

使用に際してはこの添付文書をよくお読みください。
また、必要なときに読めるように保管しておいてください。

PI-ACMTB-04

体外診断用医薬品

製造販売承認番号：20400AMY00232000

※2016年3月改訂（第4版）

※2014年9月改訂（第3版）

マイコバクテリウム核酸キット

アキュプローブ® 結核菌群同定

結核菌群同定用

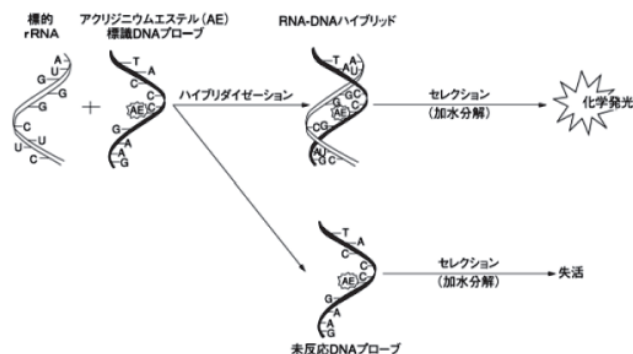


図1. HPA測定原理

※■全般的な注意

1. 本キットは、体外診断用医薬品であるため、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 添付文書に記載されている操作法を守ってください。この操作法以外の方法による検出結果の信頼性は保証いたしかねます。
3. 検体には培養した菌体を用いますので、感染の恐れがあるものとして取扱い、測定操作には使い捨て手袋や保護メガネなどを着用し、必要に応じて安全キャビネット内で操作してください。検体を手袋などに付着した場合はただちに新しいものに取りかえてください。
4. 試薬が誤って目や口に入った場合または皮膚に付着した場合は、ただちに水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
5. 人体への投与はできません。
6. 本キットでは製造販売元指定の化学発光測定装置を使用します。他の測定装置をご使用になった場合は測定結果の信頼性を保証いたしかねます。なお、これらの測定装置の使用法については、同装置の添付文書および取扱説明書をご覧ください。
7. 測定結果に基づく臨床診断は臨床症状や他の検査結果などから担当医師が総合的に判断してください。

■形状・構造等（キットの構成）

	構成試薬名	容量	20回分
1	プローブチューブ（P）（凍結乾燥品） [アクリジニウムエステル標識結核菌群DNAプローブ]	5本	4包
2	溶菌用チューブ（LT）（凍結乾燥品）	20本	1包

本キットは、別売のアキュプローブ 結核菌群同定用補充用補助試薬と合わせてご使用ください。

補充用補助試薬

	構成試薬名	容量	100回分
3	試薬1（Reagent 1）	10 mL	1瓶
4	試薬2（Reagent 2）	10 mL	1瓶
5	試薬3（Reagent 3）	60 mL	1瓶

■使用目的

ヒト体液、組織及び気管支洗浄液由来材料を抗酸菌用培地で培養した培養菌株中の結核菌群の同定

※■測定原理

本キットは、DNA-RNAハイブリダイゼーションに基づき、培養菌株中の結核菌群のリボソームRNA（rRNA）を検出する方法です。用いるDNAプローブは、化学発光物質であるアクリジニウムエステルを標識した結核菌群のrRNAに相補的な一本鎖DNAです。検体（菌体）を超音波処理により溶菌し、rRNAを遊離させます。rRNAは一本鎖であるためDNAプローブと反応し二本鎖のDNA-RNAハイブリッドを形成します。この工程をハイブリダイゼーションと呼び、ハイブリダイゼーション終了後、ハイブリッドを形成しなかった未反応のDNAプローブのアクリジニウムエステルを加水分解試薬で失活させます。一方、ハイブリッドを形成したDNAプローブの化学発光性を保持しています。ハイブリダイズしたDNAプローブの化学発光を測定し、その測定値より陽性・陰性を判定します。（図1）。この方法をHPA（Hybridization Protection Assay）法^{1,2}と言います。つまり、標的に結合しなかったDNAプローブの標識物質を選択的に加水分解し、失活させるため、洗浄などの物理的な分離操作を必要としないホモジニアスアッセイです。

なお化学発光とは、DNAプローブに標識されたアクリジニウムエステルがアルカリ条件下において過酸化水素と反応し、図2のような反応によって起こる発光現象です。本キットでは、この化学反応の際放出される光子を化学発光測定装置（リーダー50/50i）で検出します。

