中の前記哺乳動物細胞が、浮遊状態で増殖する、請求項20に記載の方法。
- 【請求項 2 3】
前記細胞培養物が植物細胞の培養物である、請求項20に記載の方法。
- 【請求項 2 4】 30
前記細胞培養物試料が、細胞培養物に由来するが、それ自体は細胞物質を実質的に含まない試料である、請求項20から23のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 2 5】
前記試験試料および/または対照試料が無細胞試薬からなる、請求項1から19のいずれかに記載の方法。
- 【請求項 2 6】
前記無細胞試薬がトリプシンである、請求項25に記載の方法。
- 【請求項 2 7】 40
細胞培養物を処理してマイコプラズマ汚染を除去するための方法であって、マイコプラズマ汚染した細胞培養物をおある作用剤で処理して、マイコプラズマを除去および/または破壊すること、次に、請求項1から26のいずれか一項に記載の方法を使用して、マイコプラズマ汚染に関して前記培養物からの試料を試験すること、必要な場合、マイコプラズマ汚染が前記試料中で検出されなくなるまで、前記過程を1回または複数回繰り返すことを含む方法。
- 【請求項 2 8】
試験試料中のマイコプラズマの存在を検出する方法であって、以下のステップ：
(i) マイコプラズマが存在するかわからない試験試料を用意するステップ、
(ii) ADPをATPに転換するための外因性試薬を加えずに、生物発光反応を使用して前記試験試料中のATPを検出または測定して、ATPおよび/または光出力の測定値(A)を得ることによって、前記試験試料中の酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼの活性を検 50

出および/または測定するステップ、

(iii) 対応する対照試料からATPおよび/または光出力の測定値(B)を得るステップ、

(iv) ATPおよび/または光出力の測定値の比B/Aを比較するステップ、および

(v) 前記比B/Aが1より大きい場合、前記試験試料をマイコプラズマで汚染されていると確認するステップ

を含む方法。

【請求項 29】

細菌細胞を保持するフィルターに前記試験試料を通過させるステップを含む、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

請求項14から29で定義したマイコプラズマによる試料の汚染を検出する方法における、アセチルリン酸もしくはその前駆体、および/またはカルバモイルリン酸もしくはその前駆体の使用。

【請求項 31】

マイコプラズマ汚染の検出に使用するためのキットであって、以下のもの

(i) アセチルリン酸もしくはその前駆体、および/またはカルバモイルリン酸もしくはその前駆体、

(ii) 酵素反応をATP形成の方向に進めるための過剰量のADP、

(iii) マイコプラズマを溶かすための1つまたは複数の作用剤

を含むキット。

【請求項 32】

マイコプラズマを溶かすための前記作用剤が界面活性剤を含む、請求項31に記載のキット。

【請求項 33】

発光反応によりATPを検出および/または測定するための手段をさらに含む、請求項31から32のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 34】

前記手段が酢酸マグネシウム、無機ピロリン酸、ウシ血清アルブミン、ルシフェリンルシフェラーゼ、ADPおよびAMPを含めた、マイコプラズマ検出試薬(MDR)を含む、請求項33に記載のキット。

【請求項 35】

前記試薬が凍結乾燥状態で提供される、請求項31から34のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 36】

凍結乾燥状態の試薬を元に戻すことができるマイコプラズマアッセイ用バッファー(MAB)をさらに含む、請求項31から35のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 37】

前記バッファーが7.5のpHを保つ、請求項36に記載のキット。

【請求項 38】

照度計、好ましくは手動照度計をさらに含む、請求項33または34に記載のキット。

【請求項 39】

細菌フィルターをさらに含む、請求項31から38のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞培養物由来の試料などの試験試料を汚染する、Mollicutesファミリーの構成菌を検出するためのアッセイの方法および物質に関する。

【背景技術】

【0002】

分類学的には、細胞壁の欠如を使用して、Mollicutesと呼ばれる綱の他の細菌からMollicutes

10

20

30

40

50

icutesを分離している(Razin他1998)。この綱の構成菌は、以下の表1中に要約する。

【 0 0 0 3 】

【表 1】

表1: Mollicutes綱の主な特徴および分類。

分類	種番号	ゲノムの大きさ (kb)	ゲノムの G+Cのモル%	生息場所
目I: Mycoplasmatales				
科I: Mycoplasmataceae				
属I: Mycoplasma	102	580~1,350	23~40	ヒト、動物
属II: Ureaplasma	6	760~1,170	27~30	ヒト、動物
目II: Entoplasmatales				
科I: Entoplasmataceae				
属I: Entomoplasma	5	790~1,140	27~29	昆虫、植物
属II: Mesoplasma	12	870~1,100	27~30	昆虫、植物
科II: Spiroplasmataceae				
属I: Spiroplasma	33	780~2,220	24~31	昆虫、植物
目III: Acholeplasmatales				
科I: Acholeplasmataceae				
属: Acholeplasma	13	1,500~1,650	26~36	動物、いくつかの 植物、昆虫
目IV: Anaeroplasmatales				
科: Anaeroplasmataceae				
属I: Anaeroplasma	4	1,500~1,650	29~34	ウシ/ヒツジの第1胃
属II: Asteroplasma	1	1,500	40	ウシ/ヒツジの第1胃
不確定				
ファイトプラズマ		640~1,185	23~29	昆虫、植物

10

20

30

【 0 0 0 4 】

本出願の文脈では、用語「マイコプラズマ」は、単にマイコプラズマ目だけではなく、Mollicutes綱のすべての構成菌を含むものとする。実際、「マイコプラズマ」は、当分野ではすべてのMollicutesに関する一般的な用語である。

【 0 0 0 5 】

マイコプラズマは、ヒト、哺乳動物、爬虫類、魚類、節足動物および植物の寄生虫として、自然界に広くはびこっている。マイコプラズマは、最も小さく単純な原核生物である。マイコプラズマは堅い細胞壁を欠いており、ペプチドグリカン合成ができず;したがって、マイコプラズマは、ペニシリンおよびその類似体などの抗生物質に敏感ではない。マイコプラズマは、DNAのグアニンおよびシトシン含量が低分子比率のグラム陽性細菌、すなわちLactobacillus、Bacillus、StreptococcusおよびClostridiumの2種からの退化的進化により発生した。Mollicutesは、進化の過程に、それらの遺伝情報の相当部分を失っている。寄生の生活環の必要性を決めるのは、この限られたコード能力である。大部分の種は、通性嫌気性微生物であるが、いくつかの種は絶対性であり、したがって、それらの代謝は嫌気性細菌と類似している。

40

【 0 0 0 6 】

50

180を超えるMollicute種が同定されており、その中で、ヒト、ウシおよびブタ由来の、20の異なるマイコプラズマおよびAcholeplasma種が、細胞培養物から単離されている。すべてのマイコプラズマ感染の95%を占める6種が存在し;これらはM. orale、M. arginii、M. fermentans、M. salivarum、M. hyorhinaおよびA. laidlawiiである。感染の主な原因は、研究室に持ち込まれる他の細胞系からの交差汚染である。さらに、外因性マイコプラズマの望ましくない源が、血清製品などの組織培養試薬中に見られる可能性がある。マイコプラズマは、細菌と異なり、汚染が濁度の増大、または明らかな細胞の損傷を生み出すことはあまりない。生菌マイコプラズマは、接種後7日で作業表面から回収することができ、マイコプラズマは、細菌保持フィルターを通過することもできる。その最大個体相において、マイコプラズマは、宿主細胞と5:1の比率で、 10^8 マイコプラズマ/上清1mlほど多く存在することができる。存在する場合、マイコプラズマは、培養培地中で検出可能な濃度に「増殖」し、次いでマイコプラズマは、細胞表面上にさらに吸着される。これは、マイコプラズマが培養中の哺乳動物細胞に入り生存するかどうかに関する論争点である。

10

【0007】

マイコプラズマは、in vitro培養物のほぼそれぞれの性質を変えることができる。マイコプラズマは培養物の栄養素、特にアルギニンを消耗する。感染した真核細胞は、異常な増殖、代謝および形態の変化を示す。いくつかの生物学的性質が、毒性決定因子として関係してきており;これらには、ホスホリパーゼ、ATPアーゼ、ヘモリシン、プロテアーゼおよびヌクレアーゼなどのマイコプラズマ酵素の、宿主細胞環境中への分泌または導入がある。

20

【0008】

マイコプラズマに関する主な問題点は、それらの汚染は目につかないことが多く、細菌検出と異なり、容易に肉眼で見ることができないことである。マイコプラズマの抗生物質に対する耐性、および通常の細菌用滅菌フィルターを通過する能力は、マイコプラズマが、細胞培養技法の典型的な予防措置を逃れることができることを意味する。これらの汚染が依然未検出である負の影響の結果として、連続的なスクリーニングが、任意の細胞培養研究室に必要な不可欠であることが明らかになっている。

【0009】

少なくとも10%~15%の培養中の細胞が、マイコプラズマによって汚染される可能性があることを示した、いくつかの研究が存在する(RottemおよびBarile 1993、McGarrityおよびKotani 1985)。大部分の細胞生物学者は、マイコプラズマに関する通常の試験を行う必要性を理解しているが、しかしながら、現在利用可能な試験のコストおよび不正確さのために、このことはこれまで、依然として実現されていない理想のままである。

30

【0010】

生菌マイコプラズマを検出するために利用可能な、唯一の正確な方法は、微生物を培養することである。しかしながら、それらのin vitro培養に関する難点が、それらの培養に必要なとされる複雑な培地のために問題となることが分かっている(Razin他、1998)。培養は最も感度の良い方法であるとも考えられてきている。なぜならそれは、生きている単一の微生物を検出することができると言われていたからである。しかしながら、結果は、当業者および非常に特異的な培養要件によって、2~3週間かかる。かかる時間は、細胞がコロニーを形成する十分な数に、細胞を培養する必要性の結果であり、したがってこれは、ディーンズ染色を使用して識別することができる。マイコプラズマは寒天上、肉汁培養物中で培養することができ、大部分のマイコプラズマは、特徴的な「目玉焼き」の外見を有する微視的なコロニーを生成し、寒天中に埋め込まれた状態で増殖するが、一部のコロニーは、寒天中に完全に埋め込まれた状態で増殖しないこともある。標準的な寒天または肉汁培養培地を使用して、容易に増殖させることができない、いくつかの菌株が存在する。これらの菌株は、それらを単離および同定するために、細胞支援型の培養を必要とする。後者の手法は、宿主細胞表面に吸着する、マイコプラズマ種の同定および検出を助ける(RottemおよびBarile 1993)。しかしながら、培養手順の複雑な性質のために、これらの試験は、マイコプラズマの受託試験所によって最も一般的に行われる。

40

50

【0011】

試料中のマイコプラズマを検出する簡単な手段の1つは、蛍光色素を使用するDNAのアッセイである。最も一般的に使用される1つは、4',6-ジアミン-2-フェニルインドール二塩酸塩(DAPI)であるが、ヘキスト染色は選択法であると考えられる。細胞培養物試料を採取し、固定しヘキスト33258(ビスベンズアミド)で染色し、UV落射蛍光下で調べる(Battaglia他、1994、Raab 1999)。細胞と結合したマイコプラズマが存在する場合、したがって細胞核は、細胞質中に蛍光構造に囲まれて現れる。陰性細胞は、細胞DNAの単なる核染色によって表される。DNA染色からの結果の正確な解釈は、経験豊かな目を必要とし、それはさらに、専門機器、すなわち蛍光顕微鏡を必要とする。

