

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 125695

(P2002 - 125695A)

(43)公開日 平成14年5月8日(2002.5.8)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド* (参考)
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/40		C 1 2 M 1/40	B 4 B 0 6 3
// C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	
1/68		1/68	A
G 0 1 N 33/538		G 0 1 N 33/538	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 329580(P2000 - 329580)

(22)出願日 平成12年10月27日(2000.10.27)

(71)出願人 000004178

ジェイエスアール株式会社

東京都中央区築地2丁目11番24号

(72)発明者 安田 健二

東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエ

スアール株式会社内

(72)発明者 村田 充弘

東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエ

スアール株式会社内

(72)発明者 日方 幹雄

東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエ

スアール株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物および生体由来物質の検出方法

(57)【要約】

【課題】 治療、臨床検査、食品検査、水質検査の分野で利用される試料中の低濃度の微生物、生体由来物質の特異的かつ効率的な濃縮方法およびこれを使用した微生物、生体由来物質の検出方法を得る。

【解決手段】 微生物および生体由来物質もしくはいずれか一方が、適用する微生物および生体由来物質の検出手段の検出限界濃度以下で含まれる可能性がある試料に、前記微生物および生体由来物質を特異的に吸着することのできる吸着体を接触させた後、吸着体に結合した微生物および生体由来物質もしくはいずれか一方の検出手段を適用することを特徴とする微生物および生体由来物質の検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物および生体由来物質もしくはいずれか一方が、適用する微生物および生体由来物質の検出手段の検出限界濃度以下で含まれる可能性がある試料に、前記微生物および生体由来物質を特異的に吸着することのできる吸着体を接触させた後、吸着体に結合した微生物および生体由来物質もしくはいずれか一方の検出手段を適用することを特徴とする微生物および生体由来物質の検出方法。

【請求項2】 試料が体液、血液、排泄物、組織、細胞、食品、環境水、循環水およびそれらを溶解、懸濁または分散させたものであることを特徴とする請求項1に記載の微生物および生体由来物質の検出方法。

【請求項3】 微生物および生体由来物質が原生動物、菌類、細菌類、リケッチャ、マイコプラズマ、核酸、抗原、抗体またはタンパク質であることを特徴とする請求項1または2に記載の微生物および生体由来物質の検出方法。

【請求項4】 微生物および生体由来物質を特異的に吸着することのできる吸着体が、粒子状、フィルター状、繊維状、シート状、チューブ状または板状であることを特徴とする請求項1、2または3に記載の微生物および生体由来物質の検出方法。

【請求項5】 微生物および生体由来物質を特異的に吸着することのできる吸着体が、有機ポリマー、無機ポリマー、無機化合物または天然高分子からなることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の微生物、生体由来物質の検出方法。

【請求項6】 微生物および生体由来物質の検出手段が核酸増幅方法または免疫化学測定であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の微生物および生体由来物質の検出方法。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかの検出方法に用いることを特徴とする吸着体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、治療、臨床検査、食品検査、水質検査の分野で利用される試料中の低濃度の微生物、生体由来物質の特異的かつ効率的な濃縮方法およびこれを使用した微生物、生体由来物質の検出方法に関するものである。より詳述すれば、湖沼河川水、水道水、循環浴槽、冷却塔などの循環水、または生鮮食品、乳加工品、インスタント食品、またはヒト、動物の体液、血液、排泄物、組織、細胞およびそれらを溶解、懸濁、分散させた試料中に含まれる低濃度の微生物、生体由来物質の検出方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】治療、臨床検査、食品検査、水質検査においては試料中の微生物、生体由来物質を迅速、正確、高感度に検出することが、治療方法、治療のタイミング

