

一般試験法の部のマイコプラズマ否定試験法の項を次のように改める。

マイコプラズマ否定試験法

検体等にマイコプラズマが存在しないことを調べる次の方法又は International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products のガイドライン (GL34 : Testing for the detection of mycoplasma contamination) に定める方法により行う。

1 培地

別に規定する場合を除き、次の組成のマイコプラズマ用液状培地を用いる。培地の液量は、通常1本当たり 100mL とする。

1.1 マイコプラズマ用液状培地

1.1.1 組成

1.1.1.1 基礎培地

1,000mL 中

| | |
|---------------|--------|
| 50w/v%牛心筋浸出液 | 100 mL |
| 獣肉製ペプトン | 10 g |
| 塩化ナトリウム | 5 g |
| ブドウ糖 | 1 g |
| L-グルタミン酸ナトリウム | 0.1 g |
| L-アルギニン-塩酸塩 | 1 g |
| 水 | 残量 |

220nm のメンブラン・フィルターでろ過滅菌し、又は 121 °C で 15 分間高压滅菌する。滅菌後の pH を 7.2 ~ 7.4 とする。

なお、適当な品質の乾燥製品を用いてもよい。

1.1.1.2 培地添加物

1.1.1.1 の基礎培地 77mL に次の各成分を添加する。

| | |
|----------------------------------|-------|
| 馬血清 | 10 mL |
| 非働化豚血清 | 5 mL |
| 25w/v%新鮮酵母抽出液 | 5 mL |
| 1 w/v% β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド〔酸化型〕 | 1 mL |
| 1 w/v% L-システイン塩酸塩試液 | 1 mL |
| 0.2w/v%フェノールレッド液 | 1 mL |

滅菌した基礎培地にあらかじめ、ろ過滅菌しておいた各添加物を無菌的に加える。

なお、添加物のうち高压滅菌可能なものは、高压滅菌してもよい。

さらに、ベンジルペニシリンカリウムを培地 1 mL 中に 500 単位及び酢酸タリウムを 0.02w/v% となるように加えてもよい。

1.1.2 性能

マイコプラズマ・ガリセプチカム、マイコプラズマ・シノビエ、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ及びマイコプラズマ・オラーレの 100CFU 未満を接種し、35 ~ 37 °C で 7 日間培養するとき、十分に増殖しなければならない。

1.2 マイコプラズマ用寒天培地

1.2.1 組成

1.2.1.1 基礎培地

1.1.1.1 の基礎培地 78mL に寒天を 1 g 加えたものである。

1.2.1.2 培地添加物

1.1.1.2 の培地添加物からフェノールレッド液を除いたものである。

なお、滅菌後、加温溶解した培地は直径 45 ~ 55mm の滅菌シャーレに 5 mL ずつ分注し、冷却、凝固させ、マイコプラズマ用寒天平板とする。

1.2.2 性能

1.1.2 を準用し、各マイコプラズマ菌株 100CFU 未満を接種し、35 ~ 37 °C で 5 vol% 炭酸ガス下で 10 日間培養するとき、固有の集落を形成しなければならない。

2 培養材料

検体又は試験品を用いる。なお、溶解用液が非添付の凍結乾燥製剤では、リン酸緩衝食塩液等の適当な溶解用液で用法及び用量に記載された規定量に溶解する。また、経口（飲水）投与剤及び穿刺剤では、接種量当たり 1 投与量となるようにリン酸緩衝食塩液等の適当な溶解用液で希釈する。

3 検体等の数量

検体ではそれぞれの容器について、試験品では 2 本以上の小分容器から等量ずつ採り、混合したものについて行う。

4 培地への接種量

液状培地 100mL に検体等を 1 mL 接種する。また、液状培地から寒天平板には、それぞれ 0.1 mL ずつを接種する。

5 培養及び観察

検体等を液状培地に接種後、十分に混和し、35 ~ 37 °C で 14 日間培養する。なお、生活細胞を含む検体等の場合は、適時に培養液の pH を調整する。

培養後、3 日目、7 日目、10 日目及び 14 日目に培養液をマイコプラズマ用寒天平板に接種し、5 vol% 炭酸ガス下で、35 ~ 37 °C で 10 日間培養し、マイコプラズマの集落の有無を観察する。

なお、この場合、対照として培地及びマイコプラズマ・シノビエを接種したものを同様に観察する。

6 判定

試験の結果、検体等及び培地を接種した平板においてマイコプラズマの集落を認めず、マイコプラズマ・シノビエを接種した平板において集落を認めたときは、この試験に適合とする。

マイコプラズマ・シノビエを接種した平板で集落を認めないとき及び培地を接種した平板でマイコプラズマの集落を認めたときは、試験を反復しなければならない。

7 再試験

試験の結果が疑わしい場合は、新たに 2 倍量以上の検体等を用いて試験を反復しなければならない。