

Stericup® および Steritop® フィルターの マイコプラズマ除去性能

要約

マイコプラズマは、細胞培養システムにおける一般的な微生物汚染物質であり、細胞株、生物製造プロセス、および研究成果に重大なリスクをもたらします。マイコプラズマ汚染を防ぐには、効果的なろ過戦略が不可欠です。マイコプラズマは、サイズが小さく変形しやすいため、孔径が 0.2 µm 程度のフィルターを通過する可能性があります。Stericup® システムや Steritop® ボトルトップユニットなどの 0.1 µm 規格の滅菌フィルターを細胞培養培地の調製に使用すると、データの完全性、細胞株の安定性、バイオセーフティのサポートに役立ちます。現在、マイコプラズマ除去のためのフィルターを評価するための業界標準はありませんが、厳格なフィルター試験が非常に重要です。0.1 µm および 0.22 µm の滅菌グレードフィルターのマイコプラズマクリアランス性能を評価するために、*Acholeplasma laidlawii* チャレンジ試験法を使用した結果を示します。私たちの結果は、0.1 µm PES 膜を含む Stericup® および Steritop® フィルターを細胞培養培地、緩衝液、および試薬の調製中に効果的に使用してマイコプラズマを低減できることを示しています。

イントロダクション

マイコプラズマの減少には、膜ろ過やデプスフィルトレーションなどのさまざまなろ過技術が使用されます。マイコプラズマ粒子の効率的な減少を達成するため、明確に定義された孔径を備えた特殊な膜を使用する膜ろ過が広く採用されています。一方、デプスフィルトレーションは、マイコプラズマなどの汚染物質を捕捉して保持するのに繊維状のマテリアルを使用します。マイコプラズマを効果的に減少させるには、ろ過媒体の選択が重要です。孔径が 0.1 µm ~ 0.2 µm の親水性膜は高い保持効率を示し、ろ過プロセス中にマイコプラズマ粒子を効果的に低減します。さらに、適切な粒子サイズ保持特性を備えたデプスフィルトレーション媒体は、マイコプラズマ減少効率をさらに高めることができます。

方法

ろ過によるマイコプラズマの減少について、孔径規格 0.1 µm と 0.22 µm のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜とポリエーテルスルホン (PES) 膜を比較しました。装置への影響を排除し、公平な実験試験を保証するために、メンブレンをバキュームカップから取り出し、コーティングしたスクリーンサポートを備えた滅菌 47 mm ステンレスフィルターホルダーに設置しました。試験プロセスは小規模 (≤ 1L) のろ過装置に合わせてモデル化し、30 psi (2.07 bar) での実際のろ過量と条件をシミュレートしました。試験微生物のサイズ (*Acholeplasma laidlawii* American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, Maryland #23206) を確認するために、各試験と並行してサイズ管理を実行してサンプルを評価しました。

使用前試験

試験に使用した膜は、使用前のマイコプラズマ緩衝液湿潤滅菌試験に供され、値が規定の最小仕様またはそれに近い仕様の最小要件を満たしているかそれを超えていることを確認しました。

チャレンジ試験とバッファージェス

A. *laidlawii* チャレンジ試験は、液体ろ過に使用されるメンブレンフィルターの細菌保持率を決定するための ASTM F838-05 標準テスト¹に準拠し、開発および製造ロットのリリース時のメンブレンフィルターの特性評価をサポートします。最初のバッファー無菌チェックに続いて、modified Hayflick's 培地での A. *laidlawii* チャレンジテストを行いました。Hayflick's 培地は、小さな細菌サイズで、一貫して高収量の A. *laidlawii* 濃度を維持することが実証された増殖培地です。最適化された培養方法を使用することにより、この試験では、滅菌グレードのフィルターのマイコプラズマ除去性を評価するために必要な再現性のある厳密な条件が達成されました。目的は、約 100 mL の容量でフィルター面積 1 cm² あたり 10⁷ 個の A. *laidlawii* という最小攻撃量を保持するフィルターの能力を評価することです。チャレンジ送達に続いて、さらに 100 mL のバッファーを使用してフィルターを通過させました。流出液を 7 日間培養し、混釈プレート上でコロニーを計数することによって A. *laidlawii* の存在を評価しました。

