

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4438182号
(P4438182)

(45) 発行日 平成22年3月24日 (2010. 3. 24)

(24) 登録日 平成22年1月15日 (2010. 1. 15)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 M 1/34 (2006. 01) C 1 2 M 1/34 A
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01) C 1 2 Q 1/04

請求項の数 1 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2000-143032 (P2000-143032)	(73) 特許権者	000226862
(22) 出願日	平成12年5月16日 (2000. 5. 16)		日水製薬株式会社
(65) 公開番号	特開2001-321156 (P2001-321156A)		東京都台東区上野三丁目2 3 番9号
(43) 公開日	平成13年11月20日 (2001. 11. 20)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成19年1月19日 (2007. 1. 19)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100101317
			弁理士 的場 ひろみ
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤感受性試験用プレート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗菌性薬剤、呈色試薬、並びにポリビニルアルコール及びショ糖を組み合わせた安定化剤を含有する混合液を、マイクロプレートに分注し、減圧乾燥法により固相化することを特徴とする薬剤感受性試験用プレートの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、保存安定性に優れた薬剤感受性試験用プレートに関する。

【0002】

【従来の技術】

細菌の薬剤感受性試験方法として、酸化還元指示薬と電子供与体を用いる方法が知られている（特開平1-187097号、特公平3-39669号）。しかして、いずれの方法も生成するホルマザン量による色調変化を測定するものであるが、当該ホルマザンが難水溶性であるため、測定機器での吸光度測定が困難であり、菌体からホルマザンを抽出する操作が必要となり、繁雑で、自動機器への適用も困難であった。また、細菌種によっては酸化還元指示薬又は電子供与体自体が発育阻害を及ぼし、正確な薬剤感受性試験結果が得られないことも多かった。

【0003】

また、薬剤及び呈色試薬が減圧乾燥法により固相化された薬剤感受性試験用マイクロプレ

ート（特開平11-287796号）が提案されている。しかし、このマイクロプレート上に薬剤と呈色試薬を固相化させる際には、薬剤の固相化と呈色試薬の固相化の2回の減圧乾燥が必要であり、熱に不安定な薬剤への適用は困難である。また、保存安定性の点でも十分満足できるものではなく、低温で保存する必要があった。

【0004】

従って、本発明の目的は、保存安定性に優れた薬剤感受性試験用プレートを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、抗菌性薬剤及び呈色試薬を固相化させる際に、特定の安定化剤を用いれば、抗菌性薬剤、呈色試薬及び安定化剤を含む混合液を一度に分注、減圧乾燥させる簡易な方法で、保存安定性に優れた薬剤感受性試験用プレートが得られることを見出し、本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は、抗菌性薬剤、呈色試薬、並びにポリビニルアルコール、ショ糖及び乳糖から選ばれる1種又は2種以上の安定化剤を、マイクロプレートに減圧乾燥法により固相化した薬剤感受性試験用プレートを提供するものである。

また、本発明は、抗菌性薬剤、呈色試薬、並びにポリビニルアルコール、ショ糖及び乳糖から選ばれる1種又は2種以上の安定化剤を含有する混合液を、マイクロプレートに分注し、減圧乾燥法により固相化することを特徴とする薬剤感受性試験用プレートの製造方法を提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明で用いられる抗菌性薬剤としては、日本抗生物質医薬品基準解説等に記載されている抗生物質、抗菌薬等で、例えばアンピシリン、アモキシシリン、アスポキシシリン、クロキサシリン、オキサシリン、ベンジルペニシリン、ピペラシリン、スルベニシリン、スルタミシリン等のペニシリン系薬剤；セフトジジム、セフォジジム、セファロリジン、セフォセリス、セフォゾプラン、セファロチン、セファゾリン、セフェピム、セフスロジン、セファマンドール、セフメノキシム、セフピロム、セフォペラゾン、セフォチアム、セフトリアキソン、セフォタキシム、セフチゾキシム等のセフェム系薬剤；セファキシチン、セフメタゾール、セフォテタン等のセファマイシン系薬剤；セファクロル、セフィキシム、セフカペン ピボキシル、セフポドキシム プロキセチル、セフテラム ピボキシル、セフジニル、セフジトレン ピボキシル、セフチブテン、セフロキサジン等の経口セフェム系薬剤；フロモキセフ、ラタモキセフ等のオキサセフェム系薬剤；ファロペネム等のペネム系薬剤；イミペネム、メロペネム、パニペネム等のカルバペネム系薬剤；アズトレオナム等のモノバクタム系薬剤；アンピシリン、アモキシシリン、セフォペラゾンナトリウム等とクラブラン酸又はスルバクタム等のβラクタマーゼ阻害剤との合剤；アルベカシン、アミカシン、ジベカシン、ゲンタマイシン、イセパマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、ミクロノマイシン、シソマイシン等のアミノグリコシド系薬剤；クラリスロマイシン、エリスロマイシン、ジョサマイシン、ロキスロマイシン、ロキタマイシン等のマクロライド系薬剤；クリンダマイシン等のリンコマイシン系薬剤；ミノサイクリン等のテトラサイクリン系薬剤；クロラムフェニコール等のクロラムフェニコール系薬剤；バンコマイシン、テイコプラニン等のポリペプチド系薬剤；シプロフロキサシン、レボフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トスフロキサシン、スパフロキサシン、ロメフロキサシン、フレロキサシン等のキノロン系薬剤；その他ホスホマイシン、スルファメソキサゾールとトリメトプリムとの合剤などが挙げられる。