【0012】

PCRによるマイコプラズマ検出は、外部のサービス研究所によって一般的に使用される試験であり、適切な機器を有する研究所においても行われる。マイコプラズマPCRキットにおいて使用されるプライマーは、マイコプラズマゲノムの保存領域にアニーリングし、いくつかの種の検出を可能にする(Raab 1999)。大部分の商業上利用可能なPCRキットは、増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分析することを必要とし、汚染種を決定する結果として生じるバンドパターンが存在する。しかしながら、バンドパターンの視覚化は主観的なものである。

【0013】

RocheからのマイコプラズマPCR ELISA(Raab 1999)は、異なる系に頼るものであり、種間を区別することができない。このキットはジゴキシゲニン-dUTPを含み、PCR産物は、抗ジゴキシゲニン-ペルオキシド複合体を被覆したマイクロタイタープレート中の、ウェルの表面上で捕捉する。テトラメチルベンジジン(TMB)で着色した生成物は、標準的なELISAプレートリーダーを使用して目に見える状態にする。

【0014】

Life Technologiesは、哺乳動物細胞中にごく少量見られる(まったく見られない場合あり)、アデノシンホスホリラーゼの活性に基づいて、MYCOTECT(商標)キットを開発した(Ve rhoef他、1983)。この酵素は、6-メチルプリンデオキシリボース(6-MPDR)を2つの毒性産物(6-メチルプリンおよび6-メチルプリンリボース)に転換する。このアッセイは、24ウェルの組織培養プレートにおいて増殖させた指標細胞系に、汚染細胞系を加えることを必要とする。マイコプラズマ陽性であるところらの毒性物質が生成するので、6-MPDR基質を加え、さらに3~4日間増殖後に、クリスタルバイオレット染色液を加え、指標細胞の生存性を試験する。200,000個の標的細胞当たり1個のマイコプラズマ細胞を検出することが報告されているが、培地条件を調節して、マイコプラズマの増殖を助長する場合(Whitaker他、1987)、この系の主な欠点は、それは手間がかかり、時間を浪費することである。

【0015】

マイコプラズマ抗原に対して産生した抗体を利用する、イムノアッセイを使用して、マイコプラズマ抗原を検出することができる。例えば、臨床試料中のM.pneumoniaeの検出(D axboeck他、2003)、異なる抗体の使用によって、種の同定が可能になる。いくつかの商業的に利用可能なキットが存在し、例えば、IDEXX研究所(米国)は、動物の健康状態と関係があるいくつかのマイコプラズマを検出するための、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を供給する。

【0016】

既知のアッセイの大部分は、終了するのに少なくとも24時間かかり、高価な機器および相当量の専門知識を必要とする。さらに、これらは染色特異的アッセイである。一般的なアッセイ、すなわち概略的にマイコプラズマ種を検出する能力を有する、アッセイは存在しない。

【0017】

英国特許第2357336B号は、それを使用して細胞培養物中のマイコプラズマを検出することができる、アッセイを記載している。このアッセイは、マイコプラズマが酵素ATPアーゼを多量に過剰生成するという観察に基づく。マイコプラズマのATPアーゼ活性は、十分

10

20

30

40

50

な細胞のATPまたは外から加えられたATPをADPに転換して、ADPを検出可能にする。それ故、このアッセイはADPの検出に基づき、これは、ADPをATPに転換する、試薬を含む酵素(ピルビン酸キナーゼとホスホエノールピルビン酸;アデニル酸キナーゼ;グリセロールキナーゼ、ミオキナーゼの組合せ;またはクレアチンキナーゼとクレアチンリン酸の組合せを含む)を試料に加え、生物発光反応を使用してATPを検出することによって行われる。

【0018】

英国特許第2357336号の開示は、考えられる補正の目的を含めて、本明細書に組み込んでいる。

【特許文献1】英国特許第2357336B号

【特許文献2】英国特許第2357336号

10

【特許文献3】de Wet他、1987、Masuda他、1989、Wood他、1989、欧州特許出願公開第0353464号

【特許文献4】White他、1996、国際公開第01/31028号および国際公開第00/24878号

【非特許文献1】www.unc.edu/depts/tcf/mycoplasma.htm

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明は、細胞培養物由来の試料などの試料中の、マイコプラズマを検出するための、他の手段を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

20

【0020】

第1の態様に従い、本発明は、試験試料中の汚染性マイコプラズマの存在を検出する方法であって、

(i)試験試料を用意すること、

(ii)試験試料中の酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼの活性(B)を検出および/または測定することであって、前記活性が汚染性マイコプラズマの存在を示すこと、および

(iii)ステップ(ii)中の前記活性の検出および/または測定に基づいて、試験試料をマイコプラズマで汚染されていると確認することを含む、方法を提供する。

【0021】

30

好ましくは、この方法は、ステップ(ii)の後、ただしステップ(iii)の前に実施される以下のステップ:

(iia)対応する対照試料中で検出および/または測定した、酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼ活性の情報(A)を得るステップ、および

(iib)試験試料中で検出および/または測定した活性(B)と、対照試料中の活性(A)を比較するステップであって;

ステップ(ii)中の試験試料中で検出および/または測定した活性(B)が、ステップ(iia)中の対照試料中の活性(A)より大きい場合、すなわち、比B/Aが1より大きい場合、ステップ(iii)において試験試料をマイコプラズマで汚染されていると確認するステップをさらに含む。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

第2の態様では、本発明は、ステップ(ii)中の試験試料中の酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼの活性(B)の検出および/または測定、および/またはステップ(iia)中の対応する対照試料中の酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼ活性の情報(A)の入手が、1つまたは複数の基質、および/または以下の反応:

【0023】

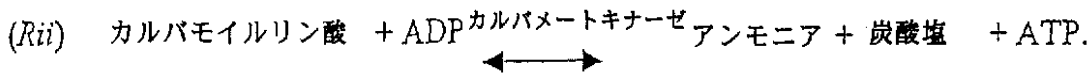
【数1】



50

【0024】

【数2】



【0025】

の1つまたは複数の生成物の出現および/または消失を、検出および/または測定することを含む方法を提供する。

【0026】

好ましくは、検出および/または測定ステップは、ATPを検出および/または測定することを含む。さらにより好ましくは、ATPを発光反応、特に生物発光反応によって検出および/または測定する。

10

【0027】

いくつかの発光系が知られており、いくつかの細菌、原生動物、腔腸動物、軟体動物、魚類、ヤスデ、ハエ、真菌、ぜん虫、甲殻類、および甲虫、特にPhotinus、Photuris、およびLuciola属のホタル、およびpyrophorus属のコメツキムシを含めた、多くの発光生物から単離されている。多くのこれらの生物中では、酵素により触媒される酸化還元が起こり、その中では、自由エネルギーの変化を利用して、高エネルギー状態に分子を励起させる。したがって、励起した分子が自然に基底状態に戻ると、可視光線が放出される。この放出される光が、「生物発光」と呼ばれる。

20

【0028】

甲虫ルシフェラーゼ、特にホタル種、Photinus pyralis由来のルシフェラーゼは、初期の研究以来、生物発光を理解するための範例となっている。P.pyralisのルシフェラーゼは、補欠分子団または固く結合した金属イオンはおそらく有しておらず、550のアミノ酸および約60,000ダルトンの分子量を有する酵素であり、この酵素は、長年の間結晶形で当分野に利用可能である。生物発光を生み出す際の、ホタルルシフェラーゼの機構における分子要素の研究によって、この酵素の基質は、ホタルルシフェリン、複素環式有機酸、D-(-)-2-(6'-ヒドロキシ-2'-ベンゾチアゾリル)-2-チアゾリン-4-カルボン酸(他に示さない限り、本明細書では以後は「ルシフェリン」と呼ぶ)であることが示されてきている。

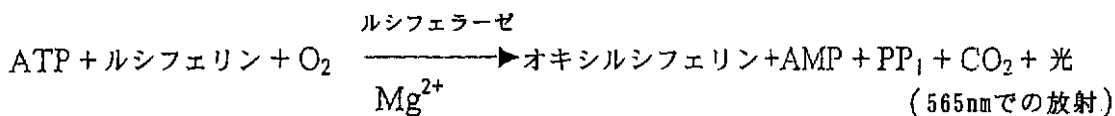
【0029】

以下の生物発光反応を使用して、ATPを検出することができる。

30

【0030】

【数3】



【0031】

放射される光の強度は、ATP濃度と直接関係があり、照度計を使用して測定する。

【0032】

ルシフェラーゼは、ATPの濃度をアッセイする手段として使用されており、 10^{-16} モルほど少ないATPを、この酵素の高品質の調製物を用いて検出することができる。ルシフェラーゼ-ルシフェリン反応は、ATPに非常に特異的である。例えば、デオキシ-ATPは、ATPによって生成される光の2%未満を生成し、他のヌクレオシド三リン酸は0.1%未満を生成する。

40

【0033】

結晶性ルシフェラーゼは、甲虫の発光器官から直接単離することができる。(特に、P.pyralis(ホタル)のルシフェラーゼ、P.plagiophthalmus(コメツキムシ)の4種のルシフェラーゼアイソザイム、L.cruciata(ホタル)のルシフェラーゼおよびL.lateralisのルシフェラーゼ(de Wet他、1987、Masuda他、1989、Wood他、1989、欧州特許出願公開第0353464

50

号)を含めた)いくつかの甲虫種のルシフェラーゼをコードするcDNAが利用可能である。さらに、ルシフェラーゼを生成する任意の他の甲虫種の、ルシフェラーゼをコードするcDNAは、既知の技法を使用して当業者により容易に入手可能である(de Wet他、1986、Wood他、1989)。甲虫ルシフェラーゼをコードするcDNAを入手することによって、cDNAを発現させるために形質転換した、培養中の細菌(例えば大腸菌)、酵母菌、哺乳動物細胞などから単離することによって、非常に純粋な形で多量のルシフェラーゼを調製することは、非常に簡単である。

【0034】

さらに、甲虫ルシフェラーゼをコードするcDNAの利用性、およびルシフェラーゼ-ルシフェリン反応を触媒する酵素をコードするcDNAを迅速にスクリーニングする能力(de Wet 10
他、1986、上記、Wood他、上記を参照)によって当業者は、ルシフェラーゼ-ルシフェリン反応による生物発光の生成を触媒する活性を保持している、多量の純粋な形の、突然変異ルシフェラーゼを調製し、得ることもできる。このような突然変異ルシフェラーゼは、1つまたは複数の位置において天然に存在する甲虫ルシフェラーゼの配列とは異なる、アミノ酸配列を有するであろう(White他、1996、国際公開第01/31028号および国際公開第00/24878号)。本開示では、用語「ルシフェラーゼ」は、甲虫に本来存在するルシフェラーゼだけでなく、このような天然のルシフェラーゼのルシフェラーゼ-ルシフェリン反応を触媒することによって、生物発光を与える活性を保持している突然変異体も含む。

【0035】

本発明の方法では、ステップ(i)の後、ただしステップ(ii)の前に、試料を処理して、 20
任意のマイコプラズマを溶かし、それによってその細胞内容物を試料中に放出させることが最も好ましい。当業者は、界面活性剤などの化学物質の施用、および超音波処理などの機械的方法を含めた、様々な方法によって、溶解を実施することができることを理解するであろう。