クオリティーコントロール

マイコプラズマの存在検査を含む日常的な管理手法を使用して、ろ過プロセスの有効性をチェックし、潜在的な問題を特定しました。

結果

クオリティーコントロール

流速は、無菌、チャレンジ、および緩衝液洗浄ステップからのサンプルを使用して取得しました。フラックス値を計算するために定義された 13.8 cm² の表面積を使用して、各ステップで 100 mL の体積を処理しました。結果を図 1 に示します。予想どおり、規格 0.1 μm のフィルターは規格 0.22 μm のフィルターに比べてフラックスが低くなりました。PES 膜を使用すると、より速い流速が達成されました。試験した 2 つの 0.22 μm PES メンブレンのうち、Stericup® PES メンブレンフィルターの流速は 20% 以上速くなりました。低流量制御の 0.1 μm PVDF メンブレンは、設計通り、流速が最も遅くなりました。チャレンジおよびバッファージェイスサンプルは、チャレンジ前の無菌チェックサンプルと比較して、より長い処理時間を必要としました。

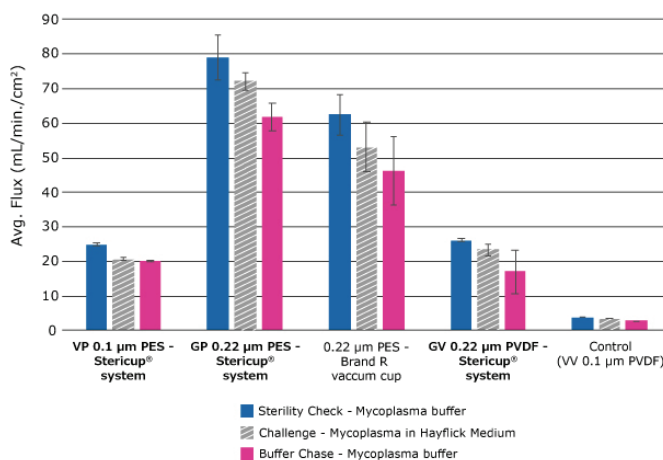


図 1. 0.1 μm および 0.22 μm の PES、および PVDF メンブレンフィルターの計算上のフラックス値。VP = 0.1 μm PES メンブレン、GP = 0.22 μm PES メンブレン、GV = 0.22 μm PVDF メンブレン、VV = 0.1 μm PVDF メンブレン。

マイコプラズマ対数減少値 (LRV)

A. *laidlawii* 培養物、最初の A. *laidlawii* チャレンジ、および流出液のサンプルを緩衝液で段階的に希釈し、GMA 寒天を用いた混釈平板法を使用して計数しました²。プレートを 6% (± 1%) CO₂、37°C (± 2°C) で 7 日間インキュベーションしました。混釈プレーインキュベーション後、混釈プレートを計数して力価を測定しました。

対数削減値 (LRV) を決定するのに、次の計算式を使用しました：

式 1: CFU/Filter の合計チャレンジ

Total Challenge = challenge concentration (CFU/mL) x challenge volume (mL/filter)

式 2: EFA (CFU/cm² で表した Effective Frontal Area Challenge)

$$\text{EFA challenge} = \frac{\text{Total challenge} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{Filter}} \right)}{\text{Filter surface area} \left(\frac{\text{cm}^2}{\text{Filter}} \right)}$$

式 3: CFU/Filter* の総通過量

Total passage = total CFU on the analytical membrane

式 4: 対数減少値 (Log Reduction Value)

$$\text{LRV} = \log_{10} \left(\frac{\text{Total challenge (CFU/filter)}}{\text{Total passage (CFU/filter)}} \right)$$

式 5: LRV のサンプル

Challenge/ 100 mL sample (CFU) = challenge concentration (CFU/mL) x challenge volume (100 mL)

Total passage (CFU/100 mL sample) = total CFU on the assay filter

LRV = challenge/100 mL sample (CFU) /total passage (CFU/100 mL sample)

