

クラス I 細菌検査用シリーズ 薬剤感受性（真菌）キット

酵母様真菌 DP ‘栄研’

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用できない。
2. 治療のための抗真菌剤の選択は、他の検査結果や臨床症状を考慮して総合的に判断し、担当医師が行うこと。
3. 添付文書に記載された内容に従い使用すること。それ以外の方法についての保証はできない。
4. 使用する装置の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

酵母様真菌 DP ‘栄研’ は、種々の希釈濃度の抗真菌剤をマイクロプレートのウエルに分注し、乾燥させたものである。

別表-1「構成製品一覧」に記した抗真菌剤を、別表-2 に記した濃度でプレート上に配列している。

【使用目的】

抗真菌剤の酵母様真菌薬剤感受性検査〔最小発育阻止濃度（MIC）の測定〕

【測定原理】

本製品は微量液体希釈法を測定原理としている。

この方法は、Clinical and Laboratory Standards Institute：CLSI Approved Standard, M27-A3, 2008.の実施基準に従っている¹⁾。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質・採取法

新鮮培養した菌を被検菌として使用する。

2. 妨害物質・交差反応性

純培養菌を用いるので、雑菌汚染のない限り特に影響するものはない。

2 種類以上の菌液が含まれた被検菌を用いると、目的菌の薬剤感受性が測定できないことがある。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法

酵母様真菌 DP ‘栄研’ は、室内温度に十分戻してから袋から取り出し使用する。

2. 必要な器具・器材・試料等

- 1) 滅菌生理食塩水（菌液調製用）
- 2) 増殖用培地（パールコア ポテトデキストロース寒天培地 ‘栄研’、サブロー寒天培地 ‘栄研’ 等）
- 3) RPMI ブイヨン 12 ‘栄研’
- 4) McFarland 標準濁度液 0.5（標準菌濁度液 A ‘栄研’ 等）
- 5) 手法用器具及び機器（8 連ピペット、フラン器、マイクロプレートミキサー、リーディングミラー、マイクロプレートリーダー）
- 6) 自動機器（接種機、判読機）
- 7) その他（白金耳、滅菌綿棒、プレート用ふた）

3. 測定（操作）法

A. 手法による操作方法

1) 菌液の調製

一夜培養した非選択寒天培地上の被検菌体を鈎菌して滅菌生理食塩水に懸濁する。菌液濃度は McFarland 標準濁度液 0.5 と同じ濁度に合わせる。菌液は、滅菌生理食塩水で 10 倍希釈した後、RPMI ブイヨン 12 ‘栄研’ で更に 100 倍希釈する。これにより最終接種菌量は約 10^3 colony forming unit/mL となる。

2) 菌液の接種

希釈した菌液 0.1 mL ずつを酵母様真菌 DP ‘栄研’ の A～H の横列、1～11 の縦列の各ウエルに接種する。陰性コントロール（NG-C：E12, F12, G12 及び H12）のウエルには菌を接種していない RPMI ブイヨン 12 ‘栄研’、滅菌精製水又は滅菌生理食塩水を 0.1 mL ずつ分注する。接種後、プレートにプレート用ふたをする。プレートを重ねる場合は 3 枚を限度とし、一番上のプレートにふたをする。

3) 培養

24 時間培養後判定する薬剤及びトレーリング発育株（注：【測定結果の判定法】参照）の確認のため、*Candida* 属菌種は 35 °C で 24 時間及び 48 時間培養する。*Cryptococcus neoformans* は 35 °C で 72 時間培養する。

4) 発育状況の確認

a. マイクロプレートリーダーによる測定

判定直前にプレートをマイクロプレートミキサーで振とうし、ウエル内の菌液を均一に懸濁する。マイクロプレートリーダーを用いて 630 nm における吸光度を測定する。

アムホテリシン B は完全発育阻止を、それ以外の薬剤は陽性コントロール（PG-C）に対して 50 % の発育阻止（ IC_{50} ）を基準とし、それ未満の発育を発育阻止とする。

PG-C の IC_{50} に相当する濁度を求めるには以下の 2 つの方法がある。

(1) IC_{50} ウエルを作製する方法

PG-C の培養液 0.05 mL を空のウエルに取り、RPMI ブイヨン 12 ‘栄研’、滅菌精製水又は滅菌生理食塩水 0.05 mL を加える。

(2) PG-C 及び NG-C の濁度から IC_{50} を算出する方法

以下の式に従って算出する。

$$IC_{50} \text{ の濁度} = (PG-C \text{ の濁度} - NG-C \text{ の濁度}) \times 0.5 + NG-C \text{ の濁度}$$

b. 目視による測定

IC_{50} ウエルを作製し、濁度を目視で比較して測定する。

B. 機器による操作方法

菌液の接種は、自動接種機により行うことができる。菌の発育状況の確認は、判読機により行うことができる。

< 測定にあたっての注意 >

- 1) 菌液の濃度と接種菌液量は結果に影響することがあるので、必ず McFarland 標準濁度液を用いて指定の濁度に合わせ、規定の液量を接種すること。
- 2) 試験に供する株は、非選択培地上に発育した集落を用い、選択培地で培養した菌株は使用しないこと。
- 3) RPMI ブイヨン 12 ‘栄研’ の代わりに、市販の RPMI 1640 培地を使用することも可能である。
- 4) 菌液は調製後 15 分以内に接種すること。

