

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2002/101037

発行日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(43) 国際公開日 平成14年12月19日(2002.12.19)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/06	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/06
C 1 2 Q 1/06	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 Q 1/68	G O 1 N 33/15 Z
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 111 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-503787 (P2003-503787)	(71) 出願人	000238201 扶桑薬品工業株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/005106		大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(22) 国際出願日	平成14年5月27日(2002.5.27)	(74) 代理人	100065868 弁理士 角田 嘉宏
(31) 優先権主張番号	特願2001-165954 (P2001-165954)	(74) 代理人	100106242 弁理士 古川 安航
(32) 優先日	平成13年5月31日(2001.5.31)	(72) 発明者	大野 典也 東京都世田谷区深沢2丁目5-15
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	松久 明生 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目7-506
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, C H, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, P L, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(72) 発明者	芥子 宏行 大阪府大阪市住吉区殿辻1丁目2-25 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食細胞機能の評価方法およびその利用

## (57) 【要約】

食細胞と外来微生物とを *in vitro* において接触させた後に、当該細胞を単離することによって調製した、外来微生物貧食済み食細胞とその製造方法、これらを利用した方法、およびキットが開示されている。食細胞の貧食機能を *in vitro* において評価できる実験的モデルを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

食細胞と外来微生物を *in vitro* において接触させた後、当該細胞を単離することによって調製された、外来微生物貪食済み食細胞。

## 【請求項 2】

前記食細胞と外来微生物とを *in vitro* において接触させる際に使用される外来微生物の菌液濁度 (O.D. = 600nm) が、0.01 ~ 0.03 である請求の範囲第 1 項に記載の外来微生物貪食済み食細胞。

## 【請求項 3】

前記外来微生物貪食済み食細胞の密度が、 $1 \times 10^4$  個 /  $\mu\text{l}$  ~  $5 \times 10^4$  個 /  $\mu\text{l}$  である請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載の外来微生物貪食済み食細胞。

10

## 【請求項 4】

前記外来微生物が、グラム陰性菌である請求の範囲第 1 項乃至第 3 項のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞。

## 【請求項 5】

前記外来微生物が、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミデス、エンテロコッカス・ファエカリス、シュードモナス・アエルギノーサ、エシェリヒア・コリおよびカンジダ・アルビカンスならびにそれらの混合物よりなるグループから選択される 1 以上の微生物である請求の範囲第 1 項乃至第 3 項のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞。

20

## 【請求項 6】

外来微生物貪食済み食細胞の製造方法であって、以下の工程、すなわち；  
食細胞を *in vitro* において外来微生物と接触させ、および  
当該食細胞を単離する、  
工程を含む、外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

## 【請求項 7】

前記食細胞と外来微生物とを *in vitro* において接触させる際に使用される前記外来微生物の菌液濁度 (O.D. = 600nm) が、0.01 ~ 0.03 である請求の範囲第 6 項に記載の外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

## 【請求項 8】

前記外来微生物貪食済み食細胞の密度が、 $1 \times 10^4$  個 /  $\mu\text{l}$  ~  $5 \times 10^4$  個 /  $\mu\text{l}$  である請求の範囲第 6 項または第 7 項に記載の外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

30

## 【請求項 9】

前記外来微生物が、グラム陰性菌である請求の範囲第 6 項乃至第 8 項のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

## 【請求項 10】

前記外来微生物が、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミデス、エンテロコッカス・ファエカリス、シュードモナス・アエルギノーサ、エシェリヒア・コリおよびカンジダ・アルビカンスならびにそれらの混合物よりなるグループから選択される 1 以上の微生物である請求の範囲第 6 項乃至第 8 項のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

40

## 【請求項 11】

貪食済み外来微生物を検出および / または同定する方法であって、以下の工程、すなわち；  
請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を固定し、  
当該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、  
当該食細胞中に存在する外来微生物の DNA を露出させる処理を施し、  
当該 DNA にストリンジントな条件下ハイブリダイゼーションできる検出用 DNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、  
および、得られたシグナルによって貪食済み外来微生物を検出および / または同定する、

50

工程を含む、貪食済み外来微生物を検出および/または同定する方法。

【請求項 12】

外来微生物に対する食細胞機能の評価方法であって、以下の工程、すなわち；  
請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を固定し、  
当該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、  
当該食細胞中に存在する外来微生物の DNA を露出させる処理を施し、  
当該 DNA にストリンジেন্টな条件下ハイブリダイゼーションすることのできる検出用  
DNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、および  
得られたシグナルによって外来微生物に対する食細胞の食作用および/または殺傷能を同  
定する、

10

工程を含む、外来微生物に対する食細胞機能の評価方法。

【請求項 13】

前記方法が、以下の特徴 (1) ~ (8)、すなわち、  
(1) 固定化する食細胞の密度 ( $x$  個 / ml) が、 $5 \times 10^6$  個 / ml  $< x$  個 / ml  $< 1 \times 10^8$  個 / ml であること、  
(2) 前記 DNA 露出工程において、1 単位 / ml ~ 1,000 単位 / ml の力価のリゾ  
スタフィンを使用すること、  
(3) 前記 DNA 露出工程において、1,000 単位 / ml ~ 1,000,000 単位 /  
ml の力価のリゾチームを使用すること、  
(4) 前記 DNA 露出工程において、10 単位 / ml ~ 10,000 単位 / ml の力価の  
N - アセチルムラミダーゼを使用すること、  
(5) 前記 DNA 露出工程において、50 単位 / ml ~ 500 単位 / ml の力価のザイモ  
ラーゼを使用すること、  
(6) 前記 *in situ* ハイブリダイゼーションの工程において、界面活性剤を使用す  
ること、  
(7) 前記検出用 DNA プローブが、350 ~ 600 塩基長の鎖長を有する 1 種以上の D  
NA プローブであること、および  
(8) 前記検出用 DNA プローブの濃度が、 $0.1 \text{ ng} / \mu\text{l} \sim 2.2 \text{ ng} / \mu\text{l}$  である  
こと、の少なくとも 1 つの特徴を有する請求の範囲第 11 項または第 12 項に記載の方法  
。

20

30

【請求項 14】

前記 DNA 露出工程において、リゾスタフィン、リゾチーム、N - アセチルムラミダーゼ  
およびザイモラーゼより選択される 1 以上の酵素が使用され、かつリゾスタフィンの力価  
が 10 単位 / ml ~ 100 単位 / ml、リゾチームの力価が 10,000 単位 / ml ~ 1  
00,000 単位 / ml、および N - アセチルムラミダーゼの力価が 100 単位 / ml ~  
1,000 単位 / ml、ザイモラーゼの力価が 100 単位 / ml ~ 500 単位 / ml であ  
る請求の範囲第 13 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 DNA 露出工程において酵素が使用され、かつ、該酵素を反応させる温度が 26 ~  
59 であり、該酵素を反応させる時間が 15 分 ~ 120 分である請求の範囲第 11 項乃  
至第 14 項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 16】

前記 DNA 露出工程において、食細胞の形態を保持させる物質をさらに使用する請求の範  
囲第 11 項乃至第 15 項のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記物質が、フェニルメチルスルフォニルフルオリドである請求の範囲第 16 項に記載  
の方法。

【請求項 18】

前記フェニルメチルスルフォニルフルオリドの濃度が、 $10 \mu\text{mol} / \text{l} \sim 10 \text{ mmol} / \text{l}$   
である請求の範囲第 17 項に記載の方法。

50

## 【請求項 19】

前記物質が、ジメチルスルフォキシドにて溶解された物質である請求の範囲第 16 項乃至第 18 項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 20】

前記ジメチルスルフォキシドの濃度が、5%未満である請求の範囲第 19 項に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記 *in situ* ハイブリダイゼーションの工程において、DNA と DNA プローブとが、界面活性剤の存在下でハイブリダイズされる請求の範囲第 11 項乃至第 20 項のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 22】

前記界面活性剤が、アニオン界面活性剤である請求の範囲第 21 項に記載の方法。

## 【請求項 23】

前記アニオン界面活性剤が、ドデシル硫酸ナトリウムである請求の範囲第 22 項に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記 *in situ* ハイブリダイゼーション工程において、ハイブリダイズ反応させる温度が 25 ~ 50 であり、反応させる時間が 30 分 ~ 900 分である請求の範囲第 11 項乃至第 23 項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 25】

外来微生物に対する食細胞機能の評価方法であって、以下の工程、すなわち；  
請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を固定し、色素を用いて当該食細胞を染色し、および  
貪食中または貪食後の細胞に特徴的な細胞形態を鏡検での観察によって検出することで、外来微生物に対する食細胞の食作用および / または殺傷能を同定する、工程を含む、外来微生物に対する食細胞機能の評価方法。

20

## 【請求項 26】

免疫機能の評価方法であって、以下の工程、すなわち；  
被検者から食細胞を単離し、  
請求の範囲第 12 乃至 25 項のいずれかに記載の食細胞機能の評価方法を用いて該食細胞の機能を評価し、および  
その評価結果を正常食細胞機能のものと比較することにより、被験者の免疫機能を評価する、工程を含む、免疫機能の評価方法。

30

## 【請求項 27】

前記免疫機能が、白血球による微生物貪食能である請求の範囲第 26 項に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記免疫機能が、放射線照射または抗癌剤投与後の患者の白血球による微生物貪食能である請求の範囲第 27 項に記載の方法。

## 【請求項 29】

食細胞への分化効率の評価方法であって、以下の工程、すなわち；  
請求の範囲第 12 乃至 25 項のいずれかに記載の外来微生物に対する食細胞機能を評価し、および  
経時的に該食細胞機能を評価してその変化を同定する  
工程を含む、食細胞への分化効率の評価方法。

40

## 【請求項 30】

食細胞機能のモジュレーターによる効果を判定するための評価方法であって、以下の工程、すなわち；  
食細胞機能モジュレーターの存在下および非存在下に外来微生物の懸濁液と食細胞とをインキュベートして食作用を許容し、および  
請求の範囲第 12 乃至 25 項のいずれかに記載の外来微生物に対する食細胞機能の評価方

50

法を用いて、前記食細胞機能モジュレーターの存在下および非存在下における食細胞機能を比較する、

工程を含む、食細胞機能のモジュレーターによる効果を判定するための評価方法。

【請求項 3 1】

食細胞機能のモジュレーターのスクリーニング方法であって、以下の工程、すなわち；食細胞機能に対してモジュレーター作用を有することが推定される薬剤の存在下および非存在下に、外来微生物の懸濁液と食細胞とをインキュベートして食作用を許容し、および請求の範囲第 1 2 乃至 2 5 項のいずれかに記載の外来微生物に対する食細胞機能の評価方法を用いて、前記薬剤の存在下および非存在下における食細胞機能を比較する、工程を含む、食細胞機能のモジュレーターのスクリーニング方法。

10

【請求項 3 2】

臨床検査方法であって、以下の工程、すなわち；被検者への薬剤投与前および投与後に該被検者より食細胞を取得し、請求の範囲第 1 2 乃至 2 5 項のいずれかに記載の食細胞機能の評価方法を用いて該食細胞の機能を評価し、およびその評価結果に基づいて判定される薬剤の効果から、薬剤投与計画を検討する、工程を含む、臨床検査方法。

【請求項 3 3】

食細胞を固定し、当該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在する外来微生物の DNA を露出させる処理を施し、該 DNA にストリンジेंटな条件下にてハイブリダイゼーションすることのできる検出用 DNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより食細胞機能を評価するための、(1) 外来微生物、(2) 前記 DNA を露出させる工程において使用される、リゾスタフィン、リゾチーム、N - アセチルムラミダーゼおよびザイモラーゼからなるグループより選択される少なくとも 1 種以上の酵素、ならびに (3) 1 種以上の検出用 DNA プローブを具備した食細胞機能の評価のためのキットの性能試験方法であって、請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれかに記載の外来微生物貧食済み食細胞を使用することを特徴とする食細胞機能の評価用キットの性能試験方法。

20

【請求項 3 4】

生体由来の食細胞を含む臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定し、該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在すると予想される外来微生物の DNA を露出させる処理を施し、該 DNA にストリンジेंटな条件下ハイブリダイゼーションすることのできる検出用 DNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより外来微生物を検出および / または同定するためのキットの性能試験方法において、請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれかに記載の外来微生物貧食済み食細胞を使用することを特徴とする外来微生物の検出および / または同定用キットの性能試験方法。

30

【請求項 3 5】

前記性能試験が、感度試験、特異性試験または再現性試験である請求の範囲第 3 3 項または第 3 4 項に記載の性能試験方法。

40

【請求項 3 6】

請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれかに記載の外来微生物貧食済み食細胞が、陽性コントロールとして使用される請求の範囲第 3 3 項または第 3 4 項に記載の性能試験方法。

【請求項 3 7】

前記固定工程の前に、外来微生物貧食済み食細胞を支持担体上に支持させる工程を含み、かつ当該支持担体が、3 - アミノプロピルトリエトキシシランをコートしたスライドグラスである請求の範囲第 1 1 項乃至第 3 6 項のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8】

前記シグナルの検出の際に、シグナルと細胞のコントラストを明確にさせるための色素が使用される請求の範囲第 1 1 項乃至第 3 7 項のいずれかに記載の方法。

50

## 【請求項 39】

前記食細胞が、血液由来である請求の範囲第 11 項乃至第 38 項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 40】

請求の範囲第 1 項乃至第 5 項のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を固定し、当該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在する外来微生物の DNA を露出させる処理を施し、該 DNA にストリンジエントな条件下にてハイブリダイゼーションすることのできる検出用 DNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより食細胞機能を評価するためのキットであって、

- (1) 外来微生物、
  - (2) 前記 DNA 露出工程において使用される、リゾスタフィン、リゾチーム、N - アセチルムラミダーゼおよびザイモラーゼからなるグループより選択される少なくとも 1 種以上の酵素、および
  - (3) 1 種以上の検出用 DNA プローブ
- を具備する、食細胞機能を評価するためのキット。

## 【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、食細胞機能の評価方法に関し、さらに詳細には、例えば、敗血症等の細菌や真菌等の外来微生物による感染状態の診断や、感染症治療薬の開発の上で有用な、感染の実験的モデルを提供する。また、本発明は、食細胞による貪食能および/または殺菌能を検出、同定および評価するための方法、食細胞機能のモジュレーターによる効果を判定するための方法、食細胞機能モジュレーターのスクリーニング方法、かかる方法を実施するためのキットにも関する。

背景技術

感染症および敗血症は、あらかじめ基礎疾患があり、それが原因となって弱毒菌が感染して引き起こされることが多い。この様な状態は、臨床現場では頻繁に起こり得るが、その臨床症状を全て網羅する理想的な動物モデルは未だ確立されていない。この要因としては、細菌感染が基礎疾患の違いにより複雑な感染状況を呈し、また、動物種の菌種に対する感受性等に大きな隔たりがあるため、感染モデルの系が、その研究目的によって個々に確立されてきたからである。現在よく知られている感染モデルの系は、(i) マウスやラットの腹腔に種々の菌種を感染させて腹腔内膿瘍を形成させ、敗血症の病態を追跡する方法(2 相性感染理論)、(ii) 特に、低免疫下での感染の動態をみる場合、シクロホスファミドを予め投与して白血球を減少させ、*Pseudomonas aeruginosa* 等の弱毒菌株を感染させる方法および感染を容易にするために電気ゴテで皮膚を広範囲に火傷させ、*Pseudomonas aeruginosa* を付着させる方法、(iii) マクロファージや好中球等によって遊離されるサイトカインなどの生体液性因子の動態を検討する場合、*Escherichia coli* 等の大腸菌類縁菌及びこれらの LPS を投与して惹起される敗血症の病態を観察する方法、(vi) ラットの盲腸を結紮穿刺(CLP: Cecal Ligation and Puncture)することにより、腸内細菌を侵入させて、ICU 及び消化器系外科でみられる腹膜炎による MOF を引き起こし、その組織像の動態を確認する(亜急性重感染症腹膜炎モデル)などが挙げられる。

好ましい動物モデルの条件として、(I) 細菌が感染原発巣から血液中に移行すること(血液中に細菌を直接投与することは、多くの場合、細菌性ショックを引き起こし、病態としてコントロールできない)、(II) 経時的に両検査法で比較検討する際、十分な血液量が確保でき、採血部位での 2 次感染及びコンタミネーションが生じない血液採取が実施できること、(III) 動物種または週齢によっては好中球等の貪食細胞が少ないため、ヒトと同程度の量の貪食細胞が確保できること、(IV) 頻回な血液採取による採血時のショック及びストレス等による免疫系の変化が各個体及び検出感度に大きく影響を与えな

10

20

30

40

50

いこと、(V) 個体差を無くすため、ある程度の例数が確保できること、等が挙げられる。

モデル動物を作製する系として最も一般均な方法である2相性感染理論は、歴史的にも古く、1931年のMeloneyらに始まり、Hite(1949)、Mergenhagen(1958)、McDonald(1963)らによって検討、確立された系である。このモデルは嫌気性菌、好気性菌に関わらず、原発巣の細菌が血液を介して2次の感染巣を形成するという、感染経路の理論的根拠として確立されており、一般的に敗血症感染モデルとして用いられている。しかしながら、本系は、細菌感染症の病態解析に使用する系として確立されたため、腹腔から血液中へ移行する細菌量に重点をおいていない。よって、各ラットの個体差の影響により、腹腔内投与した細菌量が血液中の菌量に反映されないため、投与菌量による違いをin vivo試験で考察することは困難である。

また、Bacterial Translocation法にも問題がある。Escherichia coli、Enterobacter cloacae、Klebsiella pneumoniae、Enterococcus faecalisおよびStaphylococcus epidermidis等の弱毒性感染細菌の検出感度を安易に比較できない要因として、これら菌種が腸内及び他の粘膜の常在細菌であることが挙げられる。このin vivo試験の系では、投与された菌の動態ではなく敗血症の病態の解析が目的であるので、投与した菌以外の菌種の侵入は考慮していない。最近、臨床現場及び動物実験においても、腹膜炎により腸管透過性が亢進され、腸内細菌が血液中に移行して敗血症を引き起こすことが論じられている。また、臨床現場では腹膜炎に起因するMOFにおいて感染巣が特定できない場合もあり、Bacterial Translocationとの関連が注目されている。

さらに、動物実験では、このin vivo試験モデルでEnterococcus faecalisを腹腔内投与した場合、腹膜炎による炎症ストレス等が誘因となり、腸管からのBacterial Translocationを引き起こし、33%(9/27)の割合で腸管のEnterococcus faecalisが分離されたとの報告がある。また、Steffenらも、このin vivo試験モデルで、多くの腸内細菌が血液中に移行することを認めている。

また、Bacterial Translocationではないが、ラット敗血症モデルに用いられる盲腸結紮穿刺法による腹膜炎では、12時間後に血液中からEscherichia coli、Enterobacter cloacae、Klebsiella pneumoniae、Enterococcus faecalisおよびStaphylococcus epidermidisが分離されたとの報告もある。

感染症原因微生物と宿主との間の関係は極めて複雑であるので、様々なヒト感染症、例えば、敗血症・菌血症を模した理想的な動物モデルを確立するのはさらに困難なことである。このように、菌血症・敗血症を含む感染症診断や、感染症治療薬開発のための薬効の判定の一助として、食細胞の形態を維持したまま、外来微生物の種に関わらず安定で適用範囲の広い食細胞の貪食能および/または殺菌能をin vitroで評価できる、感染症の実験的モデルが希求されているにもかかわらず、要求を十分に満たすものは提供されていないという現状にある。

#### 発明の開示

本発明は、このような現状に鑑み、in vitroにおいて食細胞の貪食機能を評価できる実験的モデルを提供することを目的とするものである。さらに、当該実験モデルを使用することによる、生体の免疫機能および食細胞への分化効率を評価できる方法を提供することを目的とする。また、当該実験モデルを使用することによる、免疫機能賦活剤、抗ガン剤、白血球分化因子、抗生物質などの各種薬剤をスクリーニングする方法、各種薬剤の投与計画を検討する臨床検査方法などを提供することを目的とする。さらには、生体由来の食細胞を含む臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定し、該細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在すると予想される外来微生物のDNAを露出させる処理を施し、該DNAにストリンジントな条件下ハイブリダイゼーションするこ

10

20

30

40

50

とのできる検出用DNAプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより、外来微生物を検出および/または検出するキットにおいて、感度試験、特異性試験および再現性試験などの性能試験、また、当該実験モデルを陽性コントロールなどとして使用する方法を提供する。

本発明は、以上詳説した現状に鑑みて成し遂げられたものであり、その要旨とするところは、以下の項目1~40に記載の通りである。

1. 食細胞と外来微生物を *in vitro* において接触させた後、当該細胞を単離することによって調製された、外来微生物貪食済み食細胞。

2. 前記食細胞と外来微生物とを *in vitro* において接触させる際に使用される外来微生物の菌液濁度 (O. D. = 600 nm) が、約0.01~約0.03である項目1に記載の外来微生物貪食済み食細胞。

3. 前記外来微生物貪食済み食細胞の密度が、約  $1 \times 10^4$  個/ $\mu$ l ~ 約  $5 \times 10^4$  個/ $\mu$ l である項目1または2に記載の外来微生物貪食済み食細胞。

4. 前記外来微生物が、グラム陰性菌である項目1乃至3のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞。

5. 前記外来微生物が、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミデス、エンテロコッカス・ファエカリス、シュードモナス・アエルギノーサ、エシェリヒア・コリおよびカンジダ・アルビカンスならびにそれらの混合物よりなるグループから選択される1以上の微生物である項目1乃至3のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞。

6. 外来微生物貪食済み食細胞の製造方法であって、食細胞を *in vitro* において外来微生物と接触させ、および当該食細胞を単離する、工程を含む、外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

7. 前記食細胞と外来微生物とを *in vitro* において接触させる際に使用される前記外来微生物の菌液濁度 (O. D. = 600 nm) が、約0.01~約0.03である項目6に記載の外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

8. 前記外来微生物貪食済み食細胞の密度が、約  $1 \times 10^4$  個/ $\mu$ l ~ 約  $5 \times 10^4$  個/ $\mu$ l である項目6または7に記載の外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

9. 前記外来微生物が、グラム陰性菌である項目6乃至8のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

10. 前記外来微生物が、スタフィロコッカス・アウレウス、スタフィロコッカス・エピデルミデス、エンテロコッカス・ファエカリス、シュードモナス・アエルギノーサ、エシェリヒア・コリおよびカンジダ・アルビカンスならびにそれらの混合物よりなるグループから選択される1以上の微生物である項目6乃至8のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞の製造方法。

11. 貪食済み外来微生物を検出および/または同定する方法であって、項目1乃至5のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を固定し、当該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、当該食細胞中に存在する外来微生物のDNAを露出させる処理を施し、当該DNAにストリンジェントな条件下ハイブリダイゼーションできる検出用DNAプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、および得られたシグナルによって貪食済み外来微生物を検出および/または同定する、工程を含む、貪食済み外来微生物を検出および/または同定する方法。

12. 外来微生物に対する食細胞機能の評価方法であって、項目1乃至5のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を固定し、当該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、当該食細胞中に存在する外来微生物のDNAを露出させる処理を施し、当該DNAにストリンジェントな条件下ハイブリダイゼーションすることのできる検出用DNAプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、および得られたシグナルによって外来微生物に対する食細胞の食作用および/または殺傷能を同定する、工程を含む、外来微生物に対する食細胞機能の評価方法。

13. 前記方法が、

10

20

30

40

50

- (1) 固定化する食細胞の密度 ( $x$  個 / ml) が、約  $5 \times 10^6$  個 / ml  $< x$  個 / ml  $<$  約  $1 \times 10^8$  個 / ml であること、
- (2) 前記 DNA 露出工程において、約 1 単位 / ml ~ 約 1,000 単位 / ml の力価のリゾスタフィンを使用すること、
- (3) 前記 DNA 露出工程において、約 1,000 単位 / ml ~ 約 1,000,000 単位 / ml の力価のリゾチームを使用すること、
- (4) 前記 DNA 露出工程において、約 10 単位 / ml ~ 約 10,000 単位 / ml の力価の N - アセチルムラミダーゼを使用すること、
- (5) 前記 DNA 露出工程において、約 50 単位 / ml ~ 約 500 単位 / ml の力価のザイモラーゼを使用すること、
- (6) 前記 *in situ* ハイブリダイゼーションの工程において、界面活性剤を使用すること、
- (7) 前記検出用 DNA プローブが、約 350 ~ 約 600 塩基長の鎖長を有する 1 種以上の DNA プローブであること、および
- (8) 前記検出用 DNA プローブの濃度が、約  $0.1 \text{ ng} / \mu\text{l}$  ~ 約  $2.2 \text{ ng} / \mu\text{l}$  であること、の少なくとも 1 つの特徴を有する項目 11 または 12 に記載の方法。
14. 前記 DNA 露出工程において、リゾスタフィン、リゾチーム、N - アセチルムラミダーゼおよびザイモラーゼより選択される 1 以上の酵素が使用され、かつリゾスタフィンの力価が約 10 単位 / ml ~ 約 100 単位 / ml、リゾチームの力価が約 10,000 単位 / ml ~ 約 100,000 単位 / ml、および N - アセチルムラミダーゼの力価が約 100 単位 / ml ~ 約 1,000 単位 / ml、ザイモラーゼの力価が約 100 単位 / ml ~ 約 500 単位 / ml である項目 13 に記載の方法。
15. 前記 DNA 露出工程において酵素が使用され、かつ、該酵素を反応させる温度が約 26 ~ 約 59 であり、該酵素を反応させる時間が約 15 分 ~ 約 120 分である項目 11 乃至 14 のいずれかに記載の方法。
16. 前記 DNA 露出工程において、食細胞の形態を保持させる物質をさらに使用する項目 11 乃至 15 のいずれかに記載の方法。
17. 前記物質が、フェニルメチルスルフォニルフルオリドである項目 16 に記載の方法。
18. 前記フェニルメチルスルフォニルフルオリドの濃度が、約  $10 \mu\text{mol} / \text{l}$  ~ 約  $10 \text{ mmol} / \text{l}$  である項目 17 に記載の方法。
19. 前記物質が、ジメチルスルフォキシドにて溶解された物質である項目 16 乃至 18 のいずれかに記載の方法。
20. 前記ジメチルスルフォキシドの濃度が、5% 未満である項目 19 に記載の方法。
21. 前記 *in situ* ハイブリダイゼーションの工程において、DNA と DNA プローブとが、界面活性剤の存在下でハイブリダイズされる項目 11 乃至 20 のいずれかに記載の方法。
22. 前記界面活性剤が、アニオン界面活性剤である項目 21 に記載の方法。
23. 前記アニオン界面活性剤が、ドデシル硫酸ナトリウムである項目 22 に記載の方法。
24. 前記 *in situ* ハイブリダイゼーション工程において、ハイブリダイズ反応させる温度が約 25 ~ 約 50 であり、ハイブリダイズ反応させる時間が約 30 分 ~ 約 900 分である項目 11 乃至 23 のいずれかに記載の方法。
25. 外来微生物に対する食細胞機能の評価方法であって、項目 1 乃至 5 のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を固定し、色素を用いて当該食細胞を染色し、貪食中または貪食後の細胞に特徴的な細胞形態を鏡検での観察によって検出することで、外来微生物に対する食細胞の食作用および / または殺傷能を同定する、工程を含む、外来微生物に対する食細胞機能の評価方法。
26. 免疫機能の評価方法であって、被検者から食細胞を単離し、項目 12 乃至 25 のいずれかに記載の食細胞機能の評価方法を用いて該食細胞の機能を評価し、および、その評

10

20

30

40

50

価結果を正常食細胞機能のものと比較することにより、被験者の免疫機能を評価する、工程を含む、免疫機能の評価方法。

27．前記免疫機能が、白血球による微生物貪食能である項目26に記載の方法。

28．前記免疫機能が、放射線照射または抗癌剤投与後の患者の白血球による微生物貪食能である項目27に記載の方法。

29．食細胞への分化効率の評価方法であって、項目12乃至25のいずれかに記載の外来微生物に対する食細胞機能を評価し、および経時的に該食細胞機能を評価してその変化を同定する工程を含む、食細胞への分化効率の評価方法。

30．食細胞機能のモジュレーターによる効果を判定するための評価方法であって、食細胞機能モジュレーターの存在下および非存在下に外来微生物の懸濁液と食細胞とをインキュベートして食作用を許容し、および項目12乃至25のいずれかに記載の外来微生物に対する食細胞機能の評価方法を用いて、前記食細胞機能モジュレーターの存在下および非存在下における食細胞機能を比較する、工程を含む、食細胞機能のモジュレーターによる効果を判定するための評価方法。

31．食細胞機能のモジュレーターのスクリーニング方法であって、食細胞機能に対してモジュレーター作用を有することが推定される薬剤の存在下および非存在下に、外来微生物の懸濁液と食細胞とをインキュベートして食作用を許容し、および項目12乃至25のいずれかに記載の外来微生物に対する食細胞機能の評価方法を用いて、前記薬剤の存在下および非存在下における食細胞機能を比較する、工程を含む、食細胞機能のモジュレーターのスクリーニング方法。

32．臨床検査方法であって、被検者への薬剤投与前および投与後に該被検者より食細胞を取得し、項目12乃至25のいずれかに記載の食細胞機能の評価方法を用いて該食細胞の機能を評価し、およびその評価結果に基づいて判定される薬剤の効果から、薬剤投与計画を検討する、工程を含む、臨床検査方法。

33．食細胞を固定し、当該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在する外来微生物のDNAを露出させる処理を施し、該DNAにストリンジェントな条件下にてハイブリダイゼーションすることのできる検出用DNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより食細胞機能を評価するための、(1)外来微生物、(2)前記DNAを露出させる工程において使用される、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼおよびザイモラーゼからなるグループより選択される少なくとも1種以上の酵素、ならびに(3)1種以上の検出用DNAプローブを具備した食細胞機能の評価するためのキットの性能試験方法において、項目1乃至5のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を使用することを特徴とする食細胞機能の評価用キットの性能試験方法。

34．生体由来の食細胞を含む臨床検体より食細胞を得、得られた食細胞を固定し、該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在すると予想される外来微生物のDNAを露出させる処理を施し、該DNAにストリンジェントな条件下ハイブリダイゼーションすることのできる検出用DNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより外来微生物を検出および/または同定するためのキットの性能試験方法において、項目1乃至5のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を使用することを特徴とする外来微生物の検出および/または同定用キットの性能試験方法。

35．前記性能試験が、感度試験、特異性試験または再現性試験である項目33または34に記載の性能試験方法。

36．項目1乃至5のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞が、陽性コントロールとして使用される項目33または34に記載の性能試験方法。

37．前記固定工程の前に、外来微生物貪食済み食細胞を支持担体上に支持させる工程を含み、かつ当該支持担体が、3-アミノプロピルトリエトキシシランをコートしたスライドガラスである項目11乃至36のいずれかに記載の方法。

38．前記シグナルの検出の際に、シグナルと細胞のコントラストを明確にさせるための

10

20

30

40

50

色素が使用される項目 11 乃至 37 のいずれかに記載の方法。

39. 前記食細胞が、血液由来である項目 11 乃至 38 のいずれかに記載の方法。

40. 項目 1 乃至 5 のいずれかに記載の外来微生物貪食済み食細胞を固定し、当該食細胞の細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在する外来微生物の DNA を露出させる処理を施し、該 DNA にストリンジエントな条件下にてハイブリダイゼーションすることのできる検出用 DNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより食細胞機能を評価するためのキットであって、(1) 外来微生物、(2) 前記 DNA 露出工程において使用される、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼおよびザイモラーゼからなるグループより選択される少なくとも 1 種以上の酵素、ならびに(3) 1 種以上の検出用 DNA プローブを具備する、食細胞機能を評価するためのキット。

10

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の一実施態様において、菌液濁度 ( $O.D. = 600\text{nm}$ ) が、好ましくは、約 0.01 ~ 約 0.03 に調製された外来微生物と食細胞とを *in vitro* において接触させ、該細胞を単離することにより外来微生物貪食済み食細胞を調製し、得られたこれら外来微生物貪食済み食細胞を、約  $1 \times 10^4$  個/ $\mu\text{l}$  ~ 約  $5 \times 10^4$  個/ $\mu\text{l}$  に調製することを特徴とする実験的モデル(以下、「貪食サンプル」と称する)を提供する。

ところで、本明細書で使用する「外来微生物貪食済み食細胞」の語は、既に外来微生物の貪食が完了した細胞のみならず、貪食中の細胞や細胞表面に外来微生物が付着して貪食を開始しようとしている細胞を含め、外来微生物に付着または外来微生物を包含しているものを指す。

20

本明細書で言う食細胞は、外来微生物をはじめとする異物を自身の細胞内に取り込むことのできる細胞であれば特に限定されるものではなく、例えば、マクロファージ、単球、好中球、好酸球などが挙げられる。また、U937細胞、HL60細胞などの食細胞系も使用できる。

食細胞としては、例えば、血液、組織液、リンパ液、脳脊髄液、膿、粘液、鼻水、痰、尿、腹水などの体液等、または、透析排液もしくは、その他鼻腔、気管支、皮膚、各種臓器、骨などを洗浄した後の洗浄液にも生体由来の食細胞が含有されるため、これらからも調製することができる。加えて、皮膚、肺、腎、粘膜などの組織からも、食細胞を調製することができる。食細胞の一つであるマクロファージには、単球、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ、固定マクロファージ、遊離マクロファージ、ハンゼマンマクロファージ、炎症性マクロファージ、肝クッパー細胞、脳ミクログリア細胞などの様々な形態に変化するため、血液のみならず、これらを含む組織も食細胞の供給源として用いることができる。組織から食細胞を調製するためには、例えば、組織採取後に、トリプシン等の酵素を用いることにより細胞を剥離して該組織中に存在する食細胞を単離する。

30

体液等より食細胞(白血球)画分を取得するために、公知の方法を使用することができる。例えば、ヘパリン加静脈血約 5ml (白血球数の少ない場合には 10ml) を採取し、この血液と血液分離試薬(塩化ナトリウム 225mg、デキストラン(分子量: 200,000 ~ 300,000) 1.5g、滅菌精製水にて全量 25ml に調製したもの)を 4:1 程度の割合で混和した後、約 10 ~ 約 40 で、約 15分 ~ 約 120分間、好ましくは 37 で約 30分間静置することにより、白血球画分(上層)を取得することができる。

40

白血球は、上記得られた白血球画分を、0 ~ 約 20 にて、約 100 ~ 約 500  $\times$  g で、約 3分 ~ 約 60分間、好ましくは、4 にて約 140 ~ 約 180  $\times$  g で 10分間遠心分離することで得られる。この時、赤血球が混入した場合には、溶血操作を行うのが好ましい。例えば、白血球のペレットに滅菌精製水 1ml を加えて懸濁し、直ちに過剰量の PBS (塩化ナトリウム 18.24g、リン酸一水素ナトリウム 12水和物 6.012g、リン酸二水素ナトリウム 2水和物 1.123g、滅菌精製水にて全量 120ml にしたもの(PBS原液; 以下、単に「PBS原液」と称する)を、滅菌精製水で 20倍に希釈したもの; 以下、単に「PBS」と称する)を加えて等張化した後、再度 4 下で、約 140

50

～約180×gで10分間遠心分離すればよい。

感染症の原因ともなる外来微生物は、食細胞によって貪食される微生物であれば特に限定されなく、細菌、真菌、ウイルス、原虫、寄生虫等が含まれる。細菌としては、例えば、ブドウ球菌、緑膿菌、腸球菌、大腸菌、連鎖球菌、肺炎球菌、結核菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、リステリア、エルシニア、ブルセラ等が挙げられる。真菌としては、例えば、カンジダ、アスペルギルス、アクチノミセス、コクシジオイデス、プラスミセス等が挙げられる。ウイルスとしては、例えば、インフルエンザウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、肝炎ウイルス、エイズウイルス等が挙げられる。原虫としては、例えば、アメーバ赤痢、腔トリコモナス、マラリア、トキソプラズマ等が挙げられる。寄生虫としては、トリパノゾーマ等が挙げられる。特に、敗血症または菌血症の原因菌としては、例えば、グラム陽性菌であるスタフィロコッカス属 (*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus agalactiae*)、グラム陰性菌である大腸菌 (*Escherichia coli*)、エンテロバクター (*Enterobacter cloacae*)、クレブシエラ (*Klebsiella pneumoniae*) 等の大腸菌類縁腸内細菌群 (*Klebsiella oxytoca*、*Serratia marcescens*、*Proteus vulgaris*、*Citrobacter freundii*)、好気性桿菌であるシュードモナス属 (*Pseudomonas aeruginosa*)、嫌気性菌であるクロストリジウム菌 (*Clostridium perfringens*)、バクテロイデス菌 (*Bacteroides fragilis*) 等が挙げられる。まれに、*Acinetobacter calcoaceticus*、*Aeromonas hydrophilia*、*Flavobacterium meningosepticum*、*Bacillus cereus* 等が原因となることもある。これらの内、特に、グラム陰性菌、あるいはスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・エピデルミデス (*Staphylococcus epidermidis*)、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)、シュードモナス・アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) およびカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) ならびにそれらの混合物よりなるグループから選択される1以上の微生物が、好適に用いられる。

食細胞に外来微生物を貪食させるためには、予め外来微生物を所定量にまで前培養し、増殖後に集めた微生物をPBSで懸濁した後、PBSにて希釈して吸光度計により菌液の濁度 (O.D. = 600nm) を、約0.001～約0.1、好ましくは、約0.01～約0.03に調整し、作製した菌液は、別々の培養用フラスコに移し、約30分間室温で静置しておく。ヘパリン加健常ヒト血液を採取し、前記血球分離試薬を4:1程度の割合で加え、約20～約40、好ましくは、約37で、約30分間静置し、白血球画分を分取する。分取した白血球画分をPBSにて懸濁する。外来微生物を入れておいた培養用フラスコの上清を静かに捨て、PBSで希釈した白血球画分をフラスコに加え、室温で、約10分間静置する。培養用フラスコ内の上清を捨て、フラスコの底に付着した白血球を、0.02% EDTA含有PBSを用いて遠沈管に回収し、例えば、4で、約140～約180×gで10分間遠心分離し、白血球を収集する。収集した白血球中に赤血球の混入が認められる場合には、滅菌精製水にて白血球の沈渣を穏やかに懸濁して溶血させた後、PBSを加えて等張化を行い、再度4で、約140～約180×gで10分間遠心分離を行い、白血球を収集すればよい。収集した白血球をPBSで懸濁し、血球計算盤にて細胞数を計測し、約 $1 \times 10^4$ 個/ $\mu\text{l}$ ～約 $5 \times 10^4$ 個/ $\mu\text{l}$ に調製する。

白血球を固定する方法として、例えば、カルノア固定を行うことができる。

具体的には、白血球を支持できる担体 (支持担体) に白血球を支持せしめ、カルノア固定

10

20

30

40

50

液（エタノール：クロロホルム：酢酸 = 6 : 3 : 1 の容量比で混合した液）に約 20 分間程度浸した後、約 50% ~ 約 90%、好ましくは、約 75% エタノール液に約 5 分間浸し、完全に風乾する。

前記支持担体は、不溶性素材のものが好ましく、例えば、ガラス、金属、合成樹脂（ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂など）、多糖類（セルロース、アガロースなど）が好ましい。

不溶性支持担体の形状としては、例えば、板状、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。特に、本発明の実施態様として好ましい支持担体は、スライドガラスを使用するのが好ましい。このようなスライドガラスとして、例えば、日本エアブラウン社製のスライドガラス（商品番号 MS311BL）が挙げられる。このスライドガラス（商品番号 MS311BL）には、直径 5 mm の円形ウェルが 14 個設けられている。また、実際に使用する際には、細胞の接着性を上げるため、3-アミノプロピルトリエトキシシラン（APS、SIGMA 社）をスライドガラスにコートした APS コートスライドガラスを使用するのが好ましい。その他、ポリ-L-リジンやゼラチンをコートしたスライドガラスも使用することができる。

APS コートスライドガラスを作製するには、まず、スライドホルダーにスライドガラス（商品番号 MS311BL）を固定した後、希釈した中性洗剤で 30 分以上浸して洗浄し、水道水で洗剤を十分に取り除き、次に、スライドガラスを精製水にて洗浄し、高温（100 以上）で十分に乾燥させた後、室温で放置冷却する。その後、スライドガラスを 2% APS 含有アセトンに 1 分間浸し、直ちにアセトンおよび滅菌精製水で順次軽く洗浄した後に、風乾する。

さらに再度、スライドガラスを約 1 ~ 約 10% APS 含有アセトンに 1 分間浸し、直ちにアセトンおよび滅菌精製水で順次軽く洗浄した後に、風乾する操作を行った後、約 20 ~ 約 60、好ましくは約 42 で乾燥させることにより作製することができる。