これらの抗菌性薬剤は、各々に応じた適切な濃度で用いることができる。

【0008】

呈色試薬としては、酸化還元指示薬と電子供与体が用いられる。酸化還元指示薬としては、還元されることによって呈色するテトラゾリウム塩で、生成するホルマザンが水溶性

10

20

30

40

50

のものが好ましく、例えば2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム・ナトリウム塩(同仁化学研究所社製、WST-1)等を好適に使用することができる。これらのテトラゾリウム塩は、使用終濃度が0.05~0.5mM、特に0.1~0.3mMとなるように用いるのが好ましい。

また、電子供与体としては、例えば1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェート(同仁化学研究所社製、1-methoxy PMS)等を使用することができる。これらは、使用終濃度が0.001~0.02mM、特に0.002~0.005mMとなるように用いるのが好ましい。

【0009】

本発明で用いる安定化剤は、ポリビニルアルコール、ショ糖及び乳糖から選ばれる1種又は2種以上である。ポリビニルアルコールとしては、種々の重合度及びけん化度のものを用いることができるが、特に重合度400~600、完全けん化型(96+mol%)のものが、取扱い上好ましい。安定化剤は、使用終濃度が、ポリビニルアルコールは、0.01~0.5重量%、特に0.025~0.1重量%であるのが好ましく、ショ糖及び乳糖は、それぞれ0.001~0.5重量%、特に0.05~0.1重量%であるのが好ましい。

安定化剤としては、特にポリビニルアルコールとショ糖又は乳糖とを組み合わせて用いるのが好ましい。

【0010】

抗菌性薬剤、呈色試薬及び安定化剤をマイクロプレートに固相化するには、まず抗菌性薬剤を精製水等の適当な溶媒に溶解し、各薬剤に応じた適切な濃度範囲の2倍希釈系列を作成する。一方、呈色試薬と安定化剤を精製水に溶解し、これと前記薬剤溶液を混合・攪拌する。この混合液をマイクロプレートに一定量分注し、減圧下、4~20時間乾燥して固相化することにより、薬剤感受性試験用プレートを得ることができる。

【0011】

本発明の薬剤感受性試験用プレートを用いて試験を行なうには、プレートの各ウェルに、予め培養した被検菌液を加え、35~37℃で16~24時間培養し、その400~450nmにおける発色を測定すれば良い。

生育している菌は、その生体内の脱水素酵素により乳酸をはじめとする有機酸を還元する。このとき、テトラゾリウム塩を共存させると水溶性の黄色のホルマザンを生じ、さらに電子供与体が存在すると、発色が促進される。抗菌性薬剤等で菌が発育阻害又は殺菌を受けた場合には、このような発色は起こらないため、細菌の薬剤感受性を試験することができる。

【0012】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0013】

実施例1

オフロキサシン(OF LX)は、National Committee for Clinical Laboratory Standard(NCCLS)M100-S10(For use with M7-A5)に記載された方法で、またポリビニルアルコール(PVA)、ショ糖、乳糖及び呈色試薬(WST-1及び1-methoxy PMS)は各々精製水に任意の濃度で溶解し、測定時(100µLの菌液で再構築したとき)の濃度が表1に示すようになるよう混合した。この混合液をマイクロプレート上に25µLずつ分注し、-400mmHgの減圧下で18時間乾燥して固相化し、薬剤感受性試験用プレートを得た。得られたプレートを直ちに、1枚当たり5gのシリカゲルとともにアルミラミネート袋に封印し、4℃又は37℃で4週間保存した。その後、これらのプレートについて、NCCLS document M7-A5に記載された方法で、OF LXの精度管理株 Staphylococcus aureus ATCC 29213(精度管理域;0.125~1µg/mL)を接種し、37℃で24時間

