2　培地性能試験

培地性能を確認するため、マイコプラズマ否定試験用液体培地Ⅰには、ブドウ糖分解マイコプラズマ種（*Mycoplasma pneumoniae* ＡＴＣＣ15531又は同等の種または株）、マイコプラズマ否定試験用液体培地ⅠⅠには、アルギニン分解マイコプラズマ種（*Mycoplasma orale* ＡＴＣＣ23714又は同等の種または株）を、それぞれ100　ＣＦＵ未満接種して、35～37℃で培養するとき、７日以内に培地が明らかに変色しなければならない。平板培地には、いずれの試験用菌株を100　ＣＦＵ未満接種した場合に接種後14日以内にマイコプラズマの集落が観察されなければならない。

3　マイコプラズマ発育阻止活性の試験及び除去

マイコプラズマ否定試験を実施する前に検体がマイコプラズマ発育阻止活性を持つかどうかを試験する。この試験は、同一製法の製剤の場合、バッチごとに行う必要はない。試験用菌株としては、*Acholeplasma laidlawii*を用いる。ただし、検体のマイコプラズマ発育阻止活性に対して*Acholeplasma laidlawii*よりも感受性の高いマイコプラズマ株が知られている場合には、その株を用いる。試験用菌株として、*Acholeplasma laidlawii*又は他のブドウ糖分解マイコプラズマを用いる場合には、マイコプラズマ否定試験用液体培地Ⅰ、アルギニン分解マイコプラズマを用いる場合には、マイコプラズマ否定試験用液体培地Ⅱに４．２に定めた量の検体を加え、試験用マイコプラズマを約100ＣＦＵ加え、35～37℃で７日間培養する。培地の色調変化を観察し、マイコプラズマの発育が見られない場合、又は検体を加えない対照培地に比べ、発育が遅延した場合は、マイコプラズマ発育阻止活性があるものとする。

この場合、阻害物質を除いて継代する、４．２の規定にかかわらず培地の量を増やす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。

なお、マイコプラズマ発育阻止活性の強い検体については、後述のメンブランフィルターを使用する方法を用いることができる。

これらの除去法を用いた後、発育阻止活性の試験を再度行い、その除去法が有効かつ適切であることを確認する。

4　培養試験法及び観察

３の試験によって、マイコプラズマ発育阻止活性が見られない検体には、４．１の直接塗抹培養法及び４．２の増菌培養法を適用する。マイコプラズマ発育阻止活性の強い検体は、４．３のメンブランフィルターを使用する方法を適用する。この場合、４．１直接塗抹培養法及び４．２増菌培養法は、実施する必要はない。

４．１　直接塗抹培養法

平板培地１枚当たり検体0.2mLを接種する。１検体当たり平板培地10枚以上を用いる。検体を接種した後、表面を乾燥し、35～37℃において５～10vol%の炭酸ガスを含む空気又は窒素ガスで、適切な湿度のもと培養する。

４．２　増菌培養法

10mLのマイコプラズマ否定試験用液体培地Ⅰ及びマイコプラズマ否定試験用液体培地Ⅱを各10本以上用意し、培地１本当たり検体0.2mL接種する。検体を接種後、容器を密閉し35～37℃において14日間以上培養し、培養５～７日目に１回と培養最終日に、対応する新しい液体培地に培養液を0.2mL移植し、同温度で14日間以上培養する。移植を終えた旧液体培地も更に14日間以上培養を続ける。いずれかの液体培地に色調変化が認められたときには、その液体培地を生理食塩液で連続10倍希釈し、各希釈液について平板培地を２枚以上用意し、各平板培地につき希釈液を0.1mL移植する。培養は４．１に準じる。

４．３　メンブランフィルターを使用する方法

孔径0.1μmのメンブランフィルターで検体をろ過後、必要に応じてメンブランフィルターをリン酸緩衝液（pH7.2）10mLずつで３回洗う。メンブランフィルターを装置から外し、半分に切断するか、あらかじめ検体を２等分し、それぞれにつき同一ろ過操作を行うことによって得られた２枚のメンブランフィルターをそれぞれ100mLのマイコプラズマ否定試験用液体培地Ⅰ及びⅡに入れる。