白血球を APS コートスライドガラスに支持させる際には、各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し風乾するのが好ましい。固定化する食細胞の密度（ $x$  個 / ml）が、約  $5 \times 10^6$  個 / ml  $< x$  個 / ml  $<$  約  $1 \times 10^8$  個 / ml、好ましくは、約  $1 \times 10^7$  個 / ml  $< x$  個 / ml  $<$  約  $5 \times 10^7$  個 / ml に調製されたものを使用することが好ましい。

また、このような 1 ml 当たりの食細胞の密度の変化に対応して、APS コートスライドガラスに固定される 1 ウェル当たりの白血球の細胞数（ $y$  個 / ウェル（直径 5 mm））は、約  $2.5 \times 10^4$  個 / ウェル  $< y$  個 / ウェル  $<$  約  $5 \times 10^5$  個 / ウェル、好ましくは、約  $5 \times 10^4$  個 / ウェル  $< y$  個 / ウェル  $<$  約  $2.5 \times 10^5$  個 / ウェルとなるように調製するのが好ましい。具体的には、白血球画分を、4 にて、約  $140 \times g \sim$  約  $180 \times g$  で、約 10 分間遠心分離することによって得た白血球ペレットに、少量の PBS を加えて懸濁し、血球計算盤を用いて白血球数を計測する。細胞数が、約  $5 \times 10^4$  個 / ウェル ~ 約  $2.5 \times 10^5$  個 / ウェルとなるように PBS で調製した白血球懸濁液 5  $\mu$ l を、APS コートスライドガラスの各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し、完全に風乾することにより調製することができる。

食細胞膜の透過性を亢進させる処理として、約 3 ~ 約 30 分間 PBS に浸し、その後、酵素前処理試薬（サポニン 1.25 g、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（比重 1.068 ~ 1.075（20/4）、pH（5w/v%）5.5 ~ 7.5）1.25 ml、PBS 原液 2.5 ml を混合し、滅菌精製水にて全量 50 ml に調製したものを）、滅菌精製水で約 2 ~ 約 50 倍に希釈した溶液に浸し、振とう機で約 3 ~ 約 30 分間浸透する方法を用いることができる。

食細胞中に存在する感染症原因菌の DNA を露出させる処理として、スライドガラス 1 枚につき酵素試薬（N-アセチルムラミダーゼ、リゾチームおよび / またはリゾスタフィン）に酵素試薬溶解液（フェニルメチルスルフォニルフルオリド（PMSF）含有ジメチルスルフォキシド（DMSO）を PBS で約 100 倍希釈して調製したものを）を 1 ml 加

えて酵素試液を調製した後、約20～約60、好ましくは、約37～約42の湿潤箱内で、この酵素試液1mlを白血球塗抹部位に滴下し、約10～約60分間静置する。その後、0.2mol/l塩酸含有PBS(PBS原液に塩酸を加え、滅菌精製水にて20倍希釈し、塩酸の終濃度を0.2mol/lに調製したものに浸し、そのまま振とう機上で3～30分間浸透することによって目的を達成できる。DMSOは5%以上の濃度でリゾチームおよびリゾスタフィンの活性を低下させる可能性があるため、5%未満の濃度で使用するのが好ましい。食細胞の形態を保持させる物質としてのPMSF以外に他の公知のプロテアーゼ阻害剤、例えば、トシルリジンクロロメチルケトン(TLCK)およびそれらの混合物などを用いることもできる。その際には、適宜DMSOなどの溶解剤を変更すれば良い。

10

酵素試薬として用いる各酵素の好ましい力価範囲は、*Staphylococcus aureus*の溶菌においては、リゾスタフィンの力価は1単位/mlで十分効果を示すが、*Staphylococcus epidermidis*の溶菌においては、10単位/ml以上のリゾスタフィン力価が必要であった。ゆえに、リゾスタフィンの至適力価は、1単位/ml～約1,000単位/ml、好ましくは、約10単位/ml～約100単位/mlに設定するのが良い。また、*Enterococcus faecalis*の溶菌においては、リゾチームの力価を約10,000単位/mlで固定したとき、N-アセチルムラミダーゼ力価が約10単位/ml以下では溶菌されなかった。リゾチームについては、N-アセチルムラミダーゼ力価を100単位/mlに固定したとき、リゾチーム力価が1,000単位/ml以下では溶菌されなかった。ゆえに、N-アセチルムラミダーゼの至適力価は、約10単位/ml～約10,000単位/ml、好ましくは、約100単位/ml～約1,000単位/ml、リゾチームの至適力価は、約1,000単位/ml～約1,000,000単位/ml、好ましくは、約10,000単位/ml～約100,000,000単位/mlに設定すると良い。また、原因菌が*Candida albicans*等の真菌である場合には、ザイモラーゼ約50単位/ml～約500単位/ml、好ましくは、約100単位/ml～約500単位/mlの力価範囲にすると良い。また、ザイモラーゼを使用する際には、特に、PMSFまたは公知のプロテアーゼ阻害剤を使用するのが好ましい。

20

また、グラム陽性菌とグラム陰性菌の成分の違い、すなわち、ペプチドグリカンまたはリポポリサッカライドの違いにより、適宜使用酵素を選択することができる。特に、グラム陽性菌、グラム陰性菌にかかわらず、より効果的に溶菌させるには、2種類以上の酵素を併用すればよい。本発明においては、リゾチーム、リゾスタフィンおよびN-アセチルムラミダーゼの3種を混合したものを使用することにより、単独の酵素によった場合と比較して溶菌活性が高まること明らかとなった。

30

酵素処理温度は、*Staphylococcus aureus*は、好ましくは約4～約60、*Staphylococcus epidermidis*は、約25より高く、好ましくは約37以上、また、*Enterococcus faecalis*では、約25より高く約60未満、好ましくは約37～約42とすれば良い。ゆえに、至適酵素処理温度を、約37～約42に設定するのが最も好ましい。また、3種類の菌に対する共通の範囲の内、限界とされる温度は約26～約59と予想できる。

40

また、酵素処理時間は、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Enterococcus faecalis*のいずれの貪食サンプルでも酵素処理時間20分以上(0分および10分においては不適であった)であり、また、白血球中に菌体は確認されなかったことから、少なくとも約15分以上、好ましくは約20分以上、さらに至適酵素処理時間を約30分～約60分とするのが好ましい。また、酵素処理時間を約15分～約120分としてもよい。

また、N-アセチルムラミダーゼとは、*Enterococcus faecalis*の熱処理乾燥粉末とN-アセチルムラミダーゼを、2mmol/l塩化マグネシウムを含む5mmol/lトリス塩酸緩衝液(pH6.0)中で、37で、5分間反応させた場合、600nmの吸光度を下げる酵素である。また、*Streptococcus sal*

50

*ivarivus* (IFO 3350) の熱処理細胞を、37、pH 7.0 で1分間に1ug 溶菌する酵素活性を1単位とした場合、2,000単位/mg以上のものを使用するのが好ましい。

リゾチームは、*Micrococcus luteus* とリゾチームをPBS内で、37で、5分間反応させた場合、600nmの吸光度を下げる酵素である。また、*Micrococcus luteus* を、35、pH 6.2で1分間に540nmの吸収を0.001下げるときの酵素活性を1単位とした場合、50,000単位/mg以上のものを使用するのが好ましい。

リゾスタフィン、*Staphylococcus epidermidis* とリゾスタフィンをPBS内にて37で5分間反応させた場合、600nmの吸光度を下げる酵素である。

また、*Staphylococcus aureus* を、37、pH 7.5で、10分間に620nmの吸収を0.240から0.125に下げるときの酵素活性を1単位とした場合、500単位/mg以上のものを使用するのが好ましい。

ザイモラーゼ(商品名: ザイモリエイス、生化学工業)とは、*Arthrobacter lutesul* の培養液から調製された酵素であり、酵母生細胞の細胞壁に対して強い溶解活性を有している。ザイモラーゼに含まれる細胞壁溶解に関わる必須酵素は、1,3-グルカン・ラミナリペンタオヒドロラーゼ(*lanimaripentaohydrolase*)であり、1,3-結合のグルコースポリマーに作用して、主生産物としてラミナリペンタオースを生成する。ザイモリエイス-100Tは硫酸分画により精製され、さらにアフィニティークロマトグラフィーにより精製され(Kitamura, K. et al.; J. Ferment. Technol., 60, 257, 1982)、100,000単位/gの活性を有している。しかしながら、この酵素の活性は、基質となる酵母の種類、培養条件および生育時期により変化することが知られている(Kitamura, K. et al.; J. Gen. Appl. Microbiol., 20, 323, 1974; Kitamura, K. et al.; Agric. Biol. Chem., 45, 1761, 1981; Kitamura, K. et al.; Agric. Biol. Chem., 46, 553, 1982)。ザイモリエイス-100Tには、1,3-グルカナーゼを約 $1.0 \times 10^7$ 単位/g、プロテアーゼを約 $1.7 \times 10^4$ 単位/g、マンナーゼを約 $6.0 \times 10^4$ 単位/g含み、DNaseおよびRNaseは認められない(Kitamura, K. et al.; J. Gen. Appl. Microbiol., 18, 57, 1972)。また、ザイモリエイスの至適pHは、約5.5~約8.5、好ましくは、約6.5~約7.5であり、至適温度は、約25~約55、好ましくは約35~約45である。さらに、酵母(対数増殖期細胞)に対する溶菌スペクトラム(属名)は、*Ashbya*、*Candida*、*Debaryomyces*、*Remothecium*、*Endomyces*、*Hansenula*、*Hanseniaspora*、*Kloeckera*、*Kluyveromyces*、*Lipomyces*、*Helschkowia*、*Pichia*、*Pullularia*、*Torulopsis*、*Saccharomyces*、*Saccharomycopsis*、*Saccharomycodes*、*Schwanniomyces*などが挙げられる。

特に、カンジダ属として、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス(*Candida tropicalis*)、カンジダ・パラシロシス(*Candida parasilosis*)、カンジダ・ガラクタ(*Candida galacta*)、カンジダ・ギリエルモンジ(*Candida guilliermondii*)、カンジダ・クルセイ(*Candida krusei*)、クリプトコッカス・ネオフォーマンス(*Cryptococcus neoformans*)等が挙げられる。本酵素の賦活剤として、SH化合物、例えば、システイン、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどを用いることができる。

これらの属に属する菌も、本発明に使用できる。この酵素は、ビール酵母懸濁液を基質として、約25で、2時間の内に、反応液(酵素: 0.05~0.1mg/ml 溶液1m

10

20

30

40

50

1、基質：ビール酵母懸濁液(2mg乾燥重量/ml)3ml、緩衝液：M/15リン酸緩衝液(pH7.5)5ml、滅菌精製水1mlで全量10mlに調製したもの)のA<sub>800</sub>が約30%減少するために必要な酵素活性を1単位とする。ザイモリエイス-100Tは、100,000単位/gの活性を有している。

酵素試薬溶解液として用いるPMSF(プロテアーゼから白血球を保護してその形態を保持させるために添加)の濃度として、10 $\mu$ mol/l以上の濃度で効果が認められ、0.1mmol/l以上のPMSF濃度では、白血球の形態の劣化が完全に抑制されていたことから、10 $\mu$ mol/l~10mmol/l、好ましくは0.1mmol/l~1mmol/lの範囲であることが好ましい。また、DMSOの濃度として、5%未満、好ましくは2%以下、さらには1%程度の濃度であることが好ましい。ゆえに、酵素試薬溶解液は、0.1mol/lフェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)含有ジメチルスルフォキシド(DMSO)をPBSで100~1,000倍希釈して調製したものであることが好ましい。

感染症原因菌のDNAを露出させる工程の後に、細胞膜タンパク質のアセチル化の工程を挿入しても良い。具体的には、アセチル化試薬(トリエタノールアミン7.46g、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量50mlとしたもの)に無水酢酸を加え、滅菌精製水で約2倍~約50倍希釈、好ましくは約10倍希釈し、無水酢酸の終濃度を0.1~3.0%、好ましくは0.8%に調製したアセチレーション試薬にスライドグラスを浸し、振とう機上で5~30分間振とうすることにより行うことができる。その後、75%、85%、98%エタノールに、順次、2~5分間ずつ浸し、完全に風乾させる。

また、細胞膜タンパク質のアセチル化工程の後に、感染症原因菌のDNAをアルカリ処理することにより一本鎖DNAとする工程を挿入することもできる。具体的には、スライドグラスを、約10mmol/l~約300mmol/l、好ましくは、約70mmol/l水酸化ナトリウム含有PBS(PBS原液に水酸化ナトリウムを加え、滅菌精製水で20倍希釈し、水酸化ナトリウムの終濃度を70mmol/lに調製したもの)に約2~約5分間浸すことにより行うことができる。その後、75%、85%、98%エタノールに、順次、2~5分間ずつ浸し、完全に風乾させる。

露出された感染症原因菌のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションできる検出用DNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行うには、例えば、プローブ希釈液にて調製した検出用DNAプローブを含有する液(プローブ液)を塗抹部位に塗布し、約25~約50、好ましくは、約37~約42の湿潤箱内で約1~約3時間、好ましくは、約2時間静置させる。

その後、ハイブリダイゼーション洗浄液(ハイブリダイゼーション原液(塩化ナトリウム13.15g、クエン酸三ナトリウム2水和物6.615g、滅菌精製水にて全量75mlに調製したもの：以下、単に「ハイブリダイゼーション原液」と称する)を、ハイブリダイゼーション原液：滅菌精製水：ホルムアミド=5：45：50の割合で混合して調製したものを)を3つの染色ピンに用意し、順次、約35~約45、好ましくは、約42で10分間ずつ浸す。その後、PBSに浸し、そのまま振とう機上で約5~約30分間振とうさせる。詳細には、プローブ希釈液には、サケ精子DNA600 $\mu$ l、100 $\times$ デンハート溶液50 $\mu$ l、ハイブリダイゼーション原液500 $\mu$ l、ホルムアミド2250 $\mu$ l、50%硫酸デキストラン1000 $\mu$ lが含まれる。プローブ液は各検出用DNAプローブ15ngを含むのが好ましく、プローブ希釈液にて全量50 $\mu$ lとするのが良い。

SA、SE、PA、EF、EKのプローブ濃度は、約0.6ng/ $\mu$ l~約1.8ng/ $\mu$ l、好ましくは約0.6ng/ $\mu$ l~約1.2ng/ $\mu$ lとするのが良い。また、0.06ng/ $\mu$ lにおいては不適であり、0.6ng/ $\mu$ lにおいては適であったことから、少なくとも0.1ng/ $\mu$ l以上とするのが好ましい。さらに、2.4ng/ $\mu$ lにおいては不適であり、1.8ng/ $\mu$ lにおいては適であったことから、2.2ng/ $\mu$ l以下とするのが好ましい。また、陽性コントロールおよび陰性コントロールの至適濃度を、それぞれ0.4~2.0ng/ $\mu$ lおよび0.6~2.0ng/ $\mu$ l、好ましくは共通して0.6~1.0ng/ $\mu$ lとするのが良い。

10

20

30

40

50

また、ハイブリダイゼーションを行う時間は、少なくとも30分以上、好ましくは60分以上、より好ましくは90分以上とするのが好ましい。さらに好ましい至適ハイブリダイゼーション時間は、約120分～約900分に設定すると良い。

また、*in situ*ハイブリダイゼーションの工程においてドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの界面活性剤を使用するのが、検出感度を高めることができる点から好ましい。SDSの濃度は、1%以下が好ましく、より好ましくは約0.1%～約0.5%、さらに好ましくは約0.25%とする。SDSは、ハイブリダイゼーションの際に用いる溶液に添加されていればよく、プローブ希釈液またはプローブ液に事前に混合したものをを用いてもよい。

さらに、検出用DNAプローブを、約350～約600塩基長、好ましくは、約350～約550塩基長の鎖長を有する1種以上のDNAプローブとすることで、食細胞内にプローブを円滑に導入し、取り込まれている外来微生物の遺伝子への確実な接触が許容されるので好ましい。対象となるプローブの塩基長(塩基対の数)が、必ず上記塩基長範囲に収まらなければならないことを意味するものではなく、プローブの塩基長の分布に、上記範囲の塩基長が含まれていればよいこととする。これらプローブは、1種で用いても数種(1種以上)で用いても良い。1種以上のプローブとは、一菌種に対しハイブリダイズできる複数種のプローブであっても良く、また、一菌種に対してプローブは1つであるが、菌種が複数種存在するためにプローブの種類が複数種となっても良く、プローブの種類が1種以上であれば特に限定されない。

これらプローブは、食細胞自体といかようにもハイブリダイズしない配列を有するDNA断片を含むものとするのが好ましく、また他の種の菌に由来する遺伝子と交差ハイブリダイズするものであってはならない。例えば、サブトラクション法を用いれば、短時間で特異プローブを作成することができる。これらプローブは、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ピオチン、ジゴキシゲニン(ジゴキシゲニン(DIG)-11-dUTP)等の非放射性同位体標識用物質を用い、定法のニックトランスレーションに従って、調製およびラベルするとよい。プローブの鎖長は、ニックトランスレーション反応において添加するDNase IとDNAポリメラーゼIの量比を変化させることにより、最も効率よくラベルできるように制御することができる。例えば、DNAプローブ(SA-24)2 $\mu$ gを効率よくラベル化し、また、外来微生物DNAと効率よく*in situ*ハイブリダイゼーションできるプローブ鎖長(約350～約600の塩基長)に調節するには、全量100 $\mu$ lの反応液中に、10U/ $\mu$ lのDNAポリメラーゼIの2 $\mu$ lに対し、全量100 $\mu$ l中に約10～約350mU、好ましくは、約25～約200mU、より好ましくは約50～約150mUとなるように調製されたDNase Iの6 $\mu$ lが存在するようにすればよい。このとき、各酵素の容量および反応液全量などは、上記必須至適反応条件の比率が一定である限り、適宜変更しても良い。また、換言すれば、全量100 $\mu$ l中にDNAポリメラーゼIを20Uに対し、DNase Iを約10～約350mU、好ましくは、約25～約200mU、より好ましくは、約50～約150mUに調製すればよい。さらに換言すれば、1単位のDNAポリメラーゼIに対し、約0.5/1,000～約17.5/1,000、好ましくは、約1.25/1,000～約10/1,000、より好ましくは、約2.5/1,000～約7.5/1,000単位のDNase Iを用いてニックトランスレーション反応を行うと良い。また、DNA1 $\mu$ gに対してみれば、DNAポリメラーゼIを約10U、DNase Iを約5～約175mU、好ましくは、約12.5～約100mU、より好ましくは、約25～約75mUに調製すれば良い。他のプローブについては、上記至適反応条件を参考にしてDNA量、DNAポリメラーゼIおよびDNase Iの至適反応条件を決定することができ、また、効率よくラベル化し、外来微生物DNAと効率よく*in situ*ハイブリダイゼーションできるプローブ鎖長(約350～約600の塩基長)に調節することができる。

*In situ*ハイブリダイゼーションを行う際のストリンジентな条件とは、例えば、ホルムアミドが約30%～約60%、好ましくは、約50%の存在下、約30～約50、好ましくは、約38～約42 でインキュベートし、その後、洗浄する条件である。

10

20

30

40

50

In situハイブリダイゼーションを行った後、ブロッキングの操作を行っても良い。具体的には、湿潤箱内でスライドガラス1枚につきブロッキング試薬（ウサギ正常血清2ml、PBS原液0.5ml、滅菌精製水にて全量10mlに調製したもの）1mlを塗抹部位に滴下し、15～60分間静置する。その後、ブロッキング試薬を除去する。菌由来の遺伝子（ゲノムDNAまたはRNA）とハイブリダイズした結果に生じるシグナルの検出のためには、定法の抗原-抗体反応等を利用した呈色反応を行うとよい。すなわち、ハイブリダイゼーションを終えた試料を十分に洗浄した後に、ブロッキング操作を行い、次いで、抗FITC抗体、抗ジゴキシゲニン抗体などの接合物、例えば、アルカリホスファターゼ接合物を用いて処理し、次いで、接合物の発色系にてシグナルを発色し、ハイブリダイゼーションの状況を確認する。例えば、プローブとして前記のジゴキシゲニン-11-dUTPでラベルしたものをを用いた場合、抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼ接合物を用い、一般に使用されるアルカリホスファターゼに対する基質（ニトロブルーテトラゾリウムおよび5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート等）を利用して検出すればよい。次いで、呈色反応を行った後に洗浄した塗抹標本は、ナフトールブラック、Fast Green（20mg/50ml、Wako Chemicals社製）等で対比染色を行い、光学顕微鏡によって細胞内シグナルが観察される。

詳細には、ハイブリダイゼーションによるシグナルを得るには、例えば、検出用DNAプローブとしてジゴキシゲニン標識DNAプローブを用いる場合には、標識抗体（アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液1.05単位、バッファA（トリエタノールアミン746mg、塩化ナトリウム17.5mg、塩化マグネシウム6水和物20.3mg、塩化亜鉛1.36mg、ウシ血清アルブミン1000mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量100mlに調製したもの）12.6μlにて全量を14μlに調製したものを標識抗体希釈液（トリス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタン8.48mg、塩化ナトリウム6.14mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量0.7mlに調製したもので10～200倍希釈、好ましくは50倍希釈した標識抗体液を調製し、この標識抗体液を塗抹部位に10μlずつ滴下し、15～60分間静置すると良い。その後、標識抗体洗浄液（ポリソルベート20 1ml、PBS原液50ml、滅菌精製水にて全量100mlに調製したものを）を2～50倍、好ましくは、10倍に希釈した溶液に浸し、そのまま振とう機上で5～30分間浸透する。この操作を2回繰り返した後、発色前処理液1（トリス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタン6.06g、塩化ナトリウム2.92g、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量50mlに調製したものと発色前処理液2（塩化マグネシウム6水和物5.08g、滅菌精製水にて全量50mlに調製したものを）を等量混合し、滅菌精製水で5倍程度に希釈した発色前処理液に浸し、そのまま振とう機上で5～30分間振とうすれば良い。その後、スライドガラス1枚につき発色試薬（ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）/5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェイト（BCIP））1mlを0.2μmシリンジトップフィルターを装着したディスポーザブルシリンジを用いてろ過しながら、スライドガラスの塗抹部位に滴下し、湿潤箱内で約10～約45分間、好ましくは、約37℃で、約15～約60分間遮光静置する。その後、発色試薬洗浄液（トリス-（ヒドロキシメチル）-アミノメタン606mg、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム2水和物186mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量50mlに調製したものを）を約2～約50倍、好ましくは、約10倍に希釈した溶液に約2～約10分間浸し、風乾した後、対比染色液（ファストグリーンFCF（食用緑色3号）50mg、滅菌精製水適量にて全量50mlに調製したものを）を2～50倍、好ましくは10倍に希釈した溶液および、約0.1～約5%、好ましくは約1%の酢酸溶液に浸す。

その後、前記発色試薬洗浄液を約2～約50倍、好ましくは約10倍に希釈した溶液に再度浸して余分の前記対比染色液を洗い流し、完全に風乾すると良い。また、上記発色試薬は、別々に調製したものであっても良い。

アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液は、プロット用メンブレンにジゴキシゲニンラベルしたDNAの1ngをプロットし、ブロッキング後、10, 0

10

20

30

40

50

00倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液で処理し、発色基質(NBT/BCIP)を反応させるとDNAのプロット部位が発色し、ジゴキシゲニンラベルしていないDNAで同様の操作をしても発色は認められないものを使用するのが好ましい。また、抗ジゴキシゲニン抗体は、ヒツジ由来のものが好ましい。詳細には、免疫したヒツジ血清より、イオン交換クロマトグラフィーと抗体カラムクロマトグラフィーで精製すると良い。

発色試薬(NBT/BCIP溶液、pH9.0~10.0)は、ニトロテトラゾリウムブルー(NBT)3.3mg、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェイト(BCIP)1.65mg、N,N-ジメチルホルムアミド99 $\mu$ g、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン121mg、塩酸適量、塩化ナトリウム58.4mg、塩化マグネシウム6水和物101.6mg、滅菌精製水適量にて全量10mlに調製したものであるのが好ましい。

この発色試薬としては、アルカリフォスファターゼをラベルしたタンパク質をプロット用メンブレンにプロットし、当該発色試薬でメンブレンを遮光室温で処理すると、プロット部位に暗紫色のシグナルが現れるものを使用するのが好ましい。

上記した対比染色を行う場合に、シグナルと細胞のコントラストをさらに明確にさせるため、食用色素、例えば、黄色4号(タートラジン)を使用することができる。その理由は、基質によって紫色が呈色し、ナフトールブラックによって青色に呈色することから、類似色のために対比染色しづらいことが挙げられる。この方法を本発明に応用したところ、対比染色を行う際に有用であることが判明した。食用色素を用いるという手法は、これまでに無かった方法である。

ジゴキシゲニンを標識化する方法として、ニックトランスレーション法を用いることができる。その他に、PCR法、ランダムプライマーラベリング法、in vitroトランスクリプションラベリング法、ターミナルトランスフェラーゼラベリング法などを使用することができる。

判定は、光学顕微鏡で鏡検( $\times 1,000$ )するとき、上述した対比染色液により染まった単一ウェル内の細胞に於いて、青紫色の発色が1つでも認められた場合に陽性と判定するのがよい。

また、検出用プローブの作成方法として、日本国特許第2558420号、特許第2798499号、特許第2965543号、特許第2965544号および特許第3026789号などを参照することができる。

例えば、ワーキングセルバンクから釣菌して培養するには、ワーキングセルバンク(SA-24)を滅菌シャーレに作製した50 $\mu$ g/mlアンピシリン含有のL-プロス固形培地に、白金耳または使い捨てプラスチックループ等で画線塗抹する(釣菌)。

一晚培養した後に、シングルコロニーを採取し、50 $\mu$ g/mlアンピシリン含有のL-プロス培地5mlに植菌して、37 $^{\circ}$ Cで終夜振とう培養する(前培養)。

前記培地400ml入り培養用フラスコに、前培養液を2.5mlずつ植菌して、約37 $^{\circ}$ Cで終夜振とう培養する(本培養)。

次に、SA-24プラスミドDNAを抽出するには、本培養した培養液を、4、4、000 $\times$ gで10分間遠心分離して集菌する。培養上清を取り除き、STE(10mmol/lトリス塩酸(pH8.0)、1mmol/lエチレンジアミン-四酢酸2ナトリウム塩(EDTA)、0.1mmol/l塩化ナトリウム)を20ml加えて菌体を再懸濁し、4、4、000 $\times$ gで10分間遠心分離して集菌する。10mg/mlリゾチームを含む溶液-1(50mmol/lグルコース、25mmol/lトリス塩酸(pH8.0)、10mmol/l EDTA)5mlを加え、菌体を懸濁して室温で5分間放置する。溶液-2(0.2mmol/l水酸化ナトリウム、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS))10mlを加え、転倒混和して氷上で10分間放置する。氷冷した溶液-3(3mol/l酢酸カリウム(pH4.8))7.5mlを加え、転倒混和して氷上で10分間放置する。

高速冷却遠心機により、4、45、000 $\times$ gで30分間遠心分離した後、上清を回収

10

20

30

40

50

し、室温になるまで放置する。放置した後、0.6容量(約24ml)のイソプロパノールを加え、転倒混和して室温で15分以上放置する。高速冷却遠心機により、25、28,000×gで30分間遠心分離した後、上清を捨て、70%エタノールでペレットを洗浄して風乾する。風乾後、TE(10mmol/lトリス塩酸(pH8.0)、1mmol/l EDTA)を8ml加えて溶解する(プラスミドDNAの抽出)。

次に、SA-24含有プラスミドDNAの精製は、得られたプラスミドDNAに、10mg/mlエチジウムブロマイド800μlおよび塩化セシウム8.6gを加え、転倒混和して溶解させる。その溶解液を超遠心用チューブに入れ、キャップまたはシールをする。垂直型ローターにより、20、500,000×gで5時間超遠心した後、紫外線ライト照射下で注射筒または注射針を使用してプラスミドDNAのバンドを分取する。分取したプラスミドDNA溶液に、等量のTE飽和1-ブタノールを加えて転倒混和し、微量高速遠心機により、15,000×gで5分間遠心分離し、上清を取り除く。この操作を繰り返し、プラスミドDNA溶液中のエチジウムブロマイドを取り除く。次に、TEを加えて1.5mlとし、脱塩カラム(NAP-10)で脱塩する。脱塩したプラスミドDNA溶液に3mol/l酢酸ナトリウム溶液を30μl加えて混和した後、3倍量の99.5%エタノールを加えて転倒混和し、-20で30分以上放置する。放置後、微量冷却高速遠心機により、4、15,000×gで20分間遠心分離して上清を除いた後、冷70%エタノールを加えて懸濁し、再度、微量冷却高速遠心機により、4、15,000×gで20分間遠心分離して上清を除き、プラスミドDNAの沈渣を減圧下乾固させる。プラスミドDNAに100μlのTEを加えて完全に溶解させ、260nmの吸光度で濃度を測定する(SA-24含有プラスミドDNAの精製)。その後、SA-24含有プラスミドDNAの制限酵素処理およびアガロース電気泳動によるSA-24のサイズチェックを行う。

10

20

SA-24含有プラスミドDNAの制限酵素処理およびアガロース電気泳動によるSA-24の精製を行うには、分子量チェックの終了したSA-24含有プラスミドDNA1mgを、制限酵素HindIII単独もしくは他の制限酵素と組み合わせ、37で1.5時間以上の反応により消化する。プラスミドDNAを消化した後、反応液の一部を0.8%アガロースで電気泳動して、消化が完全に終了したことを確認する。消化を確認した後、分取用の0.8%アガロースゲルで電気泳動し、SA-24のバンドを採取する。採取したSA-24をアガロースゲルから抽出、精製して、吸光度計にて濃度を測定する。精製したSA-24の一部を0.8%アガロースゲルで電気泳動し、シングルバンドであることを確認する。

30

SA-24のラベル化を行うには、精製したSA-24の2μgを用い、以下の表1に記載の組成を有する反応液において、ジゴキシゲニンラベルを施すとよい。

表 1 : 標識付用反応液の組成

	配合量 ( $\mu\text{L}$ )
DNAプローブ	X
10×L.B. <sup>(a)</sup>	10
100mmol/L ジチオスレイトール	10
dNTPs <sup>(b)</sup> (A、G、C 0.5mmol/L)	4
ジゴキシゲニン-dUTP <sup>(c)</sup> (0.4mmol/L)	5
DNase I <sup>(d)</sup>	6
10U/ $\mu\text{L}$ DNAポリメラーゼ I	2
滅菌精製水	Y
合 計	100

## [凡例]

- (a) 10×L.B. : 0.5mol/L トリス塩酸 (pH 7.5)、  
50mmol/L 塩化マグネシウム、  
0.5mg/mL ウシ血清アルブミン
- (b) dNTPs : 0.5mmol/L 2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸、  
0.5mmol/L 2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸、  
0.5mmol/L 2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸
- (c) ジゴキシゲニン-dUTP : 0.4mmol/L ジゴキシゲニン-11-2'-デオキシ-  
ウリジン-5'-三リン酸
- (d) DNase I : デオキシリボヌクレアーゼ I を、全量100 $\mu\text{L}$ あたり50~150mUの  
使用量となるよう25mmol/L トリス塩酸 (pH 7.5)、50%グリセ  
リン溶液で希釈して上記配合量とする。

表 1 中、X は、プローブ原液の濃度に応じて上記好ましいプローブ濃度となるように添加することができる容量であり、この容量に伴い精製水量 Y を決定して最終容量を調整する。

ラベル化後、反応液に TE を 100  $\mu\text{l}$  加えて反応を停止させる。反応停止液をスピカラムに注入し、4、380 × g で 10 分間遠心分離して、遊離のヌクレオチドを除く。次に、溶出液の濃度を吸光度計により測定し、TE で 10 ng /  $\mu\text{l}$  に調製する。

ラベル化を確認するには、ラベルした SA - 24 の 0.5  $\mu\text{l}$  をメンブレンに滴下し、風乾する。ブロッキング試薬にメンブレンを浸し、室温で 30 分間ブロッキングする。0.1 mol / l トリス塩酸 (pH 7.5)、0.15 mol / l 塩化ナトリウムで 5,000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液に、メンブレンを室温で 30 分間浸す。0.1 mol / l トリス塩酸 (pH 7.5)、0.15 mol / l 塩化ナトリウムにメンブレンを浸し、室温で 10 分間振とうして 2 回洗浄する。0.5 mol / l トリス塩酸 (pH 9.5)、0.15 mol / l 塩化ナトリウム、50 mmol / l 塩化マグネシウムに、メンブレンを室温で 10 分間浸す。発色試薬にメンブレンを室温で遮光下、10 分間浸す。メンブレンを TE に浸し、発色を停止させる。スポット下部分の青紫色の発色で、ラベル化の確認を行う。

スピカラムを作製するには、1 ml のディスプレイブルシリンジに、少量の滅菌済みガラスウールを充填する。1 mmol / l トリス塩酸 (pH 7.5)、1 mmol / l の EDTA、0.1% SDS で膨潤させたセファデックス G - 50 をシリンジにつめる。15 ml のディスプレイブルコニカルチューブにシリンジを入れ、4、320 × g で 10 分

間遠心分離し、余分の緩衝液を落とす。ディスポーザブルコニカルチューブからシリンジを抜き、排出された緩衝液を捨てた後、1.5 mlのエピンドルフ型チューブをディスポーザブルコニカルチューブの底に入れ、その上にシリンジを入れて作製する。プローブの特異性を確認するため、以下の手順に従って、ドットプロットハイブリダイゼーションを行うとよい。

まず、スポットした各ゲノムDNAを変性するために、定法に従い0.5 mol/l水酸化ナトリウム、1.5 mol/l塩化ナトリウム溶液で飽和した濾紙(ワットマン社製3MM)上に、調製した各種細菌ゲノム100 ngをナイロンメンブレン(ポールバイオタイプB、日本ポール社製)にスポットし、風乾したメンブレンを10分間静置する。次に、0.5 mol/lトリス塩酸(pH7.5)、1.5 mol/l塩化ナトリウム溶液で飽和した前出の濾紙上に10分間静置して変性DNAを中和する。さらに、2×SSC(Standard Saline Citrate)溶液で飽和した前記濾紙上に5分間静置し、リンスする。その後、メンブレンを風乾し、2×SSC溶液にメンブレンを浸し、5分間浸透する。定法に従い、プラスチックバッグ内でプレハイブリタイゼーション溶液にメンブレンを浸し、42℃、60分間親和させる。プラスチックバッグ内で、プローブ400 ngを含むハイブリタイゼーション溶液15 ml内にメンブレンを浸し、42℃で、一晚反応させる。次に、2×SSC、0.1%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)溶液にメンブレンを浸し、5分間洗浄する(2回繰り返す)。その後、0.1×SSC、0.1%SDS溶液にメンブレンを浸し、60℃、10分間洗浄する(3回繰り返す)。2×SSC溶液にメンブレンを浸し、5分間洗浄する。メンブレンを3%ウシ血清アルブミン、1%ブロッキングバッファー(ベーリンガー社製)、0.1 mol/lトリス塩酸(pH7.5)、0.15 mol/l塩化ナトリウム溶液にメンブレンを浸し、30分間おだやかに振とうする。その後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体(ベーリンガー社製)を、0.1 mol/lトリス塩酸(pH7.5)、0.15 mol/l塩化ナトリウム溶液で5,000倍希釈した溶液にメンブレンを浸し、30分間おだやかに振とうする。次に、0.1 mol/lトリス塩酸(pH7.5)、0.15 mol/l塩化ナトリウム溶液にメンブレンを浸し、15分間振とうする(2回)。0.1 mol/lトリス塩酸(pH9.5)、0.1 mol/l塩化ナトリウム、5 mmol/l塩化マグネシウム溶液にメンブレンを浸し、5分間振とうする。NBT-BCIP溶液(GIBCO BRL社製)にメンブレンを浸し、遮光下で発色反応させる。TE(10 mmol/lトリス塩酸(pH8.0)、1 mmol/l EDTA)にメンブレンを浸し、発色反応を止め、風乾する。プレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液を、以下の表2に示す。

表 2

[単位: ml]

	プレハイブリダイゼーション溶液	ハイブリダイゼーション溶液
ホルムアミド	7.5	6.75
20×SSC溶液	3.75	3.75
100×デンハート溶液	0.75	0.15
0.5mol/Lリン酸緩衝液	0.75	0.6
滅菌蒸留水	1.5	1.95
10mg/mLサケ精子DNA	0.75	0.3
50%硫酸デキストラン	---	1.5
合計液量	15.0	15.0

In situハイブリダイゼーションの工程において使用される界面活性剤としては、

公知の界面活性剤が使用できる。界面活性剤は、アニオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤、カチオン界面活性剤および両性界面活性剤に大別される。

アニオン界面活性剤は、陰イオン界面活性剤とも呼ばれ、水中で電離して有機陰イオンとなるものである。界面活性剤の分子中の親油基をRとして表現すると、 $\text{RCOONa}$ 、 $\text{RSO}_3\text{Na}$ 、 $\text{RSO}_4\text{Na}$ などがある。 $\text{RCOONa}$ のように弱酸性基を含有する界面活性剤の水溶液は加水分解しやすく弱アルカリ性であるが、 $\text{RSO}_3\text{Na}$ 、 $\text{RSO}_4\text{Na}$ などの強酸性基を有する界面活性剤の水溶液は加水分解を受けにくく、中性となる。陰イオン性であるから、多量の陽イオン性物質の存在で界面活性を失うことがあり、また強酸性にした時にも失活する。

非イオン性界面活性剤は、親水基が非イオン性のものをいう。親水基として酸化エチレン基 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ) が多用され、この基の数が増える程親水性が増す。反対に、親油基の炭素数が増加すると、親油性が増加する。従って、親水性・親油性を様々に変化させた界面活性剤が得られるのが特徴である。非イオン性界面活性剤は、水中で電離せず、無機塩の影響も受けにくいので、生体に及ぼす作用も少ない。しかも、洗浄作用は、強力で、泡立ちは比較的少ない為、洗剤のみならず、医薬品、化粧品、食品などに広く使用される。水溶性の非イオン性界面活性剤は温度が上昇すると、ある温度で水に溶解しにくくなり、水溶液が濁り出すが、これは親水基と水との水素結合が切断されるために生じる。

10

カチオン界面活性剤は、陽イオン界面活性剤ともいう。水中で、電離して有機陽イオンとなるものである。カチオン界面活性剤は、一般に洗浄作用は大きくはないが、細菌などのアニオン性のものと強く結合するため、殺菌作用が大きい。また、繊維やプラスチックの帯電防止能もある。カチオン界面活性剤の代表的なもので、ドデシルトリメチルクロリド  $[\text{C}_{12}\text{H}_{25}(\text{CH}_3)_3\text{N}]\text{Cl}$  は水溶性であるが、ジドデシルジメチルアンモニウムクロリド  $[(\text{C}_{12}\text{H}_{25})_2(\text{CH}_3)_2\text{N}]\text{Cl}$  は水に溶解しにくく、水中では2

20

分子膜状のベシクルを形成し、ベンゼンには溶解する。両性界面活性剤は、分子内にアニオン基とカチオン基の両者を併せ持っている界面活性剤である。水溶液中での電離状態はアミノ酸に類似しており、両性界面活性剤には、アミノ酸誘導体が多く存在する。従って、アミノ酸と同様に等電点を有し、等電点よりアルカリ性側ではアニオン界面活性剤として、酸性側ではカチオン界面活性剤として作用する。等電点で水溶性は最低となり、表面張力も最も低下する。両性界面活性剤は、殺菌剤、帯電防止剤などに用いられる。

30

また、アニオン界面活性剤は、カルボン酸型、スルホン酸型、硫酸エステル型およびリン酸エステル型に分けられ、非イオン性界面活性剤は、エステル型、エーテル型、エステルエーテル型およびアルカノールアミド型に分けられる。カチオン界面活性剤は、アルキルアミン塩型および第四級アンモニウム塩型に分けられ、両性界面活性剤は、カルボキシペタイン型、2-アルキルイミダゾリンの誘導型およびグリシン型に分けられる。

さらに、アニオン界面活性剤のカルボン酸型は、脂肪酸モノカルボン酸塩、N-アシルサルコシン塩およびN-アシルグルタミン酸塩に細分される。それぞれの代表例として、脂肪酸モノカルボン酸塩には、ラウリン酸ナトリウムおよび薬用せっけんがあり、N-アシルサルコシン塩は、N-ラウロイルサルコシナトリウム、N-アシルグルタミン酸塩にN-ラウロイルグルタミン酸二ナトリウムがある。また、スルホン酸型は、ジアルキルスルホコハク酸塩、アルカンスルホン酸塩、アルファオレフィンスルホン酸塩、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル(分岐鎖)ベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸塩、ナフタレンスルホン酸塩-ホルムアルデヒド縮合物およびN-メチル-N-アシルタウリン塩に細分される。代表例として、ジアルキルスルホコハク酸塩は、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、アルカンスルホン酸塩は、ドデカンスルホン酸ナトリウム、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩には直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル(分岐鎖)ベンゼンスルホン酸塩はドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸塩はブチルナフタレンスルホン酸ナトリウム、N-メチル-N-アシルタウリン塩にはN-メチル-N-ステアロイルタウリンナトリウムがあ

