

真菌検出システム（qPCR 法）技術白書

1. 製品紹介

真菌 qPCR 検出キットは、『中国薬典』に記載されているカンジダ・アルビカンス（CMCC(F)98 001）およびアスペルギルス・ナイガー（CMCC(F)98 003）を検出でき、検出限界は 100 CFU/mL に達します。また、アスペルギルス・フィガイト、カンジダ、ブラジル・アスペルギルス、ペニシリウム、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・クロセイ、ムコール・ポリモルファス、環状ムコールなど、500 種類近くの一般的な真菌の検出が可能です。

キットに含まれるプライマープローブは、細菌やマイコプラズマ、ヒトを含む哺乳動物のゲノムと交差反応を起こさないため、非常に高い特異性を持っています。さらに、『中国薬典』（ChP 9201）、『欧州薬典』（EP 5.1.6）、『米国薬典』（USP 1223）を参照し、特異性、検出限界、再現性、耐久性などの面で検証を行いました。

本キットは、FAM と HEX の 2 種類の蛍光プローブを使用し、それぞれ真菌の標的配列と内部参照対照を検出します。FAM チャンネルは真菌特異的な増幅を検出し、HEX チャンネルは内部参照の増幅を検出します。内部参照対照は、PCR 反応の段階で加えることができ、サンプル中に PCR 抑制要素が含まれている場合に偽陰性を防ぐ役割を果たします。また、サンプル抽出の段階で加えることで、抽出の効果を評価し、抽出が不適切な場合の偽陰性も防ぐことができます。

2. 性能検証

2.1 特異性

2.1.1 異なるサンプルが陰性検査に与える影響の検証

内部対照プラスミドと異なる培地を友康磁気ビーズ抽出キットで抽出した後、真菌 qPCR システムで検査を行った結果、内部参照 HEX チャンネルの検出値は Ct29～31 で変動し、陽性 FAM チャンネルは陽性対照以外のすべてのサンプルで検出されませんでした。サンプルには分子実験用の DEPC 処理水（以下、DEPC 水）、NK 細胞無血清培地 5.0（商品番号：NC0102、以下 NK5.0）、GMP 級間葉系幹細胞無血清培地（商品番号：NC0106、以下幹細胞 GMP）、および間葉系幹細胞無血清培地ベース（商品番号：NC0103、以下幹細胞培地）を使用しました。

内部参照+異なるサンプルを共同抽出した後の検出 結果（増幅 Ct 値）		
異なるサンプ ル	内部参照	真菌
幹細胞 GMP	29. 24	NoCt
	29. 23	NoCt
幹細胞培地	31. 33	NoCt
	31. 1	NoCt
DEPC 水	30. 22	NoCt
陽性対照	29. 58	35. 67
NTC1	NoCt	NoCt
NTC2	NoCt	NoCt

2. 1. 2 異なるサンプルマトリックスが陽性検査に与える影響の検証

陰性培地に 1000 CFU/mL のカンジダ・アルビカンズを加え、100 CFU/mL に希釈しました。
また、より高濃度のカンジダ・スライシスを 10 倍および 100 倍に希釈し、友康磁気ビー
ズで抽出して検査を行いました。対照として、DEPC 水での希釈も行いました。

異なるサンプルマトリックスが陽性検査に与える影響検証結果 (真菌チャネル増幅 Ct 値を検査)				
異なる培地の検証	100 CFU/mL カンジダ・ア ルビカンズ	Candida glabrata (希釈 10 倍)	Candida glabrata (希釈 100 倍)	内参照対 照
幹細胞培地	32. 4			31. 13
幹細胞 GMP	32. 65			29. 25
NK5. 0		23. 64	25. 68	28. 84
DEPC 水	32. 42	21. 22	24. 58	30. 23
NTC	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt

2. 1. 3 陰性検査に対する細菌やヒト由来細胞等の影響

本検出系は、検出テンプレートに一定量の細菌や細胞抽出物が存在していても検出されず、非常に高い特異性を持っています。

細菌とヒト由来細胞による検出系への干渉（真菌チャネル増幅 Ct 値の検出）					
細菌の状態を検出する				哺乳動物細胞の状態を検出する	
検証株 (10 ³ CFU/mL)	結果	検証株 (10 ⁶ CFU/mL)	結果	検証細胞 (10 ⁶ セル)	結果
黄色ブドウ球菌	NoCt	クロストリジウム アセトブタノール菌	NoCt	293 細胞	NoCt
緑膿菌	NoCt	肺炎連鎖球菌	NoCt		
サブティリス菌	NoCt	ラクトバシルス アシドフィラ	NoCt		
スポリウム菌	NoCt	マイコプラズマ 肺炎	NoCt		
大腸菌	NoCt				
陽性対照	30.84				
NTC1	NoCt	NTC2	NoCt	NTC3	NoCt