【0036】

界面活性剤で試料を処理すること、またはマイコプラズマ細胞膜を溶かすことはできるが、存在する可能性がある任意の細菌の細胞壁には影響を与えない他の溶解法によって、溶解を実施することが有利である。代表的な界面活性剤処理には、低濃度(例えば0.25%v/v)のTritonX100などの界面活性剤の使用がある。

【0037】

好ましい溶解方法は、マイコプラズマ膜を溶かすのに十分な方法であるが、この方法は、細菌細胞に対しては有効ではないと思われる。真核細胞の溶解と細菌の溶解を比較する試験では、非イオン性界面活性剤(主にポリエトキシエーテル)を使用して、微生物細胞に影響を与えずに、体細胞を溶かすことができることが認められてきた(SchrammおよびWeyens-van Witzenberg 1989、Stanley 1989)。界面活性剤による溶解に対して細菌を鈍感にしているのは、堅い細胞壁の存在であり、細菌細胞を溶かすための、より厳密な溶解手順が必要とされる。効率の良い溶解および全体のタンパク質放出のために、細胞壁を破壊するためのアイソザイムなどの酵素に対する露出を、細菌はしばしば必要とする(Pellegrini他、1992)。最も好ましい界面活性剤によるマイコプラズマの溶解条件を、本明細書で以後示す。 40

【0038】

しかしながら、細菌による汚染は濁度の増大を生み出し、位相差顕微鏡の下で細胞培養物を見ると、細菌を肉眼で見ることができ、これらの細菌培養物は大変容易に検出することができる、すぐに捨てることができる。

【0039】

細菌と異なり、マイコプラズマは、フィルター滅菌用に使われる0.45 μMフィルターを通過し(BasemanおよびTully 1997)、濾過ステップを加えることによって、細菌汚染とマイコプラズマ汚染を区別することができる。

【0040】

したがって、本発明の好ましい実施形態では、試験試料を、ステップ(i)において細菌 50

フィルターに通過させる。当然ながら、当業者であれば、例えば細菌保持フィルターに試験試料を通過させることによって、試験試料を処理して細菌を除去する場合、マイコプラズマを選択的に溶かすことは重要ではない、すなわち細菌を溶かす必要はないことを理解されよう。

【0041】

好ましい実施形態では、検出および/または測定ステップ(ii)の前に、ADPを試験試料に加える。しかしながらアッセイは、内因性ADPを利用することもできる。

【0042】

好ましい実施形態では、マイコプラズマ基質試薬を、検出および/または測定ステップ(ii)の前に試験試料に加え、このマイコプラズマ基質試薬は、アセチルリン酸もしくはその前駆体、および/またはカルバモイルリン酸もしくはその前駆体を含む。

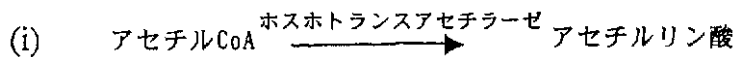
10

【0043】

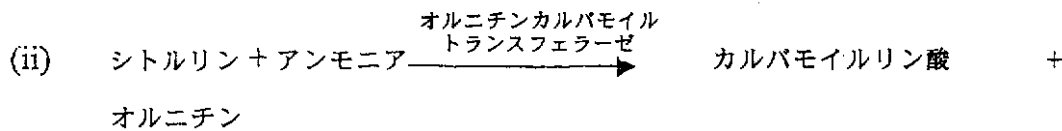
「その前駆体」によって我々は、そこからアセチルリン酸および/またはカルバモイルリン酸を生成することができる、1つまたは複数の化合物を含むものとする。代表的な反応を以下に概略する：

【0044】

【数4】



20



【0045】

したがって、アセチルリン酸をマイコプラズマ基質試薬に加える代わりに、アセチルCoAなどの前駆体を含めることができると思われる。

【0046】

同様に、カルバモイルリン酸の代わりに、シトルリンおよびアンモニアなどの前駆体を、マイコプラズマ基質試薬に加えることができると思われる。

30

【0047】

本発明の方法では、アセチルリン酸およびカルバモイルリン酸、および/またはこれらの前駆体は、ステップ(ii)の前に試料に加えることが最も好ましい。これによって、マイコプラズマ汚染に関する一般アッセイを行うことができる。なぜならマイコプラズマは、それらの酢酸キナーゼおよび/またはカルバメートキナーゼ酵素によって、片方または両方の基質を利用するからである。

【0048】

あるいは、前述の基質またはその前駆体の1つを単に使用することによって、さらに特異的なアッセイを生み出すことができる。このようなアッセイは、酵素酢酸キナーゼまたはカルバメートキナーゼの1つのみを使用する、マイコプラズマに特異的なものであろう。以下の表2は、酢酸キナーゼを優先的に、カルバメートキナーゼを優先的に、あるいは両方を利用する、Mollicutesファミリーの構成菌のいくつか(寄生哺乳動物宿主)の例を列挙する。以下に列挙したものに加えて、いくつかの爬虫類、昆虫および植物に感染性のマイコプラズマが存在し、その生化学的調査によって、これらの同じ経路の使用が確認された(Kirchoff他、1997、Forsyth他、1996、Taylor他、1996およびTully他、1994)。

40

【0049】

【表2】

表2:グルコースまたはアルギニンの利用を介したマイコプラズマによるATP生成。

種	ATP生成の優先経路	使用した酵素
M.hyorhinitis	グルコース発酵およびアルギニン溶解	酢酸キナーゼ/カルバメートキナーゼ
M. orale	アルギニン溶解	カルバメートキナーゼ
M. fermentans	アルギニン溶解およびグルコース発酵	カルバメートキナーゼ/酢酸キナーゼ
M. salivarum	アルギニン溶解	カルバメートキナーゼ
M. arginii	アルギニン溶解	カルバメート
A. laidlawii	グルコース発酵	酢酸キナーゼ
U. urealyticum	グルコース発酵	酢酸キナーゼ
M. pneumoniae	アルギニン溶解およびグルコース発酵	カルバメートキナーゼ/酢酸キナーゼ
M. mycoides	グルコース発酵	酢酸キナーゼ
M. arthritidis	アルギニン溶解	カルバメートキナーゼ
Anaeroplasmata sp	アルギニン溶解	カルバメートキナーゼ
M. hominis	アルギニン溶解	カルバメートキナーゼ
A. vituli	グルコース発酵	酢酸キナーゼ
M. lagogenitalium	グルコース発酵	酢酸キナーゼ
M. mycoides	グルコース発酵	酢酸キナーゼ
M. penetrans	アルギニン溶解およびグルコース発酵	カルバメートキナーゼ/酢酸キナーゼ
M. pirum	アルギニン溶解およびグルコース発酵	カルバメートキナーゼ/酢酸キナーゼ
M. incognitis	アルギニン溶解およびグルコース発酵	カルバメートキナーゼ/酢酸キナーゼ

【0050】

最も好ましくは、本発明のすべての態様のすべての方法において、「対応する対照試料」は、マイコプラズマ溶解処理、および/またはマイコプラズマ基質の添加、および/またはある時間間隔(例えば約30分を超える)前の、試験試料である。この好ましい実施形態では、両方の活性測定を同じ試料、試験試料に行う。第1の活性測定値(A)を、マイコプラズマ溶解ステップの前、あるいはこれと同時に得て、次いで、マイコプラズマ基質を加えた後、および/またはある時間間隔(例えば約30分を超える)の後に、第2の活性測定値(B)を得る。B/Aの値が1より大きい場合、試験試料はマイコプラズマで汚染されていると確認する。

【0051】

当業者は、「対応する対照試料」は、所定の陰性対照試料であってもよいが、これはあまり好ましくないことを理解するであろう。

【0052】

一実施形態では、対照試料は、マイコプラズマ汚染がないことが示されている。これを行うのに適した方法には、本明細書に記載するPCR試験、DNA蛍光染色、または培養法がある。したがって、一実施形態では、「対応する対照試料」によって、我々は、試験試料中

に含まれる物質とほぼ同じ物質を含むが、試験試料とは異なり、マイコプラズマ汚染がないことが示されている試料を意味する。当業者は、マイコプラズマ非汚染状態は、様々な既知の方法によって、示すことができることを理解するであろう。いくつかの適切な方法がRottemおよびBarile 1993によって総説されており、一方試験キットおよびサービスの概略は、Raab他1999中に与えられている。

【 0 0 5 3 】

試験試料および/または対照試料は、細胞培養物試料、特に哺乳動物細胞の培養物などの、細胞試料であってよい。いくつかの例を、以下の表3に列挙する。

【 0 0 5 4 】

【表 3】

10

表3:アッセイ法を使用して試験した、一般的に培養される細胞系。

細胞名	細胞型	供給機関/寄託番号	
K562	ヒト慢性骨髄性白血病	ECACC 89121407	
U937	ヒト組織球性リンパ腫	ECACC 87010802	
HL-60	ヒト前骨髄球性	ECACC 88112501	
Cem-7	ヒト急性Tリンパ芽球性白血病	ATCC CCL-119	
Jurkat	ヒト急性T細胞白血病	ECACC 88042803	20
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	ECACC 85050302	
COS-7	サル腎臓細胞、SV40形質転換	ECACC 87021302	
Vero	アフリカミドリザル腎臓細胞	ECACC 84113001	
MRC5	ヒト胎児肺	ECACC 84101801	
HUVEC	ヒト帯静脈内皮細胞	ECACC 89110702	
BSMC	ヒト気管支平滑筋細胞	Cambrex CC-2576	
NHEK	正常なヒト上皮ケラチン生成細胞	Cambrex CC-2503	
MCF-7	ヒト乳腺癌細胞	ECACC 86012803	30
AoSMC	大動脈平滑筋細胞	Cambrex CC-2571	
A549	ヒト肺癌腫細胞	ECACC 86012804	
HepG2	ヒト肝細胞癌	ECACC 85011430	
FM3A	マウス乳癌	ECACC 87100804	
PC12	ラット副腎褐色細胞腫	ECACC 88022401	
ARPE-19	ヒト網膜色素上皮細胞	ATCC CRL-2302	
RT112	ヒト膀胱癌	ECACC 85061106	40

この場合、ECACCはEuropean Collection of Animal Cell Cultureを表し、ATCCはAmerican Tissue Culture Collectionを表し、およびCambrexはCambrex Bio Science Wokingham、英国を表す。

【 0 0 5 5 】

さらに、哺乳動物の初代細胞型、ならびに組織バンク、例えばATCCおよびECACCによって保持されているすべてのそのような細胞を試験することができると思われる。

【 0 0 5 6 】

本発明のアッセイを使用して、付着細胞(例えばHepG2、A549、CHOおよびCOS細胞)、および懸濁液中で培養する細胞(例えばJurkats、U937、K562およびHL-60細胞)の培養物中の

50

、マイコプラズマ汚染を検出することができることは、注目に値する。

【0057】

試験する試料は、事前に遠心分離にかけて細胞物質を除去した、細胞培養物の上清由来であることが好ましい。しかしながら、細胞または細胞残骸の存在下でアッセイを行うこともできる。

【0058】

無細胞試料を、本発明の方法を使用して試験することもできる。例えば、本発明の方法は、組織培養培地などの無細胞試薬の試料、および典型的には血清(例えばウシ胎児血清)、トリプシンなどの動物由来の物質、および他の補充物質などを含む試料を試験するのに非常に有用である。この方法で試験することができる、いくつかの一般的に使用される培地および補充物質の例を、表4中に示す。