40

50

る。また、硫酸エステル型は、アルキル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩および油脂硫酸エステル塩に細分される。代表例として、アルキル硫酸塩は、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびセチル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩はポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミンがある。また、リン酸エステル型は、アルキルリン酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸塩およびポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルリン酸塩に細分される。代表例を挙げると、アルキルリン酸塩には、モノラウリルリン酸二ナトリウムがある。ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸塩には、リン酸ナトリウムポリオキシエチレンラウリルエーテルおよびリン酸ポリオキシエチレンオレイルエーテル(8MOL)がある。

10

非イオン性界面活性剤のエステル型は、脂肪酸グリセリン、脂肪酸ソルビタンおよび脂肪酸シヨ糖エステルに細分される。それぞれの代表例として、脂肪酸グリセリンは、モノステアリン酸グリセリン、脂肪酸ソルビタンは、モノステアリン酸ソルビタン、トリオレイン酸ソルビタン、セスキオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、ポリソルベート20(ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル)、ポリソルベート60およびポリソルベート80、脂肪酸シヨ糖エステルはステアリン酸シヨ糖エステルがある。また、エーテル型は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールに細分される。代表例を挙げると、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとして、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテルおよびポリオキシエチレンセチルエーテルがあり、また、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとして、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルおよびポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルがある。また、エステルエーテル型は、脂肪酸ポリエチレングリコールおよび脂肪酸ポリオキシエチレンソルビタンに細分される。それぞれの代表例は、脂肪酸ポリエチレングリコールは、オレイン酸ポリエチレングリコール、脂肪酸ポリオキシエチレンソルビタンには、パルミチン酸ポリオキシエチレンソルビタンおよびポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートがある。また、アルカノールアミド型は、脂肪酸アルカノールアミドの1つのみである。代表例は、ラウリン酸ジエタノールアミドである。

20

カチオン界面活性剤のアルキルアミン塩型には、モノアルキルアミン塩、ジアルキルアミン塩およびトリアルキルアミン塩があり、代表例は、モノステアリルアミン塩酸塩である。また、第四級アンモニウム塩型は、塩化(または臭化、沃化)アルキルトリメチルアンモニウム、塩化(または臭化、沃化)ジアルキルジメチルアンモニウムおよび塩化アルキルベンザルコニウムに細分される。それぞれの代表例は、塩化(または臭化、沃化)アルキルトリメチルアンモニウムとして、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化(または臭化、沃化)ジアルキルジメチルアンモニウムとして、塩化ジステアリルジメチルアンモニウム、塩化アルキルベンザルコニウムは塩化ラウリルベンザルコニウムがある。

30

両性界面活性剤のカルボキシベタイン型は、アルキルベタインの1つのみである。代表例は、ラウリルベタインである。また、2-アルキルイミダゾリンの誘導型は、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインの1つのみである。代表例として、2-ウンデシル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインが挙げられる。また、グリシン型は、アルキル(又はジアルキル)ジエチレントリアミノ酢酸があり、代表例として、ジオクチルジエチレントリアミノ酢酸が挙げられる。

40

さらに、上記代表例に加えて、Triton X-100、ラウリルサルコシン、サポニン、BRJ35、アルキルアリルポリエーテルアルコール、高級アルコール硫酸化物、N-ココイル-L-アルギニンエチルエステルDL-ピロリドンカルボン酸塩、N-ココイル-N-メチルアミノエチルスルホン酸ナトリウム、コレステロール、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン、スクワラン、ステアリルアルコール、ステアリン酸ポリオキシシル40、セタノール、セトマクロゴール1000、セバシン酸ジエチル、ノニルフェノキシポリオキシエチレンエタン硫酸エステルアンモニウム、ポリオキシエチレンオレイルア

50

ミン、ポリオキシエチレンソルビットミツロウ、ポリオキシル35ヒマシ油、マクロゴール400、N-ヤシ油脂肪酸アシルL-アルギニンエチル・DL-ピロリドンカルボン酸塩、ラウリルジメチルアミノオキシド液、ラウロマクロゴール、メチルセルロース、CMC(カルボキシメチルセルロース)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油20およびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、CHAPS、デオキシコール酸、ジギトニン、n-ドデシルマルトシド、ノニデットP40、n-オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、ラウリル酸シュクロース、ドデシルポリ(エチレングリコールエーテル)n、n-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート等も挙げる事ができる。

上掲の各種界面活性剤は、*in situ*ハイブリダイゼーションの工程で使用されることが重要であり、その使用法は特に限定されない。例えば、プローブ液またはプローブ希釈液中に混合されていても良いし、プローブ液とは別に調製した界面活性剤を含有する溶液を、プローブ液を塗抹部位に塗布する前、同時または後に添加しても良いし、当業者は適宜変更することができる。

なお、本発明において、陽性コントロールプローブが必要であれば、次のように作製することができる。例えば、まず、U937細胞(ATCC CRL-1593.2)のゲノムDNAの抽出と精製を行うには、37、5%炭酸ガスインキュベーター内で、細胞培養フラスコ(175cm<sup>2</sup>)内のRPMI1640培地(25ml)を用い、U937細胞を培養する。U937培養液を50mlの遠沈管に入れ、4、220×gで10分間遠心分離し、U937細胞を回収する。細胞を10mlのPBSで懸濁洗浄し、再度4、180×gで10分間遠心分離し、細胞を回収する。その後、上清を捨て、細胞を1mlの200μg/mlプロテナーゼK含有1%SDS含有TE溶液で懸濁し、37で30分間放置する。フェノール抽出を3~4回繰り返す、除蛋白を行う。エタノール沈殿により析出したゲノムを回収し、500μlの2.5μgリボヌクレアーゼ含有滅菌精製水に溶解し、42で30分間放置する。

フェノール抽出を2~3回繰り返す、除蛋白を行う。エタノール沈殿により析出したゲノムを回収し、500μlのTEに溶解する。その後、吸光度計により濃度を測定し、ジゴキシゲニンラベルに供することにより、陽性コントロールプローブを作製することができる。また、陽性コントロールプローブは、U937ゲノムを100ngスポットしたメンブレンに、陽性コントロールプローブをドットハイブリダイゼーションするとき、ハイブリッド形成が確認できるものを用いるのがよい。陰性コントロールプローブが必要であれば、公知の方法で作製することができる。

#### 貪食サンプルの調製

以下に、本発明の貪食済み食細胞(以下、「貪食サンプル」と称する)を作製する具体的な方法を例示する。

使用材料としては、U937細胞(ヒト単球株化細胞:ATCC CRL-1593.2)、Staphylococcus aureus(ATCC 126000)、Staphylococcus epidermidis(ATCC 14990)、Pseudomonas aeruginosa(ATCC 10145)、Enterococcus faecalis(ATCC 19433)、Escherichia coli(ATCC 11775)、ヘパリン加健常人血液、ブレインハートインフュージョン(BHI)(DIFCO社製)、Fetal Bovine Serum(終濃度10%、GIBCO社製)およびAntibiotic-Antimycitic(終濃度1%、GIBCO社製)を含有するRPMI 1640(RPMI培地1640(GIBCO社製))などが必要である。

使用機器としては、炭酸ガスインキュベーター(タパイエスベック製:BNA-121D型)、冷却低速遠心機(ベックマン製:CS-6KR型)、血球計算盤(エルマ製:ブライトライン型)、振とう培養器(タイテック製:BR-300L型)、吸光度計(ベックマン製:DU68型)、恒温器(ヤマト科学製:IC-62型)、落射型倒立顕微鏡(ニコン製:DIAPHOT型)、蛍光顕微鏡(ニコン製:OPTIPHOT型)、CCD

カメラ（浜松フォトニクス製：C5810-01型）などが必要である。

まず、U937細胞の調製は、約20～約40、好ましくは、約37の5%炭酸ガスインキュベーター内で、細胞培養フラスコ（例えば、175cm<sup>2</sup>）中のRPMI 1640培地でU937細胞（ヒト単球株化細胞、ATCC CRL-1593.2）を培養する。細胞培養フラスコは、細胞が接着しやすい成分からなる物質を含むものが好ましい。次に、U937細胞培養液を遠沈管に入れ、0～約10、好ましくは、約4、約150～約350×g、好ましくは、約220×gで約10分間遠心分離し、U937細胞を回収した。その後、回収したU937細胞をPBSで懸濁し、血球計算盤で細胞数を計算し、細胞数を約1×10<sup>4</sup>個/μl～2×10<sup>4</sup>個/μlに調製するとよい。

細菌貪食サンプルを調製するには、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Pseudomonas aeruginosa、Enterococcus faecalisおよびEscherichia coliをBHI培養液（前出）に植菌し、約20～約40、好ましくは、約37で、6時間以上培養する。培養した菌液を、0～約10、好ましくは、4、例えば、2,000×gで約10分間遠心分離して集菌する。上清を捨てた後、菌のペレットをPBSを用いて懸濁し、再度4で、2,000×gで10分間遠心分離して集菌するのが好ましい。集菌した菌をPBSで懸濁した後、PBSにて希釈して吸光度計により菌液の濁度（O.D. = 600nm）を、約0.001～約0.1、好ましくは、約0.01～約0.03、特に、Staphylococcus aureusは、約0.01～約0.03、Staphylococcus epidermidisは、約0.01～約0.03、Pseudomonas aeruginosaは、約0.02～約0.03、Enterococcus faecalisは、約0.01～約0.03、Escherichia coliは、約0.02～約0.03にそれぞれ調製したものを作製するとよい。作製した菌液は、別々の培養用フラスコに移し、約30分間室温で静置した。ヘパリン加健常ヒト血液を採取し、前記血球分離試薬を4：1程度の割合で加え、約20～約40、好ましくは、約37で30分間静置し、白血球画分を分取する。分取した白血球画分をPBSにて懸濁する。培養用フラスコの上清を静かに捨て、PBSで希釈した白血球画分をフラスコに加え、室温で約10分間静置する。培養用フラスコ内の上清を捨て、フラスコの底に付着した白血球を、0.02% EDTA含有PBSを用いて遠沈管に回収し、例えば、4、約140～約180×gで10分間遠心分離し、白血球を収集する。収集した白血球中に赤血球の混入が認められる場合には、滅菌精製水にて白血球の沈渣を穏やかに懸濁して溶血させた後、PBSを加えて等張化を行い、再度4で、約140～約180×gで10分間遠心分離を行い、白血球を収集すればよい。収集した白血球をPBSにて懸濁し、血球計算盤にて細胞数を計測し、約1×10<sup>4</sup>個/μl～約5×10<sup>4</sup>個/μlに調製する。これら貪食サンプルを、それぞれSA貪食サンプル、SE貪食サンプル、PA貪食サンプル、EF貪食サンプル、EK貪食サンプルとする。

塗抹固定を行うには、調製したU937細胞と、上記のようにして作製した各細菌貪食サンプルをAPSコートスライドガラスの各ウェルに塗抹し、風乾させる。

各細菌貪食サンプルのスライドガラスに塗抹固定する細胞数は、約5.0×10<sup>4</sup>～約2.5×10<sup>5</sup>個/ウェル、U937細胞の細胞数は、約5.0×10<sup>4</sup>～約1.0×10<sup>5</sup>個/ウェルとするのが好ましい。固定は、カルノア固定液（前出）に20分間浸した後、75%エタノールに5分間浸し、カルノア固定液を洗浄して風乾させた後、試験に使用するまで4で保存すると良い。

貪食率の測定は、スライドガラスに塗抹固定した細菌貪食サンプルをアクリジンオレンジ染色液で染色し、蛍光顕微鏡（×1,000）で無作為に細胞約200個を計測する。計測した細胞の中で、細胞内に細菌を貪食している細胞を陽性細胞とし、以下の数式に従って貪食率（%）を算出する。

$$\text{貪食率（\%）} = [ (\text{陽性細胞数} / \text{計測細胞数}) \times 100 ]$$

第6図に、調製および鏡検にて観察した貪食細胞の様子を示している。

なお、カルノア固定、白血球細胞膜の透過性亢進処理、溶菌処理、細胞膜タンパク質のア

10

20

30

40

50

セチル化、菌体DNAのアルカリ処理、*in situ*ハイブリダイゼーション、ブロッキング、標識抗体との反応、検出、判定に至る具体的操作方法は、本明細書に記載した方法を用いると良い。

また、本発明には、外来微生物貪食済み食細胞を固定し、該食細胞膜の透過性を亢進させる処理を施し、該食細胞中に存在する外来微生物のDNAを露出させる処理を施し、該DNAにストリンジেন্টな条件下にてハイブリダイゼーションできる検出用DNAプローブを用いて界面活性剤の存在下に*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルにより食細胞機能を評価するためのキットであって、(1)外来微生物、(2)DNA露出工程において使用される、リゾスタフィン、リゾチーム、N-アセチルムラミダーゼおよびザイモラーゼからなる群より選択される少なくとも1種以上の酵素、なら

10

びに(3)1種以上の検出用DNAプローブを具備する、食細胞機能を評価するためのキットも含まれる。

このキットには、下記実施例にも示したように、血液分離試薬、酵素前処理試薬、酵素試薬、アセチル化試薬、プローブ液、ブロッキング試薬、標識抗体、標識抗体希釈液、発色前処理液-1、発色前処理液-2、発色試薬、対比染色液、PBS原液、ハイブリダイゼーション原液、標識抗体洗浄液、発色試薬洗浄液、APSコートスライドガラス、プローブ希釈液、バッファーA等が含まれる。これらのうち、少なくとも酵素試薬、プローブ液を含むことが好ましい。また、本発明に使用する各種試薬、例えば、クロロホルム、エタノール、無水酢酸、DMSO、PMSF、ホルムアミド、酢酸、塩酸、水酸化ナトリウム

20

等を含んでいてもよい。さらに、低速遠心機、恒温機、血球計算盤、振とう機、湿潤箱、恒温槽、光学顕微鏡、可変式ピペット、採血管、チップ、ピペット、染色ビン、メスシリンダー、注射筒、0.2 $\mu$ mシリンジトップフィルターの器具機械を含んでいてもよい。

また、本発明は、生体由来の食細胞を含む臨床検体中に含まれる、食細胞によって貪食された外来微生物の遺伝子をモニターする方法を提供する。

さらに、本発明は、原因菌の候補となる微生物の遺伝子を同定する工程を含み、同定された結果に基づいて敗血症原因菌または菌血症原因菌が特定されることを特徴とする方法を提供する。

ここで使用することができる臨床検体としては、生体由来の食細胞が含まれる臨床検体であれば良く、例えば、血液、組織液、リンパ液、脳脊髄液、膿、粘液、鼻水、痰などの体液が挙げられる。また、糖尿病、腎障害、肝障害などの病態によっては、尿、腹水、透析排液など、その他鼻腔、気管支、皮膚、各種臓器、骨などを洗浄した後の洗浄液にも生体由来の食細胞が含有されるため、これらも本発明の臨床検体として用いることができる。加えて、皮膚、肺、腎、粘膜などの組織も本発明の臨床検体として用いることができる。これは、食細胞の一つであるマクロファージには、単球、肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ、固定マクロファージ、遊離マクロファージ、ハンゼマンマクロファージ、炎症性マクロファージ、肝クッパー細胞、脳ミクログリア細胞などの様々な形態に変化するため、血液のみならず、これらを含む組織も本発明の臨床検体として用いることができる。例えば、腎炎が疑われる患者より腎生検により腎組織を採取し、トリプシン等の酵素を用いることにより細胞を剥離して該組織中に存在する食細胞を得、得られた食細胞を用いることによって、腎炎の原因微生物を検出および同定することができる。

30

40

この方法を様々なセプシスが疑われた患者血液の診断に実際に応用したところ、投与された抗菌薬の影響を受けることなく、血液培養法に比べて約4倍の感度で起因菌を検出することができ、検出菌株の一致率は良好であることが明らかになっている。そして、血液培養では検査に3日以上14日程度を要するのに比較して、本発明の方法では全操作完了までに約8時間と極めて短時間の内に、簡便な操作によって正確な結果を得ることができるので、特に、敗血症または菌血症など、速やかな善処が必要とされる感染症の診断や予後診断のモニター等において有用マーカーとなり得る。

本発明の一実施態様によれば、外来微生物貪食済み食細胞を使用することを特徴とする性能試験が提供されるが、その試験としては、食細胞機能の評価用キットの感度試験、特異性試験または再現性試験などが挙げられる。

50

これらの試験で、外来微生物貪食済み食細胞を陽性コントロールとして使用することができる。Staphylococcus aureusに対する性能試験に貪食サンプルを用いる場合には、特に、感度試験においては、Staphylococcus aureus貪食サンプルを用いて本明細書に記載したin situハイブリダイゼーションの方法に従って試験を行うときに、シグナルを検出できると規定すればよい。

また、特異性試験を行う場合には、各種細菌貪食サンプルを用い、本明細書に記載したin situハイブリダイゼーションの方法に従って試験を行うとき、Staphylococcus aureusにのみシグナルを検出できると規定すればよい。

また、再現性試験を行う場合には、特異性試験を同時に3回繰り返し試験するとき、得られる結果は同一であると規定すればよい。他の細菌、例えば、Staphylococcus epidermidis、Pseudomonas aeruginosa、Enterococcus faecalis、Escherichia coli、Enterobacter cloacae、Klebsiella pneumoniaeについても、上記性能試験を参考にして規定すればよい。

また、上記した感度試験、特異性試験および再現性試験などの性能試験において陽性コントロールとして貪食サンプルを用いる場合には、貪食サンプルの規格及び試験方法、すなわち、各細菌貪食サンプルのスライドグラスに塗抹固定する細胞数は、約 $5.0 \times 10^4$  ~ 約 $2.5 \times 10^5$ 個/ウェル、U937細胞の細胞数を、約 $5.0 \times 10^4$  ~ 約 $1.0 \times 10^5$ 個/ウェルとするのが好ましい。

さらにまた、貪食率の測定は、スライドグラスに塗抹固定した細菌貪食サンプルをアクリジンオレンジ染色液で染色し、蛍光顕微鏡( $\times 1,000$ )で無作為に細胞約200個を計測すると、第6図に示すような、貪食細胞に特異的な形態を観察することができる。従って、計測した細胞の中で、細胞内に細菌を貪食している細胞を陽性細胞とし、貪食率(%)を算出する。

貪食率(%) = [ (陽性細胞数 / 計測細胞数)  $\times$  100 ]

外来微生物に対する貪食機能の評価方法は、in situハイブリダイゼーションを行うことにより得られるシグナルのみならず、例えば、上記貪食率を用いて算出することによって評価しても良い。ゆえに、これらin situハイブリダイゼーション法および染色による形態観察に基づいて食細胞機能の評価方法を実施することができ、かかる評価方法は、生体の免疫機能の評価方法、食細胞への分化効率の評価方法、食細胞機能に対するモジュレーターの評価方法、スクリーニング方法、薬剤投与計画を検討する臨床検査方法にも利用できる。

免疫機能として好適なものに、白血球の生菌貪食能、特に、放射線照射または制癌剤投与後の患者の白血球の生菌貪食能が挙げられ、例えば、癌治療における化学療法剤等の投与に伴って低下する免疫力の増強や、臓器移植の際の拒絶反応抑制など、食細胞の機能を亢進あるいは拮抗させることを意図して特定の薬剤を投与した場合に、実際に体内でその薬剤が有効に作用しているかどうかをこの方法によって確認でき、従って、薬剤選択や投与量に対する有用な指針を提供することが可能となる。

さらに本発明の方法は、菌血症の分野における菌と食細胞との相互作用についての、基礎および臨床研究に寄与するという効果を奏するものであり、食細胞機能のモジュレーターの有効性確認や食細胞機能に対しモジュレーター作用を有する新規物質のスクリーニングにも使用することができる。この方法においてもやはり、如上の食細胞機能の評価方法を利用するので、従来法よりも高い信頼性をもって、アゴニストまたはアンタゴニスト等のモジュレーターによる、被験者に対する実質的な効果を見極めることができる。

そして、有効性、副作用等の点で大幅な個体差を生じることのあるモジュレーターによる特定の個体への効果が同定できるので、各患者に適合したオーダーメイド的な治療指針を決定する助けとなり得る。すなわち、被検者への薬剤投与前および投与後に被検者より食細胞を得、上記方法により当該食細胞の機能の評価し、その評価結果に基づいて判定される薬剤の効果から、薬剤投与計画を検討することを特徴とする臨床検査方法が提供される。

。

10

20

30

40

50

モジュレーターとしては、食細胞の分化を促進または抑制させる物質、食機能を促進または抑制させる物質など、直接的または間接的に食細胞に關与する物質であれば特に限定されない。例えば、G - C S G、抗ガン剤、抗生物質、免疫機能賦活剤、白血球分化因子等が挙げられる。

#### 実施例

以下に、本発明を実施例に沿って具体的に説明するが、これら実施例の開示によって本発明が限定的に解釈されるべきでないことは勿論である。

#### 実施例 1：採血・血液検体の処理

臨床検体として、敗血症が疑われた患者より採取した血液 12 検体（検体 A ~ L）を用いた。各患者からヘパリン加静脈血 10 ml を採取し、これら血液と血液分離試薬（塩化ナトリウム 225 mg、デキストラン（分子量：200,000 ~ 300,000）1.5 g、滅菌精製水にて全量 25 ml に調製したものを）を 4 : 1 の割合で混和した後、37 で、30 分間静置することにより、白血球画分（上層）を取得した。この白血球画分を、4 にて 160 × g で 10 分間遠心分離することで、白血球を得た。次に、得られた白血球のペレットに滅菌精製水 1 ml を加えて懸濁し、直ちに過剰量の P B S（塩化ナトリウム 18.24 g、リン酸一水素ナトリウム 12 水和物 6.012 g、リン酸二水素ナトリウム 2 水和物 1.123 g、滅菌精製水にて全量 120 ml にしたもの（P B S 原液）を、滅菌精製水にて 20 倍に希釈したものを）を加えて等張化した後、再度 4 で、160 × g で 10 分間遠心分離した。

10

#### 実施例 2：白血球の固定

3 - アミノプロピルトリエトキシシラン（A P S、S I G M A 社）がスライドガラス（日本エアブラウン社製、商品番号 M S 3 1 1 B L）にコートされた A P S コートスライドガラスを使用した。A P S コートスライドガラスの作製は、まず、スライドホルダーにスライドガラス（商品番号 M S 3 1 1 B L）を固定した後、希釈した中性洗剤で 30 分以上浸すことにより洗浄し、水道水で洗剤を十分に取り除き、次に、スライドガラスを精製水にて洗浄し、高温（100 以上）で十分に乾燥させた後、室温で放置冷却した。その後、このスライドガラスを 2 % A P S 含有アセトンに 1 分間浸し、直ちにアセトン及び滅菌精製水で順次軽く洗浄した後、風乾した。さらに、再度、スライドガラスを 2 % A P S 含有アセトンに 1 分間浸し、直ちにアセトン及び滅菌精製水で、順次軽く洗浄した後、風乾する操作を行った後、42 で乾燥させることにより作製した。

20

30

白血球画分を、4 にて、160 × g で 10 分間遠心分離して得た白血球ペレットに、少量の P B S を加えて懸濁し、血球計算盤を用いて白血球数を計測する。細胞数が  $1 \times 10^5$  個 / ウェルとなるように P B S で調製した白血球懸濁液 5  $\mu$  l を、A P S コートスライドガラスの各ウェルに白血球が単層に広がるように塗抹し、完全に風乾することにより、白血球を A P S コートスライドガラスに支持させた。その後、カルノア固定液（エタノール：クロロホルム：酢酸 = 6 : 3 : 1 の容量比で混合した液）に 20 分間浸した後、75 % エタノール液に 5 分間浸し、完全に風乾させた。

#### 実施例 3：白血球細胞膜の透過性亢進処理

P B S に 10 分間浸し、その後、酵素前処理試薬（サポニン 1.25 g、t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（比重 1.068 ~ 1.075（20 / 4））、p H（5 w / v %）5.5 ~ 7.5）1.25 ml、P B S 原液 25 ml を混合し、滅菌精製水にて全量 50 ml に調製したものを）を滅菌精製水で 10 倍に希釈した溶液に浸し、振とう機で 10 分間浸透させた。

40

#### 実施例 4：菌体壁の溶菌酵素処理

感染症原因菌の DNA を露出させるため、スライドガラス 1 枚につき酵素試薬（N - アセチルムラミダーゼ 1,000 単位 / ml、リゾチーム 100,000 単位 / ml および / またはリゾスタフィン 100 単位 / ml）に酵素試薬溶解液（P B S で 0.1 mol / l フェニルメチルスルフォニルフルオリド（P M S F）含有ジメチルスルフォキシド（D M S O）を 100 倍希釈して製したものを）を 1 ml 加えて酵素試液を調製した後、37 ~ 42 の湿潤箱内で、酵素試液 1 ml を白血球塗抹部位に滴下し、30 分間静置した。

50

その後、 $0.2 \text{ mol/l}$  塩酸含有 PBS (PBS 原液に塩酸を加え、滅菌精製水にて 20 倍希釈し、塩酸の終濃度を  $0.2 \text{ mol/l}$  に調製したもの) に浸し、そのまま振とう機上で 10 分間浸透させた。

#### 実施例 5：細胞膜タンパク質のアセチル化

アセチル化試薬 (トリエタノールアミン  $7.46 \text{ g}$ 、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量  $50 \text{ ml}$  としたもの) に無水酢酸を加え、滅菌精製水で 10 倍希釈し、無水酢酸の終濃度を  $0.8\%$  に調製したアセチレーション試薬にスライドグラスを浸し、振とう機上で 10 分間振とうすることにより行った。その後、 $75\%$ 、 $85\%$ 、 $98\%$  エタノールに、順次、3 分間ずつ浸し、完全に風乾させた。

#### 実施例 6：菌体 DNA のアルカリ処理 (二本鎖 DNA を一本鎖に変性)

スライドグラスを、 $70 \text{ mmol/l}$  水酸化ナトリウム含有 PBS (PBS 原液に水酸化ナトリウムを加え、滅菌精製水で 20 倍希釈し、水酸化ナトリウムの終濃度を  $70 \text{ mmol/l}$  に調製したもの) に 3 分間浸すことにより行った。その後、 $75\%$ 、 $85\%$ 、 $98\%$  エタノールに、順次、3 分間ずつ浸し、完全に風乾させた。

#### 実施例 7：ハイブリダイゼーション

プローブ希釈液 ( $0.25\%$  SDS、サケ精子 DNA  $600 \mu\text{l}$ 、 $100\times$  デンハート溶液  $50 \mu\text{l}$ 、ハイブリダイゼーション原液  $500 \mu\text{l}$ 、ホルムアミド  $2250 \mu\text{l}$ 、 $50\%$  硫酸デキストラン  $1000 \mu\text{l}$  が含まれる) で調製したジゴキシゲニン標識 DNA プローブ  $15 \text{ ng}$  を含有する液 (プローブ液;  $1.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) を塗抹部位に塗布し、 $37 \sim 42$  の湿潤箱中で 2 時間静置させた。SDS 無添加のプローブ液を対照とした。ジゴキシゲニン標識 DNA プローブは、ニックトランスレーション法にて作製した。その後、ハイブリダイゼーション洗浄液 (ハイブリダイゼーション原液 (塩化ナトリウム  $13.15 \text{ g}$ 、クエン酸三ナトリウム 2 水和物  $6.615 \text{ g}$ 、滅菌精製水にて全量  $75 \text{ ml}$  に調製したもの) を、ハイブリダイゼーション原液: 滅菌精製水: ホルムアミド =  $5:45:50$  の割合で混合して調製したもの) を 3 つの染色ビンに用意し、順次、 $42$  で 10 分間ずつ浸した。

その後、PBS に浸して、そのまま振とう機上で 10 分間振とうさせた。ジゴキシゲニン標識 DNA プローブとして、*Staphylococcus aureus* および *Staphylococcus epidermidis* に対するプローブとして、SA-24 (配列番号: 1)、SA-36 (配列番号: 2) および SA-77 (配列番号: 3) ならびに SE-22 (配列番号: 4)、SE-3 (配列番号: 5) および SE-32 (配列番号: 6) (日本国特許第 2798499 号参照) の各プローブを利用した。また、*Pseudomonas aeruginosa* に対するプローブとして、P2-2 (配列番号: 7) (日本国特許第 2965544 号参照) のプローブを利用した。また、*Enterococcus faecalis* に対するプローブとして、EF-1 (配列番号: 8)、EF-27 (配列番号: 9) および EF-7 (配列番号: 10) (日本国特許第 2965543 号参照) を利用した。そして、*Escherichia coli*、*Enterobacter cloacae* および *Klebsiella pneumoniae* に対するプローブとして、EC-24 (配列番号: 11)、EC-34 (配列番号: 12) および EC-39 (配列番号: 13) ならびに ET-49 (配列番号: 14) および KI-50 (配列番号: 15) (日本国特許第 3026789 号参照) を利用した。さらに、*Candida albicans* に対するプローブとして、CA-26 (配列番号: 16)、CA-26-1 (配列番号: 17)、CA-26-2 (配列番号: 18) および CA-26-3 (配列番号: 19) (日本国特許第 2558420 号参照) を利用した。これらプローブの配列を用いて、ニックトランスレーション法によりプローブの作製を行った。

#### 実施例 8：ブロッキング

In situ ハイブリダイゼーションを行った後、ブロッキングの操作を行った。湿潤箱内でスライドグラス 1 枚につきブロッキング試薬 (ウサギ正常血清  $2 \text{ ml}$ 、PBS 原液  $0.5 \text{ ml}$ 、滅菌精製水にて全量  $10 \text{ ml}$  に調製したもの)  $1 \text{ ml}$  を塗抹部位に滴下し、

30分間静置した。その後、ブロッキング試薬を除去した。

#### 実施例 9：標識抗体との反応

標識抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液 1.05 単位、バッファー A（トリエタノールアミン 746 mg、塩化ナトリウム 17.5 mg、塩化マグネシウム 6 水和物 20.3 mg、塩化亜鉛 1.36 mg、ウシ血清アルブミン 1000 mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量 100 ml に調製したもの） 12.6  $\mu$ l にて全量を 14  $\mu$ l に調製したものを）を標識抗体希釈液（トリス -（ヒドロキシメチル） - アミノメタン 8.48 mg、塩化ナトリウム 6.14 mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量 0.7 ml に調製したもので 50 倍希釈した標識抗体液を調製し、この標識抗体液を塗抹部位に 10  $\mu$ l ずつ滴下し、30分間静置させた。その後、標識抗体洗浄液（ポリソルベート 20 1 ml、PBS 原液 50 ml、滅菌精製水にて全量 100 ml に調製したものを）を 10 倍に希釈した溶液に浸して、そのまま振とう機上で 10 分間浸透させた。この操作を 2 回繰り返した後、発色前処理液 1（トリス -（ヒドロキシメチル） - アミノメタン 6.06 g、塩化ナトリウム 2.92 g、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量 50 ml に調製したものと発色前処理液 2（塩化マグネシウム 6 水和物 5.08 g、滅菌精製水にて全量 50 ml に調製したものとを等量混合し、滅菌精製水で 5 倍に希釈した発色前処理液に浸し、そのまま振とう機上で 10 分間振とうさせた。

10

#### 実施例 10：検出

スライドガラス 1 枚につき発色試薬（ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）/ 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルフォスフェイト（BCIP）溶液、pH 9.0 ~ 10.0 : NBT 3.3 mg、BCIP 1.65 mg、N, N - ジメチルホルムアミド 99  $\mu$ g、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 121 mg、塩酸適量、塩化ナトリウム 58.4 mg、塩化マグネシウム 6 水和物 101.6 mg、滅菌精製水適量にて全量 10 ml に調製したもの） 1 ml を 0.2  $\mu$ m シリンジトップフィルターを装着したディスプレイブルシリンジを用いてろ過しながら、スライドガラスの塗抹部位に滴下し、湿潤箱内で、37、30分間遮光静置した。その後、発色試薬洗浄液（トリス -（ヒドロキシメチル） - アミノメタン 606 mg、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 2 水和物 186 mg、塩酸適量、滅菌精製水適量にて全量 50 ml に調製したものを）を 10 倍に希釈した溶液に 5 分間浸し、風乾した後、対比染色液（ファストグリーン FCF（食用緑色 3 号） 50 mg、滅菌精製水適量にて全量 50 ml に調製したものを）を 10 倍に希釈した溶液および 1% 酢酸溶液に浸した。その後、前記発色試薬洗浄液を 10 倍に希釈した溶液に再度浸して余分の前記対比染色液を洗い流し、完全に風乾させた。

20

30

#### 実施例 11：判定

判定は、光学顕微鏡で鏡検（ $\times 1,000$ ）するとき、単一ウェル内で対比染色液によって染まった細胞に於いて、青紫色の発色シグナルが 1 つでも認められた場合に陽性と判定した。その結果、本発明の方法により、12 検体中 5 検体で菌を検出した。5 検体の内訳は、検体 A - SA（*Staphylococcus aureus*）、検体 F および G - SE（*Staphylococcus epidermidis*）、検体 J - SE および EF（*Enterococcus faecalis*）、検体 L - SA および CA（*Candida albicans*）であった。なお、同じ検体を用いて、公知の方法に従い血液培養を行ったところ、検体 A は SA を検出し同一の結果を示したが、検体 F、G、J および L は菌を検出することができなかった。従って、本発明の方法が、血液培養と比較して、迅速に感度よく検出できることが判明した。

40

検体 A - SA における結果に関し、プローブ希釈液への SDS の添加の効果を、第 1 図に示した。第 1 図から、SDS を 0.25% 添加することで、シグナルの検出感度が格段に高められることが明らかである。その他の検体についても同様に、SDS を添加することで良好なシグナル検出が可能となった。なお、本実施例において使用したプローブは、SA - 24（配列番号：1）、SA - 36（配列番号：2）および SA - 77（配列番号：3）の塩基配列を組み合わせ用い、ニックトランスレーションによって作製したプローブである。

50

### 実施例 1 2 : 塗抹固定する至適白血球数の検討

A P S コートスライドガラスのウェル ( 直径 5 m m の円形ウェル ) に塗抹する至適白血球数を検討した。ヘパリン加健常ヒト血液 1 0 m l を採取し、実施例 1 に記載の手順に従って白血球を採取した。次に、得られた白血球を適量の P B S で懸濁した後、血球計算盤を用いて 1 m l 当たりの白血球数を測定し、( a )  $1 \times 10^8$  個 / m l を始点として、( b )  $5 \times 10^7$  個 / m l 、( c )  $1 \times 10^7$  個 / m l 、( d )  $5 \times 10^6$  個 / m l 、( e )  $1 \times 10^6$  個 / m l 、( f )  $5 \times 10^5$  個 / m l および ( g )  $1 \times 10^5$  個 / m l の希釈系列を作成した後、各々 5  $\mu$  l をスライドガラスに塗抹した。風乾後、カルノア固定 ( 実施例 2 参照 ) を行い、直ちに前記対比染色液で染色し、実施例 1 1 に記載した方法を用いて判定した。その結果、細胞数が  $1 \times 10^8$  個 / m l では細胞数が過剰であり、検出不適であった。また、 $5 \times 10^6$  個 / m l 以下では、ウェルに観察される細胞数が少なく、検出不適であった。よって、固定化する食細胞の密度 ( x 個 / m l ) としては、約  $5 \times 10^6$  個 / m l < x 個 / m l < 約  $1 \times 10^8$  個 / m l 、とりわけ、約  $1 \times 10^7$  個 / m l x 個 / m l 約  $5 \times 10^7$  個 / m l が好ましい。また、それに対応して、A P S コートスライドガラスに固定される 1 ウェル当たりの白血球の細胞数 ( y 個 / ウェル ( 直径 5 m m ) ) は、約  $2.5 \times 10^4$  個 / ウェル < y 個 / ウェル ( 直径 5 m m ) < 約  $5 \times 10^5$  個 / ウェル、好ましくは、約  $5 \times 10^4$  個 / ウェル y 個 / ウェル ( 直径 5 m m ) 約  $2.5 \times 10^5$  個 / ウェルとなるように調製するのが良いことが判明した。試料 ( a ) ~ ( f ) に関する実験結果を、第 2 図 ( a ) ~ ( f ) にそれぞれ示した。

10

### 実施例 1 3 : 使用溶菌酵素の選択

*Staphylococcus aureus* ( A T C C 1 2 6 0 0 ) 、*Staphylococcus epidermidis* ( A T C C 1 4 9 9 0 ) 、*Pseudomonas aeruginosa* ( A T C C 1 0 1 4 5 ) 、*Enterococcus faecalis* ( A T C C 1 9 4 3 3 ) 、*Escherichia coli* ( A T C C 1 1 7 7 5 ) を溶菌する酵素条件を検討した。*Staphylococcus aureus* および *Staphylococcus epidermidis* では、溶菌酵素としてリゾスタフィン ( *Bur. J. Biochem.* , 3 8 , 2 9 3 - 3 0 0 , 1 9 7 3 ) を使用した。*Enterococcus faecalis* には、N - アセチルムラミダーゼ ( *Archs. Oral Biol.* , 2 3 , 5 4 3 - 5 4 9 , 1 9 7 8 ) 、リゾチーム ( 生化学工業 ) を使用した。また、*Pseudomonas aeruginosa* および *Escherichia coli* については、7 0 m m o l / l の水酸化ナトリウム含有 P B S を使用した。これら各種細菌を 5 m l の B H I ( プレインハートインフュージョン ) 液体培地 ( D I F C O 社製 ) に植菌し、3 7 ° C で 8 時間以上培養した。培養した菌液を、4 ° C 、 2 , 0 0 0 x g で 1 0 分間遠心分離して集菌した。集めた菌を P B S で懸濁して試料とした。

20

30

溶菌はマイクロプレートリーダーを用い、吸光度 6 0 0 n m における菌液の濁度の減少により評価した。その結果、*Staphylococcus aureus* および *Staphylococcus epidermidis* は、リゾスタフィンにより溶菌した。*Pseudomonas aeruginosa* および *Escherichia coli* については、7 0 m m o l / l の水酸化ナトリウム含有 P B S で溶菌したため、酵素処理は必要としなかった。また、*Enterococcus faecalis* については、N - アセチルムラミダーゼ単独よりもリゾチームと併用した方が優れた溶菌活性が得られることが判明した。また、貪食作用を受けて取り込まれた菌が、例えば、*Pseudomonas aeruginosa* および *Escherichia coli* などである場合には、アルカリ処理に際して菌の細胞壁が溶解され、遺伝子が露出した状態となるので、必ずしもこの酵素処理を行う必要はない。本発明において外来微生物を溶解するために使用される前処理用の各酵素は、前述した細菌株に対して有効であるのみならず、他のスタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、バシルス属およびマイクロコッカス属を初めとする他の菌種等でも有効である。また、かような酵素は、各々単独で用いることもできるが、混合した場合の方が有効である。それら結果を、第 3 図、具体的には、( a ) S t

40

50

*aphylococcus aureus* および *Staphylococcus epidermidis*、(b) *Pseudomonas aeruginosa* および *Escherichia coli*、ならびに (c) *Enterococcus faecalis* について示した。

実施例 14：酵素溶解液に関する検討（DMSOの至適濃度の検討）

酵素試薬に含有されるプロテアーゼは、白血球の形態を劣化させることから、白血球の形態を保持させるために添加する PMSF の溶解剤である DMSO の酵素活性に及ぼす影響を検討した。*Enterococcus faecalis* を、50 ml の前記 BHI 液体培地に植菌し、37 °C で、8 時間以上培養した。この培養液を、4 °C、2,000 × g で 10 分間遠心分離して集菌し、PBS で懸濁した後、オートクレーブ（120 °C、10 分）により熱処理を行った。次に、4 °C、2,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清を捨て、1 ml の PBS で沈渣を懸濁させた後、凍結乾燥させた。この凍結乾燥試料を 0 ~ 10 % DMSO 含有 5 mmol / l トリス - 塩酸 (pH 6.0)、2 mmol / l 塩化マグネシウムで懸濁し、N - アセチルムラミダーゼに対する試料とした。また、*Micrococcus luteus* (JCM 1464) を、5 ml の BHI 液体培地（前出）に植菌し、37 °C で 8 時間以上培養した。培養した菌液を、4 °C、2,000 × g で 10 分間遠心分離して集菌した。上清を捨て、菌のペレットを PBS 5 ml で懸濁洗浄し、再度 4 °C、2,000 × g で 10 分間遠心分離して集菌した。このようにして集めた菌を、0 ~ 10 % DMSO 含有 PBS で懸濁し、リゾチームに対する試料とした。一方、*Staphylococcus epidermidis* をリゾチームの場合と同様に培養、集菌し、0 ~ 10 % DMSO 含有 PBS で懸濁し、リゾスタフィンに対する試料とした。酵素活性は、マイクロプレートリーダーを用い、吸光度 600 nm における試料の濁度の減少により評価した。ただし、本試験中それぞれの酵素力価は、(a) N - アセチルムラミダーゼ 300 単位 / ml、(b) リゾチーム 10,000 単位 / ml、(c) リゾスタフィン 50 単位 / ml とし、酵素活性に対する DMSO の影響を検討した。それぞれの酵素活性を単位時間当たりにおける菌濁度 (O.D. = 600 nm) の減少で評価した結果、DMSO は、N - アセチルムラミダーゼ活性に対しては殆ど影響を与えなかったが、リゾチームおよびリゾスタフィンに対しては、共に 5 % 以上の DMSO で活性の低下が認められた。また、2 % 以下の DMSO の濃度では、酵素活性の低下は認められなかった。ゆえに、PMSF を溶解させる DMSO 濃度は少なくとも 5 % 未満、好ましくは 2 % 以下、さらには 1 % 程度とするのが好ましい。その結果を、第 4 図 (a) ~ (c) および下記表 3 に示した。