10

20

30

40

50

培養し、MICを判定した。MIC値2は規格外であり、測定は2重測定を行なった。結果を表2～表5に示す。

なお、MICの判定は、以下に示す60%発育阻止濃度（IC₆₀）を用い、IC₆₀の吸光度に相当するかそれ以下の値を示すウエルの薬剤濃度をMICとして、判定した。

【0014】

（数1）

IC₆₀ = (陽性コントロール - 陰性コントロール) × 0.4 + 陰性コントロール

陽性コントロール；24時間培養後の薬剤無添加ウエルの吸光度（波長440nm）

陰性コントロール；24時間培養後の菌未接種ウエルの吸光度（波長440nm）

【0015】

【表1】

PVA (重量%)	0	0.05	0	0.05	0.05	0.01	0.01
ショ糖又は乳糖 (重量%)	0	0	0.1	0.1	0.01	0.01	0.1
呈色試薬	0.25mM WST-1, 2μM 1-methoxy PMS						
OFLX	0.125~2μg/mL 及び0 (陽性コントロール)						

【0016】

【表2】

PVA (重量%)	0	0.05	0	0.05	0.05	0.01	0.01
ショ糖 (重量%)	0	0	0.1	0.1	0.01	0.01	0.1
呈色試薬	+	+	+	+	+	+	+
4℃、4週間	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
37℃、4週間	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1

【0017】

【表3】

PVA (重量%)	0	0.05	0	0.05	0.05	0.01	0.01
乳糖 (重量%)	0	0	0.1	0.1	0.01	0.01	0.1
呈色試薬	+	+	+	+	+	+	+
4℃、4週間	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
37℃、4週間	2 2	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1

【0018】

表2～表3の結果から明らかなように、安定化剤を用いた場合にはいずれも、4℃及び37℃での保存安定性に優れていた。これに対し、安定化剤を用いない場合には、特に37℃における安定性が悪く、薬剤の力価低下が認められた。

【0019】

実施例2

抗菌性薬剤としてベンジルペニシリン（PCG）又はアミノベンジルペニシリン（ABPC）を、安定化剤としてPVA及び／又はショ糖を用い、実施例1と同様にして、薬剤感受性試験用プレートを製造した。得られたプレートについて、実施例1と同様にして、M

10

20

30

40

50

I Cを判定した。結果を表4～表5に示す。

なお、P C Gの精度管理域は0.25～2 μg/mLで、M I C値4は規格外であり、A B P Cの精度管理域は0.5～2 μg/mLで、M I C値4は規格外である。

【0020】

【表4】

(P C G)

PVA (重量%)	0	0.05	0	0.05	0.05	0.01	0.01
ショ糖 (重量%)	0	0	0.1	0.1	0.01	0.01	0.1
呈色試薬	+	+	+	+	+	+	+
4℃、4週間	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2
37℃、4週間	4 4	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2

10

【0021】

【表5】

(A B P C)

PVA (重量%)	0	0.05	0	0.05	0.05	0.01	0.01
ショ糖 (重量%)	0	0	0.1	0.1	0.01	0.01	0.1
呈色試薬	+	+	+	+	+	+	+
4℃、4週間	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2
37℃、4週間	4 4	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2	2 2

20

【0022】

表4～表5の結果から明らかなように、安定化剤を用いた場合にはいずれも、4℃及び37℃での保存安定性に優れていた。これに対し、安定化剤を用いない場合には、特に37℃における安定性が悪く、薬剤の力価低下が認められた。

【0023】

【発明の効果】

本発明の薬剤感受性試験用プレートは、保存安定性に優れ、保存後も薬剤の力価が低下することがない。

また、抗菌性薬剤、呈色試薬及び安定化剤の混合液をマイクロプレートに分注し、1回の減圧乾燥により得られるため、簡便であるとともに、熱に不安定で加水分解を受け易い薬剤についても適用が可能である。

30

フロントページの続き

- (72)発明者 西山 直樹
茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社内
- (72)発明者 伊藤 俊輔
茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社内
- (72)発明者 岩脇 研次
茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社内
- (72)発明者 下郷 晶子
茨城県結城市北南茂呂1075-2 日水製薬株式会社内

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 特開平11-287796 (JP, A)
特開昭64-002568 (JP, A)
特開平07-206713 (JP, A)
特開平03-193735 (JP, A)
特開平09-127097 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/34
C12Q 1/04
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)