- 5) 菌液を接種したプレートは培養中に菌液の蒸発や雑菌の汚染がないように培養すること。特に最長で 72 時間培養するので、培地が乾燥しないように、湿度を十分保ったうえで培養すること。
- 6) 一度に複数検体を接種機にセットする場合は、15 分以内で接種が可能な検体数にすること。
- 7) IC_{50} ウエルの作製は、判定の直前に行うこと。長時間放置すると、濁度に変化して MIC が変動することがある。

【測定結果の判定法】

〔判定基準〕

抗真菌剤の被検菌に対する MIC は、被検菌の発育が阻止された薬剤濃度系列のうち、最小希釈濃度で表す。

〔判定時間〕

Candida 属菌種は、下記の薬剤ごとに決められた培養時間の測定結果に基づき判定する。

ミカファンギン	24 時間
カスポファンギン	24 時間
アムホテリシン B	24 又は 48 時間
フルコナゾール	24 又は 48 時間
フルシトシン	48 時間
イトラコナゾール	48 時間
ポリコナゾール	48 時間
ミコナゾール	48 時間

24 時間培養と比べ 48 時間培養時の MIC が極端に上昇するトレーリング発育株は、動物モデルを用いた試験では感性株に属することが確認されており、24 時間培養時の MIC の方が臨床効果を反映していると報告されている¹⁾。国内の評価でもこのようなトレーリング発育株については、24 時間培養時の MIC を判定結果とするのが望ましいと報告されている^{2), 3)}。したがって、フルコナゾール、フルシトシン、イトラコナゾール、ポリコナゾール及びミコナゾールについては、トレーリング発育株は 24 時間培養時の測定結果、それ以外の株は 48 時間培養時の測定結果を判定結果とする。

C. neoformans は、72 時間培養時の測定結果に基づき判定する。

〔判定例〕		薬剤希釈濃度 (µg/mL)							
薬剤希釈濃度	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	PG-C
菌の発育	—	—	+	+	+	+	+	+	+

MIC は 16 µg/mL と判定する。

＜判定上の注意＞

- 1) 判定の際、薬剤希釈系列中に不連続な発育が認められた場合は判定を保留し、再度試験を行う。再試験でも不連続な発育が再現された場合は、発育が阻止された最小希釈濃度をもって MIC とする。
- 2) 乾燥による液量不足や発育不良から PG-C の濁度が不十分なときは IC_{50} 値が実際よりも低く示され、そのためより高い薬剤濃度でも発育とみなされることがある。このような場合は、液量や発育が良好なウエルを新たな PG-C として判定する。
- 3) アムホテリシン B 以外の薬剤では、連続した薬剤希釈系列のなかで発育阻止の程度に不連続性が見られることがある。特にその発育阻止の程度が IC_{50} 付近の濁度に相当する場合、判読機による判定では高濃度で発育・低濃度で発育阻止といった結果が得られることがある。このようなときは、再度十分な攪拌を行い、目視による確認で IC_{50} を基準とし、それ未満の発育を発育阻止とする。

- 4) 本邦における臨床検体から新鮮分離された *Candida* 属菌種のうちトレーリング発育株の占める割合はおおよそ *Candida albicans* 1～3 %、*Candida tropicalis* 30～40 %、*Candida parapsilosis* 及び *Candida glabrata* で 0～0.5 % との報告があることから⁴⁾、トレーリング発育株を見逃さないために、24 時間及び 48 時間の判定を行うこと。

- *** 5) 本製品は、Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI Approved Standard, M27-A3, 2008.¹⁾ の実施基準に準じている。また判定基準を記載した CLSI 文書は随時更新される。測定結果の解釈については注意すること。

【性能】

1. 性能

- 1) 感度
自社施設において、CLSI 法での MIC が 4 倍以上差のある試験菌株 2 株を用いて試験を行うとき、得られた両試験菌株の MIC はいずれの抗真菌剤においても 4 倍以上の差を認める。
- 2) 正確性
自社施設において、CLSI 法での MIC の明らかな試験菌株を用いて試験を行うとき、得られた MIC は CLSI 法による MIC と ±1 管以内で一致する。
- 3) 同時再現性
自社施設において、上記 2) 正確性試験により 3 回繰り返し試験を行うとき、±1 管差の範囲内で同一の成績を示す。