表 3：酵素活性（菌濁度の減少）に対する DMSO の影響

DMSO 添加量 (%)	N-アセチルムラミダーゼ O.D./5 分間	リゾチーム O.D./3 分間	リゾスタフィン O.D./10 分間
0 (対照)	79.3 ± 4.8	0.689 ± 0.028	0.168 ± 0.017
0.1	75.0 ± 3.2	0.678 ± 0.026	0.164 ± 0.009
1	75.8 ± 2.8	0.660 ± 0.026	0.160 ± 0.008
2	75.8 ± 2.5	0.653 ± 0.024	0.145 ± 0.009
5	76.3 ± 4.9	0.566 ± 0.017	0.124 ± 0.006
10	73.8 ± 3.5	0.464 ± 0.016	0.094 ± 0.006

実施例 15：酵素溶解液に関する検討（PMSFの至適濃度の検討）

酵素試薬に含有されるプロテアーゼは白血球の形態を劣化させることから、白血球の形態を保持させるために添加する PMSF (PIERCE 社製) の効果を検討した。100 μl の DMSO (和光純薬社製) に PMSF を溶解し、PMSF の終濃度が無添加 (0 mmol / l) ~ 1 mmol / l となるように PBS で 10 ml に希釈した。この溶液に、プ

ロテアーゼの力価が0.2単位/mlとなるよう、プロテイナーズK(ベーリンガーマンハイム社製)を添加した。ヘパリン加健常ヒト血液5mlを採取し、実施例1に記載の方法に従って白血球を採取した。次に、白血球を適量のPBSで懸濁して、血球計算盤で細胞数を計測し、細胞数を、約 $5 \times 10^4$ 個/ウェル~約 $2.5 \times 10^5$ 個/ウェルに調製し、その5 $\mu$ lをAPSコートスライドガラスのウェルに塗抹し、風乾後、実施例2に記載のカルノア固定の方法に従って固定した。このサンプルを用いて、実施例3~11に記載の方法に従って試験を行った。1 $\mu$ mol/l~1mmol/lのPMSFの濃度で試験を実施した結果、10 $\mu$ mol/l以上の濃度で効果が認められ、0.1mmol/l以上のPMSF濃度では、白血球の形態の劣化が完全に抑制されていた。その結果を、第5図の(a)プロテアーゼ0.2単位/mlのみ、(b)PMSF1 $\mu$ mol/ml添加(c)PMSF10 $\mu$ mol/ml添加、(d)PMSF0.1mmol/ml添加、および(e)PMSF1mmol/ml添加についてそれぞれ示した。

10

#### 実施例16：溶菌酵素ザイモラーゼの至適力価の検討

カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)を溶菌してDNAを露出させるためのザイモラーゼの至適力価を検討した。カンジダ・アルビカンスをYPD培地に植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一昼夜培養した。その後、基質としてカンジダ・アルビカンスをPBSで懸濁した溶液(基質1)、およびカルノア固定後、70%エタノールに浸し、風乾し、PBSにて懸濁した溶液(基質2)の2種類を調製した。反応は、ザイモラーゼ/PBS:0.5ml、基質:1.5ml、M/15リン酸緩衝液:2.5ml、滅菌精製水:0.5mlにて全量5.0mlに調製したものをを用いた。

20

その後、37 $^{\circ}$ Cで、2時間反応させ、そのOD<sub>600</sub>を測定した。また、ザイモラーゼ(ザイモリエイス-100T)濃度は、0mg/ml、0.01mg/ml、0.025mg/ml、0.05mg/ml、0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、2.5mg/ml、5mg/mlを用いた。その結果、基質1を用いた場合のそれぞれのOD<sub>600</sub>値は、0.533、0.521、0.553、0.554、0.548、0.417、0.394、0.288、0.163、0.113であり、また、基質2を用いた場合のそれぞれのOD<sub>600</sub>値は、0.445、0.411、0.359、0.282、0.232、0.146、0.115、0.096、0.08、0.057であった。基質1および基質2がともに、0.5mg/ml~5mg/ml、特に、1mg/ml~5mg/mlの範囲で有効であることが判明した。すなわち、ザイモラーゼの使用量は、50単位/ml~500単位/ml、特に100単位/ml~500単位/mlであることが好ましい。

30

#### 実施例17：至適酵素処理条件(力価)の検討

##### (1) 貪食サンプルの作製

###### 1 U937細胞の調製

37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内で、細胞培養フラスコ(175cm<sup>2</sup>)中のRPMI1640培地(25ml)でU937細胞(ヒト単球株化細胞、ATCC CRL-1593.2)を培養した。次に、U937細胞培養液を50mlの遠沈管に入れ、4 $^{\circ}$ C、220 $\times$ gで10分間遠心分離し、U937細胞を回収した。その後、回収したU937細胞をPBS200 $\mu$ lで懸濁し、血球計算盤で細胞数を計算し、細胞数を $1 \times 10^4$ 個/ $\mu$ l~ $2 \times 10^4$ 個/ $\mu$ lに調製した。

40

###### 2 細菌貪食サンプルの調製

*Staphylococcus aureus*(ATCC 12600)、*Staphylococcus epidermidis*(ATCC 14990)、*Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 10145)、*Enterococcus faecalis*(ATCC 19433)および*Escherichia coli*(ATCC 11775)を、各々5mlのBHI培養液に植菌し、37 $^{\circ}$ Cで8時間以上培養した。培養した菌液を、4 $^{\circ}$ C、2,000 $\times$ gで10分間遠心分離して集菌した。上清を捨てた後、菌のペレットをPBS5mlで懸濁し、再度、4 $^{\circ}$ C、2,000 $\times$ gで10分間遠心分離して集菌した。集菌した菌をPBS5mlで懸濁した後、PBSにて希釈

50

して吸光度計により菌液の濁度 ( $O.D. = 600\text{nm}$ ) を、*Staphylococcus aureus* ( $0.01 \sim 0.03$ )、*Staphylococcus epidermidis* ( $0.01 \sim 0.03$ )、*Pseudomonas aeruginosa* ( $0.02 \sim 0.03$ )、*Enterococcus faecalis* ( $0.01 \sim 0.03$ )、*Escherichia coli* ( $0.02 \sim 0.03$ ) にそれぞれ調製したものを  $15\text{ml}$  作製した。作製した菌液は、個別の  $175\text{cm}^2$  の培養用フラスコに移し、 $30$  分間室温で静置した。ヘパリン加健常ヒト血液  $50\text{ml}$  を採取し、血球分離試薬を  $4:1$  の割合で加え、 $37^\circ\text{C}$  で  $30$  分間静置し、白血球画分を分取した。分取した白血球画分を  $\text{PBS}$  で  $50\text{ml}$  にした。培養用フラスコ (前出) の上清を静かに捨て、 $\text{PBS}$  で希釈した白血球画分を  $10\text{ml}$  ずつフラスコに加え、室温で  $10$  分間静置した。培養用フラスコ内の上清を捨て、フラスコの底に付着した白血球を  $0.02\%$  EDTA 含有  $\text{PBS}$   $10\text{ml}$  で  $15\text{ml}$  の遠沈管に回収し、 $4^\circ\text{C}$ 、 $140 \times g \sim 180 \times g$  で  $10$  分間遠心分離し、白血球を収集した。収集した白血球中に赤血球の混入が認められたので、滅菌精製水  $1\text{ml}$  にて白血球の沈渣を穏やかに懸濁して溶血させた後、 $\text{PBS}$  を  $14\text{ml}$  加えて等張化を行い、再度  $4^\circ\text{C}$ 、 $140 \times g \sim 180 \times g$  で  $10$  分間遠心分離を行い、白血球を収集した。収集した白血球を  $\text{PBS}$  で懸濁し、血球計算盤にて細胞数を計測し、 $1 \times 10^4$  個/ $\mu\text{l}$   $\sim 5 \times 10^4$  個/ $\mu\text{l}$  に調製した。この貪食サンプルを、それぞれ *SA* 貪食サンプル、*SE* 貪食サンプル、*PA* 貪食サンプル、*EF* 貪食サンプル、*EK* 貪食サンプルとした。

10

### 3 塗抹固定

20

実施例 17 (1) 1 で調製した *U937* 細胞と、実施例 17 (1) 2 で作製した各細菌貪食サンプルとを  $\text{APS}$  コートスライドガラスの各ウェルに  $5\mu\text{l}$  ずつ塗抹し、風乾させた。次に、実施例 2 に記載のカルノア固定液に  $20$  分間浸した後、 $75\%$  エタノールに  $5$  分間浸し、カルノア固定液を洗浄して風乾させた後、試験に使用するまで  $4^\circ\text{C}$  で保存した (実施例 2 参照)。次いで、固定サンプルの前処理を、実施例 3 に従って行った。

#### (2) 貪食サンプルの規格及び試験方法

##### 1 細胞数

各細菌貪食サンプルのスライドガラスに塗抹固定する細胞の数を、 $5.0 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$  個/ウェルとし、また、*U937* 細胞の細胞の数を  $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$  個/ウェルとした。

30

##### 2 貪食率

スライドガラスに塗抹固定した細菌貪食サンプルを、アクリジンオレンジ染色液で染色し、蛍光顕微鏡 ( $\times 1,000$ ) で無作為に約  $200$  個の細胞を計測した。計測した細胞の中で、細胞内に細菌を貪食している細胞 (第 6 図で矢印にて示す、貪食に特徴的な形態変化が認められた細胞) を陽性細胞とし、以下の数式に従ってその貪食率 (%) を算出した。

$$\text{貪食率}(\%) = [(\text{陽性細胞数} / \text{計測細胞数}) \times 100]$$

この時に算出した各細菌貪食サンプルの貪食率 (%) は、 $10\%$  以上であった。

##### 3 試験方法

実施例 17 (2) 1 および 2 で作成した貪食サンプルを検体とした。使用した *SA* 貪食サンプルの貪食率は  $23\%$  であり、 $1.98 \times 10^5$  個/ウェルであった。*SE* 貪食サンプルの貪食率は  $27\%$  であり、 $1.74 \times 10^5$  個/ウェルであった。また、*EF* 貪食サンプルの貪食率は  $34\%$  であり、 $6.40 \times 10^4$  個/ウェルであった。

40

各貪食サンプルを塗抹したスライドガラスを用いて、実施例 3 に記載の方法に従って、酵素前処理を行った。次に、酵素前処理済みのスライドガラスを湿潤箱に置き、各種力価に調製した各酵素溶液  $1\text{ml}$  を検体塗抹部位に滴下して反応させた。その後、 $0.2\text{mol/l}$  塩酸含有  $\text{PBS}$ 、 $70\%$  エタノールにそれぞれ  $10$  分間浸し、風乾させた。このスライドガラスを、 $70\text{mmol/l}$  水酸化ナトリウム含有  $\text{PBS}$  に  $3$  分間、 $70\%$  エタノールに  $10$  分間浸した後に風乾し、 $1\%$  アクリジンオレンジ染色液で染色した。その後、蛍光顕微鏡 ( $\times 1,000$ ) により評価した。*Staphylococcus aureus*

50

sおよび*Staphylococcus epidermidis*は、リゾスタフィンで至適力価の検討を行った。*Enterococcus faecalis*は、N-アセチルムラミダーゼとリゾチームの併用で至適力価を検討するため、N-アセチルムラミダーゼを100単位/mlに固定した場合のリゾチーム至適力価の検討と、リゾチームを10,000単位/mlに固定した場合のN-アセチルムラミダーゼ至適力価の検討を行った。判定は、酵素処理により菌体が白血球中に確認されなくなるとき「適」とした。

#### 4 結果

*Staphylococcus aureus*の溶菌においては、表4に記載のように、リゾスタフィンの力価は1単位/mlで十分効果を示すが、*Staphylococcus epidermidis*の溶菌においては、10単位/ml以上のリゾスタフィン力価が必要であった。ゆえに、リゾスタフィンの至適力価を、10単位/ml~100単位/mlに設定した。また、*Enterococcus faecalis*の溶菌においては、リゾチームの力価を10,000単位/mlで固定したとき、N-アセチルムラミダーゼ力価が10単位/ml以下では溶菌されなかった。リゾチームについては、表5に記載の通り、N-アセチルムラミダーゼ力価を100単位/mlに固定したとき、リゾチーム力価が1,000単位/ml以下では溶菌されなかった。ゆえに、N-アセチルムラミダーゼの至適力価は、100単位/ml~1,000単位/ml、また、リゾチームの至適力価は、10,000単位/ml~100,000単位/mlに設定した。その結果を、第7図に示すが、図中、(a)は酵素処理前の*Staphylococcus aureus*の貪食サンプル、(b)は処理前の*Enterococcus faecalis*の貪食サンプル、(c)はサンプル(a)を酵素処理した後、および(d)はサンプル(b)を酵素処理した後の様子を示している。

表4：S. aureus、S. epidermidisに対する  
リゾスタフィンの至適酵素処理力価

リゾスタフィン力価 (U/mL)		食食サンプル						
		0	0.1	1	10	100	1,000	
SA食食サンプル	1回	不適	不適	適	適	適	適	
	2回	不適	不適	適	適	適	適	
	3回	不適	不適	適	適	適	適	
SE食食サンプル	1回	不適	不適	不適	適	適	適	
	2回	不適	不適	不適	適	適	適	
	3回	不適	不適	不適	適	適	適	

表5：E. faecalisに対するN-アセチルムラミダーゼおよび  
リゾチームの至適酵素処理力価

N-アセチルムラミダーゼ力価 (U/mL)		食食サンプル					
		0	1	10	100	1,000	10,000
E F 食食サンプル	1回	不適	不適	不適	適	適	適
	2回	不適	不適	不適	適	適	適
	3回	不適	不適	不適	適	適	適
リゾチーム力価 (U/mL)		食食サンプル					
		0	10	100	1,000	10,000	100,000
E F 食食サンプル	1回	不適	不適	不適	不適	適	適
	2回	不適	不適	不適	不適	適	適
	3回	不適	不適	不適	不適	適	適

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における上記各酵素の至適力価も同一とした。

#### 実施例18：至適酵素処理条件（温度）の検討

各食食サンプルを塗抹したスライドグラスを用いて、実施例17(2) 3 に記載の方法に準じて検討した。ただし、本試験の酵素処理時間は30分、検討温度は4、25、37、42、60とし、また、各酵素力価は、N-アセチルムラミダーゼ(100単位/mL、生化学工業社製)、リゾチーム(10,000単位/mL、生化学工業社製)、リゾスタフィン(10単位/mL、SIGMA社製)とした。

判定は、実施例17(2) 3 に記載の方法に準じて行った。その結果、Staphylococcus aureusは、4～60の温度範囲で白血球の菌体は確認されなかった。Staphylococcus epidermidisは、処理温度4および25では白血球中の菌体が残存していたが、37以上では菌体を確認されなかった。

また、Enterococcus faecalisでは、処理温度4、25および60で菌体が残存していたが、37および42では確認されなかった。ゆえに、至適酵素処理温度を37～42に設定した。その結果を、表6に示した。

表6：酵素試薬の至適処理温度

処理温度 (°C)		食食サンプル				
		4	25	37	42	60
S A 食食サンプル	1回	適	適	適	適	適
	2回	適	適	適	適	適
	3回	適	適	適	適	適
S E 食食サンプル	1回	不適	不適	適	適	適
	2回	不適	不適	適	適	適
	3回	不適	不適	適	適	適
E F 食食サンプル	1回	不適	不適	適	適	不適
	2回	不適	不適	適	適	不適
	3回	不適	不適	適	適	不適

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における酵素処理の至

適温度も同一とした。

#### 実施例 19：至適酵素処理条件（時間）の検討

実施例 17 (1) 1 および 2 に記載の方法で作成した貪食サンプルを検体とした。検討した時間は、0分、10分、20分、30分、60分、120分とした。使用した SA 貪食サンプルの貪食率は 18% であり、 $7.80 \times 10^4$  個/ウェルであった。SE 貪食サンプルの貪食率は 34% であり、 $1.10 \times 10^5$  個/ウェルであった。また、EF 貪食サンプルの貪食率は 28% であり、 $1.30 \times 10^5$  個/ウェルであった。各貪食サンプルを塗抹したスライドグラスを用いて、実施例 17 (2) 3 に記載の方法に準じて検討した。但し、本試験の酵素処理温度は 37、各酵素力価は N-アセチルムラミダーゼ (100 単位/ml)、リゾチーム (10,000 単位/ml)、リゾスタフィン (10 単位/ml) とした。判定は、実施例 17 (2) 3 に記載の方法に準じて行った。その結果、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Enterococcus faecalis 貪食サンプルともに酵素処理時間 20 分以上 (0 分および 10 分においては不適であった) で、白血球中に菌体は確認されなかったことから、少なくとも 15 分以上、好ましくは 20 分以上、さらに至適酵素処理時間を 30 分～60 分とするのが好ましい。その結果を、表 7 に示した。

10

表 7：酵素試薬の至適処理時間

酵素処理時間 (分)		貪食サンプル					
		0	10	20	30	60	120
SA 貪食サンプル	1 回	不適	不適	適	適	適	適
	2 回	不適	不適	適	適	適	適
	3 回	不適	不適	適	適	適	適
SE 貪食サンプル	1 回	不適	不適	適	適	適	適
	2 回	不適	不適	適	適	適	適
	3 回	不適	不適	適	適	適	適
EF 貪食サンプル	1 回	不適	不適	適	適	適	適
	2 回	不適	不適	適	適	適	適
	3 回	不適	不適	適	適	適	適

貪食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における酵素処理の至適時間も同一とした。

#### 実施例 20：プローブ濃度の検討

本発明の in situ ハイブリダイゼーション反応において、プローブ濃度はハイブリッド形成速度に影響を与える主要な因子である。プローブ濃度が低すぎると反応速度の低下を招き、シグナルが明確でなくなる可能性がある。また、過剰量のプローブの使用は、非特異的反応の原因に繋がる。

40

ゆえに、各種プローブ液について、至適濃度を検討した。まず、実施例 17 (1) 1 および 2 に記載の方法で作成した貪食サンプルを検体とした。使用した SA 貪食サンプルの貪食率は 24% であり、 $1.48 \times 10^5$  個/ウェルであった。SE 貪食サンプルの貪食率は 28% であり、 $2.07 \times 10^5$  個/ウェルであった。PA 貪食サンプルの貪食率は 11% であり、 $1.59 \times 10^5$  個/ウェルであった。また、EF 貪食サンプルの貪食率は 24% であり、 $1.72 \times 10^5$  個/ウェルであった。EK 貪食サンプルの貪食率は 12% であり、 $1.63 \times 10^5$  個/ウェルであった。各貪食サンプルを塗抹したスライドグラスを用いて、実施例 17 (2) 3 に記載の方法に準じて検討した。プローブは、ジゴキシゲニン標識したものを使用し、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Enterococcus

50

*us faecalis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Escherichia coli*に対する各プローブ濃度を、それぞれ、 $0.06 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $2.4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ に調製した。食食サンプルを塗抹したスライドグラス（第8図参照）に、上記各種濃度に調製したプローブ液を使用し、実施例3～11に記載の方法に従い検討した。

その結果、低濃度（ $0.06 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ）ではシグナルが明確でなくなり、一方で、高濃度（ $2.4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ および $3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ）ではバックグラウンドの増大が認められた。ゆえに、SA、SE、PA、EF、EKのプローブ濃度を $0.6 \sim 1.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、好ましくは $0.6 \sim 1.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ とした。また、 $0.06 \text{ ng}/\mu\text{l}$ においては不適であり、 $0.6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ においては適であったことから、少なくとも $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 以上とするのが好ましい。

さらに、 $2.4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ においては不適であり、 $1.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ においては適であったことから、 $2.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 以下とするのが好ましい。その結果を、以下の表8～表12に示した。

表8：SAプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
SA食食サンプル	—	+	+	+	+	+
SE食食サンプル	—	—	—	—	+	+
PA食食サンプル	—	—	—	—	+	+
EF食食サンプル	—	—	—	—	+	+
EK食食サンプル	—	—	—	—	+	+

表9：SEプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
SA食食サンプル	—	—	—	—	—	+
SE食食サンプル	—	+	+	+	+	+
PA食食サンプル	—	—	—	—	—	+
EF食食サンプル	—	—	—	—	—	+
EK食食サンプル	—	—	—	—	—	+

表10：PAプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
SA食食サンプル	—	—	—	—	—	—
SE食食サンプル	—	—	—	—	+	+
PA食食サンプル	—	+	+	+	+	+
EF食食サンプル	—	—	—	—	—	+
EK食食サンプル	—	—	—	—	—	+

表 1 1 : E Fプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 (ng/μL)					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
SA食食サンプル	-	-	-	-	-	+
SE食食サンプル	-	-	-	-	+	+
PA食食サンプル	-	-	-	-	+	+
EF食食サンプル	-	+	+	+	+	+
EK食食サンプル	-	-	-	-	-	-

表 1 2 : E Kプローブ

食食サンプル	プローブ濃度 (ng/μL)					
	0.06	0.6	1.2	1.8	2.4	3
SA食食サンプル	-	-	-	-	+	+
SE食食サンプル	-	-	-	-	+	+
PA食食サンプル	-	-	-	-	+	+
EF食食サンプル	-	-	-	-	+	+
EK食食サンプル	-	+	+	+	+	+

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定における上記各プローブの至適濃度も同一とした。

#### 実施例 2 1 : ハイブリダイゼーション温度の検討

ハイブリダイゼーション反応における反応温度は、ハイブリッド形成速度とハイブリッドの安定性に影響を与えるパラメーターである。ハイブリダイゼーション反応を高温にすると細胞の形態が劣化することが知られていることから、至適温度の検討(4、25、37、42、50、60)を行った。

まず、実施例 1 7 (1) 1 および 2 に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。使用した SA 食食サンプルの食食率は 31% であり、 $1.38 \times 10^5$  個/ウェルであった。SE 食食サンプルの食食率は 42% であり、 $1.95 \times 10^5$  個/ウェルであった。PA 食食サンプルの食食率は 14% である、 $1.27 \times 10^5$  個/ウェルであった。また、EF 食食サンプルの食食率は 48% であり、 $1.05 \times 10^5$  個/ウェルであった。EK 食食サンプルの食食率は 17% であり、 $1.85 \times 10^5$  個/ウェルであった。

食食サンプルおよび U 9 3 7 細胞を塗抹固定したスライドガラス(第 9 図参照)を使用して、実施例 3 ~ 1 1 に記載の方法に従い検討した。その結果、ハイブリダイゼーション温度が 4 以下ではハイブリッド形成速度が低下し、各種プローブで安定なシグナルが観察されなかった。また、60 においては細胞形態の変化が認められ、安定なシグナルが観察されなかった。

また、25 および 50 では 37 および 42 に比べ、シグナルが明確でなかったが検出することは可能であった。ゆえに、至適ハイブリダイゼーションの温度は、25 ~ 50、より好ましくは 37 ~ 42 に設定すると良い。それら結果を、以下の表 1 3 ~ 表 1 7 に示した。

表13 : SAプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
SA食食サンプル	-	+	+	+	+	+
SE食食サンプル	-	-	-	-	-	-
PA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EF食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EK食食サンプル	-	-	-	-	-	-

表14 : SEプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
SA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
SE食食サンプル	+	+	+	+	+	-
PA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EF食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EK食食サンプル	-	-	-	-	-	-

表15 : PAプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
SA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
SE食食サンプル	-	-	-	-	-	-
PA食食サンプル	-	+	+	+	+	-
EF食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EK食食サンプル	-	-	-	-	-	-

表16 : EFプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
SA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
SE食食サンプル	-	-	-	-	-	-
PA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EF食食サンプル	+	+	+	+	+	-
EK食食サンプル	-	-	-	-	-	-

表17 : EKプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション温度 (°C)					
	4	25	37	42	50	60
SA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
SE食食サンプル	-	-	-	-	-	-
PA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EF食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EK食食サンプル	-	+	+	+	+	-

貪食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定におけるハイブリダイゼーションの至適温度も同一とした。

#### 実施例 22：ハイブリダイゼーション時間の検討

実施例 17 (1) 1 および 2 に記載の方法で作成した貪食サンプルを検体とし、10分、60分、90分、120分、180分、900分間のハイブリダイゼーション時間について検討した。使用したSA貪食サンプルの貪食率は47%であり、 $1.45 \times 10^5$ 個/ウェルであった。SE貪食サンプルの貪食率は47%であり、 $1.33 \times 10^5$ 個/ウェルであった。PA貪食サンプルの貪食率は15%である、 $1.91 \times 10^5$ 個/ウェルであった。また、EF貪食サンプルの貪食率は41%であり、 $1.45 \times 10^5$ 個/ウェルであった。EK貪食サンプルの貪食率は20%であり、 $1.23 \times 10^5$ 個/ウェルであった。

貪食サンプルおよびU937細胞を塗抹固定したスライドグラス(第9図に示すものと同じ)を使用して、実施例3~11に記載の方法に従い検討した。

その結果、ハイブリダイゼーション時間が10分ではシグナルが観察されなかったが、60分以上でシグナルが観察され、90分以上で安定したシグナルが観察された。また、ハイブリダイゼーション時間が900分においてもシグナルの検出には変化は認められなかった。ゆえに、少なくとも30分以上、好ましくは60分以上、より好ましくは90分以上とするのが好ましい。さらに好ましい至適ハイブリダイゼーション時間は、120分~900分に設定すると良い。それら結果を、以下の表18~表22に示した。

表18：SAプローブ

貪食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
SA貪食サンプル	-	+	+	+	+	+
SE貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
PA貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
EF貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
EK貪食サンプル	-	-	-	-	-	-

表19：SEプローブ

貪食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
SA貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
SE貪食サンプル	+	+	+	+	+	+
PA貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
EF貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
EK貪食サンプル	-	-	-	-	-	-

表20：SEプローブ

貪食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
SA貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
SE貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
PA貪食サンプル	-	+	+	+	+	+
EF貪食サンプル	-	-	-	-	-	-
EK貪食サンプル	-	-	-	-	-	-

表 2 1 : E Fプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
SA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
SE食食サンプル	-	-	-	-	-	-
PA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EF食食サンプル	+	+	+	+	+	+
EK食食サンプル	-	-	-	-	-	-

表 2 2 : EKプローブ

食食サンプル	ハイブリダイゼーション時間 (分)					
	10	60	90	120	180	900
SA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
SE食食サンプル	-	-	-	-	-	-
PA食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EF食食サンプル	-	-	-	-	-	-
EK食食サンプル	-	+	+	+	+	+

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明の臨床検体の感染症原因微生物同定におけるハイブリダイゼーションの至適時間も同一とした。

#### 実施例 2 3 : ハイブリダイゼーション溶液に添加する界面活性剤の影響

実施例 1 7 ( 1 ) 1 および 2 に記載の方法で作成した食食サンプルを検体とした。プローブ希釈液に各種界面活性剤 ( SDS、ラウリスサルコシン、サポニン、BRIJ 35、Tween 20、Triton X-100 ) を添加し、実施例 7 に従ってハイブリダイゼーションを行ったところ、0.25%のSDSを添加することにより検出感度が飛躍的に増強された。また、ラウリルサルコシン、BRIJ 35、ツイーン 20 ( Tween 20 ) によって検出感度を高めることができた。その結果を、以下の表 2 3 に示した。

30

表 2 3

界面活性剤	シグナル検出
無添加	+
SDS	+++
ラウリルサルコシン	++
サポニン	+
BRIJ 35	++
Tween 20	++
Triton X-100	+

さらに、SDSを種々の濃度で用いた結果、好ましい濃度は、1%以下、より好ましくは0.1%~0.5%、さらに好ましくは0.25%であることが明らかになった。

食食サンプルを用いて得られたこれら結果を本発明に応用したところ、同一の結果を得ることができた。ゆえに、本発明においても *in situ* ハイブリダイゼーションの工程に界面活性剤、特に、SDSを添加するのが好ましい。

50

実施例 24：ハイブリダイゼーションの際に使用するプローブ鎖長の検討

*Staphylococcus aureus* プローブ (SA-24 (配列番号：1)) および *Pseudomonas aeruginosa* プローブ (P2-2 (配列番号：7)) を、ジゴキシゲニンでラベル化した。

まず、精製した各種 DNA プローブ 1  $\mu$ g を、10  $\times$  L.B. (0.5 mol/l トリス塩酸 (pH 7.5) 5  $\mu$ l、50 mmol/l 塩化マグネシウム、0.5 mg ウシ血清アルブミン) 5  $\mu$ l、100 mmol/l ジチオスレイトール 5  $\mu$ l、dNTPs (A、G、C) 各 1 nmol、ジゴキシゲニン-dUTP (Dig-dUTP) 0.5 nmol、dTTP 各 0.5 nmol、DNase 3  $\mu$ l (25 mU、75 mU および 200 mU 相当量)、10 U/ $\mu$ l DNA ポリメラーゼ 1  $\mu$ l および滅菌精製水適量にて全量 50  $\mu$ l となるように調製した。15、2 時間でジゴキシゲニンラベル化を行った。ラベル化後、5 分間煮沸し反応を停止させた。反応停止液をスピンカラム (CENTRI-SEP COLUMNS CS901、PRINCETON SEPARATIONS, INC.) に注入し、25 で 2 分間遠心分離 (3,000  $\times$  g) を行い、遊離のヌクレオチドを除去した。その後、溶出液の濃度を吸光度計により測定し、3% アガロースゲルにて電気泳動しサイズを確認した。

次に、サザンブロッティング法によりアガロースゲル内の DNA をニトロセルロース膜に転写させた。その後、2% ブロッキング試薬 (ロシュ社製) に 30 分間浸した後、1/5,000 量のアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を加え、30 分間浸した。次に、100 mmol/l のトリス塩酸 (pH 7.5)、150 mmol/l 塩化ナトリウムにて 10 分間振とうし、2 回洗浄した。その後、100 mmol/l のトリス塩酸 (pH 9.5)、150 mmol/l 塩化ナトリウムにて 10 分間振とうして洗浄した。その後、NBT/BCIP 溶液に浸して発色させた。

最後に、精製水に浸し発色を止めて乾燥させた。その結果、第 10 図の (a) SA プローブ使用時および (b) PA プローブ使用時についてそれぞれ示すように、25 mU の DNase (図中、レーン 1) を用いて、その鎖長が、主として約 350 ~ 約 600 塩基長に分布するように切断した場合に、ラベル効率が高いことが示された。こうして得られた検出用プローブを、貪食サンプルや感染症患者からの臨床検体を用いた本発明の感染症原因微生物の検出方法において使用し、ハイブリダイゼーションを行ったところ、優れた感度でシグナルが検出された。従って、ハイブリダイゼーションに使用するプローブの鎖長は、約 350 ~ 約 600 の塩基長、好ましくは、約 350 ~ 約 550 の塩基長とすることが良いものと判明した。

実施例 25：ハイブリダイゼーションの際に使用するプローブの検討

実施例 17 (1) 1 および 2 に記載の方法で作成した、*Escherichia coli* の貪食サンプルを検体として、検出用プローブについての検討を行った。

検出用プローブは、EC-24 (配列番号：11)、EC-34 (配列番号：12) および EC-39 (配列番号：13) から、実施例 24 に記載したようにジゴキシゲニンラベル化し、約 350 ~ 約 600 塩基長を有するように調製したものを、それぞれ単独または 3 種を組み合わせて使用した。得られた結果から、第 11 図に示すとおり、(a) EC-24、(b) EC-34 または (c) EC-39 のそれぞれを単独で検出用プローブとして用いるよりも、(d) これらを混合してなる混合プローブ「MIX」の方がシグナルが明瞭に検出され、感度が高められることが明らかであった。

実施例 26：種々の細菌量における本発明の貪食サンプルを用いた外来微生物の検出法と血液培養法との検出力の比較

実施例 13 に記載の *S. aureus*、*S. epidermidis* または *Enterococcus faecalis* を、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$

CFU/ml の濃度で健常人血液に混和し、インキュベーション後、臨床検体の感染症原因微生物の同定キット (ハイブリゼップ [商品名; 扶桑薬品工業株式会社]) 及び公知の方法に従う血液培養法により試験を実施した。また、広域スペクトルを持つピペラシリン (PIPC) を 10 MIC の濃度で各細菌を接触させた後、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、

10<sup>1</sup>、10<sup>0</sup> CFU/mLの濃度で健常人血液に混和し、同様に試験を実施した。その結果を、以下の表24～表26に示す。

表24

		Staphylococcus aureus					
		菌濃度(CFU/mL)					
		10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>
PIPC未処理	本願方法	+	+	+	+	+	-
	血液培養	+	+	+	+	+	-
PIPC処理	本願方法	d	+	+	+	-	-
	血液培養	d	+	+	-	-	-

d:実施せず

表25

		Staphylococcus epidermidis					
		菌濃度(CFU/mL)					
		10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>
PIPC未処理	本願方法	+	+	+	+	-	-
	血液培養	+	+	+	+	+	-
PIPC処理	本願方法	d	+	+	+	-	-
	血液培養	d	-	-	-	-	-

d:実施せず

表26

		Enterococcus faecalis					
		菌濃度(CFU/mL)					
		10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0</sup>
PIPC未処理	本願方法	+	+	+	+	-	-
	血液培養	+	+	+	+	+	-
PIPC処理	本願方法	d	+	+	+	-	-
	血液培養	d	+	+	-	-	-

d:実施せず

上記結果から明らかな通り、抗生剤処理を施した細菌を用いた試験では、血液培養法は抗生剤未処理の場合に検出できた細菌量においても細菌を検出されなかったが、ハイブリゼップを用いることにより抗生剤の影響を受けずに細菌を検出できた。

#### 実施例27：感度試験の確認

本発明の性能試験のうち、感度試験に貪食サンプルが使用できるか否か検討した。なお、各種操作方法は、実施例2～11に記載の手順に従った。

貪食サンプルとして、SA貪食サンプル、SE貪食サンプル、PA貪食サンプル、EF貪食サンプル、EK貪食サンプルを用いた。各貪食サンプルは、実施例17に記載した方法により作製した。SA貪食サンプルは、貪食率29%、細胞数が1.05×10<sup>5</sup>個/ウェルであり、「適」と判定した。SE貪食サンプルは、貪食率が47%、細胞数が1.51×10<sup>5</sup>個/ウェルであり、「適」と判定した。PA貪食サンプルは、貪食率が19%、細胞数が1.99×10<sup>5</sup>個/ウェルであり、「適」と判定した。EF貪食サンプルは、貪食率が33%、細胞数が1.25×10<sup>5</sup>個/ウェルであり、「適」と判定した。EK貪食サンプルは、貪食率が19%、細胞数は1.13×10<sup>5</sup>個/ウェルであり、「適」と判定した。

第12図に示すように、貪食サンプルを塗抹したスライドグラスを用い、実施例2～3に記載の手順に従って試験を行った。

SA、SE、PA、EFおよびEKの各貪食サンプルを1キットにつき3度試験を行い、また当該試験を3キット行ったところ、表27および第13図(a)~(e)に示すように、すべての貪食サンプルにおいて菌を検出することができた。ゆえに、貪食サンプルを実施例1~11に示す方法の感度試験に有用であることを証明した。ゆえに、実施例1~11に示す方法の感度試験の規格を、既知細菌の貪食サンプルを用い、実施例2~11に記載の手順に従って試験するとき、シグナルを検出できるものと規定した。

表27

貪食サンプル	回数	キット1	キット2	キット3
SA貪食サンプル	1	SA検出	SA検出	SA検出
	2	SA検出	SA検出	SA検出
	3	SA検出	SA検出	SA検出
SE貪食サンプル	1	SE検出	SE検出	SE検出
	2	SE検出	SE検出	SE検出
	3	SE検出	SE検出	SE検出
PA貪食サンプル	1	PA検出	PA検出	PA検出
	2	PA検出	PA検出	PA検出
	3	PA検出	PA検出	PA検出
EF貪食サンプル	1	EF検出	EF検出	EF検出
	2	EF検出	EF検出	EF検出
	3	EF検出	EF検出	EF検出
EK貪食サンプル	1	EK検出	EK検出	EK検出
	2	EK検出	EK検出	EK検出
	3	EK検出	EK検出	EK検出

#### 実施例28：特異性試験の確認

性能試験のうち、特異性試験に貪食サンプルが使用できるか否か検討した。また、各種操作方法は実施例2~11に記載の手順に従った。

貪食サンプルとして、SA貪食サンプル、SE貪食サンプル、PA貪食サンプル、EF貪食サンプル、EK貪食サンプルを用いた。各貪食サンプルは、実施例17に記載の方法によって作製した。SA貪食サンプルは、貪食率29%、細胞数が $1.05 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。SE貪食サンプルは、貪食率が47%、細胞数が $1.51 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。PA貪食サンプルは、貪食率が19%、細胞数が $1.99 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。EF貪食サンプルは貪食率が33%、細胞数が $1.25 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。EK貪食サンプルは、貪食率が19%、細胞数が $1.13 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。

第12図に示すように、貪食サンプルを塗抹したスライドガラスを用い、実施例2~3に記載の手順に従って試験を実施した。

SA、SE、PA、EFおよびEKの各貪食サンプルを1キットに含まれる1プローブにつき3度試験を行い、また当該試験を3キット行ったところ、表28~表31に示すように、すべての既知細菌貪食サンプルにおいて正しいシグナルを検出することができた。第14図(a)~(e)に、SA貪食サンプルに対しては、SA検出用プローブ(a)によってのみ特異的に検出することができることを示す。ゆえに、貪食サンプルを実施例1~11に示す方法の特異性試験に有用であることを証明した。ゆえに、実施例1~11に示す方法の特異性試験の規格を、既知細菌の貪食サンプルを用い、実施例2~11に記載の手順に従って試験するとき、該当する細菌の貪食サンプルにのみシグナルを検出できると規定した。

表 2 8

キット1	プローブの種類														
	SA			SE			PA			EF			EK		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SA 食食サンプル	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE 食食サンプル	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EF 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
EK 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

表 2 9

キット2	プローブの種類														
	SA			SE			PA			EF			EK		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SA 食食サンプル	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE 食食サンプル	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EF 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
EK 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

表 3 0

キット3	プローブの種類														
	SA			SE			PA			EF			EK		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SA 食食サンプル	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE 食食サンプル	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EF 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
EK 食食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

表 3 1

キット		陽性コントロールプローブ			陰性コントロールプローブ		
		1	2	3	1	2	3
1	サンプル	1	2	3	1	2	3
	U937細胞	+	+	+	-	-	-
2	サンプル	1	2	3	1	2	3
	U937細胞	+	+	+	-	-	-
3	サンプル	1	2	3	1	2	3
	U937細胞	+	+	+	-	-	-

## 実施例 2 9 : 再現性試験の確認

食食サンプルが再現性試験に使用できるか否か検討した。

また、各種操作方法は、実施例 2 ~ 1 1 に記載の手順に従った。

貪食サンプルとして、SA貪食サンプル、SE貪食サンプル、PA貪食サンプル、EF貪食サンプル、EK貪食サンプルを用いた。各貪食サンプルは、実施例17に記載の方法に従って作製した。SA貪食サンプルは、貪食率29%、細胞数が $1.05 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。SE貪食サンプルは、貪食率が47%、細胞数が $1.51 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。PA貪食サンプルは、貪食率が19%、細胞数が $1.99 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。EF貪食サンプルは貪食率が33%、細胞数は $1.25 \times 10^5$ 個/ウェルであり、「適」と判定した。EK貪食サンプルは、貪食率が19%、細胞数が $1.13 \times 10^5$ 個/ウェルであり、適と判定した。

第12図に示すように、貪食サンプルを塗抹したスライドガラスを用い、実施例2~3に記載の手順に従って試験を実施した。

SA、SE、PA、EFおよびEKの各貪食サンプルを1キットに含まれる1プローブにつき3度試験を行い、また当該試験を3キット行ったところ、表32~表35に示す通り、すべての貪食サンプルにおいて正しいシグナルを検出することができた。ゆえに、貪食サンプルは、実施例1~11に示す方法の再現性試験に適用する上で有用であることを証明した。ゆえに、実施例1~11に示す方法の再現性試験の規格を、既知細菌の貪食サンプルを用いて実施例2~11に従うものとし、特異性試験を同時に3回繰り返し試験するとき、得られる結果は同一であると規定した。