10

【0059】

【表4】

表4:アッセイ系を使用して試験することができる、組織培養培地および補充物質。

培養培地	血清	成長因子	他の組織培養試薬
RPMI	ウシ胎児	上皮成長因子	トリプシン
DMEM	ウシ新生児	形質転換成長因子	インシュリン
Eagle's MEM	ウマ	顆粒球コロニー刺激因子	トランスフェリン
Glasgow MEM	ヒト	顆粒球-マクロファージCSF	コラーゲン
Ham's F12	ブタ	神経成長因子	フィブロネクチン
IMDM	ニワトリ		ビトロネクチン
培地199	ウサギ		アミノ酸補充物質
McCoy's 5A	ヒツジ		ゼラチン
ハイブリドーマ			アルブミン
CHO培地			パンクレアチン
胚培養培地			ウシ下垂体エキス
ウィリアムス培地E			

20

30

【0060】

本発明の第3の態様は、試験試料中のマイコプラズマの存在を検出する方法であって、以下のステップ:

(i) 試験試料を用意するステップ、

(ii) ADPをATPに転換するための外因性試薬(例えば、キナーゼ活性の基質)を加えずに、生物発光反応を使用して試験試料中のATPを検出および/または測定し、ATPおよび/または光出力の測定値(A)を得るステップ、

40

(iii) 対応する対照試料からATPおよび/または光出力の測定値(B)を得るステップ、

(iv) ATPおよび/または光出力の測定値の比B/Aを比較するステップ、および

(v) 比B/Aが1より大きい場合、試験試料をマイコプラズマで汚染されていると確認するステップを含む方法を提供する。

【0061】

本発明の前の態様に関して述べたように、マイコプラズマ溶解処理、および/またはマイコプラズマ基質の添加、および/またはある時間間隔は、ステップ(ii)の前に行うことが最も好ましい。

【0062】

本発明の前の態様に関して述べたように、「対応する対照試料」は、マイコプラズマ溶

50

解処理、および/またはマイコプラズマ基質の添加、および/またはある時間間隔の放置(例えば約30分を超える)を施されていない、試験試料であることが最も好ましい。

【0063】

言い換えれば、両方の測定値は試験試料から得る。したがって、好ましい実施形態では、対照ATPおよび/または光出力の測定値を、界面活性剤およびルシフェラーゼ/ルシフェリンおよびAMPを含む、マイコプラズマ検出試薬の試料への添加後に得て、試験ATPおよび/または光出力の測定値は、キナーゼ活性の基質(またはその前駆体)の添加後に得る。

【0064】

本発明の第4の態様は、細胞培養物を処理してマイコプラズマ汚染を除去するための *in vitro*法であって、マイコプラズマ汚染した細胞培養物がある作用剤で処理して、マイコプラズマを除去および/または破壊すること、および、本発明の方法を使用して、マイコプラズマ汚染に関して培養物由来の試料を後に試験すること、必要な場合、マイコプラズマ汚染が試料中で検出されなくなるまで、この過程を1回または複数回繰り返すことを含む方法を提供する。

【0065】

細胞培養において使用される最も一般的な抗生物質は、マイコプラズマに対して無効である。阻害活性を示すいくつかの物質が存在し、これらにはゲンタマイシン硫酸塩、カナマイシン硫酸塩およびチロシン酒石酸がある(www.unc.edu/depts/tcf/mycoplasma.htm)。マイコプラズマ除去物質(ICN-Flow)、キノロン系の抗生物質の誘導体、さらにMinerva Biolabs(ベルリン、ドイツ)からの非抗生物質治療剤Mynox(登録商標)を含めた、いくつかの市販の治療製品が存在する。米国企業InvivogenはPlasmocin(商標)を供給し、これは2つの細菌要素を有し、一方はタンパク質合成に働き、他方はDNA複製を阻害する。抗生物質テトラサイクリンおよびシプロフロキサシンは、80~85%未満の成功率を有することが報告されている(www.unc.edu/depts/tcf/mycoplasma.htm)。したがって、ひとたび汚染が確立されると、培養物からマイコプラズマを完全に根絶することは非常に困難である。

【0066】

有効な抗生物質の大部分はキノロン系の誘導体であり、異なる抗生物質の有効性は、試験するマイコプラズマ種に従って変わる。Duffy他、2000は、キノロン系ゲミフロキサシンに対する*M.pneumoniae*、*M.hominis*、*M.fermentans*、*M.genitalium*および*U.urealyticum*の生存性を調べ、テトラサイクリン、クリンダマイシンおよび他のキノロンを含めたいくつかの抗生物質と比較した。これらの結果によって、種間の様々な応答性が示されたが、しかしながら、ゲミフロキサシンはテトラサイクリンより良く働いた。tetM遺伝子を得ているために、テトラサイクリンに対して耐性を示すいくつかの種が存在する。これは頻繁に起こることであり、マイコプラズマ源に依存する種の応答性の変動によって複雑になる。例えば、真核細胞培養物中で抗生物質に曝されたマイコプラズマは、ヒトまたは動物源から単離した同種とは異なるプロファイルを示す(Taylor-RobinsonおよびBebear 1997)。抗マイコプラズマ治療の報告されている成功は、非常に様々なようであるが、Uphoff他、2002による近年の研究は、96%の白血病-リンパ腫細胞系は、試験した治療剤の少なくとも1つによって、マイコプラズマがなくなったことを報告している。

【0067】

本発明の様々な態様を具体化するいくつかの例を、添付の図面を参照しながら、ここで記載する。

【実施例1】

【0068】

本発明のアッセイ法

好ましいアッセイ法の原則は、マイコプラズマ酵素の適切な基質を供給することである。マイコプラズマ汚染が存在する場合、好ましくはルシフェラーゼ-ルシフェリン反応によって、次いで測定することができるADPからATPへの転換が存在する。

【0069】

マイコプラズマ検出試薬を加え、約5分後、第1の光出力の読み取り値(A)を得て、マイ

10

20

30

40

50

コプラズマ基質(MS)を加え、任意の酵素活性を約10分間進行させ、この地点で第2の光の読み取り値(B)を得る。

【0070】

マイコプラズマ汚染が存在する場合、したがって第2の読み取り値(B)は、第1読み取り値(A)と比較すると大きく、1より大きい比B/Aを与える。培養物が陰性である(マイコプラズマによって汚染されていない)場合、したがって比B/Aは1であるか、あるいは通常経時的に見られる発光シグナルの減衰のために、1未満であることが最も多いであろう。図1は、この反応の動態を示す。典型的には、マイコプラズマ汚染に関して見られる比B/Aは、1よりはるかに大きく、例えば図1は、114の比を示す。

【0071】

本発明の好ましいアッセイキットは、マイコプラズマ検出試薬(MDR)、MDRを元に戻すためのマイコプラズマアッセイ用バッファー(MAB)、およびマイコプラズマ基質(MS)を含む。MDRおよびMSは、凍結乾燥状態の調製物として提供することが好ましい。

【0072】

すべてのマイコプラズマは、酢酸キナーゼ経路またはカルバメートキナーゼ経路によってATPを生成する。本発明のマイコプラズマ基質は、これらの酵素反応の一方または両方の基質を含む。ADPは両方の酵素に必要なものであり、本発明のマイコプラズマ検出試薬中に過剰に供給して、ATP形成の発生を促進することが好ましい。

【0073】

事前に遠心分離にかけて細胞物質を除去した培養物上清の試料に、MDRを加えるが、細胞の存在下でアッセイを実施することができる。代替的あるいは追加的に、試験試料を細菌フィルターに通過させることができる。

【0074】

MDRは、ルシフェラーゼの基質、ルシフェリンおよび他の補助因子、ならびにAMPおよびADPを含む。マイコプラズマ基質(MS)は、カルバメートおよび/または酢酸キナーゼ活性を検出するために必要な、カルバモイルリン酸および/またはアセチルリン酸またはその前駆体を含む。

【0075】

好ましい試料体積は100 μ lであり、これに100 μ lの還元MDRを加える。約5分後、第1の発光読み取り値(A)を得て、これによって基本の読み取り値が与えられ、これによって更なる比の計算値B/Aを決定する。

【0076】

本発明のアッセイ法を使用して、*Acholeplasma laidlawii*、*M. hyorhinae*、*M. fermentans*、*M. orale*および*M. genitalium*による汚染を調べ、いくつかの未知のマイコプラズマ汚染を検出している。

【0077】

本発明者は、彼らのデータを比較してPCRによりマイコプラズマを検出しており、1より大きい比とマイコプラズマDNAの検出の間に、相関関係があることを示している。これを図2に示し、この場合、ゲル上の陽性PCRバンドは、1より大きい比と相関関係がある。

【実施例2】

【0078】

細胞培養物からマイコプラズマ汚染を除去するための過程における、本発明の方法の使用。

本発明者は、代表的なマイコプラズマ除去物質(ICN-Flow)、キノロン系の抗生物質の誘導体で細胞を処理すると、我々は比B/Aの減少を検出することができることも示している。

【0079】

製造者(ICN-Flow)は、汚染性マイコプラズマの完全な除去を確実にするための検疫における、細胞の7日間の処理を奨励している。しかしながら、本発明のアッセイ法を使用して得た比率のデータによって、7日間では十分でなかったことが示された。これらの比率

10

20

30

40

50

が1より大きい状態であった事実から、このことは明らかであった。さらに処理剤の除去、連続的培養の後、比率は増大し、PCR試験(Stratageneキット)後、培養物は再度陽性であった。これらのデータは図3中に示し、この場合3つの異なる細胞系がM.hyorhinisで汚染されていることが見出された。

【0080】

K562およびU937細胞は浮遊細胞系であるが、A549細胞は付着細胞型であり;したがって、これらのデータによって、付着細胞型と浮遊細胞型の両方に、アッセイを使用することができることが確認される。これは図2中にも示し、CHOおよびCOS-7細胞は、細胞培養研究室で一般的に使用される付着細胞型である。

【0081】

図3も、10日間のMRAを用いた処理を示し、COS-7およびCHO細胞培養物は、汚染性マイコプラズマを除去するのに十分であった。

【実施例3】

【0082】

マイコプラズマを除外するための細菌フィルターの失敗

本発明者は、いくつかの細菌阻止フィルターを通過する培養物上清が、生菌マイコプラズマの存在を示す、正の比率を示し続けたことも示している。これは図4中に示す。

【0083】

マイコプラズマは直径600 μm もの大きさのコロニーを形成することができるが、そのライフサイクル中に、0.15 μm もの小ささの単細胞として存在することもできる。その小さな大きさのために、マイコプラズマは、組織培養用試薬を「滅菌する」ために一般的に使用される、0.45 μm および0.22 μm のフィルターを通過することができる。図4によって、細胞の存在下でアッセイを行うことができるが、低い検出感度が存在することも確認される。したがって、本発明のアッセイ法は、実質的に細胞を含まない試料に行うことが好ましい。このことは、細胞培養物を遠心分離にかけ、上清を試料採取し、および場合によっては細菌フィルターを介した濾過によって、容易に達成することができる。