2.1.4 細菌やヒト由来細胞等が陽性検査に与える影響

特定の細菌や細胞が存在する場合、システムは検出限界付近の濃度や比較的に高い濃度の真菌の検出状況、および内部参照対照の検出状況を検証しました。DEPC 水の添加を対照とし、緑膿菌、大腸菌、293 細胞の添加は、100 CFU/mL のアスペルギルス・ナイガーやカンジダ・アルビカンスの検出に影響を与えませんでした。

菌試料への菌株または細胞添加による菌検出妨害検証結果 (菌チャネル増幅 Ct 値検出)					
100CFU/mL アスペルギルス・ナイガー		100CFU/mL カンジダ・アルビカンス		100CFU/mL カンジダ・アルビカンス	
検証株 (10 ³ CFU/mL)	結果	検証株 (10 ⁵ CFU/mL)	結果	検証細胞 (10 ⁶ セル)	結果
緑膿菌	32.30	緑膿菌	32.76	293 細胞	33.44

大腸菌	32.86	大腸菌	33.49	DEPC 水	33.41
DEPC 水	32.41	DEPC 水	32.76	NTC	NoCt
NTC1	NoCt	NTC2	NoCt	NTC3	NoCt

菌試料に菌株または細胞を添加した菌検出に対する干渉検証結果 (内部参照チャンネル増幅 Ct 値)					
100CFU/mL アスペルギルス・ナイガー		100CFU/mL カンジダ・アルビカンス		100CFU/mL カンジダ・アルビカンス	
検証株 (10 ³ CFU/mL)	結果	検証株 (10 ⁵ CFU/mL)	結果	検証細胞 (10 ⁶ セル)	結果
緑膿菌	28.76	緑膿菌	29.10	293 細胞	29.72
大腸菌	28.79	大腸菌	29.21	DEPC 水	29.14
DEPC 水	30.20	DEPC 水	28.85	NTC	NoCt

さらに検証を行い、10⁶cells/mL の幹細胞、293 細胞、NK 細胞を添加しても、*Aspergillus niger* や異なる濃度の *Candida glabrata* の検出には影響がありませんでした。これらの細胞の添加は、2 種類の真菌の検出に影響を与えませんでした。

真菌サンプルへの細胞添加による真菌検出干渉検証結果 (真菌チャンネル増幅 Ct 値検出)			
細胞培養物 (10 ⁶ セル/mL)	100 CFU/mL アスペルギルス・	<i>Candida glabrata</i> (希 釈 10 倍)	<i>Candida glabrata</i> (希釈 100 倍)
幹細胞	33.16	21.35	
293 細胞	32.16	21.68	
NK 細胞		22.25	25.43
DEPC 水	32.42	21.22	24.58
NTC	NoCt	NoCt	NoCt

2.2 検出限界

2.2.1 中国薬典無菌検証用真菌検査

薬局方の要求に従い、それぞれ 10 CFU/mL および 50 CFU/mL の濃度でカンジダ・アルビカンスとアスペルギルス・ナイガーを調製しました。異なるロットの友康磁気ビーズ抽

出キットを使用して抽出し、異なるロットの真菌 qPCR システムで検査を行ったところ、いずれのロットでも 2 種類の濃度の真菌を安定して検出できました。両真菌の検出限界は 50 CFU/mL でした。検証データは以下の通りです。

検出限界検証結果（真菌チャネル増幅 Ct 値検出）									
検証真菌	穴 1	穴 2	穴 3	穴 4	穴 5	穴 6	穴 7	穴 8	NTC
50 CFU/mL カンジダ・ アルビカンス	33.4 1	34.6 2	34.2 4	34.9 7	33.7 2	34.2 2	33.8 9	33.7 8	NoCt
50 CFU/mL アスペルギ ルス・	33.6 4	33.6 5	33.2 2	34.0 8	34.0 1	34.1 0	34.4 2	33.6 1	NoCt