表32

キット1	プローブの種類														
	SA			SE			PA			EF			EK		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SA貪食サンプル	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE貪食サンプル	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA貪食サンプル	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EF貪食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
EK貪食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

表33

キット2	プローブの種類														
	SA			SE			PA			EF			EK		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SA貪食サンプル	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE貪食サンプル	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA貪食サンプル	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EF貪食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
EK貪食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

表 3 4

キット2 食食サンプル	プローブの種類														
	SA			SE			PA			EF			EK		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SA食食サンプル	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SE食食サンプル	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA食食サンプル	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EF食食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
EK食食サンプル	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

表 3 5

キット		陽性コントロールプローブ			陰性コントロールプローブ		
		1	2	3	1	2	3
1	サンプル	1	2	3	1	2	3
	U937細胞	+	+	+	-	-	-
2	サンプル	1	2	3	1	2	3
	U937細胞	+	+	+	-	-	-
3	サンプル	1	2	3	1	2	3
	U937細胞	+	+	+	-	-	-

#### 産業上の利用可能性

本発明によって、*in vitro*において食細胞の貪食機能を評価でき、免疫機能の評価、食細胞の分化効率の評価、食細胞機能モジュレーターのスクリーニング、効果の判定、臨床検査における投与計画の指針、感染症診断の指標、キット等の性能試験など、種々の目的に利用することができる実験的モデルが安定的に提供される。

【配列表】

## S E Q U E N C E L I S T I N G

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Method for Evaluating Function by Phagocyte and Use Thereof

<130> 02P328W0

<150> JP 2001-165954

<151> 2001-05-31

<160> 19

<210> 1

<211> 10207

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> Designated as SA-24

<400> 1

```

aagcttatgg acctatitaa ggtatattga ttagttggct tggattaatt teiggaacat      60
ttacagtcia ttgatctgt aaacgatigg tgaacactga gaggatgcag cgaattaaac      120
aacgtactgc tgttcaacgc ttgattagtt ttatigateg ccaaggatta atcccattgt      180
tiattttact ttgttttccct tttaagccaa atacattaat aaattttgta gegagtctat      240
ctcatattag acctaaatat tatttcattg ttltggcatc atcaaagtta gtttcaacaa      300
ttatittagg tiatttaggt aaggaaatta ctacaatttt aacgcalcci ttaagaggga      360
lattaatggt agtttgtgtg gtigtatttt ggattgttgg aaaaaagtia gaacagcatt      420

```

ttatgggale	gaaaaaggag	igacatcgtg	aaaaaagttg	taaaatatti	gatttcattg	480
atacttgcia	ttatcattgt	actgttcgta	caaactittg	taatagttag	tcaigicatt	540
ccgaalaatg	atatgtcacc	aaccttaac	aaaggacgt	gttatgttaa	ataaaattaa	600
agtlacattt	aatcaattga	ataatggatg	taicattaca	tataggcgtg	giaacgagat	660
atatactagt	cgaattatig	ccaaacctgg	tcaatcaatg	gcgtttcgtc	agggacaatt	720
aiaccgigat	gaccgaccgg	itgacgcac	ttatgccaag	aacagaaaaa	ttaaagattt	780
tagttigcgc	aattttaaag	aattagaatg	agataattata	ccgcctaaca	atittgtttg	840
gclaaatgat	caigataaca	atcagcatga	ttctagacaa	tttggtttaa	ttgataaaaa	900
ggatattatt	ggtaataata	gittgagata	ttatcctitt	tcaaaatgga	cgattcagtt	960
caaatcttaa	aaagaggigt	caaaattgaa	aaaagaatta	ttggaatgga	ttatttcaat	1020
igcagtcgct	tttgcattt	tatttatagt	aggtaaattt	atigtacac	catatacaat	1080
taaaggtgaa	tcaatggatc	caactttgaa	agatggcgag	cgagtagctg	taaacattat	1140
tggatataaa	acaggtaggt	tggaaaaagg	taatgtagtt	gtcttccatg	caaacaaaaa	1200
tgaigactat	gttaaaccgt	tcatcggigt	tcttggtgat	aaagtagaat	ataaaaatga	1260
tacattatat	gtcaatggta	aaaaacaaga	tgaaccatat	ttaaaciata	attiaaaaca	1320
taaacaaggt	gattacatta	ctgggacitt	ccaagttaa	gatttaccga	atgcgaatcc	1380
taaalcaaat	gtcaticcaa	aaggtaaata	ttlagttcct	ggagataatc	gtgaagtaag	1440
taaagatagc	cgtgcgittg	gcctcattga	tgaagaccaa	atigttaggt	aagtttcatt	1500
tagattcigg	ccatttagtg	aatttaacaa	taatttcaat	cctgaaaata	ctaaaaatta	1560
alatgaaaca	aatacaacat	cgtttgtcgg	tittaatact	gataaacgat	gtttttatit	1620
gttagtacca	caataaaaagc	taagttcgaa	atgaacttat	aataaatcaa	tcacaatcac	1680
ttigtgttaa	aataigigtc	aaaggaagtg	agggtttgtc	atgacattac	atgcttattt	1740
aggtagagcg	ggaacaggta	agcttacgaa	aatgttgacc	gaaataaac	aaaaaatgaa	1800
agcagalccg	ctiggagatc	caatcatttt	aattgcgcca	actcaaagta	catttcaatt	1860
agaacaagcc	tttgtcaatg	atccggaatt	aaatggtagt	ttaagaacag	aagtgttgca	1920
tttgaacga	ttaagtcac	gtattttcca	agaagttagt	agttatagcg	aacaaaagtt	1980
atctaaagct	gcaacggaaa	tgatgattta	taacattggt	caagaacaac	aaaagtattt	2040
aaaactttat	caatcacaag	caaaatatta	tgggtttagt	gaaaaattaa	cagaacaaat	2100
tcaagatttt	aaaaaataig	cagtaacgcc	tgaacattta	gaacacttta	ttgctgataa	2160

aaataigcaa	actcgaacta	aaaataagtt	agaggatatt	gcittaatal	accgtgagtt	2220
cgaacaacgc	attcaaaacg	agttiatfac	tggtgaggat	tcattacaat	atttiatlga	2280
ttgtatgccg	aatcagagt	ggctaaaacg	tgctgatata	tatattgaig	gttticacaa	2340
cttticaacg	atlgaglat	taataatcaa	aggattaatt	aaatalgcga	gagtgicaca	2400
attatattga	cgacagatgg	taaccacgat	caatitagtt	tttagaaaa	ccatcggaag	2460
tgttacgaca	taltgaagaa	atagcaaatg	aactcaatat	ttctatigaa	cgicaatatt	2520
tcaaccaatt	atcgccttc	aataatcaag	atltaaagca	tcttgaacaa	gaatttgatg	2580
tacticaaai	caatcgagig	gcatgicacg	gicatatcaa	tatlttagaa	tctgcgacia	2640
tgagagagga	aataaalga	attgcegcac	gtatcatcgt	tgatattcgt	gataagcaat	2700
tacgatatac	agataligca	atltiatatc	gigacgagtc	ttatgcctat	ttatttgatt	2760
ccatattacc	gcttataat	atccittata	acattgatac	aaagcgttcg	atgacacatc	2820
atccggctat	ggaaaigatt	cgttcattga	ttgaagttat	tcaatcta	atggcaagtga	2880
atccaatgct	acgctlatg	aagactgatg	tglttaacgce	atcataicta	aaaagtgcac	2940
acttagltga	ttacttgaa	aatltlgtac	ttgaacgtgg	tatatacgg	aaacgtlgtl	3000
tagatgatga	gctatltat	gtcgaacatt	ttagcaaaat	ggggcgtaaa	gcgcataaac	3060
tgaccegaaga	tgaacgtaac	acatttgaac	aagtcgttaa	gtlaaagaaa	gatgtcattg	3120
ataaaaatlt	acatttga	aagcaaatgt	cacaagcgga	aactgtaaaa	gacittgcaa	3180
ctgcttttta	tgaagtatg	gaataatcgc	aactgccaaa	tcaattgatg	acagagcgag	3240
atgaacttga	tttaaatggt	aatcatgaaa	aggeggagga	aattgatcaa	atatggaatg	3300
gcttaattca	aatccttgac	gacttagttc	tagtatttgg	agatgaacca	algtcgaig	3360
aacgtttctt	agaagiatlt	gatattggt	tagaacaatt	agaatttgtc	atgattccac	3420
aaacattaga	tcaagltagt	attggtacga	tggtatlggc	taaagtcgac	ataagcaac	3480
atgttlactt	agttggaatg	aacgacggca	ccatgccaca	accagtaact	gcatacaagtt	3540
taattactga	tgaagaaaag	aaatattttg	aacaacaagc	aatgttagag	ttgagtccta	3600
catcagatat	ttacagatg	gatgaagcat	ttgtttgcta	tgttgctatg	actagagcta	3660
agggagatgt	tacatltct	tacagtctaa	tggtatcaag	tggtgatgat	aaggagatca	3720
gcccaltttt	aaatcaaat	caatcattgt	tcaaccaatt	ggaaattact	aacattcctc	3780
aataccatga	agtaacceca	ttgtcactaa	tgcaacatgc	taagcaaacc	aaaattacat	3840
tattigaagc	atgctgtgct	tggttagatg	atgaaattgt	ggctgatagt	tggttagatg	3900

cttatcaagt aattagagai agcgatcatt taaatcaagg tttagaitat ttaatgtcag 3960  
 cattaacglt tgacaatgaa acigtlaaaat taggtgaaac gtigtctaaa gatttataatg 4020  
 giaaggaaat caatgccagt gtaatctgtt ttgaaggtaa tcaacaatgc ccatttaaac 4080  
 actatgcttc acatggctcg aaactaaatg aacgaacgaa atatgaactt caaaaactttg 4140  
 atttaggtga tatttccat tccgttttaa aatataatc tgaacgiatt aatggcgatt 4200  
 ttaacaatt agacctgaaa aaaataagac aattaacgaa tgaagcatig gaagaaattt 4260  
 tactaaagt tcagttaa ttaataaatt ctacagctta ctatcgttat ttatcaagac 4320  
 gcattggcgc tattgtagaa acaacactaa gcgcattaaa atatcaagge acgtattcaa 4380  
 agtttatgcc aaaacatttt gagacaagtt ttgaaggaa accaagaacc aatgtacga 4440  
 attaattgca caaacattaa cgacaactca aggtattcca attaatata gagggcaaat 4500  
 tgaccgtatc gatacgtata caaagaatga tacaagtttt gtaaatca ttgactataa 4560  
 atcctctgaa ggtagtgcga cacttgattt aacgaaagta tattaaggta tgcaaatgca 4620  
 aatgatgaca tacatggala tegtlttaca aaataaaca cgcctlggat taacagatat 4680  
 igtgaaacca ggiggattat tatacttcca tglacatgaa cctagaatta aatttaaatc 4740  
 atggctctgat attgatgaag ataaactaga acaagattta attaaaaagt ttaagctgag 4800  
 tggtttagtg aatgcagacc aaactgttat tgatgcattg gatattcgtt tagaacctaa 4860  
 attcacttca gatattgtac cagtlggltt gaataaagal ggctctttga glaaacgagg 4920  
 cagccaagtg gcagatgaag caacaattta taaaticatt cagcataaca aagagaattt 4980  
 tatagaaca gcttcaata ttatggatgg acatactgaa gtcaccatt aaagtacaaa 5040  
 caaaaatigc calgtgcttt ttgtagttat caatcggtat gtcattgaga tggcatgatt 5100  
 gatagtaagc gatatcgac tgtagatgaa acaataaatc caattgaagc aattcaaaat 5160  
 attaacatta atgatgaatt tgggggtgag taatagatga caattcaga gaaaccacaa 5220  
 ggcggtgatt ggactgacgc gcaatggcaa aglatttacg caactggaca agatgtactt 5280  
 gttgcagccg cggcaggttc aggtaaaaca gcigtactag ttgagcgtat tatccaaaag 5340  
 attttacgtg atggcattga tglegatcga ctittagtcg taacgttac aaacttaagc 5400  
 gcacgtgaaa tgaagcatcg tglagaccaa cglattcaag aggcattgat tgcctgatcct 5460  
 gcaaatgcac acitgaaaaa ccaacgcac aaaattcacc aagcacaat atctacactt 5520  
 catagttttt gcttgaatt aattcaacag cattatgatg tattaatat tgaccegaac 5580  
 ittagaaca gcagigaagc tgaaaatatt ttattattag aacaaacgat agatgaggtc 5640

atagaacaac attacgatat ccttgatcct gcttllatlg aattaacaga acaattlgct 5700  
tcagatagaa gtgatgatca gtttcgaatg attattaaac aattgtattt ctttagcggt 5760  
gcaaalccaa atcciacaaa ttggttggat caattggatga caccatacga agaagaagca 5820  
caacaagcgc aactlatica actactaaca gacttatcta aagtatttat cacagctgcc 5880  
tatgatgctt taaataagge gtafgatttg ttagtatga tggatggcgt cgataaacat 5940  
ttagctgta tagaagatga acgacgttta atggggcgtg ttttagaagg tggttttatt 6000  
gatatacctt atttaactga tcacgaattt ggcgcgctt tgcctaactg aacagcgaaa 6060  
attaaagaag caaaigaaat gatggtegat gccttagaag atgctaaact tcagtataaa 6120  
aaatataaat catlaaitga taaagtgaat aatgattact ttcaagaga agctgatgat 6180  
itgaaagctg atatgaaca atggcgcca cgagtaaagt accttgcgctg tattgtgaaa 6240  
gatgltatgt cagaaitcaa tcgaaaaaag ctagcaaaa atattctgga tttttctgat 6300  
talgaacaat tlgcattaca aatitlaact aatgaggatg gttcgcttc agaaaitgce 6360  
gaalcalacc gtcaacactt tcaagaaata ttggtegatg agtatcaaga tacgaaccgg 6420  
gttcaagaga aaataciatc ttgcatcaaa acgggtgatg aacataatgg taattiatit 6480  
atggttggag atglttaagca atccattat aaatttagac aagctgatcc aagttiatit 6540  
attgaaaagt atcaacgctt tactatagat ggagatggca ctggacgtcg aattgatttg 6600  
tcgcaaaact ccgttctga aaagaagtac tgtcaacgac taactatata tcaaacatat 6660  
galggatgaa caagtcggtg aagtaaaata tgatgaagcg gcacagttgt attatggtgc 6720  
accatatgat gaatcggacc atccagtaaa ctlaaaagtg ctigtgaag cggatcaaga 6780  
acaiagtgat ttaaciggta gtgaacaaga agcgcatttt atagtagaac aagttaaaga 6840  
tatcttagaa calcaaaaag tttatgatat gaaaacagga agctatagaa gtgcgacata 6900  
caaagatate gttatictag aacgcagctt tggacaagct cgcaatttac aacaagcctt 6960  
taaaaatgaa gataticcat tccatgtgaa tagtcgtgaa ggttactttg aacaacaga 7020  
agtcgctta gtattatcat ttttaagagc gatagataat ccattacaag atatttattt 7080  
agtgggtta atgcgctccg ttatatatca gttcaagaa gacgaattag ctcaaattag 7140  
aatatigagt caaalgatga ctacttctat caatcgattg taaattacat taatgacgaa 7200  
gcagcagatg ctattitagt tgataaatta aaaatgtttt taticagatat tcaaagttac 7260  
caacaatata gtaaagatca tccggtgtat cagttaattg ataaatttta taatgatcat 7320  
taigtlatte aalactitag tggacttatt ggtggacgtg gacgacgtgc aaacctttat 7380

ggtttattta ataaagctat cgagittgag aaitcaagtt ttagaggttt alatcaattt 7440  
attegittta tcatgaalt gattgaaaga ggcaaagatt ttggtgagga aatgtagtt 7500  
ggtccaaacg ataatgtigt tagaatgatg acaattcata gtagtaaagg tctagagttt 7560  
ccattigtca tttatctgg attgtcaaaa gattttaata aacglgatit gaaacaacca 7620  
gltatlltaa atcagcaatt tggctcggga atggattall ttgatgtgga taaagaaatg 7680  
gcatttccat cttagcttc ggttgcatai aaagctgttg ccgaaaaaga acttggigtca 7740  
gaagaaatgc gattagtcta tgtagcattia acaagagcga aagaacaact ttatttaatt 7800  
ggtagagtga aaaatigata aatcgttact agaactagag caatigtcta tttctggiga 7860  
gcacattgct gicaatgaac gattaacttc accaaatccg ttccatctta tttatagtal 7920  
tttatctaaa catcaatctg cgtcaattcc agatgattia aaatttgaaa aagatatagc 7980  
acaagttgaa gatagtagtc gtccgaatgi aaataittca attatatact ttgaagatgi 8040  
gtctacagaa accatittag ataataatga atatcgttcg gttaatcaat tagaaactat 8100  
gcaaaatggt aalgaggatg ltaaagcaca aattaacac caactlgatt atcaatalcc 8160  
alatgtaaat gatactaaaa agccatccaa aacaatctgt ttctgaattg aaaaggcaat 8220  
atgaaagaag aaaglggcac aagttacgaa cgagtaagac aalatcgtat cggttitcaa 8280  
cgtatgaacg acctaaattt ctaagtgaac aaggtaaacg aaaaagcgaa ttgaaattgg 8340  
tacgtlaaig catacagtga tgcaacattt accattcaaa aaagaacgca tctctgaagt 8400  
tgagttacat cagtalatcg atggattaat cgataaacat altatcgaag cagatgcgaa 8460  
aaaagatate cgtatggatg aaataatgac attatcaata gtgagtatat tcgattattg 8520  
ctgaagcaga gcaagttiat cgigaattac cgittgtagi taaccaagca ttagttgacc 8580  
aattgccaca aggagacgaa gacgtctcaa ttattcaagg talgaltgac ttaatctllg 8640  
ttaaagatgg tgtgcattat ttgttagact ataaaacega tgcatttaat cgtcgcctg 8700  
ggatgacaga lgaagaaatt ggtacacaat taaaaataa alataagata cagatgaaat 8760  
attatcaaaa lacgcttcaa acgatactta ataaagaagt taaaggttat ttatactct 8820  
tcaaaattgg tacattgcaa ctgtagtati ttgattttca aaagaataaa aaataattc 8880  
gattaagtgc aaagtccttg tagcagaatg aacacaactc altttcaaaa ttgcttact 8940  
tatttatttg ttattlgata acgaaaaaag ttataatglg aaltaagata aagatgagga 9000  
gttgagaatg aatgaaatc ttatcattca agtataatga caaaacttca tatggcgta 9060  
aagtaaaacg cgaagatgct gtatgggatt taacacaagi atttgctgac ttlgcagaag 9120

gagatticca tcctaaaaca ttgttagctg gttacaaca aatcatact ttagatttc 9180  
 aagaacaagt acgtaaagca gttagcag cagaagatag cggcaaagct gaagactata 9240  
 aaatttcatt taatgacatt gaattcttac caccagtaac acctccgaat aatgtgattg 9300  
 cttttggtag aaattacaaa gatcaigcga acgaattaaa tcatgaagla gaaaaattat 9360  
 atgtatttac aaaagcagcg tcalctttaa caggagataa tgcaacaatt ccaaatcata 9420  
 aagatattac tgatcaatia gattatgaag gtgaattagg tattgttatt ggtaagtctg 9480  
 gfgaaaagat tccaaaagca tiagctttag attatgitta cggctataca attattaacg 9540  
 atatcactga tcgcaaagca caaagigaac aagatcaagc attttatca aaaaglttaa 9600  
 ctggcggttg cccaatgggi ccttatatcg ttactaaaga cgaactacca ttacctgaaa 9660  
 atgtaaatai tgttacaaaa gttacaatg aaattagaca agatggtaac actggcgaaa 9720  
 tgattcttaa aattgalga ttaatagaag aaatttcaa atatgttga ctactaccgg 9780  
 gagattatta ttgcaactgg tacaccagct ggcgttgggtg caggatgca accacctaaa 9840  
 ttttlacaac caggigtatga agttaaagtg actattgata atattggaac gctgacaact 9900  
 tatalcgcla aataatlatc atttaaaaag ctaaccaggi ctttatatag attggttagt 9960  
 tttttcttgc ttttctaaaa aggtgttaaa gataaattat ttataatgtt accattttga 10020  
 gatgaaagtg aatatatgat attaagaagi agttgattat ttacagcag attcacaata 10080  
 ttctaataag ggcaatgcaa atgctatgtt ctctctctca aatatagaag tgtggttagaa 10140  
 tatatattcg tglalaatca aatctagatt aaattacaag caagigggta ttaatcccaa 10200  
 gaagcct 10207

<210> 2

<211> 2082

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> Designated as SA-36

<400> 2

aagctttcta atclatcggt aaigatttgc tttaaaattg ggicgaagti aattgaaggt 60  
gigaagtglia tatciglait aataaccatg teattcattt gctgcttcaac ttigtlaaca 120  
agtcctccgt catataaaaa taatggtagc acaatcaatt ttgataccg ttteggatg 180  
ctttctaaat catgtglaaa aciaatctct ccatalageg ttctcgcata agtagglita 240  
ttaaictgca aatgltgagc gcataattgt aactcttctg gigccttagt aaaatttcca 300  
ttaaatatgc cgigigcaac aaccalaact ccaacttgtt gttcgtcace tgctaalgcg 360  
tcacaaatac gttgttcaat taatcgtctc attaaaggat gttgtccaag tggtctgctt 420  
acttctacct ttaigtctgg ataccgtctg ttcatlcal gaacgatatt cggatatacc 480  
ttgagataai gcatlgcaact aaagattagc aatggtaaca ttttaaaatg gtcaacecca 540  
ctttgaatca acgtcgtcat taccgtctct aaatcctgat gctcacttc taaaaacgca 600  
atatcatagt gatgtalate alcttttact aattcagaaa taaatgcttc taacgcttga 660  
ttctgtctgc cgtgcctcat gccatgtgca acaalgaat tcccatcacc atttaccac 720  
cctttcacac gtattglata ccaaalcatt ttgtttttgt gaaaagaatc acattataat 780  
gtaaaateag ggaattccct gatgcctgta gcatgcata ttcttatac attttccctt 840  
tttgtiaaai caaaaaagc gaccgatata tgaatcccta ctcaacattt attlgagcaa 900  
gcatcaatat atcggctcgt tgtagtgtat attattatct taaaatggtg gttggcctaa 960  
tattgtttcg tcaaaagcgt cgggtatcaa tactttgccc atgatcacac ctaaaatgccc 1020  
atcalcattt lcatgltcgc tgtatallc ataaccttt ttctcalaaa tttlaagtaa 1080  
ccacggatgc aatcttgcag atgtacctaa agtaactgcc gctgacttta acgtatctcg 1140  
caaaaalgct ctccaacata agtaagtaal tggetaccat agccttccce ttcalactca 1200  
ggattlgtcg caaacacca gacaaaagga tagcccgaaa tactttleac acttcccaa 1260  
ggatatctaa ccglaatcgt agatataatt tcatcatcaa ttgtcatgac aaatgtagta 1320  
ttttiatctia tattttcttt aacagcatct aaattagcat taactgaagg ccaatcaata 1380  
cctagtctc tttagaggct aaatgcttca tgcattgagti gttgcaattt ttctgcatct 1440  
tgttcaactg cgagtcgaat catcgttttt gtcataatlaa tccccactct tttttaaattg 1500  
atttaacct attttatttt taaaataaat atecalcaaa gttatcaat aaatttatca 1560  
catgtcagaa agtatcttc atctgaatac accaatactc tcaigaaact tattaataat 1620  
tactctctca acgtaaaaaa accattcaaa ttcatgaatg gtttgaaga atgattcatt 1680  
gttaegctat ttaatcaata catcttaatt attgttctc taaacgatta cgttaccat 1740

tlaagaaagc ataaacgaga cctacaaaaa taccgccacc gacaaagtia cctaagaaag 1800  
 caaaaacgat attitttaa acatgtaacc atgaaactgc atcaaggta aagaatacca 1860  
 tacctgcata tagacctgca tgaacacaa cgtgctcata tccaigtat acaaagacca 1920  
 cgacaccaca agctatgaag aatgcccttg ttaagccgcc titgaattgc atagagaiga 1980  
 aaataccaat attaataaag aagttacaga aaataccttt tgtaaaaata tccaacctg 2040  
 ttgaatcaac agtcttttct tgaactaaag ctgttaaage tt 2082

<210> 3

<211> 2885

<212> DNA

<213> *Staphylococcus aureus*

<220>

<223> Designated as SA-77

<400> 3

aagcttttga ttaatttggg cttaaagta ticecaatia taattctca tgatttctt 60  
 attggatttc gaatttgggt tcatgcattg ttgctcaaa gaacatgctg aacagtcate 120  
 gcaticatat agcttgaagi cacgtttaaa accatatcia tcaatcgggt atgcatactt 180  
 tttaaaacct attcttttgt taltaggaca tataaattea tcaatgaatt cgtcatattt 240  
 ccaattttga ggttaaaaa tgcactttt aaactttcia gtttatctt taalaaacat 300  
 gccatcagta ataagtggcg tttattaaa acatctataa tagccatata gttttgctca 360  
 ctatcataac tgcacagctt acattaactc tggtaatacc gaggatttga atcattgtta 420  
 aaaatggaat laaagttcta gtatctgttg gggtttgaat taggicatag gataaaaaaa 480  
 ttgagaattt gtcgclattt gtaaattgta tcttggctta agttggccat ttlicatatg 540  
 gcttctcttc attctcataa aagttgcate atgateagcc cagaaagcia tttctatctt 600  
 taagaatcca ttttgttct tcatatttat ttttcttctt ggaataatca tcaaatttct 660  
 ttttgaactt ctaaatctca gttctttttt acgggtctgt tttctaatit gagcactctt 720  
 cgttctaaat agaattgattt aaactttcga tttcttttat ctaaaatgact accaatlaaa 780

tctatitcct	cicgtgaitt	tgaatacttt	tcttccacac	aatgtatatai	ctattggcat	840
tagcttctac	ttatgtacca	tcaataaaaa	ttgaattait	atcaataaga	ttttgcctta	900
aacattgact	atggaaciga	ataaataaag	atccaattaa	cgcatcagia	ttaggattca	960
cictaaaacg	aitaatagtt	ttataagaag	gigttagatc	ttgagctaac	cacatcatic	1020
gaatactgtc	atgaagtaat	tictctatlc	tacgaccaga	aaalacagai	tgagtataig	1080
catataagat	gatttttaac	atcatttttg	gatgatagga	tgttgcgcca	cgatgaigtc	1140
tgaattcacc	gaattcgctc	tcaggtatcg	ttcaacaat	ttcatttaca	tatcgcgaaa	1200
tatcatttta	aggaattcta	acagaagttt	clattggtag	tgtaagtgg	gcaaagigtc	1260
ttattttttt	aaagtaigia	aaagtaaat	tacaigttaa	tacgtagtat	taatggcgag	1320
actctgagg	gagcagtgcc	agtcgaagac	cgaggctgag	acggcaccct	aggaaagcga	1380
agcattcaat	acgaagtatt	gtataaatag	agaacagcag	taagatattt	tctaatlgaa	1440
aattatctta	ctgcigtitt	tttagggatt	taigtccag	ccigtittat	tttcgactag	1500
tttggagaat	ttattgacat	tcacattatt	taaacggcaa	caaagattgt	tttattttga	1560
taggcattat	atggigttaa	aaaattigca	tgaaaattaa	aaaatgcttc	gttcaggaag	1620
gtgtcgtaat	ttacctatt	gctgaatgaa	gcattttatt	tttaaatatg	atagccaata	1680
taacaagcta	taaatccaat	gatgaattgt	aaaagtgaal	aattgagaaa	aaggtttaata	1740
tcaatttttg	gtgtcatcat	taatgtiaagt	tcttggctc	acgttgagaa	agttgittaag	1800
ccacciaaaa	aaaccggiga	caaagaacgc	agggaacct	gagattgaaa	ttgataggcc	1860
tatagttaat	ccaattaaaa	aactaccaac	tagatttact	atcaatgttg	cgataggtaa	1920
ctttgaagta	aatttaigat	taaaataatc	aglaaiggca	cttctagcaa	ttgcgccaaa	1980
accgcegeca	atcatgacta	aatgattga	taicatgata	aaccaccacc	tagttttata	2040
cgcagtaac	ataacaaaat	accaaagaca	taacttgta	cagcatatag	tagtaaagtt	2100
ataaattggt	gatgatcaaa	catalgtatt	aattctaat	gaaatgttga	aaaagtcggt	2160
aaagcaccaa	gaaaaccagt	cgtaatagct	tttttaggg	tcggaiggtt	tgaaaaaat	2220
gcaattgtta	aggctgttag	caateccatt	acaaaggcac	cagtcaaatt	ggctatcagt	2280
gttccgattg	gaaaaccicc	gtcagtatlc	agaaaagaaa	tgaggtaacg	taataaagcg	2340
cctaaagcac	caccgataaa	aatatataca	taitgcattt	ggttcacctc	gaaaagaagt	2400
agtttgaatt	taaaaaagag	gttttgcaa	cagcagcaca	aaaattgtcg	atgcattatc	2460
aaacctcatt	atagtataa	tcttgttgta	taactatagc	gattagatgc	atagttatga	2520

tticgaaaat ctaaiatitit ttatacgcaa caacgtcaic aaaitgtitit acicattata 2580  
 gcatgaiaca ttgtattgitt ttgtattaac gctacattga caitttatct tttttaaata 2640  
 aaaccgaaig tacgacaatt gaaaagatat gtactaaaat aacaattaga ataatccaag 2700  
 gcaaactitit acicgcaatt ctaaiccaat ctgcatcagg ctttagtgat ttaattgaac 2760  
 gatcigcaaa aattatagac aaaattagta caattgagtt aataacactg cagaaaagta 2820  
 ttaatttaat aaaagaatta aaaaatccac ttaggaaaac gttatttgta ttaaagaaaa 2880  
 agctt 2885

<210> 4

<211> 8654

<212> DNA

<213> *Staphylococcus epidermidis*

<220>

<223> Designated as SE-22

<400> 4

aagcittgitt tattgcttag ttatatttcc aalaacactc attttataatg tacgtattgc 60  
 caaaaaaaaaat tatctataca gtaataagta igaaatgaga actggaataa tcaattggtat 120  
 tattgcitta attctagtaa ttatgcaagg gtitcactit aactgggcta ttattcctat 180  
 tictatctat ggcatcagt ttgtatitit cgctggaatt attttaagtc ttgttgglat 240  
 aittittaaa cglatagaat ttgtaggagt tggcttacta ttttgtcaaa aacatagatg 300  
 caatggtaac tgaccggaa attgcacagt tttctcttt agcaatttgg attatacttg 360  
 ttgtgctaat caitttttat acgatacgtt tatctgaacg cactaaatca tcaicatata 420  
 caaagattta aactcagaaa ataigctaga catatcttcc tgagtittttt aaittattaa 480  
 aatataicat ttgtttacca tataagtitt ttttagaaaa tgaatcacta ttttaaiata 540  
 caaataaatt aattacactg aaaataacct aaaagcgtaa cactatitit atattgggtat 600  
 ataaatgact aaaggaggt gccaatgta ataaaattca aatttgtaat cagattgaac 660  
 ttaactatata tgatgaagge gaaggcatcc ccatcattit aattcatgga ttagatggaa 720

acttggcagg atttaaagat ttaaaaaatg aactcaagaa gcagtataga gtaattactt 780  
 atgatgtcag aggtcaigga aaatcttcac gaacagaatc atatgaatta aaagatcatg 840  
 tgaagattt aaatgattt atgggagcat taaatatega ttctgcacat attttaggac 900  
 atgatatggg gggcatcatt gcgagtgaat ttactgaaaa atatcaatat aaagtgatta 960  
 cattgacaat igtctggcc aaaagtgaag acattgcaaa tggtttcaac aaattaatgg 1020  
 ttgattacca agaagaatta gcaggcttta ataaatctga ggcaatgatt attttattct 1080  
 cttaaattatt taaagagaaa gataaagcaa tgaaatgggt atcaaagcca aaaattatac 1140  
 aatagaccaa ctccggaaga aagtgcatt gcagtacgtg cattgcttaa tattaaagat 1200  
 tiaactcgtg tcatcataa tgtgtccata cctactttaa ttgigaatgg taagtaigac 1260  
 ccactcatalc aaaataaaag tcattatgat atggatcaat attatgatca agttacaaaa 1320  
 attgtatttg ataaticagg acatgcacca catatcgagg aaccagaaaa attcctgaaa 1380  
 ctctacttag atttgttag ttaaaaaata agaacataaa taaaacect taaatgatta 1440  
 ttgtcggaaa atcatttgag ggtttttag tagcagtaaa gtttgactc agatcactat 1500  
 cgtattaact taataaaaga gtaaacagt cttatcttc ataagtgaag gaaatatctg 1560  
 ttinactcc tagccattat acttcatte attatttgc tctgtgatac ggttgtttac 1620  
 tcgtllaagt aaatcatcga tttttttag ctgcttagaa tctactaaga ttaaacagt 1680  
 tcttcatcg ttttattac gttttttatt aaagtaattt tcttgagata aatttttaac 1740  
 agctllaaca acttgagggt gtttataatt taagtattg ataatactt taagataata 1800  
 tctctctct tttctctc taatataagt taatactga aattcttcaa agctgattga 1860  
 gaattcttt ttaattatc cttttaatc gtcagcataa gtgaccatag cttaataatc 1920  
 aaagcagtca ttgattttg aaatagccat taatgaaacc tccctattta tatcatatcc 1980  
 ataaatctta aaaccatct ttttaaatt aaagatagtt aattatatta ttgaattaag 2040  
 attacttga taciataacc taatttatta atttatatc attttctta tgaaaatagc 2100  
 aaagtgtccg tcataatata gtattaaatt aaattlaag aatataatta atgctatatt 2160  
 atttagtiaa ttataactaa ataaaatia gaagtaaca aataagitt tataaaaca 2220  
 attatcttt aaagttata ctggaattg caatgtagca ttigtatat tcaaaaaat 2280  
 aagattgitt ctatcttc ttaattaat aaaaattata ctaaaagaa tactttttgg 2340  
 aaagaattt actaacatt tttatatata aatgtttatt aatttagaag taggattttt 2400  
 aacaacttt tcaictatca ataagcctt agttatatta atataccac tttttaact 2460

ctttttggtat gttacttctc tttttgtaga attaaaacat agcgtttttg aacaatagct 2520  
gacgtaggia acctctatgtc atttgaggct aatttgattt taaagtgtgt tccaatttga 2580  
tgattgggtt ggttagaaaag taaaatgtcg taataatgaga cgccattttt tatttttgat 2640  
ggtatattcg aaatttcttt aattttacia gtaaatlgag tgttgtcact agatgttaca 2700  
gaaataatttt gatttatatt taataaatc aactcagatt ctgatatatt agcacgaata 2760  
atagcttctg tgctattaat ttgcactatc ttttcgittg gttttgaagg gatagaatta 2820  
atataatgaa tacttccatt aattggigaa aataaagtgg atttaattga ggatttagtt 2880  
tgaatcattt gtaattttag ctgattaaagg aatgaataat aatgtaaatc atttttagaa 2940  
tttaaagttt tgttgttacg ttcatcacta agtgtatttt ggagttctc atataaatga 3000  
tccttttcat aattgtaata ttctaacact ggagtgtttt tagatacttt gctatgattt 3060  
tttactaaaa gtttttgag ttgtcctaaa gtgggaggtg agtagaaaat atagctgtta 3120  
agaggggctt gtataccagt tgitgaaagg agtaatttgg gctttgctt tatagttttt 3180  
atatttttaa tcttctgtt ttiagaagtt aatttagaga aagtaalgta actaaaacta 3240  
caagttgtga gaatgaaaat gaatagtaat gaagaaataa cgatgcgtt cttggctatg 3300  
gatgttccac tcataatait atgtgaggt tattatacac tattattta aatgaaatat 3360  
attaatttta aataagcatt acitttgggt tglatatgtt ttatttcaa aaaataaagt 3420  
aaatcaattt aataaattga aaaatagaag gctatcttta attttaaata atatgattct 3480  
acataaatgt tactataaga agaatcactc ataaaaactg ccaacaaaga caaaatcttt 3540  
gttggcagtt cgaaatagac atttatttgt atgaggaatc tacatttaata taageggata 3600  
atttttatic agaataagga attttaaata atcgttaata aataalacct atagctatac 3660  
ataataatcc acctactta cgtgatgta ttttgitttt aggtgaacce aacaaaccga 3720  
aatgatgat aataatccc ataactatt ggccatcat agcaattata gtagttaaag 3780  
ctgctcctaa gaaaggcatt aaaataatat tagatgttac gaatgccatt cctaglatec 3840  
ctccaataaa ataaatagat ttaactctac ctagtgtttt atgagtagat gatatttca 3900  
gactacgatt aaatactaat gtaaatataa ataacgctat tgtaccaacg ctaaatgata 3960  
tgagtgaagc aaatatggat gagtgtgtgt gttgagccag tgtgctgtt attgttgttt 4020  
ggattggcgg acgaaaccaa atacgaatcc aataagcaac cagaatacta ttgggtatt 4080  
cttatgtcta ttaacaggat gctacgaac ataattcata aatataaitc cagtaattaa 4140  
aaatataait ccaacacctt taaataatgt aaaagattgt tgatgggcgc ccaataatcc 4200

aaatgtatca atgattacac ccataataat ttgccctgta accgtaataa caacagtaag 4260  
tgcctgcgect aatcttggta ataataataa gtttccagtt aaatagataa cacctaatag 4320  
tccctcctagg acccaagiat agttaagtgt ttgcttagaa aagaattctg gtgtaatac 4380  
ttgtggatga ataatgatat taagcacaag taagcataat gtccgacag caaaagatat 4440  
ggitgaagca taaaaagatg aacgggtaaa ttggetttagc ctigagltga ttgaaglttg 4500  
aataggaagt aacaigccaa caaaaattcc taaaagatat agaaaaaaca atgataaaaa 4560  
ccaactttct caatttaata tgattatcat accattcata atcatgittc taaaatgatt 4620  
gagccataag caaagiatag aaataagtig tgaatgttcc gaggtgtcat acagccgata 4680  
ctatittgat gaatcattat aataaaaatgc acattaaaca agtttiagaa ttaaaaaaag 4740  
cgagacatca ttttgaattt gatatacacc ttcataataa taaaagaaca atgtaaatta 4800  
agttcttttt tagacttgaa caatittaaa aaatttgttc ttcgataagt cttttttatg 4860  
atlttiaglac tttaaaataa gcgtcaaaaa taatgttita tgaattaat tttatcttca 4920  
aatataacag ttgtcctttt atcaataagt tgtgcagcat aaattttgac aggctttccc 4980  
aaactaaatc ttaaaaatgc taattctaaa atgtctaat ctaaaagtig gttcatactt 5040  
tctttaattia atgttctgt aglaatagcg ttaaaatcgg gtaatagtaa ttgacgggt 5100  
ttatlaagal ttgatttaaa tacgagttcc aaagtttttg acatactgat gtatcctcct 5160  
taaattaaag atctgtttt aacgatctcg actttgtcat acctttcgcc actgaacgtt 5220  
caalgaigga acgaaaagal ttgatttgat cattagaaac aagcggatta atgttagaaa 5280  
aacgacgctt atgttcgact acittaccct cagaattatg ttgtattga gtaaagataa 5340  
tcgtcacttg attgacttca ttcataataa aacctcctt caclatatai atcgaaatag 5400  
atigaaaaaa aaggacacat tttttgaaaa atataggcaa atgctttga ttgatalaaa 5460  
acgtcattta tcattaattia tgaacctgt tttagaaggt atataggta agtagaattg 5520  
ttaagltgta aaagaaaaaa ttggaacctg atatttaaaa taaccaactt aaaagattga 5580  
tcagtgctta aaattactat ttatataiga attaaaatai taagatctcc caatatgaga 5640  
atgaattagt ttaagtttat cgalgaltga aaaattatag cctcatggat tclatcttat 5700  
ataaaataaa gttctatcc ctlttgata taaataagaa tagttacctt ttigigatat 5760  
gccaattcag aaaaaaagcg acagtgttg aatctatgia tgcacaataa actcattcaa 5820  
atcaactagc aatatcaaat caataatcgt gttgcaccat aalaaggatt aaaacctgtt 5880  
agtttaacta atttaagaaa aacatttgat taicttctct ttcaatcggg aatattaatt 5940

tctatcattc aacaaiatit tggatcagc alaacttaag aaatattgag atitattgaa 6000  
 atacgataig tttcaaatcg ccatacaatg attacactta ataaaigatt acacttaata 6060  
 taaatgtaaa aagaaaagga ggggttaaag gagtttagta tatcttatgg cgactaattt 6120  
 attagicatg ctcatagitt taticacict gagtcacgt caactaagaa aggttgcggg 6180  
 ctatgttgcg ttaatagctc ctattgtgac atctacatat tttattatga aaataccaga 6240  
 tgtgattcga aataagitta ttgctgttcg attaccatgg atgccttcaa ttgatattaa 6300  
 tttagattia agattagatg gtttaagttt aatgttcggc ttaattatit cgctaaiagg 6360  
 tgtgggtgla ttttttatg ctacgcaata tttatcccac agtacggaca atcttcttag 6420  
 attttctac tatttactat tattttatgtt cagtatgatt ggcattgtaa tagctaataa 6480  
 taccatctta atgtaigtat ttigggaact cacaagtatt tctcattct tgcittatac 6540  
 ctatiggtae aataatggtg aaagtcatt aggcgccatt caatcttca tgattacagt 6600  
 gtttgggtgg ctacggttat taacaggatt tatcatttta tatacatta caggaacaaa 6660  
 cacaattact gatacttaa tcaacgcaat gcaatttca gacatcttt atttatacca 6720  
 atgatttga tgcattatit aggtgcittt accaaatcg cacaatttc gtttcatatt 6780  
 tggttacca aggccatggc agcacctaca ccagtaagt ctatcttca ttggcaaca 6840  
 atggtaaagg ctggaatctt tttactatit agatttacac ctllattggg acttagiaat 6900  
 gtttatatit atacagtac atttgttgg ctataacta tgttatttgg atctttaaact 6960  
 gctttacgac aatagcactt aaaaggata ctgccttatt ctacaataag tcaattaggt 7020  
 atgattatga caatggtagg tctaggiggc ggttatgctc agcacacac agatgaattg 7080  
 tctaagttit atattitagt tttatttgcg ggcatttcc atttaatgaa tcatgcggtt 7140  
 tttaaatgtg cattatttat gggcgttggg atcattgac acgagtcgg aacacgtgat 7200  
 attcgtttgc taaatggta gclaaagtc tcccctaaa tgcataitgt catgttgcctc 7260  
 gctgcattat ctatggcagg ttttctttt ttaaatggct tttlaagtaa ggaaatgttt 7320  
 ttagaitcgt taactaaagc aaacgaactt gatcaatag gcttcgtatt aacgtttgtg 7380  
 attatttcaa taggttcat cgcgagtata ttgacttita ctatgcact ttacatgata 7440  
 aaagaaacat tctggggaaa ttacaatata gaaaaatit aacgtaaaca aatacaigaa 7500  
 ccatggctat ttagtttacc agcigtgatt ttaatgttac tcalccagt tatcttcttt 7560  
 gttccaaacg tttttggcaa ctttgttatt ttgcccgcaa ccagatcigt atctgggata 7620  
 gggcggaggi tgatcattt gtgccacata tttctcagt gcatgggtgt aatctccatt 7680

aattttaaga tagtgtat ataggactat tttagctcia gigtgatigg aaagaggita 7740  
cgcatcaaat aatcaaaagt gctcgattac agtggctatc ggaaattat agagaatttg 7800  
aattatactc agcccgggi atacgigcat tgatgaataa taaattgaat tattacatca 7860  
tgattacatt atttatttt gtagectatg tagttatgga tattgactg tgggtttcc 7920  
tcatgtactc agcttcata tagttcttcc ggaccgttg aagttatctt atcagttgta 7980  
acattgatia tccgcattc attaatcttt attcgtcaac gactaacgat ggiggtattg 8040  
aatggaatga tiggatcgc agttacattt tattttattg caatgaaage tccagattta 8100  
gctttaacac agttagttg tgaacctatt acgacaatct tatttattgt tagttttccg 8160  
agactacctt acatcccctg agttaaggca aatttaaaaa aagagacctt caaatcatt 8220  
gtgtcacttg ttatggcatt gacgggtgga tcaattttt ttgttgcctc acaagcagat 8280  
ggfatgcctt caattgctaa attttaigaa gatgcatacg aacttacagg tggaaaaaat 8340  
attgtcaatg ctatactagg tgacticaga gccttagata ctatgiltga aggactagtg 8400  
ttaatcatag ctggattagg tatttatacg ttaacttaatt acaaagatag gagggggcaa 8460  
gatgaaagag aatgatgtag tacttaaatc agttacaaaa atgttagtgt ttattllgtt 8520  
aacatttggg tttatglat tttttgctgg ccataataat ccaggiggig gcctttattg 8580  
tggcttgatt tttagctcgg catttatctt aatgtttctt gcctttgatg taaatgaagt 8640  
gttgaaaaaa gctt 8654