【実施例4】

【0084】

好ましいアッセイの感度

図5および8中に示すように、上清の希釈がアッセイの感度を示し、その中で、汚染された培養物上清の1:1000希釈によって、1より大きい比を依然として与えることができる。異なるマイコプラズマ(Mollicutes)種の、酢酸キナーゼおよびカルバメート酵素の特異的活性に依存して、試料をさらに希釈することが可能である。希釈範囲も、試験試料中のコロニー形成単位の数に応じて変わるであろう。

【実施例5】

【0085】

本発明のアッセイ法の変形

本発明のアッセイ法は、ADPの形でカルバメートおよび酢酸キナーゼ基質、カルバモイルリン酸およびアセチルリン酸またはその前駆体の、外からの外的な添加なしで機能するのである。汚染された培養物試料では、アセチルリン酸およびカルバモイルリン酸またはその前駆体が、細胞培養物由来の十分な細胞ADPと共に内生的に存在して、ATPの形成に向かう反応を刺激するのである。あるいは、他の外から加えられる酵素または細胞酵素、すなわちATPおよびAMPを利用するアデニル酸キナーゼによって、ADPを生成させることができる。

【0086】

これらの基質を直接加えることを避け、これらの基質をそれ自体で生成する系を有することができる。酢酸塩およびアンモニアをATPと共に使用することによって、酢酸キナーゼおよびカルバメートキナーゼ酵素に、アセチルリン酸およびカルバモイルリン酸を生成させ、次いでこれらを同じ酵素により使用して、ADPからATPを生成させることができる。

【0087】

10

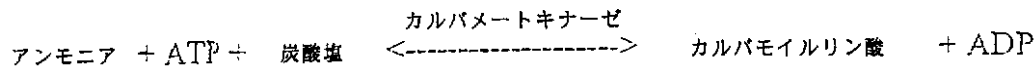
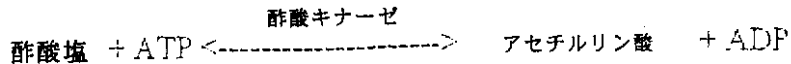
20

30

40

50

【数5】



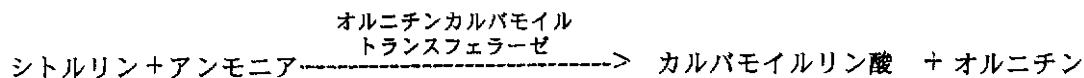
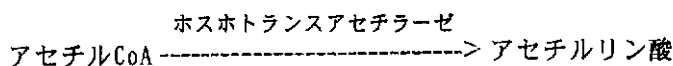
【0088】

この2つの基質は、グルコース発酵およびアルギニン溶解経路の最初の部分を利用することによって、例えばマイコプラズマ酵素によって使用することができるアセチルCoAおよびシトルリンを加えて、アセチルリン酸およびカルバモイルリン酸をそれぞれ合成することによって、「前駆体」から生成することもできる。

10

【0089】

【数6】



20

【0090】

以下の図は、M. fermentansの生化学的活性の間の違いを示し、M. fermentansはカルバメートキナーゼ経路によりATPを優先的に生成するが、酢酸キナーゼ経路も利用するであろう。図6は、個々に酵素経路用に、次いで試薬と組み合わせて基質を加える影響を示す。

【0091】

M. fermentansは両方の経路を利用し、M. oraleはカルバメートキナーゼ経路のみを利用し、図7に示すように、正の比率は、カルバメート試薬単独または組合せ試薬においてのみ観察される。図8は、M. oraleに関する検出限界が、14CFU/ウェルという低さであることを示す。

【0092】

本発明者は、酢酸キナーゼ経路を優先的に利用するマイコプラズマ、すなわちM. hyorhynisを調べている。そのデータは、図9に示す。

30

【0093】

本発明者は、15を超える異なる細胞系(表3参照)を試験し、これらの細胞はいずれも、比率に影響を与え偽陽性を与えるのに、十分な基本的酵素活性を有していないことを示した。本発明者は、理論によって縛られることを望まずに、この理由は、これらの経路が嫌気性であり、すべての哺乳動物細胞培養物は、酸化リン酸化によってATPを生成するからであると考え。それ故、カルバモイルリン酸またはその前駆体のみ、あるいはアセチルリン酸またはその前駆体のみを使用することによって、問題のマイコプラズマ汚染が、酢酸キナーゼ経路、カルバメートキナーゼ経路、あるいは両方を使用する群に由来するかどうかを判定することができる、本発明のアッセイ法を生み出すことができる。これには、有用な診断用途がある可能性がある。

40

【0094】

酢酸キナーゼ活性を有する細菌は、細胞培養物の汚染物質として通常見出される細菌に限らず、主に分子生物学のために研究室で扱われる、ある決まった大腸菌種の例外が考えられる。しかしながら、この微生物に関する活性は、非常に高い接種原濃度においてのみ見られ、この場合、濁度の増大が存在し、試料の生じる濁度は、肉眼によって容易に観察される。それ故、必要な場合、本発明の方法を改変して、細菌汚染に関する最初のスクリーニングステップを含ませることができる。これは様々な方法によって達成することができるが、試料を標準的な細菌フィルターに通過させることによって、行うことが好ましい

50

(BasemanおよびTully、1997)。

【実施例 6】

【0095】

本発明のマイコプラズマアッセイ法およびキットにおいて使用するための好ましい試薬要素

1. マイコプラズマ検出試薬(MDR)、100ml当たり

- ・ 酢酸マグネシウム 214.5mg(10mM)
- ・ 無機ピロリン酸 178.4 μg(4 μM)
- ・ ウシ血清アルブミン 160mg(0.16%)
- ・ D-ルシフェリン 10mg(360 μM)
- ・ L-ルシフェリン 250 μg(8.9 μM)
- ・ ルシフェラーゼ(RY) 85 μg
- ・ ADP 250.5 μg(5 μM)
- ・ AMP 69.44mg(2mM)

10

*RYは、Lucigenによって供給される組換えルシフェラーゼに与えられた名称である。D-ルシフェリンとL-ルシフェリンの混合物は、D-ルシフェリン単独より、安定した光出力を与えることが見出されている。

【0096】

2. マイコプラズマ基質(MS)、100ml当たり

- ・ アセチルリン酸 55.23mg(3mM)
- ・ カルバモイルリン酸 45.87mg(3mM)

20

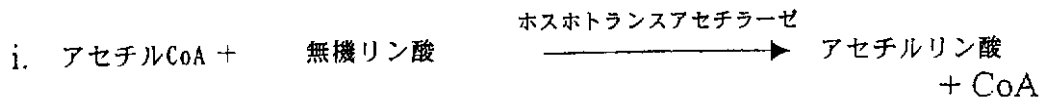
【0097】

マイコプラズマ基質(MS)前駆体

アセチルリン酸またはカルバモイルリン酸を生成する反応の例:

【0098】

【数 7】



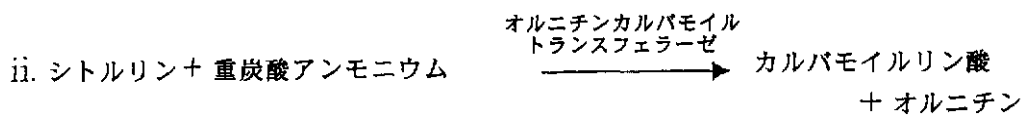
30

好ましい濃度範囲:

アセチルCoA	0.1mM~100mM
無機リン酸	0.1mM~100mM
(例えば、リン酸カリウム)	

【0099】

【数 8】



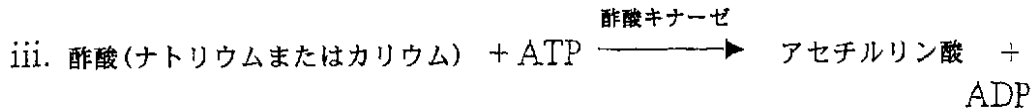
40

好ましい濃度範囲:

シトルリン	1mM~100mM
重炭酸アンモニウム	1mM~200mM

【0100】

【数9】



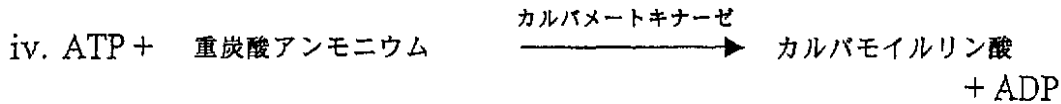
好ましい濃度範囲：

酢酸(例えばナトリウムまたはカリウム)	1mM~500mM
ATP	0.1mM~100mM

【0101】

10

【数10】



好ましい濃度範囲：

重炭酸アンモニウム	1mM~200mM	mM
ATP	0.1mM~100mM	10mM

【0102】

20

供給業者

Sigma-Aldrich Company Ltd.
Fancy Road
Poole
Dorset
BH12 4QH
英国

【0103】

3. マイコプラズマアッセイ用バッファー(MAB)、100ml当たり

- HEPES 1.1915g(50mM)
- EDTA 74.44mg(2mM)
- Triton X-100 250 μl(0.25%)
- pH7.50

30

【0104】

本発明のマイコプラズマアッセイ法およびキットにおいて使用するための要素の、好ましい濃度範囲

好ましい濃度範囲は以下のものを含む。

- ADP、1 μM~100mM、好ましくは1 μM~100 μM、より好ましくは5 μM。
- AMP、1 μM~100mM、好ましくは0.1mM~10mM、より好ましくは2mM。
- アセチルリン酸、1 μM~100mM、好ましくは0.1mM~20mM、より好ましくは3mM。10を超る濃度は光出力を低下させるが、アッセイは依然有効である。
- カルバモイルリン酸、1 μM~100mM、好ましくは0.1mM~20mM、より好ましくは3mM。

【実施例7】

【0105】

界面活性剤のマイコプラズマアッセイに対する影響

試料中への酵素の放出を可能にするために、生菌マイコプラズマの細胞膜を破壊することは、本発明のアッセイ法の好ましい実施形態である。

これによって、基質の結合およびATPの生成が可能になる。しかしながら、マイコプラズマ汚染を示す正の比率は、任意の溶解処理の不在下で得ることができる。これらの酵素

50

は、生菌マイコプラズマによって放出される可能性があることによって、このことが示される。一部の死んでいる微生物が、自然な溶解によってその中身を放出したことも考えられる。

【0106】

さらに低濃度の非イオン性界面活性剤Triton-X100を加えることによって、カルバメートキナーゼおよび酢酸キナーゼの試料中への最大限の放出を確実にすることによって、アッセイの感度が大幅に増大する。

【0107】

以下の実験の目的は、マイコプラズマ汚染K562細胞培養物に関して見られた比率に関する、Hepes-EDTAバッファー中のTriton-X100の濃度を決定することであった。2種の微生物、M.hyorhinisおよびM. oraleを調べた。

【0108】

図10は、界面活性剤による溶解ステップなしで、マイコプラズマ酵素を検出することができることを示す。図10は、4~5%より大きい濃度で光出力の低下も示し、これはルシフェラーゼ酵素/反応に対する、界面活性剤の悪影響によるものである。しかしながら、20% (v/v)もの高濃度で正の活性を検出することもできる。

【0109】

本発明者は、前の実験で使用したTriton-X100の濃度では、大腸菌菌株JM109細胞由来の検出可能なカルバメートキナーゼまたは酢酸キナーゼの活性も、まったくなかったことも示している。