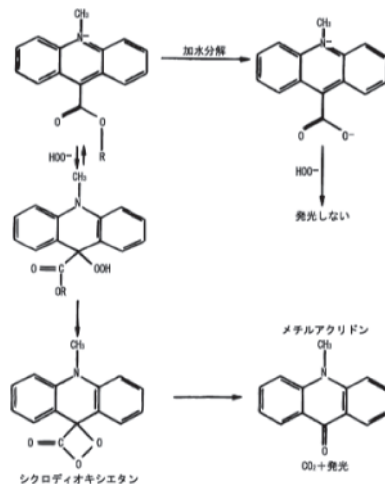


図2. 化学発光機構

※■操作上の注意

1. 測定試料の性質、採取法

- 1) 本キットの検体には必ず小川培地または液体培地で培養した新鮮な菌株をお使いください。それ以外の検体では正しい結果が得られません。
- 2) 検体は培養後、できるだけ早く測定してください。

2. 妨害物質、妨害薬剤

検体中の共存物質が測定値におよぼす影響は検討されておりませんので不明です。

3. 交差反応性

- 1) 本キットでは、*M.tuberculosis*、*M.bovis*、*M.bovis* BCG、*M.africanum* および *M.microti* をそれぞれ分離同定することはできません。また、耐性菌を判別するものではありません。
- 2) 本キットに用いられているDNAプローブの標識部位に変異の生じた亜株が出現した場合は、本キットでは検出できないこともあります。

4. 操作上の留意事項

- 1) 陰性コントロールおよび陽性コントロールは検体測定のつと同時に測定してください。
- 2) 試薬の分注などの操作は一定間隔、同一の順序にするなど、常に同一条件で行ってください。
- 3) 発光強度の測定には化学発光測定装置（リーダー50/50i）を用い、専用のリーダー用試薬をご使用ください。なお、機器およびリーダー用試薬の使用に際してはこれらに添付の取扱説明書などをご覧ください。
- 4) ハイブリダイゼーションや加水分解は温度および時間管理を十分にしてください。
- 5) プローブチューブはアルミパックに入れたまま2～8℃に保存してください。また、アルミパックを開封後、残ったプローブチューブはパックの口をテープかクリップで密閉して保存し、使用期限（外箱に記載）内のものでも開封後は2ヵ月以内に使用してください。また、アルミパック内の乾燥剤は捨てないでください。
- 6) 試薬2は沈殿が析出しやすいため、使用前に35～60℃でインキュベート後、混和して沈殿を溶解してから使用してください。

5. その他

- 1) 使用する器具は清浄なものを使用し、特に検体やコントロールの分注にはコンタミネーションを避けるためフィルター付チップを使用してください。使用したフィルター付チップはただちに破棄

- し、再利用はしないでください。
- 2) コンタミネーションの原因物質の除去には次亜塩素酸ナトリウム液が有効です。使用する器具やキャビネット内は有効塩素濃度2.5～3.5%の次亜塩素酸ナトリウム液で拭いてください。
 - 3) 超音波洗浄器、水浴の水は毎回取りかえてください。また、水を取りかえる際には、有効塩素濃度2.5～3.5%の次亜塩素酸ナトリウム液で機器本体を拭いてください。
 - 4) 測定に必要な試薬類・器具・機器の使用の際にはこれらに添付の取扱説明書などをご覧ください。

***■用法・用量（操作方法）

1. 試薬の調製法

- 1) 試薬2は35～60℃で5分間あらかじめインキュベートしてから使用してください。
- 2) その他の構成試薬は、常温に戻した後そのまま使用してください。

2. 必要な器具・器材

器具・器材等	規格等
アキュプローブ 結核菌群同定用 補充用補助試薬	別売品
白金耳	1 μL用
コントロール用培養菌株	付属品ではありません。（注意）
超音波洗浄器	
ヒートブロック	9.5 ± 5℃に設定可能：蓋付き
水浴	6.0 ± 1℃に設定可能：蓋付き
マイクロピペット	100 μL、300 μL分注用
フィルター付チップ	100 μL、300 μL分注用
化学発光測定装置	リーダー50/50 i
リーダー用試薬（リーダー用試薬 I、リーダー用試薬 II）	別売品
安全キャビネット	
フロートラック	
ミキサー	

（注意）本キットにはコントロールが付属しておりません。現在お使いの基準株をコントロールとするか、陽性コントロールには *M.tuberculosis* (e.g. American Type Culture Collection, ATCC #25177) を、陰性コントロールには *M.avium* (e.g., ATCC #25291) または *M.intracellulare* (e.g., ATCC #13950) を使用してください。