<210> 5

<211> 2362

<212> DNA

<213> Staphylococcus epidermidis

<220>

<223> Designated as SE-3

<400> 5

aagcttcaca acttgaaaat atagecaaaa cattaaagga tttaggtaga aaacgagcaa 60  
ttttaattca tggtgcaaat gggatggaig aggccacgt tictggtgaa aatatacttt 120

atgaagttag cagcgaaaga gcaltaaaaa aatatagttt aaaagcagaa gaagtcggit 180  
tagcttatgc aaataatgac acgttgatag gttggtcacc tcaaacaaat aaacaaattg 240  
cattgaatat cctaagtggc acggatcaact caagtaaagc agatgiagti ttgttaaatg 300  
ctggaattgc tttatagtgt gctgagcaag tggaaagtat caaacatggc gtagagagag 360  
cgaaalatct cattgalaca ggtatggcaa tgaacaata tttaaaaatg ggaggttaag 420  
taatgactat tttaaatgaa attatigagi ataaaaaac ttigtitgag cgtaaatact 480  
atgataaaaa acttgaatit ttacaagata acggaaatgt taagaggaga aagctgattg 540  
atfeacttta actatgatag aacattatca gttattgctg aaataaaatc gaaaagecca 600  
tctgtaccic aattaccgca acgtgatctt gttcaacaag ttaaagatta tcaaaaatat 660  
ggtgctaattg ctatttcaat attaactgat gaaaaatact ttggcggtag ttttgaacga 720  
tiaaatcagt tatcaaagat aacatcgltt ccagttttat gtaaagattt tattattgat 780  
aaaaitcaaa tagatgttgc aaaacgagct ggigcatcta ttatttiatt aatagtaaat 840  
attttaagtg atgaccaatt aaaagaattg tattcatatg caacaaacca taatttagaa 900  
gccttagtag aagttcatac aattagagaa ctigaacgtg cacaccaaat taacctaaa 960  
attatlggtg ttaalaatcg tgatttaaaa cgatttgaaa ccgatgtct acatacaaat 1020  
aaattactta agtttaaaaa gtetaattgc tgctacattt cagagagtgg cattcataca 1080  
aaagaagatg ttgagaaaat agtagattca agtattgacg gittacttgt aggggaggca 1140  
tlaatgaaaa caaatgactt aagtcagitt tttgcctagt ttaaagttaa agaagaatct 1200  
ctatgatagt taattitgtt ggitttaaaa ccgaaagtga tattaagaaa attaaaaaat 1260  
tagaagtiga tgcagtaggg ttatatacatt atcccgatag taagagacat gctcactga 1320  
aacaattaaa atattlggtt aaaatagtgc cagatcatat agagaaagta gtgtcgtagt 1380  
aaatcctcaa atgtccacca taaagagaat aattaatcaa actgataita acacaatcca 1440  
attacatgga aalgaaagca ttcaattaat tagaaatatt aagaaactta attcaaaaat 1500  
aagaatcata aaagcaattc cagcaacaag aaatttaaat aataacattc aaaagtataa 1560  
agatgagata gactatgttt attatagata caccatcaat cacatcggga gggacaggic 1620  
aaagtttiga ctggaattaa ttaaaaaaaaa taaaggcgtt gatitctca ttgcggtggt 1680  
ttggaitttg aaaagataaa acgattagaa atatatcat ttggacaatg tggttatgac 1740  
atctcaactg gcattgagtc acataatgaa aaagatttta ataagalgac tgaatatta 1800  
aaatitttga aaggagacga atgattaaig aaaaitcaaa cagaagtaga tgaattgggc 1860

tttttcggtg aataatggtg ccaatatgta cctgaaacat tgatgccagc tattattgaa	1920
cttaaaaaag cataatgagga cgcgaaatca gatactcact tcaagaaaga atttaattat	1980
tatttaagtg aataatggtg tagagaaacg cctttaacat ttgctgaatc atacacaaaa	2040
ttgtaggtg gtgcaaaaat atatcctaaa agagaagact taaatcacac tggigcicat	2100
aaaattaata acgcgatagg acaggcacta ttagctaaaa ggatggggaa aactaaatia	2160
gtagccgaaa caggigctgg tcaacatggt gtagcaagtg ccaccatcgc tgcctttatc	2220
gatatggatc tiatigtitt catgggaagt gaagatatca aacgtcaaca acttaacgta	2280
tttagaagg aatigctagg agctaaagta gtgtctgtgt cagatgggca aggaacacta	2340
tcagatgctg taaataaagc tt	2362

<210> 6

<211> 5024

<212> DNA

<213> Staphylococcus epidermidis

<220>

<223> Designated as SE-32

<400> 6

aagcitttg atttttaag aaaaaattaa acaagggggc attgcttatg gtcaatagaa	60
gaaagatac aattatggc gcgggacata caggtagggc tciagcattc attcttgcac	120
aaaaggaatt aggagatatt gtgittgatt aacgccagca atcagagggt atggctaaag	180
gaaaggcgtt agatatitta gaaagcggac ccatttgggg gtttgacaca tctgtacatg	240
gttcagtaaa laiagaagat altaaagatt cagacatagt ggtagatgact gcaggatatac	300
ctaggaaaac aggaatgaca aggagaagaa tiagttcaaa ctaatgaaca aataglacga	360
gaaactgcat tacaattgc aacgtaigca cctcattcaa taattattgt attgactaat	420
ccggtgatg tiatgacata tactgcattt aaagcctcag gttttcctaa agaacgtatt	480
attggtcaat ctggaatiti agacgctgca agatatcgaa cttttattgc tcaagaactt	540
aacgigtctg tcaaagatgt aatgggttt gtttaggtg gacatggtga tacgatgta	600

cctttgatta ataacacaca cattaatggg aticcagtia agcaicitat ttctgaagaa 660  
 aagattgac aaatlgttga acglacacgt aagggiggig cagaaattgt tgcattacta 720  
 ggtcaaggct cagcatatta tgcaccagca actgctatat aigaaactat agatgcaatt 780  
 ttaaatgac gaaaacggit attaccaagt atigcttatc tagagggaga atacggitgt 840  
 tcagatattt gtticggagt tectactata ataggatac aaggaataga aaagattata 900  
 gaggtagata tgaataaiga tgagiatcaa caactacaac acctcgcgca agatgtgagt 960  
 gaagtcaaaa actcactaaa attcaaataa ataattatga agttctacat cttaaatgt 1020  
 tagatttttg tgaanaatgt gtaaagggia ttttttctgt gattataaa agcgtttct 1080  
 igatataalg aacatataat catagaataa ggagacgatt aaaatggcta aaggggacca 1140  
 atatcaagct catactgaaa aatatcatga gtaaaaagtc taaaaaagt tataaacctg 1200  
 tgggattat cattagtttt attattttta ttacaatctt gttattacc acaccagcag 1260  
 gattaccigt aatggctaaa gcagcactag ctattttagc ttctcctgta gttatglggg 1320  
 ttacagaage agttactat ccagtttctg caacattaat tttaggatta atgatacttt 1380  
 tactaggitt aagtcagtt caagatttat ccgaaaaact tggaaaccta aaagtggcga 1440  
 cataatacia aaagglagcg atattttagg aacgaataac gccttagtc acgcttttag 1500  
 tggtttttca acctcagccg tagcacttgt agctgcagca ttatttttag cagtagctat 1560  
 gcaggaaacc aatttacata aacgacttgc attatttctg ctatcaatgt ttggaaataa 1620  
 aactagaaat atagtcattg gtcctatttt agtatctatt gttctagcat tctttgtacc 1680  
 atcagctaca gcacgtctg gtgcagttgt cccaalatta ctgggaatga ttgctgcatt 1740  
 taatgtgagt aaggatagta gacttgcttc attatttatt attactgctg tacaagcagl 1800  
 ttctgalatgg aatataggta ttaaaaacgg ctgcagcaca aaatattgta gccatcaatt 1860  
 ttattaacca aaattlagga catgatgtat catggggaga gggltttta tctctgccc 1920  
 gggctcaatc attatgteta tagctcttta tttataatg attaagtita tgccacctga 1980  
 acatgatgca atigaagggt gaaaagagtt aattaaaaag gaacttaata aatlaggacc 2040  
 agtcagtcac agagaatggc gactaattgt gatttcagtg cttttatatt ctctggctga 2100  
 ctgagaaagt atgcatccg atlgattcag ctctgattac actagtgtct ctaggtatta 2160  
 tgctaatgcc aaagattggi gttattactt ggaaagggtg tgaagaag. attccttggg 2220  
 ggacgattat agtatitgtt gtaggaatct cacttggtaa tgtattactt aaaacaggag 2280  
 ccgtctatgg ttatgatca acatttgttt gatgggtctt aaacatttac cgalcatagc 2340

aactattgcg ttaattacct tatttaatat attaatacat ttaggttttg caagtgcaac 2400  
gagcttagcc tctgcgttaa taccigtgtt tatttcittg acttcaacgc taaatttagg 2460  
tgatcatgct attggttttg tatttaataca acaatttgtg attagitttg gtttctact 2520  
acctgtcagt gcaccacaaa atatgcttgc atatggtaact gggactttta ccgtaaagga 2580  
ttttttaag acaggtatac ctttaacgat agtaggttat attttagta tegtatttag 2640  
tttaacgiat tggaaaiggc ttggtttagt gtaagtaaaa gatttaggta ttaaaatgat 2700  
aattataaat gtctcgtaaa gtttaatat ttaactttac gacacatttt ttataaactc 2760  
gtggcaagtt aatcttaata gtigaaatgt atcgtataaa aatatatga atgtaaatag 2820  
aatttagiat tagagaataa caaaaaatig atgttaggtg gtaaaatcia atggctatag 2880  
gtgtcataat aatagagtt tttaggctaa ataataatcc attattigat tatatatata 2940  
gtaataaaga atctataaat catgtttatt ttattatcc aactgaagag ttigaagaag 3000  
aagcaaaaaa gaaagcaca tactattatg ggtccataca gaagttatg tatgaactac 3060  
aacgatatga talagaacc cttttgatgt cttatgataa attaatagac ttttghtaaa 3120  
aacaagctat agacaaagtt gtgttgcag gtgatattat gagttatcat cacgaagaat 3180  
atgacatttt acatcaaagg aaacgattta aacaagctaa tattcaagta atatcattaa 3240  
gagcaaatca ttattttaa ccccgtaaaa cacataataa acaaggggaa ccatataaag 3300  
tatttaccag tttttataga aaatggcgic ctactttaat gattagagat gaataigact 3360  
atcattttaga agatatttca aaggtttagt tgaaatctca acalaaaatt aaagaagatt 3420  
atcattcata tggataagt gaacgtgat tcaaaaatcg ttggtctgaa tttttatctc 3480  
aagatatcga aaattataaa gaaaacaggg aatacttgc tgaagtatta acaagccaac 3540  
taagtattta cttagcttat ggaatgatag atattataca atgttttcaa cgatttactt 3600  
caaaattatg ataaaaatga acaaaattac gaaactttta tacgtgaatt gattttttaga 3660  
gagttttatt atgtattaat gaccaattat cccgaaacag ctcatgttgc ttttaagaa 3720  
aaataccaac aattgaaatg gtccttataat gaagagaatt ttaactgtg gaaagatggg 3780  
aatactggtt ttccaattat tgatgcagca atggaggaac ttaaaacaac tggatttatg 3840  
cataatcgca tgagaatggt agtttctcaa tttttaacta aagatttgtt tattgactgg 3900  
atttgggggt agtcatttt caaacaaaa ttaatagatt atgatgcagc ttcaaaigt 3960  
cacggatggc agtggtcagc ttctactgga acagatgctg taccatactt tagaatgtt 4020  
aatctataa gacaaagcga gcgttttgat aataatgcac gatataaaa aacttacatt 4080

ccaagattaa atcagglaga igctaagtat ttacacgata ctcataaati cgagcaacaa 4140  
 ataaaggggc aaggigtiga aataggtaaa gactatccta aacaaaigat tgatcacaaa 4200  
 gaaagtagac aacgtgtaat gtcagaattc aaagctatag attaaataaa aaagatctga 4260  
 acaacatgat ataggtgttc agatcittat ctagttacat aaaaaagcaa acatgaatta 4320  
 aaatataatc taacaaagtt aaaatataca tataatitaag attiaattta gitticaaag 4380  
 giacticcca aittgtataa cggggcicat aataaaataa tigtatcaa talaatccta 4440  
 tccetaaegg taaacacati aalaaaatag ctttagtata actccatcct atttgatgce 4500  
 ataaatgacc ttcataagt tgaataatga tgagacatac cattaaaatt acttcaattia 4560  
 tcatlgglat aatctcacc ctitaataaa caataigact gtigtigtga tgagcaccat 4620  
 taaaacgaca aatagtaacg cittaacatc tatgattaaa aaaaccicti tcacaatttt 4680  
 taaaggtgca titaataaat agacagtatg taatcttaag aatcgaccga tglaaaacc 4740  
 taatccattt aagaacatta atataactat caaiagtcga titaaccata cataagacgt 4800  
 aaaatgtgca atitctaaaa atataagaat lgtgaggat attgctaaga gtacgccaag 4860  
 tattaatatag gtgaaataaa tccattctgt gatgttitaat ccagctaaaa agttaaattg 4920  
 aaatlggttt aagtgtatga gatcgglaai catataaaat gtgttiggaa ctaataatag 4980  
 aaatatgagt ccgaaaacaa taaataaggg ccattcaaaa gctt 5024

<210> 7

<211> 9515

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<220>

<223> Designated as P2-2

<400> 7

aagctttcct ccagaccctt caccgccgtg gagatcgacg gcigggcgat gtacagcttg 60  
 cgcgaggcct cggccacgtt gccgcattcc acggtggtea cgaataactt gattigccgc 120  
 aaggtatagg acgccacigc aagacctcat cggcgcatca tcttccccgg gccgggcgtg 180

cgcgccctga ttgtgtgtc cgccgcgctg caagcaagtt gcaggccgct gccgagcgtc 240  
 gcgcgctggc cgcggaacga ttgcecgctt gcacgataac ccagcacgac gcacittgcc 300  
 ggggcacgcc tggccagctt tttcttatgt cccgaggaca tttttaataa ttttccctcg 360  
 ccgcggttg cgcgaccatc cttecccatc gaccccatgg acagcggttc gcctcccggc 420  
 ggtccgggcc atgcgtgcag aaccacgacc ggcgagacc ggcgagataa caaggagaag 480  
 gtggggtgtt cgaactcagc gattggcaac ggcgcgccgc gacacagcgc ttcatcgacc 540  
 aggccctgat cggcggcgcg cagcgtccag ccgccagcgg cgctaccttc gacgccatcg 600  
 atccggcgag caatcgctg ctggcgcggg tcgcgccctg cgaatcgggc gacgtcgacg 660  
 cggcagtgcc cgcgcgccgc cgcgccttcg acgaaggccc ctgggcgcgt ctgcgcccg 720  
 tegagcgeaa gcgcgtgctc tgcgcctggc cgagctgatg ctggcccatc gcgaagagct 780  
 ggcgctgctc gactcgctga acatgggcaa gccggtgatg gacgcctgga acatcgatgt 840  
 acccggcgcc gccacgctt tcgcctggta tgcggaaagc ctgcacaage tctacgacca 900  
 ggtcgcgccg gccgccagc agaccctggc caccattacc cgcgtgccgc tgggggtgat 960  
 cggcgcggtg gtgccgtgga acttcccgct cgacatggcc gccctggaagc tcgccccggc 1020  
 cctggccgcc ggcaactcgg tgggtgctcaa gccggccgag cagtcgccgt tctccgccct 1080  
 gcgccctggc gagctggccc tggaggcggg ggtgccgga ggcgctgctga acgtggtgcc 1140  
 gggcctcggc gagcaggccg gcaaggccct cggcttgca cccgaggtgg acgcaactggt 1200  
 gttaccggc tccaccgagg tggcaagta ctcatgcag tattccgcgc aatccaacct 1260  
 caagcaggtc tggtggagt gcggcggtaa gactccgaac ctggtgttcg ccgattgccg 1320  
 cgatctgac ctggcgccgg aaaaaggcgc ctccggcatt ttcttcaatc agggcgaggt 1380  
 ctgttcggcg aactcgcgt tgcctggtgga gcgttcgac cagcagagt tcgtcgagcg 1440  
 cctgctggcc aaggcccgcg actggcagcc gggcgatccg ctggaccgg gccagccgcg 1500  
 ccggcgccat cgtcgaccgc cggcagacc cgggattct cgcgccatc gagcgggcgc 1560  
 aaggcgagg cgcgacctg ctgcgggtg ccgccagttg acgatcaacg gttcggacaa 1620  
 ctteatgaa ccgacctgt tcggcgacgt acgcccggac atgcagetgg ccgcgagga 1680  
 aatcttcggc ccggtgctgg cgatcagcgc cticgactcc gaggacgagg ccatacgctt 1740  
 ggccaaggac agccgctac gccctgccgc ctgcctgtgg agcagcagacc tgcaccgtgc 1800  
 gcaccgggtg gcgcggcgt tgaatgccgg aacgtgtcgg tgaataccgt ggacgcgctg 1860  
 gacgtcgcg tgccttcgg cggcggcaag cagtccggct tcggtcgcga cctgtcgctg 1920

cattccttcg acaagtacac ccagttgaag acgacctggt tccagttgcg ctgaagacgc 1980  
gacggacgcg acacgactcg atgccgataa cgacaacaag aggacgatec aatgaacgac 2040  
acgccgaacg tgcgtgagcc ggccctgcgc cgcgtgctcg ggctgggacc gctgctggcg 2100  
gtggccatcg gccctggtggt ttcccagggc gtgatggtae tgatgctgca aggcgccggg 2160  
acggccggcc igggcttcac cgtgccgctg ggagtggcct acctgctggc gctgactacg 2220  
cctttccctt ttccgagctg gccctgatga ttccccgcgc cggtagcctg agcagctaca 2280  
ccgaggtggc catcgggcat ttcccggcga tccctggcgc cttttccggc tacgigtgtg 2340  
tggcgatgtt cgcctctctg gcggaactgc tgcigtctga cctgatcacc ggcaaggctc 2400  
accccggcgc gctgccgcgc atgctggtgc taccggctgc tggcctgtt caccctgctc 2460  
aacctgctcg gcacgcacat ctccgcgcgc ctgcagagcg cgtggcgcct gctgatgatg 2520  
atcgtccctc tggctgctcg cctgggtgcg gtgagcagcg accacgcttc cgcgcagacc 2580  
gccctggcga gcggctggaa cccgctgggg gtaagcgccc tggcgcctac cgcgatggcc 2640  
gtgtggggct tgcctggcgc cgagttcctc tgcctgctgg tggaggagac gcggcgtccg 2700  
gagcgcaaca tcccgcgttc gatgacctc ggccctgagca tcatttccct gaccategcc 2760  
ctctactgct tccgtgctct gctgtgcatc ccgcaggcgg aactggcggc cgaccgcctg 2820  
ccacacttc tcttcgcaa ccgcgtgttc ggcgagtac gccagctgtt cctggctgac 2880  
gccgcgatca ccgccacctg cagcaccctc aactcgtcgc tggcggcgat cccgcggatg 2940  
ctctacggga tggcgcagaa cggccaggcc ttcccgaat tcaagcagct cagccggcgg 3000  
gcgcgcacgc cctgggtggc ggtgctgttc gtcgccgca taccggcct gccgatcctg 3060  
alcctcggcc aggaccggga ctcgataaac ctgctgctgc tcgccgcgc gctggcctgg 3120  
ctgctggcct acatcactgc ccacgtcgac gtgctggccc tgcgccgtcg ctatccgcac 3180  
atcggccgtc cgtttcgac gccgttctac ccgctgccgc aactgttcgg catcggcggg 3240  
atgatctacg cggctggcca cgtctcgccg accccggaaa tgaccggacg gatcttcgcc 3300  
agcggcggcg tggctgctcg cgtggtctcg ctggtggcgg tggctgggat caaggcgtg 3360  
atgcgcaagc cctctctctg acccgaaccg ctcgagacgg ccggtgagac tgcggcggc 3420  
aagtcctcgc cctcgaacc cctgcaatc ctccggcctg acgcgccaag ggaacaagga 3480  
gaacacagac gatgaccgtc cagctcaacc cgcagcgcga caccgcgac taccagcaac 3540  
tggacggcgc gcaccacatc cacgccttc tcgaccagaa ggccgtgaac cgcgaaaggc 3600  
ccgcgggiga tggctccgcg cgatggcctg cagctctggg acaacgacgg caagcgtac 3660

ciggacggca tglccggcct ciggigtacc aaccicgget acggccgcca ggacctcgcc 3720  
 gccgccgcca gccgccagct ggaacaactg ccgtaciaca acatgtlctt ccacaccacc 3780  
 caccggcggg tggtaggact ticcagatg ctcttcagcc tgcigccgga ccactacagc 3840  
 cacgcgatct acaccaactc cggctccgag gccaacgagg tgcigalccg taccgtgcgg 3900  
 cgetactggc agatectcgg caagcccgag aagaagatca tgatcggecg ctggaacggc 3960  
 taccacggct cgacctggg cagcaccgcg ctccggcgga tgaagtcat gcacgagatg 4020  
 ggcgatget gccggacttc gccacatcg acgaacctc ciggtagcc aacggcgggc 4080  
 agctgagccc ggccgaagtl cggtcgccc gcggcgctgc aactggagga gaagatectc 4140  
 gaactggggc cggagaacgt cggcgcttc gtcgcccagc ctctccaggc cggcggtggc 4200  
 atgatcttc cggcgaag ctattggccg gagatccagc gcctcggc gcagtagcag 4260  
 gtcgtgctgt gcggcgacga agtgatcgcc ggcttcggcc gcaccggcga atggttcgcc 4320  
 cacgaacact ttcgctcca gccggacacc ttgtccatcg ccaagggcct gacgtccggc 4380  
 tacatcccca tggcgggcct ggtactcgcc aagcgcateg ccgaggtgct ggtggagcag 4440  
 ggcggggigi tcgcccacgg ctgacctat tccggccacc cggtagcgcc ggccggtggc 4500  
 atcggcaacc tcaaggctgc gcgacgaggg cgtggtcacg cgggtcaggg aggagaccgg 4560  
 cccctacctg caacgctgcc tgcgcgaggt ctccggcgac catccgctgg tcggcgaggt 4620  
 ccaggggccc ggcttcgctg ccgcgctgca gtccgcccag gacaaggtag ccgcaagcg 4680  
 ctccgccaac gagaacgatc tggcctggcg ctccgcacc atcggcggtc tcgaggaggg 4740  
 cgtgatcacc cgtccacc ccggccgat gatcatggcc ccggcgctgg tggccggggc 4800  
 tggcgagatc gacgaaciga tcgacaagac ccglatcgcg tgggalegca ccgcgcgcg 4860  
 gatcggcgtg ctctgacgcg ccccgcgggc ccggcctcgg ccgggtcgcc tgcgacacgg 4920  
 agcgtcccc cataacgacg atcggcgccc tggcgaccgc gcgcggaacc gtlccggcct 4980  
 ctggcgggca cggctaage aacatcaca caatgccaal cggctgtggg agtgttccat 5040  
 gttcaagtc ttgcaccagt acgcacacgt gtttcccggt ttgtccctgt tegtccctggc 5100  
 gttcggcgcg gggcccagg ccgagagcca gagcctgacg gtgatccct tggcgggcgc 5160  
 gaccaaggcc gccaggaac aggcctattt caaaccttc gagcgaagcg gcggcgggca 5220  
 ggtggtcgcc ggcaataca acggcgaaat ggccaagtg aaggccatgg tcgacgtcgg 5280  
 caaggicagc tgggacgtgg tcgaggtgga gagccccgaa ctgctccgcg gctcgacgca 5340  
 gggcgtgttc gaacgctcg acccgcgcg tttcggcgac ccgcgcgagt tcgtcccgcg 5400

cactttcage gactgcgggg tggccacctt cgtctggctg atggatgatg cctacgactc 5460  
gacgaagctg gccagggcgc cgcagtcctg ggcggatttc tggaacgtcc gcgagttccc 5520  
ccggcaagcg tggcctgcgc aagggcgcca agtacacctt ggaagtggcg ttgctggccg 5580  
acggggtgaa ggcggaggac cctacaagg tactcgccac cccggagggg gtcagccgcg 5640  
cctttcgcca agctcgacca gctcaagccg aacatccagt ggtgggagge cggcgcccag 5700  
ccggcgcaat ggctggcggc cggcgacgtg gtgatgagcg cggcctacaa cgggcgcctc 5760  
gcccgtgcgc agaaggaggg ggtgaaactg gccatcgtct ggcccggcag tctctacgat 5820  
ccggagtact gggcggtggt gaagggcacc ccgaacaagg cgttggcgga gaaattcctc 5880  
gccttcgcca gccagccgca gacgcagaag gtgttctccg agcagatccc ctacgggccc 5940  
gtacacaagg gcacctggc gttgctgccg aagacggtgc aggaggcgtt gccgaccgcg 6000  
gccggccaac ctgcaaggcg cgcgggcggt ggatgccgag ttcigggtgg accacggcga 6060  
ggagctgaa cagcgttca atgctgggc gcgcgctgag cgttgcgtt cggcaaaaaa 6120  
aatgacgggc cccaagtctt cggggcccgt cgggtcaaa cgttgcggg gtgatcagcg 6180  
cagetcttc aacaacctt gcagataccg acagccctcg gtatccagcg cctgcaccgg 6240  
aaggcgcggc gccccacct ccaggccgga gaggeccagg ccggccttga tgggtgctcg 6300  
cagcccccg cggaggatga agtcgagcag cggcaactgc cggtagaaca gcgcgcgggc 6360  
cttctccagg tcgcctgca gaaccgctg gtagagctgg ccgttgcgag tcgggatcag 6420  
gltcggcgcg gccttgcacc agcctttcgc gccggccacg aaggcctcca gcgccagcgc 6480  
gttgcagccg ttgtagaagg gcaccggcc ttcgcccagc aggcgcagct ttgtcatcgc 6540  
ctggatgtcg ccggtgctt ccttgacctt ggtcacgttg tccacttgc ggacgalcgc 6600  
caggatcagt tccaccgaca tctgatgcc gctgggtccc gggttgtgt agagcatcac 6660  
cggcacgccg atggcttgc caaccgcgcg gtagtgctgg aacacttccg cctcgttgag 6720  
cttccagtag gagatcgcca ggaccatcac cgcctcggcg ccgagggatt cggcgaactg 6780  
cgcgcggcgc acggtcttgg ccgttgcag gtcggagacg ctgacgatgg tcggcacgcg 6840  
atgggcgacg gttctcaggg tgaagtcgac cactctctc caitccgggt cgtcaggta 6900  
ggcgccctcg ccggtcttgc cgagcggggc gatggcgtgc acgcccctt cgtcaggcg 6960  
ctcgaatgag ccggcgaggg ccggcaggtc gagaccgccg tcggcgccga aggggggtga 7020  
tgggttagcc gatgatccc tggatggatg cggacattgg algtaccctt gacattgagt 7080  
gggaaatgcc aggaacggacc tgggtggaaa ggtcgttctc ctcaggcagt cgtgtttgcg 7140

cggcaggcag cgccgggct agtagttgaa tgcggcgccg tggcgcttcg gggiggagat 7200  
ccagtcgtgg gcctcgcgcg ccagggcggg cgggatcggc ttgatctctc cggeggccat 7260  
cgccagcaac tgcactctcg ccgcgcgctc gagcagcacc gcgatcacgc aggcctcctc 7320  
gatgctcgca ccggtggcca gcaggccgtg ggggagagc aggatggcgc gcttctcgcc 7380  
gagggcgggg gagatgatct egccttcctc gttgcttacc ggcacgcccg gccagtcctt 7440  
gaggaaggcg cagtcgicgt atagcgggca aaggccaag tgcgagacct gcagcggiaa 7500  
ttccagggtc gacagcgcg cgatgtgcag cgggtgggtg tggatgatgc agttgacgtc 7560  
cgggcggggc cgatagacc agctgtggaa gcgatggcc ggattcgcca tgcctgccc 7620  
gtggaggacg ttgaggtctt cgtcgaccag cagcaggttg ccggcgctga tctcgtcgaa 7680  
gcccaggccc agttgctggg tgiagtaggt cccgcctcc gggccgcgcg agggatctg 7740  
cccggcgagc ccggagtcgt ggccggcctc gaagagaatc cggcaggtca gggccagctt 7800  
ttgccgtca gtcacgat tctcgccgag gctgcttcc atctgctca gcgcgtgctg 7860  
gatcagttga tcttgggta atccaggtg cgtaacatg cgaggttctt ttgacggagc 7920  
gagtcggggg aaaccgagc cagttgcgcg ccacgcaacg acccggtgt aatgacacg 7980  
gatcaagta tatgacaaa agtgctatt agcaagagag aagttcacc gccatcggga 8040  
gaaggctgic ctcaagtc atgccttga aattgctgag aaaaaaac cgggtcacgc 8100  
tgagaccct ggccgacaag accggcctga ccaagagct cctgtccaag gtcgagcgcg 8160  
ggctgaacac gccgtccat gccgcgcgc tgaagctggc gaaggcgtg aacgtgcagg 8220  
tggaggagct gttctccgag gaaagcgacg gtgtcgacgg ctacagcacc gttcgtcgcg 8280  
accagcgcaa gtcgctgctc agcggcgacg accgcccggc ctacgcctc ctgctcgag 8340  
cagatcggcg cccgcgcgt gttgccgtt atctccacc cccgcgcga tticagtcac 8400  
tcgacgtta aggagacct cggcgaagag ttactctc tccatgagg ccaggctgag 8460  
gtcgactta igaaccagc gatcactc gagcggcg acgcccgtca ttcaacgca 8520  
cagaagccgc accgcatcg ctccctgggg gagaccag cggaaatgct ggigggtgac 8580  
cacagcgac aatgaggcga cggcttcggt cgateggatg ctgctaacg ttctgttca 8640  
ttatcgaact gitaatgat tctggatg tgagccctc gaccccgcg taaggcttc 8700  
gtcagtgcc gtcaggcag cgcacaaca gacgagacc gaccgatggc tgaatcctc 8760  
tcccgcgcg aacggigcga cgttcgctc acgatggcga cagcgtcgc ctcaaggct 8820  
tcactacct gatccgacg nccgcccggc acgagctgat ccgccagggc aggaaagacc 8880

tgacgctgat ccgcaigact cccgacctgg tctacgacct gctgatcggg gcaggctgcg 8940  
 cgaagaagct ggtgttctcc tggggcggca accccgggtg cggttcgctg cacegcctgc 9000  
 gcgacgcggt ggagaagggc tggcccgcaa ccgctggaga tcgaggaaca cagccacgcc 9060  
 gacctcgcca acgclatit tgcggcgccc tccgggctgc ccttcgcggt ntgcgcccct 9120  
 acgcccgttc cgacctgccc aaggtaaac cgtgatccc cagcgtcacc tgcctgtca 9180  
 ccggcgaagt gctggcggcg gggccctcgg tgcgtccgga cgtcagcgtg atccacgcgc 9240  
 agaaggccga ccgcaagggc aacgtgctgc tctggggcat cctcggcgtg cagaaggaag 9300  
 cggcccgtgc ggcaagcgc tgcctgtca ccgtcgagga gatcgtcagc gaactggacg 9360  
 ccccgatgaa cgcctgcgtc ctgccgagct ggggcgctca gcgccgtgtg cctgggtccc 9420  
 ggcggcgcgc atccgtccta tgcctcggc tactacgagc gcgacaaccg ctctaccag 9480  
 gactgggacc cgatcggccc cgaccgcgaa agctt 9515

<210> 8

<211> 2291

<212> DNA

<213> Enterococcus faecalis

<220>

<223> Designated as EF-1

<400> 8

aagctttaga taatgataaa cgcgtgtatg tgaatgtcca gccgattcaa tgcctactg 60  
 gagaaacagt gattggtgic ctttatgtga aaagtaattl agaaaataaa taccaagaaa 120  
 ttactaacac agcaagtatc ttttccactg ctcttattat tgcgcagca atctcgatt 180  
 ttgtgacctt actgattgca cgatcaatca cgaagccgat tggtgaaatg cgcgagcaag 240  
 ccattcgaat cgtcgtggg gattacgctg gaaaagtaga agtccatgga aaagatgaat 300  
 taggccaatt agcagaaaca tttaatcaat taccagaacg gattgaagaa gcacaagaaa 360  
 caatggaagc agaagaatcg tttagatagt gtcttaacgc atatgacaga tgggtgicatt 420  
 gcgacggatc gccgcggaaa ggtgattacg attaatgaga tggcccttc attattaaat 480

gtaaaaaatg aaaaigtgat tgggacctcg ttattagagi ttttagatat tgaagaagat 540  
 tacacattgc ggaagctggt agaagagcca gatgaactgc tgattgatec ctcaacgict 600  
 gatcgtgaag aagaccaa at gattatccgg gtagacttia cgaatgattcg tcgggaatca 660  
 ggatttatta ctggcttagt ttgcgtactt catgacgtca cagaacagga aaaaaacgaa 720  
 cgggaaagac gggaaattgt ttccaatggt tctcatgagt tgcgacgctt ttgacaagta 780  
 tgcgtagtta tatagaggct ttgagtgaag gagcttggga aaacctgag atttgcgccga 840  
 atttcttaaa agtcacgita gaagaaaccg accgatgat tcttatgatt aatgatttgt 900  
 taaatttata tcggatggac tctgggaata cacatcttca attagagtat gtgaatttia 960  
 acgaattgat taatttgtc ttggatcgct ttgatatgat gattgaaaat gagcaaaaaa 1020  
 attacaaaat tcgccgtgaa ttactaaac gcgatttatg gtagagtta galacagaca 1080  
 aagtaattca ggtttitgac aacattttga acaatgcgat taagtattcg ccagatggcg 1140  
 gegtcattac ctgcgacta gttgaaacac ataataatgt cgtcttiagt atctcggacc 1200  
 aaggtttggg catccctaaa aaagatctcg ggaaagcttt cgagcgtttt tatcgtgigg 1260  
 ataaagcacg tgcgcgagca caagggtggga ctggtttagg tttagcaatt tctaaagaag 1320  
 taattcgggc ccataacggg agtatitggg tggaaagtac agaaggtgaa ggatcaactt 1380  
 tctatatttc actaccatat gaaccttatg aagaggattg gtgggaatga tgaaaaaatc 1440  
 agaattgatt acaagaattg gcttgatttt gatggtcatt ttaagtatat atttttcagt 1500  
 caatatctgg ctgaattctg ccaaaaaaat accagaaatg aagtcgggaa gccaaagtcac 1560  
 aacagctgtc aatgaaaaag ccattggcga tctctattta cctttgcaat tgattcgaat 1620  
 agccgatgga aaagcgaatc aaagtaatcg tgaacatta attagtaatg ttcaaaatga 1680  
 tattaaaatg gctacgtttg gtaaattgac acaagttgtg acaaaaaatg cagagcaact 1740  
 taagcgtac aaccaaatgg aacaaggcat tgaacttctt tatcaaggtc cctttttaat 1800  
 ctccgactat gcttcgattt ataacttate cattaatttt actaacttta atgagttgac 1860  
 ggaccagtat ttacgaaaa ttcaattgga tttaacgaa aataagatac gttttttaga 1920  
 ttatgatcaa tccaacgict atgaagcgcc calgactgtt aalaagcgcc gcttaattggg 1980  
 aattatcaat aaagagggat tgcaaatca agacgtttcc gaaaatacgc taaccaaaaca 2040  
 aggacaatgt tatttaacca atgatatgaa gttgaaaaag tacagttata tcttanitcg 2100  
 caaccagita ctgilttag gaatgctttt ttcaatgaaa cggaagatat ccaaccaat 2160  
 gaagacagtc aagaettaac ctatacgagt aaagaagaac gattgtttgc agaagaaaaa 2220

ciggggaaaa tcatitttaa agggaccttg ccagaagaga ataaacggga cccaatctat 2280  
aatcaaagct t 2291