計算した LRV を図 2 に示します。結果は、Stericup® および Steritop® フィルターの 0.1 μm 規格 PES Express™ PLUS メンブレンが、0.22 μm PVDF および PES メンブレン (LRV = 2.6 ~ 3.2) と比較して優れた低減効果 (LRV ≥ 7) を実証したことを示しています。対照の低流量保持性 0.1 μm PVDF メンブレンの計算値は、LRV > 9.1 (完全保持性) でした。

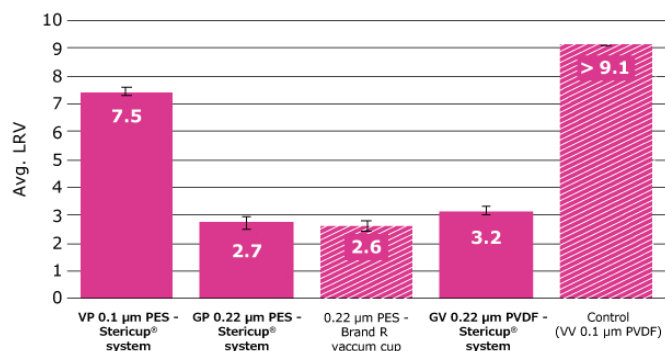


図 2. さまざまな膜タイプの計算上の対数減少値 (LRV)

規格孔径 0.1 μm のフィルターは、細菌の LRV > 7 (低流量 PVDF コントロール、LRV ≥ 9.1 ; PES; LRV > 7.5) の減少が実証されました。試験したすべての企画孔径 0.22 μm の PES および PVDF フィルターは、2.6 ~ 3.2 の対数減少値で *A. laidlawii* を減少させました。標準偏差をエラーバーで示します。VP = 0.1 μm PES メンブレン、GP = 0.22 μm PES メンブレン、GV = 0.22 μm PVDF メンブレン、VV = 0.1 μm PVDF メンブレン。

結果

ろ過は、さまざまな研究、開発、製造プロセスにおいて生物由来製品の純度と安全性を維持する上で重要な役割を果たします。精密ろ過戦略を細胞培養ワークフローに採用することで、研究者はマイコプラズマ汚染に関連するリスクを軽減し、生物学的材料の完全性と品質を確保できます。メンブレンフィルターの細菌保持率を決定するための ASTM F838-05 標準試験の適用により、メンブレン フィルターの特性を評価するための認知されたフレームワークが示されました。本試験の結果は、0.1 μm PES 膜を含む Stericup® および Steritop® フィルターを細胞培養培地および緩衝液の調製中に効果的に使用してマイコプラズマを低減できることを示しています。また、性能的にこれらのフィルターを上流の細胞培養プロセスにおけるマイコプラズマ汚染のリスク軽減に使用できることを示しています。効果的なマイコプラズマの減少には、ろ過能力を理解し、適切なろ過製品を細胞培養ワークフローに導入することが不可欠です。

製品情報

製品名	ファネル容量	数量	カタログ番号
Stericup® Vacuum Filtration System, 0.1 µm, PES filter	250 mL	Pack of 12	S2VPU02RE
Stericup® Vacuum Filtration System, 0.1 µm, PES filter	1000 mL	Pack of 12	S2VPU11RE
Steritop® Vacuum Bottle Top Filter, 0.1 µm, PES filter	1000 mL	Pack of 12	S2VPT10RE

参考文献

1. American Society for Testing and Materials. Standard Method for Determining Bacterial Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration. 2005 ASTM® Standards on Materials and Environmental Microbiology, Second Edition, Designation F838-05(2013).
2. Demonstrating Millipore Express™ SHR mycoplasma clearance capability at pilot and production scale over an extended filtration time. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/528/266/mycoplasma-clearance-capability-tn1209en-mk.pdf>

Stericup® 吸引ろ過フィルターの詳しい情報はこちら [SigmaAldrich.com/stericup](https://www.sigmaaldrich.com/stericup)



メルクライフサイエンス公式
SNS、動画コンテンツをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2024年7月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original Lit No. is MK_AN13428EN Ver. 1.0 54418 03/2024

メルク株式会社

ライフサイエンス サイエンス & ラボソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio

E-mail: jppts@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140