【0110】

前述の結果によって、使用した細菌細胞数に関して、正の比率が存在しないことが確認される。細菌細胞を溶かすことが報告されているレベル(1~2%)まで、Triton-X100濃度を増大させることによって、1を超える正の比率は依然もたらさなかった。

【0111】

一般に、生物学的界面活性剤を普通に使用し、脂質の両極膜を破壊して放出させ、次いで膜結合タンパク質を溶かす。非イオン性界面活性剤は非変性であり、生物学的活性を害さずに膜を溶かすことができる。非イオン性界面活性剤は主に、タンパク質の立体配座の研究用、および疎水性タンパク質が広がる膜からの親水性タンパク質の分離用に使用されている。アニオン性およびカチオン性界面活性剤は、タンパク質構造の大きな修飾をもたらし、タンパク質凝集体を破壊する際により有効である。両性イオン性界面活性剤も低変性であるが、タンパク質凝集体を破壊する際に有効である。

【0112】

真核生物と原核生物両方のタンパク質要素を効率良く溶解、放出および保存するために、これらの異なる群の界面活性剤が、いくつかの異なる細胞型と共に研究されている。

【0113】

本発明の好ましいアッセイ用に、必要とされる溶解剤は、マイコプラズマ膜の破壊を引き起こし、基質と反応するために必要とされる代謝酵素の放出を可能にする、溶解剤である。界面活性剤除去または中和ステップは存在しないので、選択した系が、カルバメートキナーゼおよび/または酢酸キナーゼの活性、またはルシフェラーゼ/ルシフェリン/ATP反応を害さないことが、したがって重要である。細胞培養物/試料の潜在的な污染源である可能性がある細菌に対して、ほとんどあるいはまったく影響を与えずに、マイコプラズマの溶解を選択的に引き起こす系を使用することも好ましい。

【0114】

しかしながら、0.45 μmフィルターによる濾過ステップが存在することによって、任意の污染源であるより大きな微生物を除去するはずである。

【0115】

細菌とマイコプラズマの間の重要な違いは、細胞壁の欠如であり、細菌を溶解するのをさらに困難にしているのは、細菌の細胞壁である。全体的な溶解をもたらすことができる、いくつかの非常に厳密な方法が存在し、これらには圧力(French Press)および超音波処

10

20

30

40

50

理がある。他の酵素による消化法には、リゾソーム、次に界面活性剤の添加がある。しかしながら、マイコプラズマは約1~2%のTriton X-100の濃度で溶かすことができる。

【0116】

Brij(登録商標)35(0.4%)(Sigma-Aldrich Company Ltd.)およびB-PER(1%)(Perbio Science UK Ltd.)などの、低濃度の他の非イオン性界面活性剤は、ルシフェラーゼ酵素に対する悪影響がなく、ルシフェラーゼ反応に悪影響を与えずに、マイコプラズマ膜を破壊することができる。これらの界面活性剤の濃度は、マイコプラズマ検出の感度を失わずに、10%まで引き上げることができる。

【0117】

汚染性マイコプラズマを、溶解ステップなしで検出して、マイコプラズマ膜を破壊することができる。しかしながら、軽い溶解ステップ(Hepes-EDTAバッファー中に0.25%のTriton X-100)を加えることによって、当該のマイコプラズマ酵素が反応混合物中に放出されることによって、アッセイの感度が増大する。

10

【0118】

溶解ステップは、好ましいことにマイコプラズマの選択的溶解を引き起こすが、細菌細胞にはほとんど、あるいはまったく影響を与えないと思われる。低濃度の大部分の非イオン性界面活性剤が、これを行うはずである。しかしながら、濾過ステップは、任意の汚染細菌を物理的に除去し、任意の界面活性剤の使用を可能にするが、ルシフェラーゼ反応あるいはカルバメートキナーゼおよび酢酸キナーゼの活性を阻害しない、界面活性剤が好ましいと思われる。

20

【実施例8】

【0119】

好ましいキットの中身

LT07-118(10の試験に十分である)

- 1.LT27-217、マイコプラズマ検出試薬、凍結乾燥状態。2×600µlバイアル。
- 2.LT27-218、マイコプラズマアッセイ用バッファー、1×10mlボトル。
- 3.LT27-221、マイコプラズマ基質、凍結乾燥状態。2×600µlバイアル。

【0120】

LT07-218(25の試験に十分である)

- 1.LT27-217、マイコプラズマ検出試薬、凍結乾燥状態。5×600µlバイアル。
- 2.LT27-218、マイコプラズマアッセイ用バッファー、1×10mlボトル。
- 3.LT27-221、マイコプラズマ基質、凍結乾燥状態。5×600µlバイアル

30

【0121】

LT07-318(100の試験に十分である)

- 1.LT27-216、マイコプラズマ検出試薬、凍結乾燥状態。1×10mlバイアル。
- 2.LT27-220、マイコプラズマアッセイ用バッファー、1×20mlボトル。
- 3.LT27-224、マイコプラズマ基質、凍結乾燥状態。1×10mlバイアル

【0122】

本発明のキットおよび方法用の、好ましい試薬組成物

- 1.マイコプラズマ検出試薬(MDR)、100ml当たり

40

- ・ 酢酸マグネシウム¹ 214.5mg(10mM)
- ・ 無機ピロリン酸¹ 178.4µg(4µM)
- ・ ウシ血清アルブミン¹ 160mg(0.16%)
- ・ D-ルシフェリン² 10mg(360µM)
- ・ D-ルシフェリン² 250µg(8.9µM)
- ・ ルシフェラーゼ(RY)³ 85µg
- ・ ADP¹ 250.5µg(5µM)
- ・ AMP¹ 69.44mg(2mM)

【0123】

- 2.マイコプラズマ基質(MS)、100ml当たり

50

- ・ アセチルリン酸¹ 55.23mg(3mM)
- ・ カルバモイルリン酸¹ 45.87mg(3mM)

【 0 1 2 4 】

3. マイコプラズマアッセイ用バッファー (MAB)、100ml 当たり

- ・ HEPES¹ 1.1915g(50mM)
- ・ EDTA¹ 74.44mg(2mM)
- ・ Triton X-100¹ 250 μ l (0.25%)
- ・ pH7.50

【 0 1 2 5 】

好ましい濃度範囲:

- ・ ADP、1 μ M ~ 100mM
- ・ AMP、1 μ M ~ 100mM
- ・ アセチルリン酸、1 μ M ~ 100mM、好ましくは1mM ~ 10mM
- ・ カルバモイルリン酸、1 μ M ~ 100mM

10

【 0 1 2 6 】

供給業者

1.

Sigma-Aldrich Company Ltd.
Fancy Road
Poole
Dorset
BH12 4QH
英国

20

2.

Resem BV
Goudenregenstraat 84
NL-4131 BE Vanen
オランダ

3.

Lucigen Ltd
Porton Down Science Park
Porton、Salisbury
Wiltshire SP4 OJQ
英国

30

【 0 1 2 7 】

本発明の好ましい実施形態は、いくつかのマイコプラズマ酵素の活性を利用する、選択的な生化学的試験を提供する。これらの酵素が存在することによって、迅速なスクリーニング手順が与えられ、試験試料中の汚染性マイコプラズマの感度の良い検出が可能になる。生菌マイコプラズマが溶解され、酵素はADPからATPへの転換を触媒するマイコプラズマ基質と反応する。

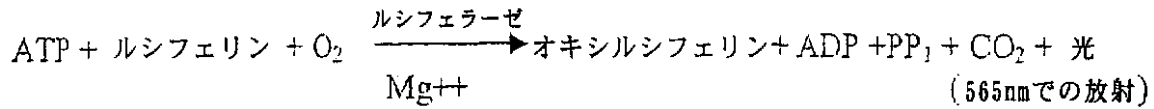
40

【 0 1 2 8 】

マイコプラズマ基質の添加の前(A)および後(B)に、試料中のATPのレベルを測定することによって、マイコプラズマの存在または不在を示す、比B/Aを得ることができる。これらの酵素が存在しない場合、第2の読み取り値は第1の読み取り値(A)を超える増大を示さず、一方、マイコプラズマ基質試薬中の、マイコプラズマ酵素とそれらの特異的基質の反応によって、高いATPレベルがもたらされる。このATPの増大は、以下の生物発光反応を使用して検出することができる。

【 0 1 2 9 】

【数 1 1】



【0 1 3 0】

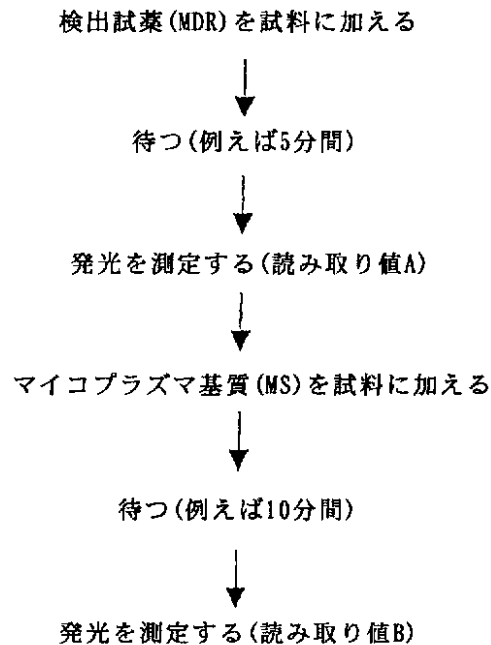
放出される光の強度はATP濃度と直接関係があり、照度計を使用して測定する。アッセイは、周囲室温(18~22)、ルシフェラーゼ活性の最適温度で行うことが好ましい。

【0 1 3 1】

【数 1 2】

本発明の単純な試験プロトコル

10



20

30

B/Aが1より大きい場合=マイコプラズマ汚染試料

B/Aが1以下である場合=マイコプラズマを含まない試料

【0 1 3 2】

方法の概略

培養物上清を遠心分離にかけて細胞を除去し、および場合によっては、アッセイを行う前に細菌フィルターに通すことが好ましい。

キットは、アッセイを行うために必要とされる試薬すべてを含む。

100 μlの培養物上清を、試料として採取する。

マイコプラズマ検出試薬(MDR)を加える。

5分間待つ。

発光(A)を読み取る。

マイコプラズマ基質(MS)を加える。

10分間待つ。

発光(B)を読み取る。

【0 1 3 3】

試薬の還元および保存

関連キットに適用可能な、正確な試薬還元に従うことを確実にする(10、25または100アッセイ地点)。

50

この手順は、少なくとも15分間の平衡時間を通常必要とする。

マイコプラズマ検出試薬(MDR)およびマイコプラズマ基質(MS)は、凍結乾燥状態のペレットとして供給されるのが好ましい。これらをマイコプラズマアッセイ用バッファ(MAB)中で元に戻して、アッセイにおいて使用するための作業溶液を生成する。

【0134】

10試験用の(キットLT07-118):

1. マイコプラズマ検出試薬の調製

600 μ lのマイコプラズマアッセイ用バッファを、凍結乾燥状態のマイコプラズマ検出試薬を含むバイアルに加える。

キャップを付け戻し、軽く混合する。

10

室温で15分間、試薬を平衡状態にする。

【0135】

2. マイコプラズマ基質の調製

600 μ lのマイコプラズマアッセイ用バッファを、凍結乾燥状態のマイコプラズマ基質を含むバイアルに加える。

キャップを付け戻し、軽く混合する。

室温で15分間、試薬を平衡状態にする。

【0136】

3. マイコプラズマアッセイ用バッファ

これは、すぐに使用できる状態で提供することが好ましい。使用しないときは、2~8

20

で保存する。

【0137】

25試験用の(キットLT07-218)