<210> 9

<211> 2441

<212> DNA

<213> Enterococcus faecalis

<220>

<223> Designated as EF-27

<400> 9

aagcttcigc gctaggaacc agccctitaa ttacatctcc ccatactgga ttgacaatg 60  
ccacttgata agcaaaaatc acaaaaataa caacaattaa agcaacaaca atagcttcaa 120  
ttttctaaa accaatitti gtcaataaca acaaaagtaa aacatcaaat accgtaatga 180  
agacagccag acctaaagga atatgaaata ataaatataa ggcaatigcg cccccgataa 240  
cttcagcgal atcigtgacc ataaltgcta acctctgtaa aatccataat acaataccia 300  
acgtcttact agttctagca cgaatcgctt gtgctaaatc caictgtgaa caatgcctaa 360  
tttagcagcc alatatggga gcaacattgc aatcaaatg gaaattaaaa taategacat 420  
caataaatat tgaanaatit gtccccagct aattgaagta gaccagtctc ctggatccat 480  
ataccctact gctaccaatg ctcttgacc tgagtaagca aataacgttt tccaaaaact 540  
catatitita ggcacgtcga tgggtgccatt aattcttca agcgaaggac catttgcata 600  
ttcaatcaaa tgatgcttt gctttggctc atgtcttct gaattttca attcaattcc 660  
ttctttcgtt ttgcaataat tttaaaaggc ccttccgctt agaaggttaa cctctagtat 720  
atittaggia cacctaaaa atactgctaa aaataacaaa algcaagact tgaagaaaa 780  
ttttgacagt gtaaaaaatg atgtctgtaa atgtgcgac ttaaagttag aagaaatcag 840  
ggtagctggg agttgattat cttagaagt agaaaataag ggacctaat catctcgct 900  
taggtccctt atttatitit tatteggita ttctattaag aatggatgct acaatttctg 960  
tcgtgtcagc tgaatgattt ctaaaatctc gtaaacctaa tctgacgaaa accttcaagt 1020

acttcgggca acttatttn ccccatcca aaagttccat catticitti caataaictt 1080  
 igtaaaatit ettcitttc gaccgctaac aaaaaatgat aaacgtcaat gccigctcgt 1140  
 ctacagataic caatcagctc ticttcatai tcatttttat aaagggtcat tgiaacaata 1200  
 ateggccgtc cagacictti ggacattcgt ttiaataaat gagcatcca gcaacgccat 1260  
 tctgatact cctgaaaac attticittc atttcttcgg gaactagctc catcaatgca 1320  
 ctaccaataa ticttgatc ataaatgatt gcgttgggaa gtittgttg taactcatgt 1380  
 gcaatggctg ttttccgga tccaaacgca ccgtttaacc aaataattat cataatttc 1440  
 tttctctcg aacaaattc ttigtgttt aatttaggtg ctagattact ttiaattttt 1500  
 itagccattc acttatagt actacttaca tctttaacag taaacgagac aaactaaaaa 1560  
 tacaacatcc tacgtatta accteggggt atataacata ctcatcigt aattctccc 1620  
 taaaaaaaca gaatgigggc aalctttta agaataatg aatagaataa caacaaacag 1680  
 taattcaggt ataaccagt agaaattgtt ttatttttag tcacgagiat gataagcatg 1740  
 taaatcaaat agaataat taggtgaggt tactctgaag aacacaggt atcgctcgga 1800  
 aatgicgaga gacagtaac agtaaagcag ggatigicga attaaggcti tectaagata 1860  
 actagaatli tttcttacg tctcagaaag ccaagctca attatigiga ttacctata 1920  
 aletcttct tttattcggc gacctctta atatgattaa ttggagggtt ttaaattgaa 1980  
 agctgtcact geatcacia agaaaaaac cctacttct aaaaglatcg ggaactttac 2040  
 ctgctcacc aitttaggca tttcaattt tatcatcgtc tictcttggc taaaaatgaa 2100  
 tgcctctct cacaccttc cctcagaaga attcctcgca acaccaagta aaacagatga 2160  
 ttctttatct ccatcaaac tttttactt ttcaattcga acctgttcc gaatgatgt 2220  
 ggggatggct tggctctcc tgtttctct tgtttttgtt atttagccg taaaalataa 2280  
 aacggcacga agagtcaat taccattagt taatttctt gaatctgtc cattgctagg 2340  
 tttttgacc ttacaactg ctgggttact tggtttatt ccaggaaaig tcatgggggc 2400  
 agaagcgggt gctattttg ccatcttcc aggtcaagct t 2441

<210> 10

<211> 3480

<212> DNA

<213> *Enterococcus faecalis*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designated as EF-7

&lt;400&gt; 10

```

aagcttctag cglttcggat tggcgccat gaigcaccag gagagecagc aatcaatacc      60
aaaaalaigc ctacagcagg aggacttgca atctacattg cttttgctag ttcattgitta     120
ttgatttttc gttcgattat cccacaagat tatatttggc cgattatitit ggctgggtgga     180
alggttgttt tgacaggccct caitgatgat ailaagaga ttactccaai gaaaaaaca       240
atcggatitit tgitagcagc attagtiatt tiattttgtt gctggaattc ggatagattit     300
tgtgacgttg ccagttgttg gaatgattga ttlgcgctgg tttagtttac cactaacitit     360
attgtggatt ttagcgattt cgaatgcagi aaatttaatt galggtttgg atggtttagc     420
atcaggcgta tccattattg gattaaccac gatttggtatt acagggiatt ttttcciaa     480
tgctaaaacg gtctatatcc caattgttat ttttatttta gttgcgagca ttgcgggatt     540
tttcccatat aattttatc cggctaaaaat atttctagga gataccgggg cgttatitci     600
cgggtttatg attgcagtaa tgcgttaca gggcttgaaa aatgctacgt tiattacggt     660
aattacgcca atggigattt taggtgtgca attacggata cggtttatgc aattattcga     720
cggctatitg acaagaagcc calttcctca gcagataaaa tgcattitaca tcaccgcttg     780
ttatcittag gttttacca taaagggggc gtcattgacta tttatgcatt agcgttagtt     840
ttttcittg tctctttatt gttcagctat tcaagtacag tagcatcaat tttattaatt     900
gtcttttgtt taattggctt agaactatlc attgaactaa tgggtctagt tggcgaaggg     960
cateaacctg tcatgtattt gttacggatt ttagggaatc gtgaatatcg tcaggagcaa    1020
atgaaaaagc gacttggcaa gcattetaag agaaaglaaa gaaatettta ggttgcittg    1080
cgagagctaa acctatgata taattccatt aaacttaaaa agtataatgt gtgaaacata    1140
tgcttttttt ttaagacgat gtttcagtag taaggagaaa tgagcatgca agaaatggta    1200
acaatctega ttgtcactta taatagtcgt tacattttta atgtactaga ccaattaaaa    1260
gccgaactag gtacigatag tatctatgat atctatctct atgacaatca tttctgaaaca    1320
gcgtatcttg aaaaattaac aacataigaa ccatttatta ctatccatcg cgcigaagaa    1380
aatcaaggtt ttggctatgg tcataatcaa gigtatttca atgcttcgac aaagtatgca    1440

```

attatititaa tcccgatgtg ttggttacta aagacgtgct tgatcgttat tagacgtatc 1500  
aaatagataa gaacattgca gtcggtagcc ctaaagttgt taaatgaaga tggcacgacg 1560  
caatatttag ttgcicaaaa attagatgtc ttcgattata tgttacgttt tattcccttt 1620  
caatttghaa agaaaatitit tgataaacgt ttgagtatit atgaatgtcg cgatttgcg 1680  
gatacagaaa caacggatat taaaatgggc tcaggctgtt ttatgttgat tgatcgtgaa 1740  
aaattcgttg aaattgggtg gttcgtatgaa cgtttcttca tgtactttga agacaacgat 1800  
ttatgtttac gctttggcaa agcaggctat cggattctct atacgccttt tgaaacggtt 1860  
gttcacatgt atgaaaaggg cgcccataaa agtcgaaaat tgtttaaaat ctttatgcaa 1920  
tcaatgggga aatitititaa caaatggggc tggagttctt tttaatgagt caaagattag 1980  
cggtagtcat cgtcttataa caaatgaaaa tggctgatac gccgaattat ttgttattaa 2040  
aagaagtggt agaccacccc caattgcaat tatttattit tgacaacagt ccacttctc 2100  
aagaagatgc attatititaa caaccaaatg ttacttatcg acataatcct gataatccag 2160  
gactagcgac cgcttataat gaagcgattg ctttttagtca agcgaatcaa tgigaattat 2220  
tgttgctcct tgaccaagac acagaagtgc cagctcttta ttttgatacg ttgatcatca 2280  
tgccattaga tccgactgtg gcagtctatg ttccaattgt agaagcaaat ggacaacaaa 2340  
tttcgccagt atatagtgat caatagcttg ggcttaaagg agcaaagcca acagcagga 2400  
tagccaacca accgttgatg gctatcaatt ctggtacagt tattacggca gaaacgctac 2460  
gctgggttga aggattttcg gaagaatttc ctttggacta ttttagaccat tggttctttt 2520  
atcaaitaaa tcaagccaat aaaaagattg aagtcctacc aatccacctt aaacaagaat 2580  
tgtctgtttt agattatcti acaatgagtc ctcaacgtta tcgctctatt attgaagcag 2640  
aaacgttatt ttatcgtcga tatgatcaag aaaagtttc ccatcatcga cgccatttat 2700  
ttttacgcag tagtaagcaa tttttaactg tcaaaaatcg ccaaatttgg cggcaaacat 2760  
tggcagaatt tcicaagttt atgaaaggat aatctatgat ctacgtttgt attgctgacat 2820  
ataatggaga aaaatctctc gcggaacaat tagatagiat tcttttataa gtcagtgaag 2880  
aagalgaact aattatttca gatgatggtt ctactgatca tacgttggaa attttgagga 2940  
cgtaigcagc gaattatccc caaattcaat tgitacaagg tcccagggca aggagtgatt 3000  
gctaattttg cattttgctt tacgcatacg aaaggcgaag taatattttt agcagatcaa 3060  
gatgatgltt ggttgccaaa taaagtaacg acggtgacag aatattttga agcgcacctt 3120  
gacatccaag tggttattag tgacttgaaa attgttgatg cggatttaca agttaccaat 3180

cccctttatt taagtttoga aaagtc aaac cagggttttg gcgaaatgcg ataaaaagtg 3240  
 gctataatgg ggcaggatg gcctttcgtc aagaaatgaa aaacgcat tttaccattc 3300  
 cgccagaagt tccatgcat gatatgtgga ttggcttatt agctgcacgg aagaagcaaa 3360  
 egggtctcat taaagaacca ttagtgcctt accgaagaca tggagcgaat gtcagcccca 3420  
 ttattacca aacaagttc caacaaaaat taaattggcg tltgaalita ttaaaagctt 3480

<210> 11

<211> 3615

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Designated as EC-24

<400> 11

aagcttttct tgcgigtct tgtgaggctt ccttegccat tatcatcag atccacataa 60  
 ataaagecgt agcgcitaga catttggaa tgagatgca tgaactaaatc aattggcccc 120  
 caactgggtg accccataat atccacacca tggcaatcg ctcaattac ctgtaccagg 180  
 tgatcgittt aataggcaat tggataatcg tctgtatcg aaccatccgc tcaaacgctg 240  
 tcttttgcgc ctaatccgtt ctgacaata aataacggtt ttgataacg atcccaaage 300  
 gtatttaaca gaaccgiaa tcaaacgga tcaatttgc acccccactc tgaacttttc 360  
 agatgcggat tggggatcat attcagatg ttgccctgcg catttttatt aatgctttcg 420  
 tcttgggaac acaaccagtc atgtataact aaagagatga atcgacggta tgttttaaat 480  
 ctctgcgtca ctteagtc tctcaatggt gatattgtg tgcggaaga aacgctgcat 540  
 atagccggga tactggccac gcgctgaac atcacciaag aacatccagc gccggttctc 600  
 ttecatggcc tgaacatat cctgtggctg gcaggtagg gggtaaacca gccaccgag 660  
 aagcatattg ccgatitcg ctteggggag caggctatga caggctttaa ctgcccgcgc 720  
 actggcaacc agttgatggt ggatagcctg ataaacttc gcctcggcac tctcttcctc 780  
 cageccccag ccggtgaatg gcgcgigiaa cgacatgtt attcaataa acgtcagcca 840

taacgceact	ttatgittggt	agcgagtaaa	gaccgigcgg	gcgtaatgii	cgaagigaic	900
gaigaccgct	cgattagcca	accgccgtag	ttttcacca	gcccalatgg	catttcgtaa	960
tgggataacg	ttaccagcgg	cttgatcccc	gcctgcgcca	tticalcaaa	cagccgatcg	1020
taaaacgcta	accccgttc	atleggttcg	acttcgtcgc	ctgagggaa	aattcgcgcc	1080
caggcaatgg	aaatagcag	acaggtgaag	cccctctcgg	caaataacgc	gatatcttcc	1140
gggtaacggt	gataaaaatc	gaigcgcaca	tcittgatai	icicittccc	caggatgcgc	1200
ggttccattt	ttcccattac	gcattgaggt	glaaaatctga	ggtcgagatc	ccittgccat	1260
cttccitgcca	ggcaccttcc	acctgattgg	cagcigtitgc	ggcaccccaa	agaaaigtii	1320
ctgaaatgc	tticalaati	aactcctitt	atcgttagcg	aatgatggat	aacagcggtt	1380
cacctgcgct	tatctgcgcc	gigccgtggg	glaatacgtc	cglaaaaatca	tcgctattac	1440
tgattaatac	eggegtcgtc	agatcaaatc	eggctcgcg	aatagcaggg	atatcaaaaag	1500
aaatcagccg	atgcctigia	ttgacctigt	caccacgtt	gacgigagcg	gaaaagaait	1560
tgcctccag	ttttacggtg	tcgataccga	catgaatcag	gatctccaca	ccatcatctg	1620
actcaatgcc	aatggcgtgt	aatgiggcga	acaacgaage	aattcgacce	gcaaccggag	1680
aacgcacttc	accaaccgag	ggcagaatgg	caataccttt	acccaacagg	ccactggcaa	1740
acglggtalc	agcgacgiga	atgagcgaca	caatcctccc	cgicalcggg	gaacagatac	1800
egccctgctc	aggiggigia	ataacctctg	gtgtittctc	ttcggggcac	ccitgcgctgg	1860
ctgacgttla	gcggtgatga	aatgaagcat	caccgtaccg	acaaaigcgc	aaccgatggc	1920
aatgacaccg	ccaataacgc	tggcccagac	ggtgaaatca	atcccgttg	acgggatggt	1980
ttgcatgaag	gigaaaatac	ttggcaaacc	aaaggagtag	acttctgtii	gcgcgtagcc	2040
aataalggtg	gccccaaaag	ccccactgat	acaggcgata	acaaaaggggt	acttaecgcg	2100
caggittgacg	ccatataccg	ctggttcggg	gataccaaac	agactcgtca	acgcccgtga	2160
tccegccacc	actttttct	gegcatecgg	ttcgcagagg	aagacgcega	gcgcccgcce	2220
gacctgcgcc	ataatggcgg	gcattaacag	eggatcatg	gigtcgtagc	ccagcacggt	2280
gaagttattg	atacacaccg	gcaccaggcc	ccagtgcagt	ccgaacatga	cgaagatttg	2340
ccagaagccg	cccattaccg	cgccccgcaa	tgcaggaacc	gccigataaa	gccagagata	2400
accggcggca	atcagttcgc	ttatccaggt	tgatagcggc	cccaccagea	gaaaggtgac	2460
gggtgtgata	accatcagac	atagcaatgg	tgtgaagaaa	tttttgattg	ccgacggtaa	2520
ccacgcatta	agtccgctgt	ccagaatgct	gcacaaccag	gcagaaaaaa	taatgggaat	2580

aaccgatgac gagtaatica acaatgtgac cggaatacce aggaaatcca gceccagcgc 2640  
atccgctttt gcgcgttctc gaaaagcagt acagaattaa tggatgcaet aacgctccac 2700  
caatcaccat ggcagtaaat ggattatcgc cgaagcgttt ccccgcggtg tatcccagga 2760  
ttatcgggaa gaacccaaaac aaggcatcac tggcgtgaa taaaattaa taagtaccac 2820  
ttgttcggg cgtccactga aaagtgagcg ccagagccag cataccttc aagatecccg 2880  
gttgccegcc atcaaacga tacagaggcg taaaaatacc tgaataaca taaacaaagc 2940  
ggtttagaca gattacctt atcalacatt ttccggtgcc tgitgcctt ttctgcaag 3000  
gcctgccaca ctgtaaccg ccaggaagac atcggccaca tggttacctg tgaccacctg 3060  
aaactggcca ccgcttcca ccaccataat aalaccgggg gctttttca gtacctctgc 3120  
ttgcgctttg ctctcatct ttaattttaa aacgtaaate gcgttgcga atgcatcaga 3180  
ctcacaatgt tatctgcgcc cccgactcct gcgactatit ttctgctaa ctccgicata 3240  
acttgcectc tacgcttgc ggcaaaactc caaaaaaaaa ccgaaaaaa acggcctgac 3300  
glgaalcaag caatititit caggititgc ccgcttagtg cggtaacaat ccttacctc 3360  
giaataatat ttcagigtc ttgcgcacg cgtctatat ttatggctaa aaacataatc 3420  
tctgcgggig aaatitacg ttgatactgc aaaccaataa aaatggcga ccttccgca 3480  
cattgceatg ctgcgggia atitititit actgcttgtt gtaatgatc atcaatctg 3540  
itaaitgaag catgtcaag aalacgccag galaaaaact teagatggt aaccagtcgc 3600  
tgataactca agctt 3615

<210> 12

<211> 4954

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<223> Designated as EC-34

<400> 12

aagcttaacc gctctcatct gtgaccgca cggcatagct atattctgcc ggtcctggga 60

cgtagcgaga ttgacatgca aaaaaacggi ggcgaggcgg taaccgitga ggaticaatg 120  
 tcgatgattc atgccicgcg tggcglgtta aaaccegccg gigtatgct gaaatcagag 180  
 tgtgcagtgg tcgcgggaaat cgcgcaggca gcactacccc agagcggigt agcctgggag 240  
 tatecggtag aagattalga tcgcaltcgc aaigacattg aagctgtgct gccagagttc 300  
 gccgactata accagegcac cgcateccc ggtaggtttc acctgataaa tgcagctgct 360  
 gaaaggcgct ggatgacgcc gtcaggtaag gctaatttca ttaccagcaa agggcgttta 420  
 gaagatcect cttcagcgtt taacagtaag ctggatcatg cgacagtacg cagccacgat 480  
 cagtacaaca cgacgattta tggtaiggtat galecctatc gaggggtatt cggtaacga 540  
 gatgtggtct ttatgagtgc taaacaaget aaaatttgcg gigtlaaaaa cggcgaaaga 600  
 gttaatetta ttgcgcttac gccagacggt aagcgcagtc acgccgcatg gatagattaa 660  
 aagtggtcat ttacctatg gctgaccgct cactggtagc ctattttcca gaatcgaatc 720  
 acatgctaac acttgataac cagatccat taagtggcat tcttggtat aaaagtattc 780  
 cgcttgaatl agaaccatca aattaatgtc tcttctcatt tcttctgctg tcatccgcac 840  
 agcagaagaa ttctcattg actattattt cgcaatttgc tcacatggat taaattaaac 900  
 tacatactat aagatataaa ctctgccta cagctgtaag aaactccgt cagtactgaa 960  
 gcaccagtc tatttctct tttctccagc ctgttatatt aagcactg attaacgatt 1020  
 ttttaacgta tccgclaat aaacatattt gaaatgatg cgaccacagt gaaaaacaaa 1080  
 atcacgcaa gagacaacta laaagaaatc atgtctgcaa ttgigggtgt cttattactg 1140  
 acacttacgt gatagccatt tttteggcaa ttgatcagct gagtatttca gaaatgggtc 1200  
 gcattgcaag agatcttaca catttcaata tcaatagtct gcaaggctgt aaacaaacag 1260  
 caaattataa atatgaaatg ttaaaaaagt atcgataaaa acittatgt ttttaaggaga 1320  
 taaaatgtcg ctgctttgtt ctgttatatt taitcatcat gccttcaacg ctacacattt 1380  
 agataaagat tacgcttct ctgacggcga gatccctgat glagataacg ctgttcgtac 1440  
 gcattttgaa ccttatgagc ggcattttta agagatcgga ttactgaaa ataccattaa 1500  
 aaaatatcta caatgacta acatccagac aglgacgggt ccgttccctg cgaagttttt 1560  
 acgtgcttca aatgtaccga ctggattgct taatgaaatg atgtcttate tcaactcgga 1620  
 agaacgcaat catcataatt ttccagaact ttgctttttt tcttgctgt ctatttttgc 1680  
 cgcalgcaa ggtttcatta cactattaac taacggtgtg ctatccgttt ctgggaaagt 1740  
 gagaaatatt gtcaacaiga agccggcgca cccatggaag ctgaaagata ttgtgactg 1800

cctgtacatc agtgaagcc tgligaagaa aaacttaagc aagagcaaac gacatticta 1860  
 cagattcttt tagatgcaag aatgcagcac gcaaaaaatt tgatacgcgt agaaggitca 1920  
 gtcaataaaa ttgccgaaca atgtggttat gccagtlacat citatittat ttatgcgttc 1980  
 cgcaaacatt tccgcaacag tccgaagaga gtttctaagg agtaccgttg tcaaagtcac 2040  
 acgggtalga ataccggcaa cacgalgaat gccttagcta ttgattati tgctaacgag 2100  
 tagtcaacca cacacgctgc gtaagaatta aatggggcag ccattcccig ccccgcgttg 2160  
 ttttaggcg atatatattat tgaataaati aagtgcacac caicacatit ttatgcactt 2220  
 gcataaccig ttgcatgatt attatgacac tcaattctgc atttgtcag taaaatgcaa 2280  
 taatttatta aatatcaata aattagttgt ttatcggcga gaaatiacit aatagaacag 2340  
 aaagtaatgt caacgcttia tggactgttt ttccctittt tttagctaaa tetgctatct 2400  
 ctttalgiga ctaacttcac ttacatccac ttattctctc tctlaaaatt actttggaat 2460  
 taagtacaat aagaagagga acattitaiga agtcigcatt aaagaaaagt gtcgtaagta 2520  
 cctcgataac ttgatactg gcactcggta tggctgcatt tgctgcicat gcggcagatg 2580  
 atgtaaagct gaaagcaacc aaaacaaacg ttgccttctc agacttlacg ccgacagaat 2640  
 acagtlacca aggaaagcca aatattatcg tactgaccat ggalgalctt ggllatggac 2700  
 aacttccttt tgataagggg tcttttgacc caaaaacaat ggaaaatcgt gaagttgtcg 2760  
 atacctaca aatagggata gataaagcca tgaagctgc acaaaaatca acgccgacgc 2820  
 tcccttcatt aatggatgaa ggcgctacgt ttactaacgg ctatgtggca cacgggtgtt 2880  
 ccgcccctc ccgcccgcga ataatgaccg gtcgagctcc cgcctccttt ggtgtctatt 2940  
 ccaalaccga tgcctcaggat ggtattccgc taacagaaac ttctctgctt gaattattcc 3000  
 agaatcatgg ttattacact gcagcagtag glaaatggca ctigtcaaaa atcagtaatg 3060  
 tgccggtacc ggaagataaa caaacgcgtg actatcatga caccctcacc acattttctg 3120  
 cggaagaatg gcaacctcaa aaccgiggct ttgattactt tatgggattc cacgctgcag 3180  
 gaacggcata ttacaactcc ccttcactgt tcaaaaatcg tgaacgtgtc cccgcaaaag 3240  
 gttataicag cgalcagtta accgatgagg caattggcgt tgttgatcgt gccaaaacac 3300  
 ttgaccagcc ttttatgctt tacciggttt ataatgctcc gcacctgcca aatgataaic 3360  
 ctgcaccgga tcaataicag aagcaattta ataccggtag tcaaacagca gataactact 3420  
 acgcttcctt ttattctgtt gatcagggtg taaaacgcat tctcgaacaa ctgaagaaaa 3480  
 acggacagta tgacaataca attattctct ttacctccga taatgggtgc gttatcgaig 3540

gtccctcggc gctgaacggg gcgcaaaaag gctalaagag tcagacctat ccigggcgta 3600  
 ctcacacccc aatgittatg tggtaggagaa ggaaaacttc aaccggtaa ttatgacaag 3660  
 ctgatttccg caatggattt ctacccgaca gctcttgatg cagccgatat cagcattcca 3720  
 aaagacctta agctggatgg cglltccttg ctgccctggt tgcaagataa gaaacaaggc 3780  
 gagccacata aaaatctgac ctggataacc tcttattctc aciggttga cgaggaaaat 3840  
 attcattctt gggalaatta ccacaaattt gttcgccata cagtcagacg attaccgca 3900  
 taaccccaac actgaggact taagecaatt ccttatacag gtgagaaaata aegattattc 3960  
 gcttgctat acagtagaaa acaatcagtt aggtctctac aaactgacgg atctacagca 4020  
 aaaagataac ctggccggc ccaatccgca ggtegttata gagatgcaag gcgtggtaag 4080  
 agagtttacc gacagcagcc agccaccgct tagcgaggta aatcaggaga agtttaacaa 4140  
 tataagaaa gcactaagcg aagegaaata actaaacctt catggggcg attttccgc 4200  
 cgcttattg agcgagalag cgaatgcact tacagccaag cctccagtt tccaatgta 4260  
 tctcaaatgt gattactgtt ttaccctga aaaagagtcg cagtttactc atgaaaaatg 4320  
 gatggatgac agcactttga aagagttcat caaacaatat atcgcagcgt ctggcaatca 4380  
 ggtctattht acctggcaag gcggigaacc cactctggct ggctggatt ttttccgtaa 4440  
 agttattcac tataacaac gctatgcagg ccaaaaacgt attttaatg cattacaaac 4500  
 gaatggcatt ttattgaata atgaatggtg tgcttctca aagaacatga atttctggtg 4560  
 gtatctcgat cgaatggccc caggagttac atgaccgta cagacgcagt aattcaggta 4620  
 accgiacitl tgcaaaaagt atagcagcca tgcagcgtct gaaatcalat caagtagagt 4680  
 tiaatagtt aaccgicatt aalaacgtta atgtccatta cctcttgag gtttatcatt 4740  
 ttttaaaac tatcggcagt aaacatatgc aatttatcga attgctagaa accgggacgc 4800  
 cgaatattga tttcagttg calagtgaga acacattccg tatcattgat tttctgtgc 4860  
 ctcccacggc ttatggcaag tttatgtcaa ccatthttat gcaatgggtt aaaaacgatg 4920  
 tgggtgaaat tttcalccgt cagtttgaaa gctt 4954

<210> 13

<211> 3796

<212> DNA

<213> Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designated as EC-39

&lt;400&gt; 13

```

aagcttaaic gcgigaatica ggagtaaaaaaatgacaacc cagacigtct ctggtcgccc 60
ttatttcacg aaagcgggct gatggagca gaaatcgctt atcgctctgc tggctctgat 120
cgcgattgtc tcgacgttaa gcccgaactt ttccaccatc aataacitat tcaatattct 180
ccagcaaacc tcagtgaacg ccattatggc ggctgggatg acgctgggta tccctgacgc 240
gggcatcgac ttatcggtag gttctctggt ggctgctgac ggctgagttg ctgcatctat 300
cgtcggcatt gaagcaatg cgtctgtggc tctctctgct gctctcgcgt taggtgctca 360
atggctgctg taaccggggt gatgttagcg aaagctcgcg tccagggctt tctcctacg 420
ctggctatga tcttttaci gcgctggctg acctggtttt ataccaacgg tagcccagtg 480
aataccggct ttactgagaa cgcctgctg tttggctggt ttggtattgg tctctcctg 540
ggcttaccga cgcctgctg gatcatgggg atgtcttcc tctcggcctg gctcatgctg 600
catcacacgc gctctggggc ttacatctac gcctctgggc acaacgaagc gacaacgcgt 660
cttcttggtt tcaacgtcaa taaaatcaaa atcatcgtct attctctttg tggctctctg 720
gcatcctggt cgggatcata gaagtggcgc gctctctctc cgcacaacca cggctggggc 780
tggtctatgag ctggatgcta ttgctcgggt ggctctgggc ggtacgagtc tggctggggc 840
aaaagctgct atgttggga cgttgatcgg cgcattaat ctggcttcc ttaataatgg 900
attgaatttg ttagggtttt cctctatata ccagatgat gctaaagcgg tggctatctt 960
gctggcgggt ctggtagaca acaaaaagca gtaataacga ctacaggcac atcttgaata 1020
tgaacatgaa aaaactggct accttgggtt cgcctgttgc gctaaagcgc acctcagtg 1080
cgaatcgcat ggcaaaagac acctcgcgc tggctgctc caccttaac aacctgtct 1140
ttgctatgct gaaagatggc gcctcagaaag aggcggataa acttggctat aacctgtgct 1200
tggactceca gaacaacccg gcgaaagagc tggcgaacgt gcaggactta accttctgcg 1260
gcacaaaaat tctctgatt aacctgaccg actcgcagc agtggglaa gctgtgaaga 1320
tggctaaaca ggcaaacatc cggcttata ctcttgaccg ccaggcaacg aaaggigaag 1380
tggctgagca cttgctctt gataacgtac tggctggcaa aatcctggtt gattacatc 1440

```

cgaagaaagc gggatgaaggt gccaaagtta tggagcigca aggcattgct ggtacatccg 1500  
cagcccgtga acgiggcgaa ggcttccagc aggccgttgc tgctcacaag tttaatgttc 1560  
ttgccagcca gccagcagat ttgatcgca ttaaagggtt gaacgiaatg cagaacctgt 1620  
tgaccgctca tccgatggt caggctgtat tggcgagaa tgatgaaatg ggcctgggcg 1680  
cgctgcgcgc actgcaaact gccggtaaat cggatgtgat ggtcgtcgga tttagcggta 1740  
caccggaatg cgaanaagcg gtgaatgatg gcaaacatgc agcgaactatc gctcagctac 1800  
ccgatcagat tggcgcgaaa ggcttcgaaa ccgcagataa agtctgaaa ggcgagaaaag 1860  
ttcaggctaa gtatccggtt gatctgaaac tggttgttaa gcagtagttt taatcagggt 1920  
gtatgacctg atggigacat aaatacgtca tggacagatg aacgtgtaat ataaagaaaa 1980  
gcagggcagc cgccacccta acacggtggc gcattttatg gacatccga atatgcaaaa 2040  
cgcaggcagc ctgctgttc ttggcagcat taatgcigac cacattctta atcttcaatc 2100  
tttctact ccaggcgaaa cgtaacgggt aaccactatc aggttgcatt tggcggcaaa 2160  
ggcggaatc aggcctggc tgcctggcgt agcggtgca atatcgctt tattgcctgt 2220  
acgggtgag acagcaltgg tgagagcgtt cggcagcagc tggccactga taacatgat 2280  
attaciccgg tcagcgtgat caaaggcgaa tcaacaggtg tggcctgat tttgttaat 2340  
ggcgaaggtg agaalgcat cggattcat gccggcgcta atgctgccc tccccggcg 2400  
ctgggtggaag cgcaacgiga gctattgcc aacgcgtcag callatlaa gcagctggaa 2460  
tcaccactcg aaagtgtgat ggcagcggcg aaaatcgccc atcaaaaataa aaactatcgt 2520  
tcgcttaacc cgtccggct cgcgaacttc ctgacgaact ctgcctctg gacattatta 2580  
cgccaaacga aacggaagca gaaaagctca ccggtattcg tgtgaaaat gatgaagatg 2640  
cagcgaaggc ggcgaggtta cttaalgaaa aaggtatcc tactgtactg attactttag 2700  
gaagtcgtgg tgatgggct agcgtgaatg gtgaaggtea ggcgcttcc ggattccggg 2760  
tgcaggctgt cgalaccat gctgccggag atacctttaa cggctcgta atcaeggcal 2820  
tgctggaaga aaaaccattg ccagaggcga ttcttttgc ceatgctgcc gctgcgattg 2880  
ccgtaacacg taaaggcgca caacctccg tactgtggcg tgaagagatc gacgcatttt 2940  
tagacagcca gaggtagc ttggtacaa tgaagatgt tggccgctg gcgggcgttt 3000  
ctacctaac agttctcac gttatcaata aagatcgctt cgtcagtga gcgattaccg 3060  
caaagtgagc gcgaitaaag actcaattac ggcctatcag ctctggcgcg tagcctcaaa 3120  
ctcaatcaaa cacataccat tggcatgttg atcaatgcca giaccaatec ttctatca 3180

gaaciggtgc ggtcgttga acgcagctgc ttccaacgcg gttatagici cgicctttgc 3240  
 aataccgaag gcgatgaaca gcggatgaat cgcaatctgg aaacgcigat gcaaaaacgc 3300  
 gttgatgget tgctgttact gtcaccgaa acgcataac ctccgctga aatcatgcaa 3360  
 cgltatccga cagtgcctac tgtgatgatg gactgggctc cgttcgatgg cgacagcgat 3420  
 cttatcagg ataactcgtt gctgggcgga gacttagcaa cgcaatctt gatcgataaa 3480  
 ggtcataccc gtatcgcctg tattaccggc ccgctggata aaactccggc gcgctgcggt 3540  
 tggaaggtta tggggcggcg algaaacgtg cgggtctcaa cttccctgat ggctatgaag 3600  
 tcactggiga ttttgaattt aacggcgggt ttgacgctat gcgccaactg ctatcacatc 3660  
 cgctgcgtcc tcaggccgic tttaccgaa atgacgctat ggctgttggc gtttaccagg 3720  
 cgtlatatca ggcagagtta caggttccgc aggatacgc ggtagttggc tatgacgata 3780  
 tcgaactggc aagctt 3796

<210> 14

<211> 6914

<212> DNA

<213> Enterobacter cloacae

<220>

<223> Designated as ET-49

<400> 14

aagcttttcg agttcgccat ccggcaacag ctcactgagc ttttaccgce ccagggtgcc 60  
 ttgaaactca attcccagct cagtaaggcg gtccctgaata atctctttgc gagattttc 120  
 actggtaccg gcatcaggtg ttgcaggttt cagctcgcca ccagcctcgc cttcatcag 180  
 ccggacgtta gacttcagcg ccgggtgaag atctttcaac tccaccacgt cgccaacctt 240  
 tacgcegaac catgggcgca caacttcgia ttiagecatg ctgtttcctt acgccaggtt 300  
 agcgcgctag acaacgccag acaggcctga tcgtctgcag taattgcag gccttcagca 360  
 gacatgatct ggaagttgia gttaacgtta ggcagttggc gcggcagtgg cacaacgcca 420  
 acagccatac ccaccagtgg ggagatcacg tcacgacgac gaacgtacgc gataaactcg 480

tiaccgggtca ggcggaagtc algcggattt ciltcaccgg tgcgaatggc agaacagcct 540  
 gcaggagagt gccgctcacc acaccattaa ctacgtatgg ctgagccata ttigcccaga 600  
 tctcagggga aaccacatc acatcatact gagctacttt gtiggigcgt gcgggtggtac 660  
 cgaalgctcc tttaacaaag aactcaaaat atlgagtcgt ggttgcgctg gtcaggtcga 720  
 tgitcgcacc accagcacca gaaccgaggt taatcttctt ggtgttcggg tggttcttga 780  
 tgccctgcgc cgggtaggac tgaacctgaa ttttgaate gccgttcagg tagtagttga 840  
 cgcgcttcctg gttgaacttg cgcactcttcg ccatctgcga atccagaacc agatcaatgc 900  
 ctacagagtt aagggcagca gcatgacgcc agttaacacc gtagccagca gtgaacaccg 960  
 gaatcgggtc gccatcgtc gcgtagtcag tglggtcgaa ggagaatggc gcctgaccat 1020  
 cgatgcttac tgacacgtcg tcagcgatgt cgcgcaccac gttatacagc ttggcggttt 1080  
 taccaaccgg cagcaccgic tgaacgcgca tcaggicgtt tacgatctcc atgccaactt 1140  
 cctgatcccg cagctgcagc acctggttgt caatctcagc ccagaagica cgggagaaac 1200  
 cgccaacagc gtlacaagcc agcatgtcag gcgtcateat tgcgcggtta gctgcaatga 1260  
 tggaaatgtt ctgtaggttc cacatgttgc ggtttgccea cagctcactc cagtgeccgc 1320  
 cgaggcggga gtlagtcgcc agcgtctctt tagagaagta catatgtgtt tgtccttttg 1380  
 ttaccgcca gctgcggcga cagtccaac gcgcatacgc acgcgaatga agtcagtggt 1440  
 gctggccgcg atggltatll calccctggt glagccgac acigaaicag tglcggatgt 1500  
 ggcaagggtt aactgaccgg cagttcccag ctgatcggg ctgtcttttt tatacgcacc 1560  
 aggcaggcag cgcagcgcga gctcaccgacc tctctegacg tagttacctt ctgcccgaic 1620  
 cccggcaggg atttcttcgg tgattgtcag gccctgggtg taaccgacat cgatgatgta 1680  
 caggcggccg gtlagcgcgg tgccctgagc gaatttatcg gatgagtga tggttgcggc 1740  
 ggtgccagga agcaaccggc cggccgttgt gcgggittcg gctttgtaca gagactgacc 1800  
 gtcgatatta acgcgacgat aacgtggcat taltecgget ccttacttga agtgttcgtc 1860  
 tgcggctggt gcgccggtt ctttgtgctg ctgagcattg ttggigccca gcgacttga 1920  
 catcgcgtcc agagcttcgc ctgacagagc gtlcgcgagc gatctgcca tggaccttcg 1980  
 caaccgcttc gcgcttctgt tctctctcgg cacgggagtt cgcggttaagg gttctcgcga 2040  
 gttgcctctg attggcctgc agcgcataca cctttccgc gagaggetta atagccgctt 2100  
 cagtattggt cgcaacagcc tgcccgatac tgctgccgat ttgttccagt tcttcttttg 2160  
 ttaaaggcat gtcgctccg ttttgtggtt tgggtgcagge tglctctgcg gttgtaatag 2220

agcttligaat tgttagcgac gacigccacc caccactcc tggcgcctac tgcggttccg 2280  
 gtatcgtcga ttgtgatctt cccgccatca gccaataccg taaaccigag caicaccgce 2340  
 atttcgcacg atgaccacct gcgagtcagt gagtcagcaa cccaggcata ttcattccgtg 2400  
 cccggcgcga acttggcttt ggctgcccga tcgagacgct gctcgcctc ccggtaggat 2460  
 tcaccacca gcgcgcggga gttccttta agcggctgcg ccagatcgge gttaccate 2520  
 aggccaacgc cctgctcagg ggiggcggct ccgacttctg gcagtaggat cgcgtcgtg 2580  
 tccatgtgt gaatcttgc caccactcg gcaccctag ctctctgtg ttctttaggc 2640  
 tcaagctggt cgaggaaagc ggcgacactg giatgaatcg gcggaacgtc atcgcgcgc 2700  
 tcgatggctg cgacgcctc aagtagttct cggccacctt cagactcacc ggccggggca 2760  
 acatcaacc acttttcgag gtagatacga ttaccggact tcttaacgtt gcggttccac 2820  
 gcgccgatat ggcttgcgtt aatcccctcc ggggagaaag cagacacgaa ctgaccatta 2880  
 acctgagggt ggcccagcgg ccccagggia cctccagcc ccttatagt ggctcgtat 2940  
 tgccttggc tgtacaagc gccattcatg acgacgttag ctggaagtgt gtagctcgge 3000  
 agcaccaggt gctcagccc gttgtatgtt tcgcgcggga tagactggct gttcaccttt 3060  
 gtggtgatgt tgacctgaat atgctacca tgtttcgggt cctggattgg acgctgtgct 3120  
 tcgtggttta cctggaattt catgagttat ttctccgcc aggcgtaacc gctcgcctgc 3180  
 atcgaattat atctctgtt gatttctgig atgggtctcg ggtattccgg ctgcccctc 3240  
 gcatccacca gcaccactg ctggctgcat ttgcagttga tggagttgcc atctttgctg 3300  
 taccagtcac gcacctctc gttggtgtag aggtgggcat gggcgcactg cgtgggtatg 3360  
 tcgcgttgc ggcgacagag ctgagatgtg aaccagcagc gtttaaggc cgaacaggtc 3420  
 attgcctct tggcttcat cccacttggc ccggcgcagc gcggtagtea cttcagtgcg 3480  
 tctatccgg ttagcccgc gttctctgat gccggtctgg tctgtcaggi tgcgggcaat 3540  
 gtccagagga ttgagcccgc gcccacacc atcagtaaga cacgcgccat gtcgcctta 3600  
 acgtcagcgc tcagccctt catttctca aatacagcg catgcaccag cgccttgcgt 3660  
 ttctgatact ggtcgttgc gaggatggag gccagcact cacgccggc tgcgtacacc 3720  
 ggggattgct gactgaggit gtagaacgac tgcccgglec cttttccga agccagatcg 3780  
 atgtactcgt aaaaccacag gtcgtaatcg ccacctcaa gcagtacctg atcaaccagg 3840  
 taactggcat cgttcaggat gatggagagt agcattgggt ttagctggta ttctatctg 3900  
 cgtttactg cgagggagga aggtattttg ttgagtctg attgtacgc ctgccaate 3960

ttaticatcc gectggcgaa giccttcatt gcccgggcgtt ccagcgcate ggctccggtc 4020  
 ggatccgat agttacgcgg cagaatcggg gccctcgtct lcttcgtcgc catcccttc 4080  
 tccaatgga aattcaicga cgtttcata accggcagca gtgcggaatt tcttcacgac 4140  
 taaaggctgg ttttctccg ctcccctgga acgtctgggt aatctctgcc atggttttgg 4200  
 catttgcgag tttctcagtt ccagctctgt cgttgaggtc atcccagata accgtcttct 4260  
 cgctgactgc atcaataat ttccaggctga tgagcttgc acigaagct tcaatttcga 4320  
 atgacaggtc accgcgccgt gactggcagc gcgcgttgaa atattctga tccctgggtc 4380  
 tigcccttc acccgtctgc atcccaacca gaaccttac agggatatca acagatgcag 4440  
 cgaaggttg caggtgacg ttataggctg ctgacggatc cgctacagct gtgaccagtg 4500  
 gtgtgactgi agccccitgg gttgctatca gaacatcgtt accacggctc atttccccgg 4560  
 caacttctgt aaacttatcc tgcaactcgt ccattgacg ccataaagtg acgcgagatt 4620  
 gttgaaatcg atttcttct caaagttgac attaagctgc cgcgcggcgt tctttaggaa 4680  
 tgactacca gaaccacct cgaccttctc aaggctgacg caggcgttat agccaggctc 4740  
 aaggaagcca atageatcat tagaatagtc accaaggata aagacgcgat cgggatgtac 4800  
 gaagcgtga ttagtccac cgcttgggaag gctctcaaca tatttccact gctttggctg 4860  
 cccglagcct gccgattct ggtcagttac ccactcctg acgtttaaig acccagccca 4920  
 tgcgatcgta accttttta gtagcttgc acgaacaaca ggtgatccc atgttctgga 4980  
 atcattgata tgcagcagga taccgcata acgtccgacc tctcggcggc ggtctgcttc 5040  
 agcaaaagcc cgcctaaaggc gctttgtgaa aaccttttg gttcttctt cccaggcagt 5100  
 tteatctta ctctcgtcgg catcatcacc ctgatgatt tccgggttg tctgccagca 5160  
 cttgccacc agcttctct ctgcgccgtg ggtattcca ccgcgacgat acagtgcgta 5220  
 gaggttttcg taagigacc gctcagggaa tccatactc caccatgcgg aatggcgctt 5280  
 atgtccagc cccattgtag gcgccaacag cccatacgg gcacgggcca tccgcgcate 5340  
 gttcaacgca tggttgacgg cgagagttaa ttgtcagtc atggtttgc cgttgggtga 5400  
 ttaaggcat aaaaaaggc cgtttggcg accttgggc ttttaaaaa gctaaactct 5460  
 gttgaacgaa alaaacataa ctgctcagg cttaacgcca taatcactg ccaacttctg 5520  
 agtgcactca atlaagacag tigtgcaga ttctgaagag cttgcacat aaatttcgaa 5580  
 gtttcaaal aciccgccgt tgggtggta aatcttata gacataaacc aatcattcat 5640  
 aatactact ccttacaga attgagtga tattatcggc aagtgcata gtttctttaa 5700

attatctcaa ccttttcggg atcaatcatcc eggccatctg gcccttacgi ttaatgtgtc 5760  
 cgtcaggct gtagegaata ccgtccagc agtgttcgta accgtctgcc agttaggca 5820  
 atacctgcc ggtgatcgg tccgtttgt aggaccacat gcgggctct ctcgccacat 5880  
 tcttcagcg aggatggata atgatttcgt caaagcccg aagatgcgcg ataccgtcct 5940  
 caacaatccc ctgcaattc tcggcagccg agatgtttaa gccctggcgc ttgagatagc 6000  
 tgatagtctc gggtcgggcg gagtcggcct tgatgggcca gtcacgcgat cgggggattg 6060  
 tctctatag ctctggcata tggtcagact ctgtctctg accgtatgcc tegtattcga 6120  
 tctacagccg gttgtcagg atgaacgagc gcaccagcgt gttagggtct ttggcgaac 6180  
 cgaagtcagc accgaagaaa aggcgatcgg cctcttcca tagctggtc gagaactcag 6240  
 cgatccgta ttaccggcc agcaactgtc taccagatt ttcaggtaa gcacctccc 6300  
 aaaccacgc gtaattgcc gggtaagcc ggcctcagc gttctctgc taacctcca 6360  
 gcacgtcggg gaacatgga ttatccgtgt agttcatctc aacgtgatac agtcctgcc 6420  
 agcctcttia cggaaacgt taccctcgc ctgcccgc gcgccgggtt ceatgtacc 6480  
 caaatctctg aacctctc acgaacggc gggctcagc ctgcccagc taltctctg 6540  
 actgattcag cctcaaac ccaacagagc aagatgcgcg ctctgactt gatctctc 6600  
 aggttatgcc gcagaccga gaacacgtg ttaacgtct tctcattgt gggatgtac 6660  
 tctctcga taccaaagt ggaagccagc cagggaacag acaggatagc ctgttacc 6720  
 tctgcaatc tgcacttc cagtgattc atgaattcac gcgcacagag caccagccg 6780  
 ctctaccgt tcaatcga ctgataccc ttaccgctg tcaatcagc aaaagtgcgc 6840  
 gcttggcac taccagccc accatgcgag caccggtaac gctattctc ggcaatgaa 6900  
 agtggcga gctt 6914