3. 測定法

- 1) 検体の調製（喀痰を検体とし、小川培地を使用するときの例）
 - （1）採取した喀痰に倍量の4%水酸化ナトリウム溶液を加え十分均等化し、ただちにその0.1 mLを3%小川培地に接種し、37℃で約2週間（1コロニー以上のコロニーが生えてくるまで）培養します³。
 - 培養後、培地に増殖したコロニーをそのまま検体とします。
 - （2）溶菌用チューブを検体数分とコントロール分用意し符号などを付け、試薬1および試薬2を各100 μLずつ分注します。
- （注意）検体として液体培地を使う場合には、試薬1を入れる必要はありません。
- （3）小川培地からコロニー1 μLを白金耳にて採取し、溶菌用チューブ内で懸濁させます。（液体培地を検体とする場合は、よく攪拌した後、100 μLをピペットにて採取します。）
- （4）溶菌用チューブにきっちりとキャップを締め、ミキサーにて攪拌します。

2) 溶菌

- （5）超音波洗浄器用ラックに溶菌用チューブを差し込み、超音波洗浄器にセットします。この際、溶菌用チューブのキャップは水面上に出るようにしてください。
- （注意）溶菌用チューブは超音波洗浄器の底部や壁面に接触しないように注意してください。
- （6）60～70℃で15分間超音波処理を行います。
- （注意）溶菌効率をよくするために、超音波洗浄器中の温水（60～70℃）は脱気をしてください。（脱気方法：温水を超音波洗浄器に入れ、15分間超音波をかけ脱気します。）超音波処理は20分間を超えないように注意してください。
- （7）溶菌用チューブを95 ± 5℃に設定したヒートブロックに移し、10分間インキュベートします。

3) ハイブリダイゼーション

- （8）プローブチューブの入ったアルミパックの上部を切り取り、プローブチューブを検体数とコントロール分取り出し溶菌用チューブと対応した符号などを付けます。
- （9）プローブチューブに超音波処理した溶菌用チューブから、上清を100 μL分取し、キャップをしてミキサーでよく攪拌します。
- （10）フロートラックの穴にプローブチューブのキャップが上面に現れる程度まで差し込んだ後、60 ± 1℃の水浴に浮かべ、15分間インキュベートします。水浴の水位はプローブチューブの約2/3以上が水面下に沈むようにしてください。
- （注意）ハイブリダイゼーション時間は20分間を超えないように注意してください。

4) 加水分解

- （11）水浴から取り出したプローブチューブのキャップをはずし、試薬3を300 μL加えた後、キャップをし、ミキサーでよく攪拌します。
- （12）フロートラックの穴にプローブチューブのキャップが上面に現れる程度まで差し込んだ後、60 ± 1℃の水浴に浮かべ、10分間インキュベートします。
- （注意）加水分解時間は11分間を超えないように注意してください。
- （13）水浴からプローブチューブを取り出し、常温で5分間放冷します。その後キャップをはずし1時間以内に化学発光測定装置で測定します。プローブチューブは測定まで常温で保存してください。

5) 検出

- （14）化学発光測定装置（リーダー50/50 i）は測定の20分前には、スイッチを入れてください。洗浄操作を終了後、リーダー50/50 i はプロトコルNo.4を入力してください。
- （15）湿らせたペーパータオルでプローブチューブの外側を拭き、化学発光測定装置の測光部に入れて測定します。なお、化学発光測定装置につきましては、装置の取扱説明書をご覧ください。
- （注意）化学発光測定装置のリーダー用試薬 I、II の量を確認しておきます。

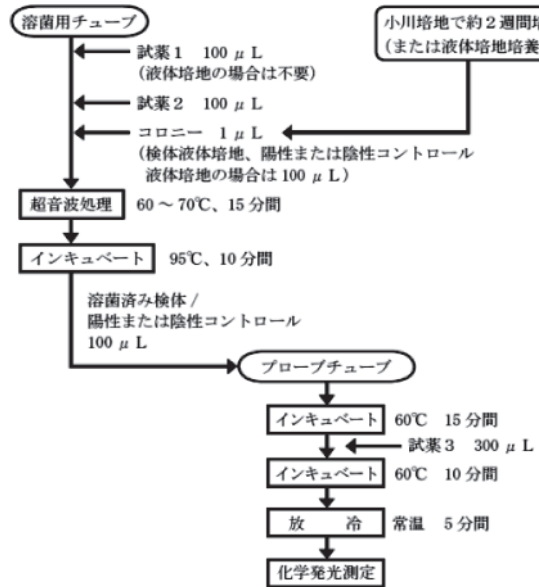


図3. 測定操作法概略図

***■測定結果の判定法

1. 判定

本キットは検体の測定値がカットオフ値以上の値を示した場合を陽性と判定します。カットオフ値未満の測定値は陰性と判定しますが、各化学発光測定装置にて下記の範囲を示す値となった場合には再検査をしてください。