2. 測定範囲

別表-2 に示した各抗真菌剤の希釈系列の範囲。

3. 相関性試験成績

CLSI 法での MIC との相関性を確認した結果、90～100 % の一致率が得られた⁵⁾。

4. 較正用基準物質に関する情報

本製品は、アメリカン タイプ カルチャー コレクション (ATCC) に収載されている菌株により性能を確認している。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 1) 全ての操作は微生物の取扱いに習熟した人の指導のもとに、バイオハザード対策を実施したうえで行うこと。
- 2) 検体 (被検菌) 及び培養物等は感染の危険があるものとして十分に注意して取り扱うこと。
- 3) 感染を避けるため、検査時は使い捨て手袋を着用すること。
- 4) 口によるピペティングはしないこと。
- 5) プレートを送る場合は、2～10 °C を維持すること。

2. 使用上の注意

- 1) プレートは指定の貯蔵方法で保存すること。
- 2) 使用期限を過ぎたプレートは使わないこと。
- 3) プレートの入っている袋にキズや破損、もしくは乾燥剤が入っていない等の異常があった場合は使用しないこと。
- 4) 一度開封したプレートは袋に戻し密封して、2～10 °C で保存すること。開封後はなるべく早く使用すること。
- 5) プレートは汚染しないように無菌的に取り扱うこと。

3. 廃棄上の注意

- 1) 使用後のプレートは、オートクレープ等で滅菌処理した後、廃棄すること。オートクレープを使用する場合は、蒸気を吸い込まないように注意すること。
- 2) 検体に接触した器具や廃液等は、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1,000 ppm 以上、1 時間以上浸漬）又はグルタールアルデヒド（2 %, 1 時間以上浸漬）による消毒処理、あるいはオートクレープ（121 °C、20 分間以上）による滅菌処理を行うこと。
- 3) プレートはポリスチレン（PS）、袋はアルミニウム、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリエチレン（PE）、ケースは紙を主な材質としている。
- 4) 滅菌後のプレートや器具等は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法 : 2～10 °C

有効期間 : 1 年間

*【包装単位】

製 品 名	包装単位	製品コード
酵母様真菌 DP ‘栄研’	5 枚 x 2	9DEF47

【主要文献】

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI Approved Standard, M27-A3, 2008.
- 2) 内田勝久, 他 : 医薬ジャーナル, **39** : 3301-3308, 2003.
- 3) 内田勝久, 他 : 真菌誌, **47** : 209-217, 2006.
- 4) 内田勝久, 他 : 深在性真菌症, **2** : 52, 2006.
- 5) 社内資料

パールコアは栄研化学株式会社の登録商標です。

【問い合わせ先】

栄研化学株式会社 お客様相談窓口

フリーダイヤル ☎ 0120-308-421

【製造販売業者の名称及び住所】

栄研化学株式会社

〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地

製造販売元



栄研化学株式会社

栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地

* 製品コード 9DEF47

酵母様真菌 DP ‘栄研’

別表－1「構成製品一覧」

	構成試薬名	成分名	試薬濃度
酵母様真菌 DP ‘栄研’ ミカファンギン	M C F G	ミカファンギンナトリウム	別表－2 参 照
酵母様真菌 DP ‘栄研’ カスポファンギン	C P F G	カスポファンギン酢酸塩	
酵母様真菌 DP ‘栄研’ アムホテリシン B	A M P H－B	アムホテリシン B	
酵母様真菌 DP ‘栄研’ フルシトシン	5－F C	フルシトシン	
酵母様真菌 DP ‘栄研’ フルコナゾール	F L C Z	フルコナゾール	
酵母様真菌 DP ‘栄研’ イトラコナゾール	I T C Z	イトラコナゾール	
酵母様真菌 DP ‘栄研’ ポリコナゾール	V R C Z	ポリコナゾール	
酵母様真菌 DP ‘栄研’ ミコナゾール	M C Z	硝酸ミコナゾール	

別表－2「薬剤希釈濃度配列表」

単位：μg/mL（MCFG、CPFG及びAMPH-Bは μg（力価）/mL）

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ミカファンギン	A	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
カスポファンギン	B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PG-C	
アムホテリシン B	C	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PG-C	
フルシトシン	D	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PG-C	
フルコナゾール	E	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PG-C	NG-C
イトラコナゾール	F	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PG-C	NG-C
ポリコナゾール	G	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PG-C	NG-C
ミコナゾール*	H	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PG-C	NG-C

* 硝酸ミコナゾールとしての量

PG-C：陽性コントロール

NG-C：陰性コントロール