<210> 15

<211> 5975

<212> DNA

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<220>

<223> Designated as KI-50

&lt;400&gt; 15

aagcitatc cacgciggag gcgtccggga ttatcggcgt caacgtatc gccggcatcg 60  
ccgggaccat catcgccggc atgcctccg accgcctttt caaacgcaac cgcagcgtga 120  
tgcccggtt catcagccig ctgaacaccg ccggttcgc cctgaigctc tggtegccgc 180  
acaattacta cactgatatt ctggcgatga ttatcttcgg gccaccatt ggcgcictga 240  
cctgcttccf tggcgggctg atcgccctg atatctctc gcgcaaggcc gccggggccg 300  
cgctcggcac catcggcatc gcagctacgc cggcgccggc ctggcgagc tictcaccgg 360  
gttcattatt gataaacgg ctatccctga aaacggcaaa acgctgtatg attcagcac 420  
gttggcgcig tctgggtgg gtacggctc ggctcgcgc tactctgtt taccactgcc 480  
gccatcgtcg cccggcgcca tggcgtcga cggcagacct cgttctctc ataaccgatt 540  
aacgaataag gaagaagata tgaigcctgc aagacatcag gggctgttac gccgtttat 600  
cgctcgcgc ctgccctgc tggcgtcga atctccgcgc gcccgggact ggcagctgga 660  
gaaagtggc gagctcagc gccacggtat tctccgcgc acggccggca accgggaagc 720  
catcgaggcc gccaccggcc gaccgtggac cgagtggacc acctatgac gggagctcac 780  
cgccatggc tatccgcgc tggcaacaa agggcgtgcg gaaggccagc attaccgcca 840  
gctcggccig ctgcagccg galgcccgac ggcggagtcg atatacgtc gccccagccc 900  
gctgcagcgg acgcgagcga ccgccaggc gctgggtgat ggcgccttc ccggctcgg 960  
cgtcctatc cattaigtca gggggatgc cgateccctg ttcagaccg acaagctcgc 1020  
cgccacgcaa accgacccg ccgccagct ggcgcggtga aagagaagc cggggaictg 1080  
gcgaggctc gcaggcctc gcgccacca tccagctatt gaaacaggc gtttgtcagg 1140  
ccgataagc ctgccgatc ttcgatacc cgtggcaggt cgagcagagc aaaagtgga 1200  
agaccaccat tagcggactg agcgtgatg ccaatatggt ggagacgctc cgtctcggct 1260  
ggagtgaaaa cctgcctctc agccagctgg cgtggggcaa gatcaccag gccaggcaga 1320  
tcaccgccct gctgccctc ttaacggaaa actacgatc gagtaacgat gtgttgtata 1380  
ccgcgcaaaa acgcggtcgt gtctcctca acgctatgct cgacggctc aaaccggagc 1440  
gaatcgaac tacgctggct gctcctggc gccatgacac caatacgc atggctcgc 1500  
cgctgatgaa cttagctgg cagctcccg gctacagccg gggaaatate ccgccgggca 1560  
gcagcciggt gctggagcgc tggcgaacg cgaagagcgg agaacgctat ctgcgggtct 1620

atitccaggc ccagggccic gacgacctg gtcgtcigca gacgccggac ggcagaccc 1680  
cgatgetgcg tcaggagtgg caticagccgg gctgccgca gaccgatgtc ggtacgcigt 1740  
giccccticca ggcggctatt accgcccicg gtcagcgtat cgaccgatca tccgccccgg 1800  
cggtagcatg gtcctgccgt agcggcgcggt gttttgicc ggcccgggaa aaccititit 1860  
tccaggccgg cagcagctcc gttatccgti gtcggcgca aacgccccgg cggcgacctg 1920  
cgccggggig acaccgcig tccagcacc agccgcttat cagcccagca ggcgtgacgt 1980  
cgaacgccgg attgtaaacg gttgccccg tggcgccca ctgtaccgcg ccgaagctgc 2040  
ccgccactcc ggtcacticc gccgcgcgc gctgctcaat ggggatcgcc gccccgttcg 2100  
ggcaatggcg gtcgagggig gtcgccccg cagcagcgtt aaacgggatc tggtgataat 2160  
gggccaaaac cgcagagaa taggtgccga tttatctgc cactgcccg ttggcggcga 2220  
tacggicgce gccgaccac accgcatcca cctgcccctg cgcctcagg ctggcgcca 2280  
ttgaatcgcc gatcagctga tagggcagc ccagctgcc cagctcccag gcggttaaac 2340  
gaccgcccig cagcagcggc cgggttcat caaccatac gttggtcact tttccctgcc 2400  
ggigcgccag cgcgalaacg ccgagggcgg tccctacccc ggcggicgce agcccaccgg 2460  
tggtgcagtg ggtcagcagt cgactgccgg gctcaccag cgcacigccc gcctcagcga 2520  
tgggtegca cagctgttta tcttcttga ccagacgcaa ggcttccgct tccagcgct 2580  
ggggtaate tccgggccag cgtgcttca tgcgatcaga ttattcatca ggtigaccgc 2640  
cgicggcccgc gccgcgcga gtcctcagcg cctgctggag tgcctccgg ttccagcccgc 2700  
gctgggccag cagggccagc agcaggtgg cggacaggcc aatcagcggc gcgccgcga 2760  
ccccgcaggt atgaataatg tccaccagca gcgcaacgtt atccgcccgc agccagcgtt 2820  
tttctgccc caaggcctgc tggctgagaa taaaagctg atttactc acccgcaggc 2880  
tggiggctc taalgctgc atgtcttaa atccctgtt cgttgttgta tcacattgtg 2940  
tcaggatgga atccagaagt atagacgtc gaacggctta atcagaatic gaggatcgag 3000  
gcaatgtcgc aataccatac ctccaccgc cagatgccg tggcttacgc gcagagtcc 3060  
gccggcatcg acanccatct gagctggca gccgcagga agtggcgat ggcaactcaa 3120  
tctgggtgitt aaagigtctg ategccaggc cgtcagggc gatcgtcaaa caggctctgc 3180  
cctacgtcgc ctgcgtcggc gaatcctgga cgtgacctt cgaccgcgc cgtctgaag 3240  
cgcagacct ggtcgcacc tctcagcaca gccgcagca caggttaaaa atccatcact 3300  
ttgatcccga gctggcggig atgggatgg aagatcttcc cgaccaccgc atcttgcgcg 3360

gagagcttat cgtaacgic tactatcccc aggegcccgc ccagctlggc gactalciggg 3420  
cgcagggtgct gttcacacc agcgatttct acctccatcc ccacgagaaa aaggcgcagg 3480  
tggcgcagtt tattaacctg gcgatgtgcg agatcacga ggatcigtte tttaacgacc 3540  
cgtalcagat ccacgagcgc aataactacc eggegagct gggaggccga tctcggccc 3600  
ctcgcgcagc acctcagct taagctggcg gtggcggcgc tgaagcaccg ttctttggcc 3660  
catgcggaag cgtctctga cggcgataac cacagcgggt cgatcttctg tcccgaaggc 3720  
agcctgaagg ccacgcagc cgagttcggc tacttcggcc ccattggctt cgatacggc 3780  
accgcatcg gcaacctgct gcttaactac tgcggcctgc cgggccagct cggcattcgc 3840  
gatcccgccg ccgcgcgca gcagcggctg aacgacatcc accagctigt gaccacctt 3900  
gccgagcgt tccaggcgt ggccggcgag aaaaccgcg acgcggcgt ggcttcccc 3960  
ggctatgctt ccgctttct gaaaaagggt tggcggcagc cggctcggctt ctggcgcagc 4020  
gaactgatcc gccgcagct cggactgtcg cacgtcggg atatcgacac tatecaggac 4080  
gacgcatgc gicatgagtg cctcgcacc gccattacc tgggcagagc gctgatctg 4140  
ctggccgagc giatcgacag cgtcgacgag ctctggcgn gggtaccca giacagctga 4200  
gtgcgcctgt tccccacc ccaacctct cccacagga gaggagcac cccctaaaa 4260  
agtccattt tctgggatg cccggcgn gn tgccttggc gggctacag atagecgc 4320  
aacggttga tcttgcact ttctgtaggc cgggtaagge gaaagccgc acccggcaga 4380  
catgcgagta caatttga ttiaccttac cctcaccga gatactcaat caccgatagc 4440  
ccgccgttgt aatcgggtct gtagataalg ccttgcgc 4500  
tggatcacc gcgggcggcc gggacgggta tccatctt tctcagcga gccggcaca 4560  
gcgccccgt ctcagcggg cgatacgggt tggaaatgc gtaagccgc acccggcat 4620  
tctgalactg ggcaaaaac agcgttgagc tgacaaagct ccccgccgg tctcctatgca 4680  
ggttgtcgg accgaaatgc gccccttctg ccacgtaac cgttctacc ggccggcggga 4740  
aggctggcat gctcaccgg tgggttggct cgcggatcc aacagccag atcagcttct 4800  
cgccgtctc ctggttatcg agcaaccgtt catccagcacc caccagcaga tccgatccg 4860  
gcagcggcag cgcggtatgc gtccgcgc cgaacggcgg gctccagtg cgatggctaa 4920  
tcagcctcgg ctgggtacgg tctttgacat ccagcagct caggccgccc tccgcccagc 4980  
tgcgtaggcg talccccggc aataatggcg tgatgcagc catagcgtt gccctgcggc 5040  
cagtcgggtg tttaccgcc cgcctggctg atccccgca gccaccagc cccggctact 5100

tcgggccttac gcggatcggc cagatcgaig gtcaggaaga igtatcggg aaaaccgicg 5160  
 atcagcgcag acacalacgc ccagcgccecg ccgacgtacc agatcgggtg aalaccgatg 5220  
 ccgtaagcg acaggaaact gatttcccg gctgcgcggg agtggaaata tcaaagatgc 5280  
 gcagcccgcc gctccagccc ctgtccigca cctcctgac cgtgicaccc aecgagcggg 5340  
 tgtagtacac ctctcatca gcaaaacggg cgtcagcaaa cagatcccg gcgttgatca 5400  
 ccagcagcag atcgtcatgc gcttggaglg cacgttccag gtgcccggcg gcgcggcaat 5460  
 atagttgacg gggggggcc gggteggatc gegaacatcg accacggaaa aacctgcca 5520  
 caccataatg ccgalatagg cgaatcccg glgcaccatc agctgcacgc cgtccggacg 5580  
 accgccctga tcgctatggc caatcagccg catattcgg ctgtattcgg gggaaggtaa 5640  
 tctgacata ggggatccct ctgcgccggg gcatgggtt tccccctct cctgcggaga 5700  
 gggccggggc gagggcacea ggccgcgcc caccgccacc cggcttgatt ttatttgttc 5760  
 ttgccttcca gcgtcgcgaa ccacggcgcg ataaagtctt cggctggcc ccagccaggg 5820  
 ataatttcc ccagcgacgc cacgttacc gctcccgct gggccgccag cagcgcctgg 5880  
 ggaalcgctg ccgcttgaa gtcgtaggig gctggcgtcg gctcgcggc gatcttgtg 5940  
 gcgatcagcc gcacgttggc cgcgccgata agctt 5975

<210> 16

<211> 899

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<223> Designated as CA-26

<400> 16

gaattcctag laagcgcaag tcatcagctt gcgttgatta cgtcccigcc ctllgtacac 60  
 accgcccgtc gctactaccg atigaatggc ttagtgaggc ctccgattg gtttaggaaa 120  
 gggggcaacc tcattctgga accgagaagc tggtaaaact tggcattta gaggaagtaa 180  
 aagtcgtaac aaggtttccg tagtgaacct gcggaaggat cattactgat ttgcttaatt 240

gcaccacatg tgttttctt tgaacaaact tgccttgcgg tgggcccagc ctgccgccag 300  
 aggtctaaac ttacaaccaa tttttataca actigtcaca ccagattatt acttaatagt 360  
 caaacitcaa caaacggatc tcttggttct cgcagcgaaa tgcgatacgt aatatgaatt 420  
 gcagatattc gtgaalcac gaacttttga acgcacattg cgccctctgg tattccggag 480  
 ggcatgcctg tttagcgtc gtttctccct caaaccgctg ggtttggtgt tgagcaatac 540  
 gacttggggt tgcctgaaag acggtagtgg taaggcggga tcgittgaca atggcttagg 600  
 tctaaccaaa aacattgctt gcggcggtaa cgtccaccac gtatatcttc aaactttgac 660  
 ctcaaactcag gtaggactac ccgctgaact taagcatalc aataagcggg ggaaaagaaa 720  
 ccaacagggg ttgcctcagt agcggcgagt gaagcggcaa aagctcaaat ttgaaatctg 780  
 gcgtctttgg cgtccgagtt gtaattttaa gaaggtatct ttgggcccggt ctctttgcta 840  
 tgticcttgg aacaggacgt cacagagggt gagaatcccg tgcgatgaga tgaccggg 899

<210> 17

<211> 189

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<223> Designated as CA-26-1

<400> 17

gcgcaagtea tcagcttgcg ttgattacgt ccttgcctt tgtacacacc gcccgctcgt 60  
 actaccgatt gaatggccta gtgaggcctc cggattgggt taggaaagg ggcaacctca 120  
 tictggaacc gagaagctgg tcaacttgg tcatttagag gaagtaaaag tcgtaacaag 180  
 gtttccgta 189

<210> 18

<211> 224

<212> DNA

<213> *Candida albicans*

<220>

<223> Designated as CA-26-2

<400> 18

```

gctgggtttg gtgttgagca atacgacttg ggtttgcttg aaagacggta gtggttaaggc      60
gggatcgitt gacaatggct taggtctaac caaaaacatt gcttgcgggcg gtaacgtcca      120
ccaagtatat ctcaaaactt tgacctcaaa tcaggttagga ctaccgctg aacttaagca      180
tatcaataag cggaggaaaa gaaaccaaca gggattgcct cagt                          224

```

<210> 19

<211> 369

<212> DNA

<213> *Candida albicans*

<220>

<223> Designated as CA-26-3

<400> 19

```

aaacggatct ctiggttctc gcagcgaat gcgatacgta atatgaattg cagatattcg      60
tgaatcatcg aatcttigaa cgcacattgc gccctctggt attccggagg gcatgcctgt      120
ttgagcgtcg ttctccctc aaaccgctgg gtttggtgtt gagcaatagc acttgggttt      180
gctlgaaaga cggtagtggg aaggcgggat cgttigacaa tggcttaggt ciaacaaaa      240
acaitgcitg cggcggtaac gtccaccacg tatacttca aactttgacc tcaaatcagg      300
taggactacc cgctgaactt aagcatatca ataagcggag gaaaagaaac caacagggat      360
tgctcagt                                          369

```

【図面の簡単な説明】

第1図は、*in situ*ハイブリダイゼーションを（a）界面活性剤（SDS）不使用下および（b）界面活性剤（SDS）使用下で実施した結果を示す図である。

第2図は、種々の白血球細胞密度で固定した際の様子を示す図である。

第3図は、（a）*Staphylococcus aureus*および*Staphylococcus epidermidis*、（b）*Pseudomonas aerugi*

*nosa*および*Escherichia coli*、ならびに(c) *Enterococcus faecalis*に対する溶菌酵素の活性を経時的に示す図である。

第4図は、(a) N-アセチルムラミダーゼ300単位/ml、(b) リゾチーム10,000単位/ml、および(c) リゾスタフィン50単位/mlの溶菌活性に対するDM SOの添加による濃度依存的効果を示す図である。

第5図は、白血球に形態劣化をもたらすプロテアーゼの作用を抑制するために用いるPMSFの添加効果を、(a) プロテアーゼ0.2単位/mlのみ、(b) PMSF1 $\mu$ mol/ml添加、(c) PMSF10 $\mu$ mol/ml添加、(d) PMSF0.1mmol/ml添加、および(e) PMSF1mmol/ml添加について示す図である。

第6図は、本発明に従って調製した貪食サンプルにおいて、食細胞が細菌を貪食して形態変化を起こしていることを示す図である。 10

第7図は、貪食サンプルに対する酵素処理の効果を示す図で、(a) 酵素処理前の*S. aureus*の貪食サンプル、(b) 酵素処理前の*E. faecalis*の貪食サンプル、(c) サンプル(a)を酵素処理した後の様子、および(d) サンプル(b)を酵素処理した後の様子を示す図である。

第8図は、*in situ*ハイブリダイゼーションでの至適プローブ濃度の検討のために用いた貪食サンプル塗抹用のスライドグラスを示す概略図である。

第9図は、*in situ*ハイブリダイゼーションでの至適温度の検討のために用いた貪食サンプル塗抹用のスライドグラスを示す概略図である。

第10図は、(a) SAプローブおよび(b) PAプローブのジゴキシゲニンラベル化で得られる検出用プローブの鎖長とラベルによるシグナル強度を示すサザンロット(上段)および電気泳動(下段)の図である。 20

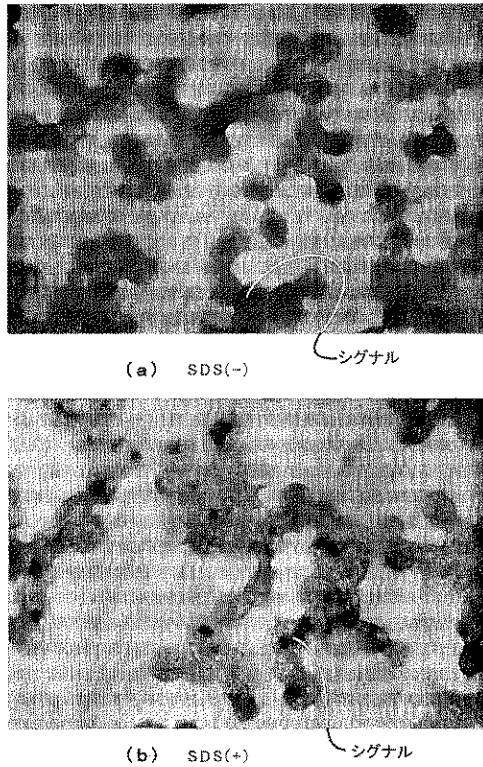
第11図は、*E. coli*貪食サンプルに関する*in situ*ハイブリダイゼーションにおいて、検出用プローブとして、(a) EC-24、(b) EC-34、(c) EC-39、および(d) プローブ(a)~(c)の混合プローブを用いた場合に認められたシグナル検出の結果を示す図である。

第12図は、貪食サンプルの塗抹用スライドグラスを示す概略図である。

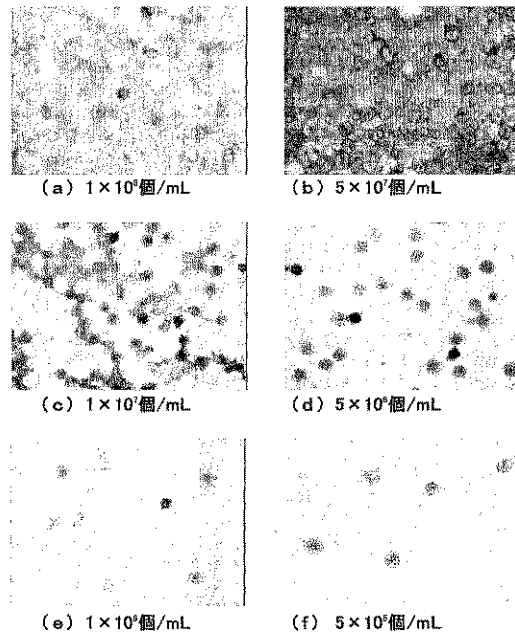
第13図は、(a) SA、(b) SE、(c) PA、(d) EFおよび(e) EKの各貪食サンプルを、対応する検出用プローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったときのシグナル検出の結果を示す図である。 30

第14図は、SA貪食サンプルに対してSA検出用プローブが特異的にシグナルを呈している様子を示す図である。

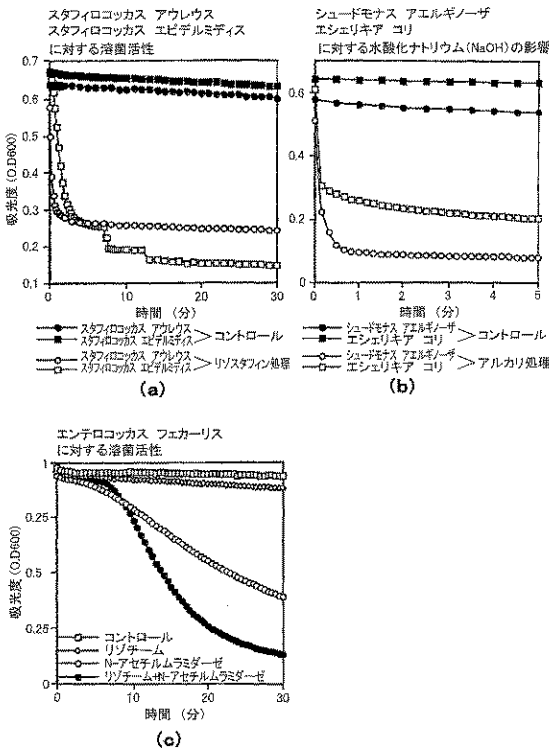
【 図 1 】  
第 1 図



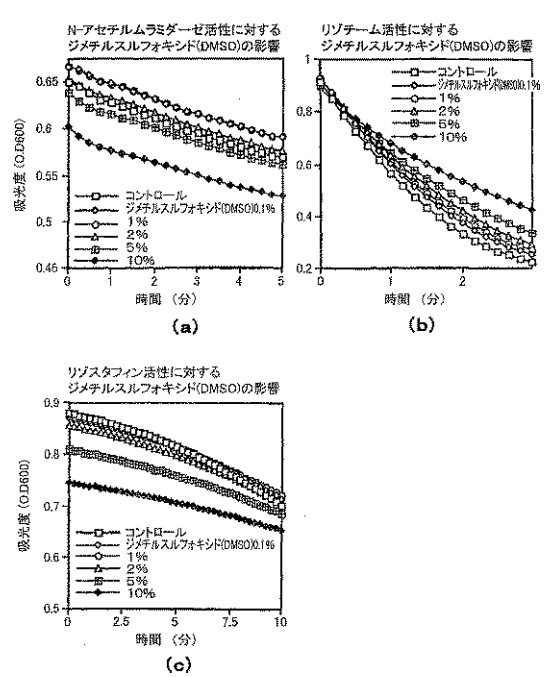
【 図 2 】  
第 2 図



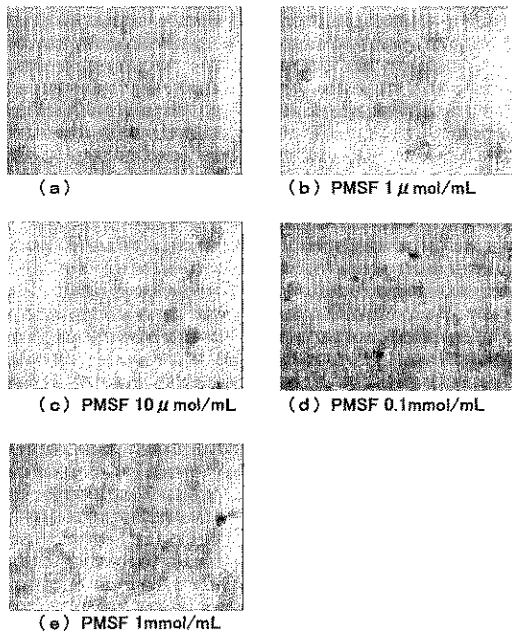
【 図 3 】  
第 3 図



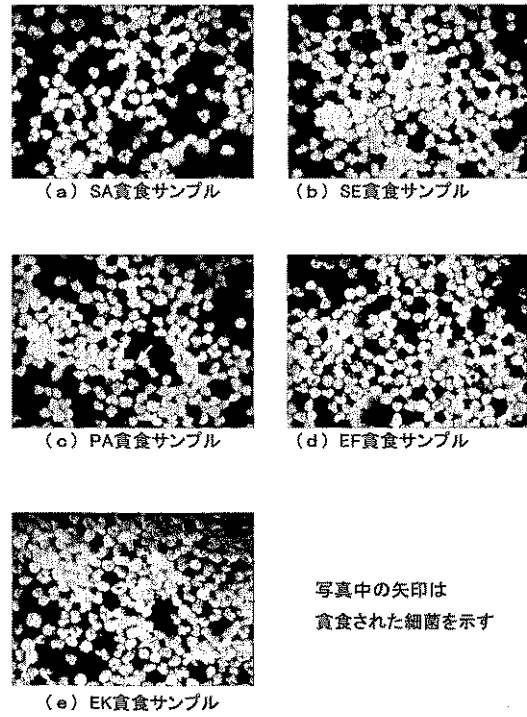
【 図 4 】  
第 4 図



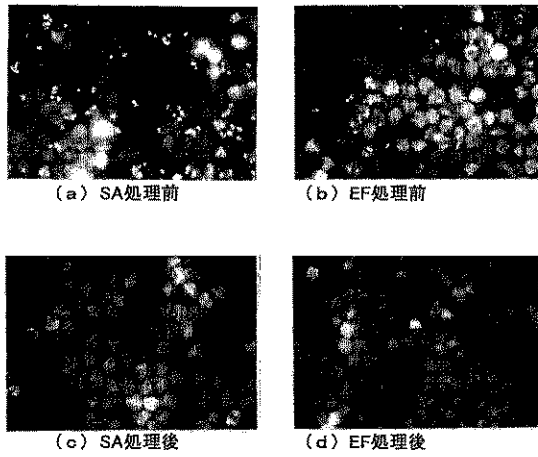
【図5】  
第5図



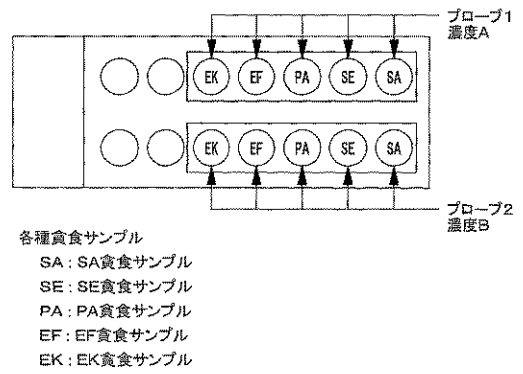
【図6】  
第6図



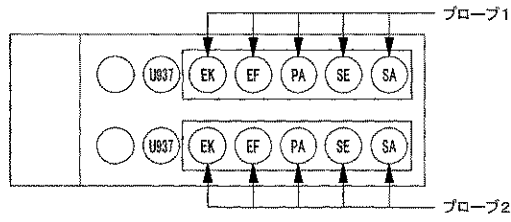
【図7】  
第7図



【図8】  
第8図

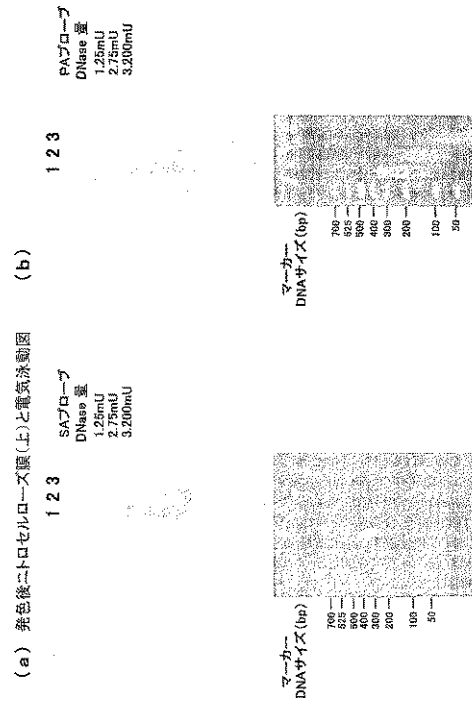


【図 9】  
第 9 図



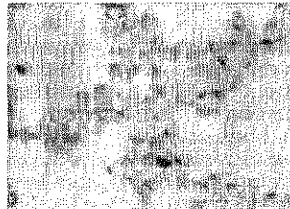
SA : SA 肉食サンプル  
SE : SE 肉食サンプル  
PA : PA 肉食サンプル  
EF : EF 肉食サンプル  
EK : EK 肉食サンプル

【図 10】  
第 10 図

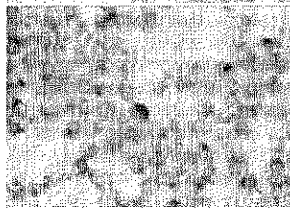


【図 11】  
第 11 図

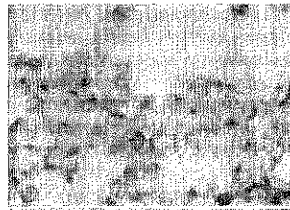
(a) EC-24



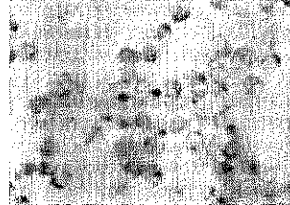
(b) EC-34



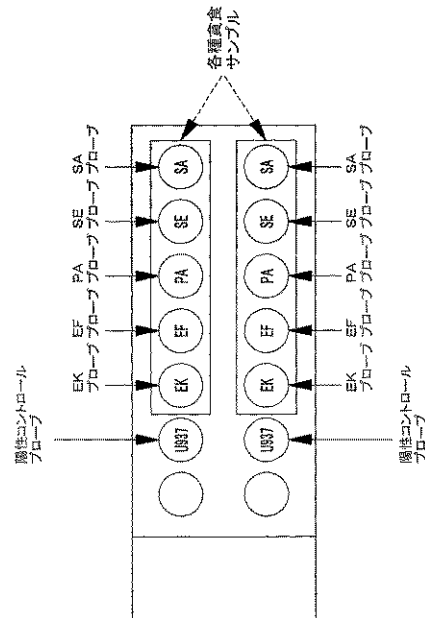
(c) EC-39



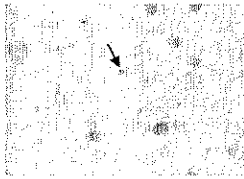
(d) Mix



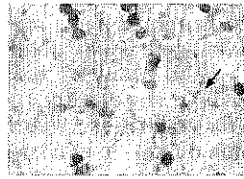
【図 12】  
第 12 図



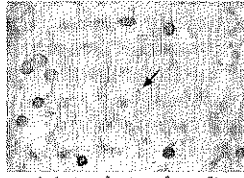
【図13】  
第13図



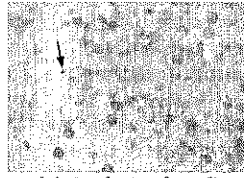
SA食食サンプル(SAプローブ)  
(a)



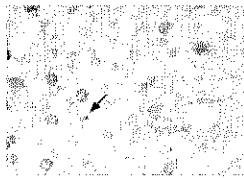
SE食食サンプル(SEプローブ)  
(b)



PA食食サンプル(PAプローブ)  
(c)



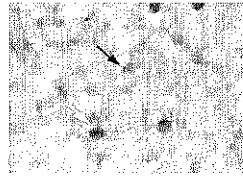
EF食食サンプル(EFプローブ)  
(d)



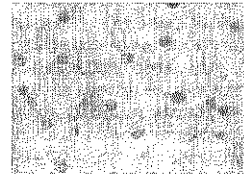
EK食食サンプル(EKプローブ)  
(e)

写真中の矢印はシグナルを示す

【図14】  
第14図



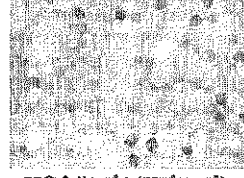
SA食食サンプル(SAプローブ)  
(a)



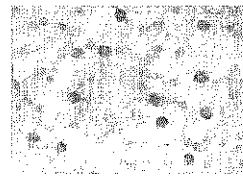
SE食食サンプル(SEプローブ)  
(b)



PA食食サンプル(PAプローブ)  
(c)



EF食食サンプル(EFプローブ)  
(d)



EK食食サンプル(EKプローブ)  
(e)

写真中の黒矢印はシグナルを示す  
また、写真中の白矢印に示したように  
対比染色により濃く染まる細胞もある

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/05106
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/06, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/53  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/06, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/53  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 159653 A1 (S.A. Innovit N.V.), 30 October, 1985 (30.10.85), & JP 60256377 A & US 4737455 A	1-25, 29-31, 33, 40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 20 August, 2002 (20.08.02)		Date of mailing of the international search report 03 September, 2002 (03.09.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office  Facsimile No.		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05106

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 26-28, 32, 34-39  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 26 to 28, 32 and 34 to 39 involve methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) (continued to extra sheet)
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/05106

Continuation of Box No. I-1 of continuation of first sheet (1)

of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/05106
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/06, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/53		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/06, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 159653 A1 (リシエ・アノム・イノフォーナムローズ・ベンノットシャップ) 1985.10.30 & JP 60-256377 A & US 4737455 A	1-25, 29-31, 33, 40
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日	20.08.02	国際調査報告の発送日
		03.09.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子
		4N 9637
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/05106

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 26-28, 32, 34-39 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 26-28, 32, 34-39 は、人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法を含むものであり、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査報告を要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I		
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/569	B
G 0 1 N 33/569		C 1 2 N 5/00	E

- (72)発明者 安部 加奈子  
大阪府枚方市村野本町 3 0 - 3 9
- (72)発明者 杉本 典彦  
大阪府八尾市美園 4 丁目 1 1 5 - 1 - 4 0 3
- (72)発明者 上山 浩  
大阪府大阪市城東区森之宮 2 丁目 9 - 1 4 1 2
- (72)発明者 江田 宗司  
京都府京都市山科区御陵封ジ山町 7 - 1 4 7
- (72)発明者 上原 啓嗣  
兵庫県宝塚市長尾町 8 丁目 1 3 - 4 1 2
- (72)発明者 岩見 高尚  
大阪府貝塚市久保 1 3 0 - 2 1
- (72)発明者 山本 誠司  
大阪府大阪市港区築港 3 - 7 - 2 - 5 1 3
- (72)発明者 荒木 宏昌  
奈良県大和郡山市藤原町 1 - 1 2

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	评估吞噬细胞功能的方法及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2002101037A1</a>	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2003503787	申请日	2002-05-27
申请(专利权)人(译)	扶桑制药工业有限公司		
[标]发明人	大野典也 松久明生 芥子宏行 安部加奈子 杉本典彦 上山浩 江田宗司 上原啓嗣 岩見高尚 山本誠司 荒木宏昌		
发明人	大野 典也 松久 明生 芥子 宏行 安部 加奈子 杉本 典彦 上山 浩 江田 宗司 上原 啓嗣 岩見 高尚 山本 誠司 荒木 宏昌		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/06 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 C12N5/06		
CPC分类号	G01N33/5047 C12Q1/6841 C12Q1/689 G01N33/5005		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/02 C12Q1/06 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.B C12N5/00.E		
代理人(译)	古河钓鱼		
优先权	2001165954 2001-05-31 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了通过在使吞噬细胞与外来微生物体外接触后分离细胞而制备的外来吞噬性吞噬细胞，生产该吞噬细胞的方法，利用该方法的方法以及试剂盒。有。提供了一种能够在体外评估吞噬细胞吞噬功能的实验模型。