1. マイコプラズマ検出試薬の調製

600 μ lのマイコプラズマアッセイ用バッファを、凍結乾燥状態のマイコプラズマ検出試薬を含むバイアルに加える。

キャップを付け戻し、軽く混合する。

室温で15分間、試薬を平衡状態にする。

【0138】

2. マイコプラズマ基質の調製

600 μ lのマイコプラズマアッセイ用バッファを、凍結乾燥状態のマイコプラズマ基質を含むバイアルに加える。

キャップを付け戻し、軽く混合する。

室温で15分間、試薬を平衡状態にする。

30

【0139】

3. マイコプラズマアッセイ用バッファ

これは、すぐに使用できる状態で提供することが好ましい。使用しないときは、2~8

で保存する。

【0140】

100試験用の(キットLT07-318)

1. マイコプラズマ検出試薬の調製

10mlのマイコプラズマアッセイ用バッファを、凍結乾燥状態のマイコプラズマ検出試薬を含むバイアルに加える。

キャップを付け戻し、軽く混合する。

室温で15分間、試薬を平衡状態にする。

40

【0141】

2. マイコプラズマ基質の調製

600 μ lのマイコプラズマアッセイ用バッファを、凍結乾燥状態のマイコプラズマ基質を含むバイアルに加える。

キャップを付け戻し、軽く混合する。

50

室温で15分間、試薬を平衡状態にする。

【0142】

3. マイコプラズマアッセイ用バッファー

これは、すぐに使用できる状態で提供することが好ましい。使用しないときは、2~8で保存する。

【0143】

装置

1. 器具

このキットは、照度計の使用を必要とする。照度計のパラメータを評価し、それ未満の条件を使用して、機械の正しいプログラミングを生み出すこと。

10

【0144】

本発明の好ましいアッセイは、キュベット/管状照度計と共に使用するために設計された。プレート状照度計に関する使用は、以下を参照されたい。

キュベット/管状照度計:

時間1秒(集積値)を読み取る。

【0145】

2. 他の装置および消耗品

a. 10mlの滅菌ピペット

b. 照度計用キュベット

c. マイクロピペッター -50 ~ 200 μ L; 200 ~ 1000 μ L

d. 卓上遠心分離機

20

【0146】

好ましい試験プロトコル

培養培地の試料は、任意の他の処理ステップ、例えばトリプシン処理の前に、採取すべきであることに留意されたい。

1. すべての試薬を使用前に室温にする。

2. マイコプラズマアッセイ用バッファー中で、マイコプラズマ検出試薬およびマイコプラズマ基質を元に戻す。室温で15分間放置して、完全な再水和を確実にする。

3. 2mlの細胞培養物または培養物上清を遠心分離管に移し、1500rpm(200 x g)で5分間、任意の細胞をペレット状にする。

30

4. 100 μ Lの透明な上清を照度計用キュベット/管に移す。

5. 1秒間の集積読み取り値を得るために、照度計をプログラム設定する(これは通常、大部分のキュベット照度計のデフォルト設定値である)。

6. 100 μ Lのマイコプラズマ検出試薬をそれぞれの試料に加え、5分間待つ。

7. キュベットを照度計中に置き、プログラムを開始させる(読み取り値A)。

8. 100 μ Lのマイコプラズマ基質をそれぞれの試料に加え、10分間待つ。

9. キュベットを照度計中に置き、プログラムを開始させる(読み取り値B)。

10. 比率を計算する=読み取り値B/読み取り値A。

【0147】

結果の解釈

読み取り値Bと読み取り値Aの比率を使用して、細胞培養物がマイコプラズマによって汚染されているかどうかを判定する。

40

【0148】

本発明のキットによって与えられる速度および利便性は、本発明のキットが、マイコプラズマの存在に関して培養物をスクリーニングするための、独特な方法を提供することを意味する。このように、本発明のキットは、培養中の細胞の一般的な試験に理想的に適合している。本発明の試験法を頻繁に使用することは、細胞系が感染したとき、治療行動をとることが促されることを示す。本発明の試験法を、完全培地の移入細胞系および一般的に使用される成分に広げることできる。

【0149】

50

それぞれの実験状況内で、得られる異なる比率の解釈は、使用する細胞型および条件に応じて変わる可能性がある。しかしながら、この試験は、非感染培養物に関して1未満の比B/Aを与える。マイコプラズマに感染した細胞は、1より大きい比を通常生み出すであろう。

【 0 1 5 0 】

【表 5】

表a.アッセイ結果の解釈:健常細胞系および感染細胞系の例示。

細胞系	マイコプラズマの比率	結論
感染細胞		
K562	123.26	陽性
A549	4.10	陽性
U937	8.26	陽性
HepG2	1.27*	ボーダーライン、24時間以内に検疫および再試験
健常細胞		
HL60	0.72	陰性
COS-7	0.46	陰性

10

20

【 0 1 5 1 】

プレート式照度計に関するプロトコル

1. すべての試薬を使用前に室温にする。
2. マイコプラズマアッセイ用バッファー中で、マイコプラズマ検出試薬およびマイコプラズマ基質を元に戻す。室温で15分間放置して、完全な再水和を確実にする。
3. 2mlの細胞培養物上清の細胞培養物を遠心分離管に移し、1500rpm(200 × g)で5分間、任意の細胞をペレット状にする。
4. 100 μlの透明な上清を発光適合性があるプレートに移す。
5. 1秒間の集積読み取り値を得るために、照度計をプログラム設定する。
6. 100 μlのマイコプラズマ検出試薬をそれぞれの試料に加え、5分間待つ。
7. プレートを照度計中に置き、プログラムを開始させる(読み取り値A)。
8. 100 μlのマイコプラズマ基質をそれぞれの試料に加え、10分間待つ。
9. プレートを照度計中に置き、プログラムを開始させる(読み取り値B)。
10. 比率を計算する=読み取り値B/読み取り値A。

30

【 0 1 5 2 】

試薬のいずれかを取り扱うときは、多大な注意を払わなければならない。皮膚は、高レベルのATPをその表面に有しており、これが試薬を汚染し、偽の高い読み取り値をもたらす可能性がある。ラテックス製手袋は、この問題を回避する。

【 0 1 5 3 】

すべての試薬の最適な作業温度は22 °Cである。試薬が凍結されている場合、使用前に試薬を室温(18 ~ 22 °C)に到達させる時間を常に与えること。

40

【 0 1 5 4 】

アッセイの感度によって隠れた汚染を検出することができ、この比率がかろうじて1を超える場合(例えば1.3まで)、試料を再試験することが勧められる。検疫状態に保たれた任意の培養物を、培養のさらに24 ~ 48時間後に試験して、比率が増大したかどうかを見ることができる。

【 0 1 5 5 】

概要

本発明のアッセイは、細胞の存在下または不在下で行うことができる。既知のマイコプラズマ

50

ラズマ検出システムとは異なり、本発明のアッセイは、安価な手動照度計システムを使用して、試料を迅速にスクリーニングすることができ、15分以内に結果を与え、汚染試料の適切な取り扱いを可能にすることができる。

【 0 1 5 6 】

PCRおよびDAPI/ヘキスト染色液は、生菌マイコプラズマまたは死菌マイコプラズマ由来の、すべてのDNAに結合するであろう。それ故、マイコプラズマの処理および除去を調べると、マイコプラズマが根絶されていても、PCR/DNA染色液を使用すると、依然として偽陽性で終わる可能性がある。

【 0 1 5 7 】

本発明のアッセイは、生菌マイコプラズマを検出することができるが、一方PCRなどの既知の方法は、生菌マイコプラズマと死菌マイコプラズマを区別することができない。

【 0 1 5 8 】

[参考文献]

References

- 1) Razin S, Yogev D and Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 62(4): 1094-1156.
- 2) Rottem S and Barile MF. 1993. Beware of mycoplasmas. *TIBTECH.* 11: 143-151.
- 3) Rottem S. 2002. Sterols and acylated proteins in mycoplasmas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 1289-1292. 10
- 4) McGarrity GJ and Kotani H. 1985. in *The mycoplasmas Vol IV.* (Razin S and Barile MF eds) p. 353-390. Academic Press.
- 5) Battaglia M, Pozzi D, Grimaldi S and Parasassi T. 1994. Hoechst 33258 staining for detecting mycoplasma contamination in cell cultures: a method for reducing fluorescence photobleaching. *Biotechnic and Histochem.* 69: 152-156. 20
- 6) Raab LS. 1999. Cultural revolution: mycoplasma testing kits and services. *The Scientist.* 13 (20): 21-25.
- 7) Verhoef V, Germain G and Fridland A. 1983. Adenosine phosphorylase activity in mycoplasma-free growth media for mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 149(1): 37-44.
- 8) Whitaker AM, Windsor GD, Burnett CM and Taylor CH. 1987. A rapid and sensitive method for the detection of mycoplasmas in infected cell cultures using 6-methyl purine deoxyriboside. *Dev. Biol. Stand.* 66:503-509. 30
- 9) Daxboeck F, Krause R and Wenisch C. 2003. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 9(4): 263-73.
- 10) de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR and Subramani S. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7(2): 725-37. 40
- 11) Masuda T, Tatsumi H and Nakano E. 1989. Cloning and sequence analysis of cDNA for luciferase of a Japanese firefly, *Luciola cruciata*. *Gene.* 77(2): 265-70.
- 12) Wood KV, Lam YA, Seliger HH and McElroy WD. 1989.

- Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colours. *Science*. 244 (4905): 700-2.
- 13) de Wet JR, Wood KV, Helinski DR and DeLuca M. 1986. Cloning firefly luciferase. *Methods Enzymol.* 133: 3-14.
- 14) White PJ, Squirrell DJ, Arnaud P, Lowe CR and Murray JA. 1996. Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354. *Biochem J.* 319(2): 343-50. 10
- 15) Baseman JB and Tully JG. 1997. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg. Infect. Dis.* 3(1): 21-32.
- 16) Kirchhoff H, Mohan K, Schmidt R, Runge M, Brown DR, Brown MB, Foggin CM, Muvavarirwa P, Lehmann H and Flossdorf J. 1997. *Mycoplasma crocodyli* sp. nov., a new species from crocodiles. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 742-6. 20
- 17) Forsyth MH, Tully JG, Gorton TS, Hinkley L, Frasca S, van Kruiningen HJ and Geary SJ. 1996. *Mycoplasma sturni* sp. nov., from the conjunctiva of a European starling (*Sturnus vulgaris*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 716-9.
- 18) Taylor RR, Mohan K and Miles RJ. 1996. Diversity of energy-yielding substrates and metabolism in avian mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* 51: 291-304. 30
- 19) Tully JG, Whitcomb RF, Rose DL, Bove JM, Carle P, Somerson NL, Williamson DL and Eden-Green S. 1994. *Acholeplasma brassica* sp. nov. and *Acholeplasma palmae* sp. nov., two non-sterol-requiring mollicutes from plant surfaces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:690-4.
- 20) Web reference: www.unc.edu/depts/tcf/mycoplasma.htm
- 21) Duffy LB, Crabb D, Searcey K and Kempf MC. 2000. Comparative potency of gemifloxacin, new quinolones, macrolides, tetracycline and clindamycin against *Mycoplasma* spp. *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 45: 29. 40
- 22) Taylor-Robinson D and Bebear C. 1997. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. 40: 622-630.
- 23) Uphoff CC, Meyer C and Drexler HG. 2002. Elimination of mycoplasma from leukaemia-lymphoma cell lines using antibiotics. 16(2): 284-288.