検出限界検証結果（真菌チャネル増幅 Ct 値検出）								
検証真菌	穴 2	穴 3	穴 4	穴 5	穴 6	穴 7	穴 8	NTC
10 CFU/mL カンジダ・ アルビカンス	34.4 1	34.8 9	34.2 2	34.9 1	35.3 9	36.6 0	NoCt	NoCt
10 CFU/mL アスペルギ ルス・	35.4 5	35.5 3	NoCt	NoCt	35.3 5	38.7 4	36.4 1	NoCt

2.3 再現性

3 回にわたり、異なる時間に異なる担当者がそれぞれシステムを設定し、相応の濃度の真菌を検出した結果、50 CFU/mL のカンジダ・アルビカンスおよびアスペルギルス・ナイガーを安定して検出できました。検証結果は以下の通りです。

真菌を検出する	濃度	検出孔数	テストロット	チェックアウト状況
カンジダ・アルビカンス	100 CFU/mL	8 穴	1	8/8 ポジティブ
カンジダ・アルビカンス	100 CFU/mL	8 穴	2	8/8 ポジティブ
カンジダ・ア	100 CFU/mL	8 穴	3	8/8 ポジティブ

ルビカンス				
アスペルギルス・	100 CFU/mL	8 穴	1	8/8 ポジティブ
アスペルギルス・	100 CFU/mL	8 穴	2	8/8 ポジティブ
アスペルギルス・	100 CFU/mL	8 穴	3	8/8 ポジティブ

真菌を検出する	濃度	検出孔数	テストロット	チェックアウト状況
カンジダ・アルビカンス	50 CFU/mL	8 穴	1	8/8 ポジティブ
カンジダ・アルビカンス	50 CFU/mL	8 穴	2	8/8 ポジティブ
カンジダ・アルビカンス	50 CFU/mL	8 穴	3	8/8 ポジティブ
アスペルギルス・	50 CFU/mL	8 穴	1	8/8 ポジティブ
アスペルギルス・	50 CFU/mL	8 穴	2	8/8 ポジティブ
アスペルギルス・	50 CFU/mL	8 穴	3	8/8 ポジティブ

真菌を検出する	濃度	検出孔数	テストロット	チェックアウト状況
カンジダ・アルビカンス	10 CFU/mL	8 穴	1	6/8 陽性
アスペルギルス・	10 CFU/mL	8 穴	1	6/8 陽性

2.4 耐久性

2.4.1 システムが反応温度に耐えられる範囲

反応温度を変えると、検出される Ct 値に若干の影響が見られます。現在の検証は反応温度 60℃に基づいて行われていますが、温度を下げると非特異的な増幅が起こるリスクが高まる可能性があります。

真菌チャンネル増幅 Ct 値の検出					
FAM チャンネル	58℃	59℃	60℃	62℃	63℃
アスペルギルス・ナイガー 100CFU/mL	32.53	31.00	31.98	32.87	33.04
	32.54	32.76	32.43	32.36	33.07
NTC	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt

内部参照チャンネル増幅 Ct 値					
HEX チャンネル	58℃	59℃	60℃	62℃	63℃
内部参照	28.57	28.11	27.70	28.54	28.07
	28.32	28.52	28.16	28.24	28.27
NTC	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt

2.4.2 異なる蛍光定量 PCR 装置が検出に与える影響

本検出システムは、一般的な FAM および HEX 蛍光チャンネルを使用しており、市販のほとんどの蛍光定量 PCR 装置に適合します。上海宏石医療科技有限公司の SLAN-96P および SLAN-48P 全自動医療用 PCR 分析システム、そして西安天隆科技有限公司の Gentier 96R 全自動医療用 PCR 分析システムで検証が行われました。これら 2 つのメーカーの 3 種類の機器での検査結果は一致しています。

検出機器-マクロ石 (増幅 Ct 値)		
検証株 (100CFU/mL)	真菌	内部参照
カンジダ・アルビカンス	32.76	28.85
	33.41	29.14
アスペルギルス・	32.41	30.20
	33.00	31.21
NTC1	NoCt	NoCt

NTC2	NoCt	NoCt
------	------	------

検出装置-天隆(増幅 Ct 値)		
検証株 (100CFU/mL)	真菌	内部参照
カンジダ・アルビカンス	33.395	28.363
	33.543	28.613
アスペルギルス・	31.980	27.699
	32.434	28.160
NTC1	NoCt	NoCt
NTC2	NoCt	NoCt