以後の培養法、移植等については４．２に準じる。

5　観察

液体培地の培養期間中は、培地の色調変化を観察する。それぞれの平板培地を14日間以上培養し、７日目及び培養最終日に集落の形成の有無を観察する。疑わしい集落を認めた場合は、ディーネス染色液で染色して鏡検する。

6　判定

以上の試験において、マイコプラズマの増殖を認めないときは、この試験に適合とする。

B　指標細胞を用いた核染色法

検体を指標細胞に接種して培養し、核酸を蛍光色素で染色して顕微鏡観察するとき、指標細胞の核以外に、マイコプラズマの核酸が見えるかを調べることによって、検体中のマイコプラズマの有無を試験する方法である。

ウイルス浮遊液に指標細胞への細胞変成作用がある場合には、ウイルスを中和する。中和のために添加したものも含め、被験検体がマイコプラズマ発育阻止活性を持つかどうかをあらかじめ試験する。

1　試験操作法の妥当性についての検討

本試験に先立ち、指標細胞とマイコプラズマ試験用菌株を用いて試験操作法の妥当性を検討する。指標細胞は、試験に使用する前は、抗菌物質非存在下で培養する。指標細胞として用いる細胞（Ｖｅｒｏ細胞又はマイコプラズマの検出感度が同等以上であることが評価された細胞）に、試験用菌株として*Mycoplasma hyorhinis*（ＡＴＣＣ29052、ＡＴＣＣ17981又は同等の種または株）及び*Mycoplasma orale*（ＡＴＣＣ23714又は同等の種または株）の100ＣＦＵ以下の菌量を接種する。細胞を以下の試験方法で培養するとき、両方の菌株が検出されれば、指標細胞として適している。

2　試験方法

２．１　カバーグラスを沈めた培養デイッシュ又は同等の容器に指標細胞を1×10^4細胞／mlで接種し、５％炭酸ガス存在下で１日35～38℃で培養する。

２．２　試験検体として細胞培養上清を接種する。試験には、陰性対象（非接種）ならびに*Mycoplasma hyorhinis*（ＡＴＣＣ29052、ＡＴＣＣ17981又は同等の株又は種）及び*Mycoplasma orale*（ＡＴＣＣ23714又は同等の株又は種）を100ＣＦＵ以下の菌量を接種した陽性対象も実施する。全ての指標細胞は、５％炭酸ガス存在下で35～38℃で３～６日間の培養し、指標細胞の密度が細胞接着面の半分を覆う状態で固定を行う。

２．３　デイッシュにメタノール／酢酸（100）混液（３：１）を入れてカバーグラスを固定後、液を除き完全に風乾する。カバーグラスは、次に核酸の蛍光染色液（ｂｉｓｂｅｎｚａｍｉｄｅ等）で染色し、蒸留水で洗浄し、風乾後、スライドガラスに封入し、蛍光顕微鏡下で400～600倍又はそれ以上の倍率で核形態を観察する。

3　観察と判定

陰性対象では指標細胞の核の染色像のみが観察される。陽性対象では指標細胞の核に加えて、マイコプラズマの核酸に由来する微小な蛍光が斑点状に指標細胞の周囲に観察される。検体を接種した指標細胞でマイコプラズマ由来の蛍光斑点が観察されないときは、この試験に適合とする。

C　核酸増幅法

マイコプラズマ属、あるいはウレアプラズマ属、スピロプラズマ属、アコレプラズマ属等のモリキューテス綱の細菌（以下「マイコプラズマ等のモリキューテス」という。）の核酸を特異的に増幅させて検出し、これらに由来する核酸が検体中に存在するかを試験する方法である。この試験法の実施の注意点として、使用する核酸増幅系については、特異性、検出限界ならびに、核酸抽出手技