24) Schram E and Weyens-van Witzenburg A. 1989. Improved ATP methodology for biomass assays. *J. Biolumin. Chemilumin.* 4: 390-398.

25) Stanley PE. 1989. A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *J. Biolumin. Chemilumin.* 4:375-380.

26) Pellegrini A, Thomas U, von Fellenberg R and Wild P. 1992. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative and gram positive bacteria related to their basic character. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 180-187.

10

【図面の簡単な説明】

【0159】

【図1】*M. hyorhina*汚染の存在下での、ATP生成の動態の図である。

【図2】StratageneからのPCRキットと、本発明の好ましい実施形態の比率の間の比較の図である。

【図3】本発明の好ましい実施形態のマイコプラズマ除去物質を用いた、汚染細胞系の処理の図である。

【図4】細胞、上清、および0.45 μm(F1)、0.22 μm(F2)および0.1 μm(F3)フィルターによって濾過した上清に関する、比率のデータの図である。

20

【図5】上清の希釈の影響の図である。

【図6】異なる基質に対して試験した、7900CFU/ウェルでの、*M. fermentans*の図である。

【図7】異なる基質に対して試験した、1450CFU/ウェルでの、*M. orale*ストックの図である。

【図8】アッセイの感受性を示すための、*M. orale*ストックの希釈の図である。

【図9】*M. hyorhina*、異なる基質試薬の比較の図である。

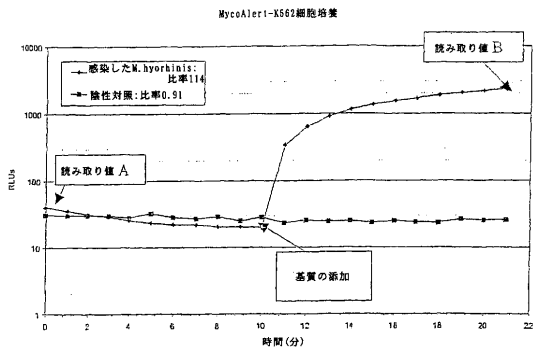
【図10】*M. hyorhina*(MH)および*M. orale*(MO)で感染させたK562細胞における、マイコプラズマ酵素活性の検出に対する、Triton-X100濃度の影響の図である。

【図11】多数(1~10,000細胞/試料100 μl)の細菌細胞(大腸菌)と比較した、*M. hyorhina*(MH)で汚染されたK562細胞に対する、高いTriton-X100濃度の影響を示す図である。

30

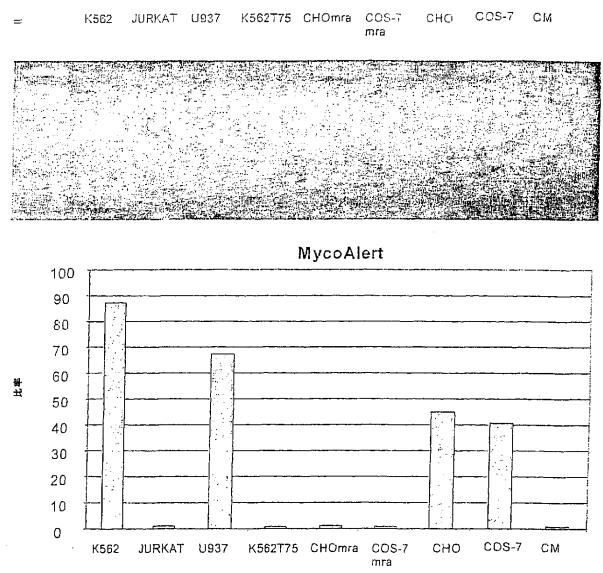
【 図 1 】

FIGURE 1



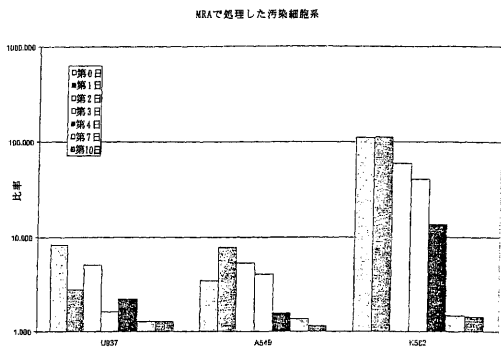
【 図 2 】

FIGURE 2



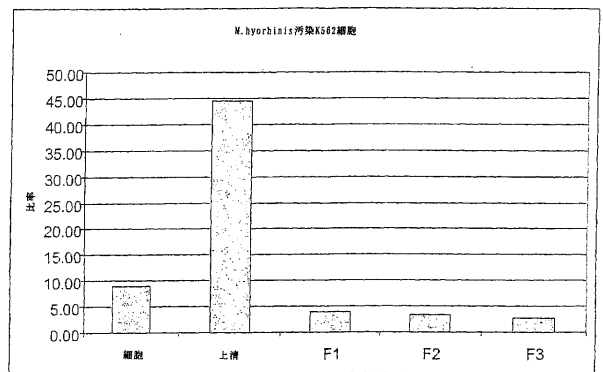
【 図 3 】

FIGURE 3



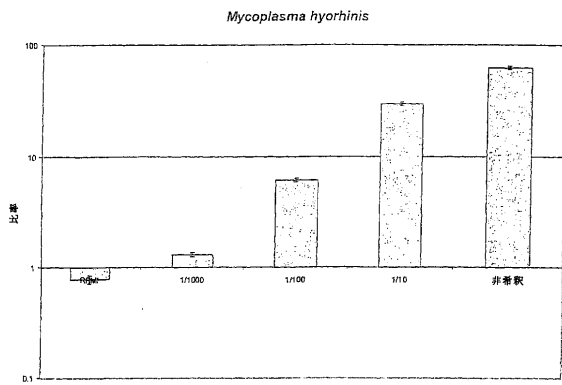
【 図 4 】

FIGURE 4



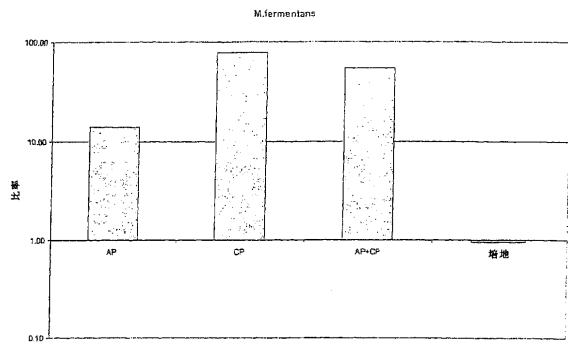
【図5】

FIGURE 5



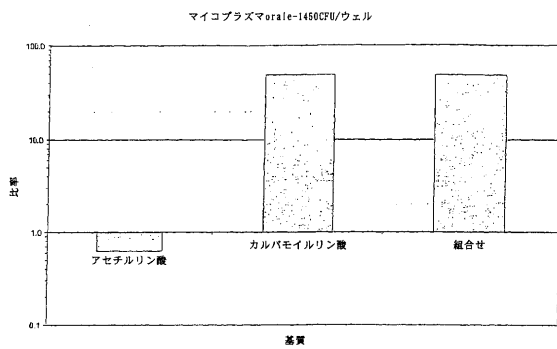
【図6】

FIGURE 6



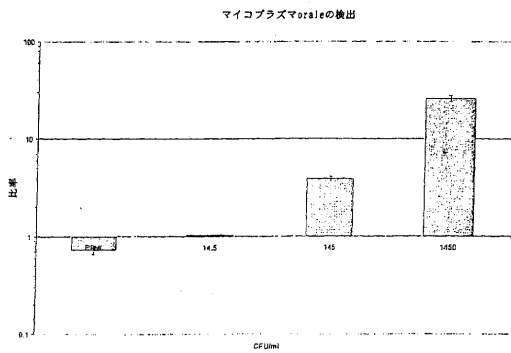
【図7】

FIGURE 7



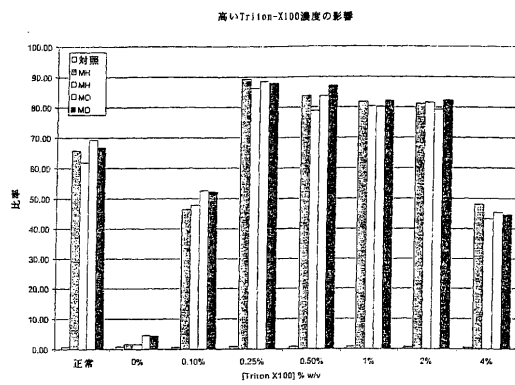
【図8】

FIGURE 8



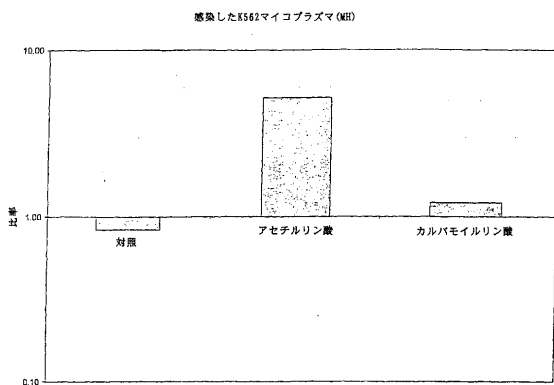
【図10】

FIGURE 10



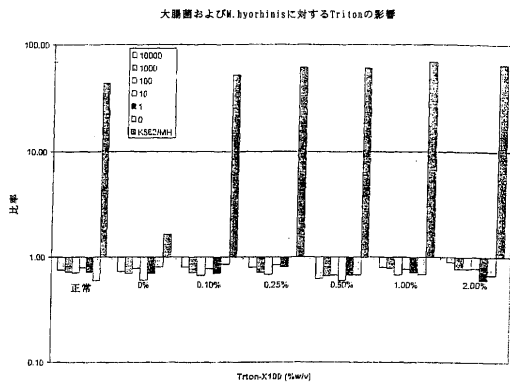
【図9】

FIGURE 9



【 図 11 】

FIGURE 11



フロントページの続き

- (72)発明者 アンソニー・ピット
イギリス・ノッティンガム・NG9・2BE・ビーストン・ヘンリー・ロード・25
- (72)発明者 シャロン・バトリシア・メアリー・クローチ
イギリス・ノッティンガム・レントン・ロード・13・レントン・ロッジ
- (72)発明者 ケヴィン・ジョン・スレイター
イギリス・ノッティンガム・NG7・1ED・ザ・パーク・キャヴェンディッシュ・クレッセント
・サウス・23A
- (72)発明者 アン・コックス
イギリス・ノッティンガム・ロング・イートン・ミルデール・ロード・1

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 特開2001-208756(JP,A)
特表2003-500045(JP,A)
特表2003-513651(JP,A)
FEMS Microbiol. Lett. (1978) vol.3, no.3, p.143-145
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1967) vol.143, no.1, p.573-577
Anal. Sci. (Jan 2003) vol.19, no.1, p.105-109

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/48

C12Q 1/04

PubMed

BIOSIS/WPI(DIALOG)