	リーダー50/50 i
カットオフ値	30,000 RLU
再検査範囲	20,000～29,999 RLU

RLU : Relative Light Unit

「当社データによります」

2. 判定上の注意

- 1) 測定結果は同時に測定した陽性コントロールおよび陰性コントロールの結果が、以下の範囲をはずれた場合には判定できませんので、再度測定を行ってください。
 - （1）陰性コントロール値（陰性コントロールとして *M.avium* ATCC #25291 を使用した場合）がリーダー50/50 i で測定した場合5,000 RLUを超えた場合は、原因としてヒートブロックまたは水浴の温度の不備、試薬3の分注量および分注後の攪拌不足またはコントロール株のコンタミネーションが考えられます。
- （注意）陰性コントロール； *M.avium* の McFarland No. 1（約 $3 \sim 6 \times 10^8$ CFU/mLの菌数に相当）の菌液100 μLから溶菌・抽出した rRNA と同等量の rRNA 液。
- （2）陽性コントロール値（陽性コントロールとして *M.tuberculosis* ATCC #25177 を使用した場合）がリーダー50/50 i で測定した場合100,000 RLUを下回った場合は、原因として採取する検体（菌体量）の不足、不適当な超音波処理、攪拌不足、古い菌株などの使用が考えられます。
- （注意）陽性コントロール； *M.tuberculosis* の McFarland No. 1（約 6×10^7 CFU/mLの菌数に相当）の菌液100 μLから溶菌・抽出した rRNA と同等量の rRNA 液。

- 2) 感染があっても感染の時期、検体採取部位、検体採取方法および培養条件などによっては検査結果が陰性の場合があります。本キットにおいて陽性と判定された検体は、結核菌の感染を強く疑わせるものですが、測定結果に基づく臨床診断は臨床症状や他の検査結果などから担当医師が総合的に判断して行ってください。

■臨床的意義

日本における結核患者数は、抗結核薬の普及により戦後著明に減少してきました。しかし、この10年間の減少率は鈍化傾向にあり、既往感染者の高齢化に伴う再発などの要因により、年間約5万人の新規患者が登録されています⁴。

結核症の診断は喀痰などの臨床検体から結核菌を証明することで、一般的には培養による分離・同定検査が行われています。しかし、この検査には約4～8週間を要し、迅速な結核菌の検出・同定検査の出現が望まれていました⁴。

本キットは約2週間目の抗酸菌分離培養株（1コロニー）を検体として、結核菌群の同定を短時間で可能とするものです。すなわち、結核菌群 rRNA を標的として、それに相補的な DNA プローブとハイブリダイズさせ、未反応の DNA プローブを加水分解で失活させた後に、ハイブリダイズした DNA プローブの化学発光を測定し、その測定値より陽性・陰性を判定します。この方法を HPA 法^{1, 2} と言いますが、この方法により約1時間で結核菌群の同定が可能となりました⁵⁻⁷。

■性能

1. 性能

1) 感度

- (1) 陰性コントロールを試料として測定するとき、RLU 値は 5,000 以下を示します。

(注意) [測定結果の判定法] 2. 判定上の注意を参照。

- (2) 陽性コントロールを試薬 2 で 3 倍に希釈して調製した 3 倍希釈陽性コントロールを試料として測定するとき、RLU 値は 100,000 以上を示します。