の選択決定、疾病、感染、体質の診断判定、食品の汚染、遺伝子操作の有無の判定、水質汚濁、汚染の判定、処置効果の確認の上で極めて重要である。通常これら微生物や生体由来物質の検出は、生化学検査、免疫学的検査などの手法を利用して検出されてきたが、検査対象である試料中にこれら微生物や生体由来物質がある濃度以上で存在する場合は検出可能であるが、微生物や生体由来物質の存在が低濃度の場合は、これら微生物を培養し濃度を高めた後に検出に供するか、生体由来物質においては液体クロマトグラフィーや質量分析計などを最新鋭の機器を駆使して検出することが試みられてきた。しかしながら、微生物の培養法においてはその操作が煩雑かつ熟練度を要し、本分野の専門家であっても再現性良く結果をうるものが従来困難であった。また、培養に長期間を要する微生物においては迅速な診断、処置が不可能であり、実用面で大きな足かせとなっていた。また、高感度な液体クロマトグラフィーや質量分析計などを最新鋭の機器を駆使しても検出しうる生体由来物質の検出限界には自ずから限度があり、かつ機器自体が高価かつ取り扱いに高度の熟練を要し、汎用的に利用できるものでなかった。健康意識の向上や食品検査の要求度の高まり、及び環境問題の意識の高揚からより微量な生体由来物質の検出が近来求められるようになって来ている。

【0003】近年、ポリメラーゼチェーンリアクション法（以下PCR法）に代表される、核酸増幅技術やインベーター技術などの遺伝子検査技術により、低濃度の微生物、核酸を有する生体由来物質を検出できる可能性が開けてきた。しかしながら、PCR法などによっても極微量の低濃度の微生物、核酸を有する生体由来物質の検出には特殊な設備と高度な技術が必要とされ、一般的な施設で簡便に実施することはきわめて困難である。また、使用可能なサンプル量も機器により制限されており、少量のため、PCR法によっても検体中の微生物、核酸を有する生体由来物質の濃度が低いと検出出来ないことが問題であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、従来の方法では検出不可能であるか、あるいは可能であっても煩雑な培養操作や高価かつ汎用性に課題のある分析機器の使用が必要であった低濃度の微生物、生体由来物質の工業的に有意な検出方法を提供するものである。

【0005】

【発明を解決するための手段】本発明は、上記の課題を解決するものとして、微生物および生体由来物質もしくはいずれか一方が、適用する微生物および生体由来物質の検出手段の検出限界濃度以下で含まれる可能性がある試料に、前記微生物および生体由来物質を特異的に吸着することのできる吸着体を接触させた後、前記試料中から前記吸着体を分離し、次に吸着体に結合した試料から

微生物および生体由来物質もしくはいずれか一方の検出手段を適用することを特徴とする微生物および生体由来物質の検出方法を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明をより具体的に詳しく説明する。

[吸着体]本発明で使用するこの吸着体(以下、単に「目的物質吸着体」という)は、素材そのものを示すのではなく、種々の材料、例えば有機ポリマー、無機ポリマー、無機化合物および天然高分子化合物など、またはこれらの組合せたものからなり、形状も後述のように種々の形状をとり得る。該吸着体は微生物、生体由来物質を容易に分離することができることから、水不溶性であることが必要である。試料となる水性物質、例えば血液、尿、タンパク質水溶液などに不溶の物質からなる。目的物質吸着体を構成する有機ポリマーとしては、例えば芳香族ビニル化合物、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、不飽和カルボン酸などのラジカル重合性モノマーの(共)重合体、ポリエステル、ポリオレフィン、ポリエーテル、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリアミド、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂、ポリエチレンイミン、ポリプロピレンイミン、ポリリジン、グルコサミン、ポリアリルアミンなどが挙げられる。無機ポリマーとしては、例えばアルコキシシラン、オルガノアルコキシシランなどの加水分解縮合物を挙げることができる。無機化合物としては、例えばシリカ、アルミナ、リン酸カルシウムなどを挙げることができる。天然高分子としては、例えばデキストラン、セルロース、アガロース、グルコマンナンなどを挙げることができる。材料が、例えば有機ポリマーの場合などでは、水溶性のものもあるが、目的物質吸着体は水不溶性である必要があるため、その場合架橋させたり、水不溶性基材に保持させるなどの処理が必要である。

【0007】本発明において、目的物質吸着体はその表面がイオン性であることが微生物、生体由来物質の特異的な吸着能を上げるために好ましい。ここで、表面がイオン性であるとは、目的物質吸着体の表面がアニオン性およびカチオン性の少なくともいずれか一方の荷電を有する、または特定の条件下で荷電を有する状態となりうることを示す。目的物質吸着体の表面がアニオン性を有するものとしては、例えば、目的物質吸着体がアニオン性基を有するモノマーを共重合した重合体からなるもの、重合体をアニオン化してなるもの、合成高分子にスルホン酸含有単量体をシード結合又はグラフト重合してなる重合体、陽イオン交換樹脂からなるもの、硫酸化した天然高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたもの、無機ポリマーまたは無機粒子の表面に、アニオン性基を有する重合体または硫酸化した天然高分子を有するもの、などである。ここで、アニオン性基としては、スルホン基、カルボキシル基などを挙げることが