(注意) [測定結果の判定法] 2. 判定上の注意を参照。

2) 正確性

- 陽性コントロールを試料として 3 回同時に測定するとき、RLU の平均値は $470,000 \pm 70,000$ の範囲を示します。

3) 同時再現性

- 陽性コントロールおよび陰性コントロールを試料として 3 回同時に測定するとき、RLU の変動係数 (CV 値) は、10% 以下を示します。

4) 測定可能最少菌数⁷

- 本キットの測定可能最少菌数は約 106 CFU です。

2. 相関性試験成績^{6, 7}

生化学的同定法との相関性は下表のとおりです。

生化学的同定法と本キットの一致率

		生化学的同定法		
		陽性	陰性	合計
本キット	陽性	73	0	73
	陰性	0	91	91
	計	73	91	164

感度 1.000

特異度 1.000

一致率 1.000

*** ■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) 検体には、ヒト体液、組織または気管支洗浄液由来材料を抗酸菌用培地で培養した培養菌株を用いますので、抗酸菌などに感染の恐れがあるものとして取り扱ってください。使い捨て手袋や保護メガネなどを着用し操作してください。検体が手袋などに付着した場合はただちに新しいものに取りかえてください。
- 2) 結核菌は国立感染症研究所病原体等安全管理規程による病原体の危険度分類 BSL3 の病原体なので、取扱うときは通常の微生物学実験室を実験区域と限定した上で生物学的安全キャビネットの中で用いてください。
- 3) 検体および試薬を分注する際にビペットは口で吸わないでください。また、検体および試薬を取扱う際には使い捨て手袋、防護メガネ白衣などを着用してください。
- 4) 試薬が誤って目や口に入った場合または皮膚に付着した場合は、ただちに水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。

2. 使用上の注意

- 1) 冷蔵庫から取り出したキットは常温に戻してから使用してください。
- 2) 本キットは、必ず 2～8℃ で保存し、凍結はしないでください。
- 3) 使用期限（外箱に記載）が過ぎたキットは使用しないでください。
- 4) 本キットは異なる製造番号（外箱に記載）のキットと組み合わせで使用したり、残った試薬を混合して使用しないでください。
- 5) 本キットは抗酸菌分離培養からの結核菌群の同定のみに使用してください。
- 6) 本キットは検体からの直接検出には使用できません。

3. 廃棄上の注意

- 1) 検体の残り、検体が含まれている反応液、検体が付着しているビペットチップなどは、121℃、20分間のオートクレーブによる滅菌または 2.5～3.5% 次亜塩素酸ナトリウム液による処理など、廃棄物の処理および清掃に関する法律に基づく感染性廃棄物処理マニュアルに従って処理した後廃棄してください。
- 2) リーダー用試薬 II は 1 mol/L の水酸化ナトリウム溶液です。廃棄する場合は施設の排水基準に従って廃棄してください。
- 3) 試薬 I には、防腐剤としてアジ化ナトリウムが含まれていますので、廃棄する場合には多量の水で流してください。アジ化ナトリウムを含む液を長時間にわたって廃棄しますと、排水管が金属の場合爆発性の金属アジドを生成することがあります。
- 4) 試薬を廃棄する場合は、多量の水で流してください。
- 5) 本キットでは培養した多量の菌体を試料としますので、試料による検査室の汚染を防ぐための処理が必要です。発光強度測定終了後の反応液を含む試験管に、有効塩素濃度 2.5～3.5% の次亜塩素酸ナトリウム液を満たし、15分間以上処理してから廃棄してください。また、反応液に触れた試験管などの器具類も同様に有効塩素濃度 2.5～3.5% 次亜塩素酸ナトリウム液に 15分間以上浸した後廃棄してください。
- 6) プラスチックおよびガラスの試薬容器は廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

■貯蔵方法、有効期間

1. 貯蔵方法：冷所保存（2～8℃）
2. 有効期間：12ヵ月

■包装単位

1 キット 20 回分
別売 補充用補助試薬

■主要文献

- 1 岡田 淳：日本臨床，50，310-314，1992.
- 2 松岡幸雄：日本臨床，50，56-60，1992.
- 3 阿部千代治：抗酸菌の検査，JATA BOOKS，18-28，1993.
- 4 後藤美江子ら：臨床と微生物，22（6），11-20，1995.
- 5 阿部千代治ら：臨床と微生物，18（4），557-561，1991.
- 6 島田 肇ら：感染症学雑誌，66（1），81-86，1992.
- 7 長沢光章ら：臨床検査，36（2），197-200，1992.

■問い合わせ先

極東製薬工業株式会社 営業学術部
〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町7-8
電話 03 (5645) 5664
FAX 03 (5645) 5703

*** ■製造販売業者の氏名又は名称及び住所

製造販売元
ホロジックジャパン株式会社
東京都文京区後楽1-4-25日教販ビル

発売元

 極東製薬工業株式会社
東京都中央区日本橋小舟町7-8