できる。

【0008】上記の例として次のものを挙げることができる。

アニオン性基を有するモノマーを共重合した重合体の例：カルボン酸含有単量体の(共)重合体をあげることができる。ここで、カルボン酸含有単量体(以下「カルボン酸単量体」という)とは、付加重合性の不飽和結合およびカルボキシル基を分子中に有する重合性単量体である。具体例としては、アクリル酸、メタクリル酸、クロトン酸、イタコン酸、フマル酸、マレイン酸などをあげることができる。

【0009】重合体をアニオン化(スルホン化)してなるものの例：少なくともその表面にスルホン化可能な官能基、例えば主鎖または側鎖に不飽和二重結合、芳香族基、第一級または第二級アミノ基、第一級ハロゲン化アルキル基、脂肪族アルデヒド、脂肪族ケトン、脂肪族カルボン酸、脂肪族カルボン酸無水物、水酸基等をもつ(共)重合体からなり、その表面の少なくとも一部がスルホン化されているもの。表面スルホン化可能な(共)重合体の例として、スチレン、 α -メチルスチレン、ビニルナフタレン、ジビニルベンゼン、ブタジエン、イソプレン、ビニルアルコール等のスルホン化可能な単量体の(共)重合体、およびこれら単量体と他の重合性単量体との(共)重合体等の付加重合系高分子化合物；ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエステルエーテル、ポリアリールエーテル、ポリアルキレンオキシド、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリウレタン、芳香族化合物のアセトアルデヒド縮合物、ポリエーテル等の縮合重合系高分子化合物等があげられる。

【0010】陽イオン交換樹脂の例としては、ジビニルベンゼン架橋スルホン化ポリスチレンがあげられ、粒径は、中心粒径が0.1mmから1mm程度のもので良い。

硫酸化した天然高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたものの例：硫酸化多糖類としては、ヘパリン、デキストラン硫酸、セルロース硫酸、ガードラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デキストラン硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸、デルマタン硫酸、アミロペクチン硫酸、ケタラン硫酸、キシラン硫酸、カロニン硫酸、ペクチン硫酸、イヌリン硫酸、アルギン酸硫酸、グリコーゲン硫酸、ポリラクトース硫酸、カラゲニン硫酸、デンブリン硫酸、ポリグルコース硫酸、ラミナリン硫酸、ガラクトサン硫酸、レバン硫酸、メベサルフェート、フコイダン、硫酸化グリチルリチンなどの抗ウイルス性を有する多糖類を挙げることができる。硫酸化多糖類は、エポキシ基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、水酸基、酸クロライド基などの官能基を持つ重合体に直接もしくはカップリング剤やスペーサーを介して

担持させることができる。

【0011】目的物質吸着体の表面がカチオン性を有するものとしては、例えば、目的物質吸着体がカチオン性を有するモノマーを共重合した重合体からなるもの、カチオン性を有する重合開始剤を用いてラジカル重合させて得た重合体からなるもの、カチオン性を有する化合物を重合体担体に結合してなるもの、陰イオン交換樹脂からなるもの、カチオン性基含有水溶性高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたもの、無機ポリマーまたは無機粒子の表面に、カチオン性を有する重合体またはカチオン性基含有水溶性高分子を有するものなどである。

【0012】ここでカチオン性基としては、1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基；4級アンモニウム基、イミノ基（-NH-基及び=NH基）、アミジノ基、イミジノ基、ヒドラジノ基；さらにピリジル基等の窒素原子を含む環状基などを挙げることができる。上記の例としては、次のものを挙げることができる。

カチオン性を有するモノマーを共重合した重合の例：カチオン性を有するモノマーとしては、2-ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、2-ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート、2-ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリレート、3-ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリレート等のアミノアルキル基含有（メタ）アクリル酸エステル類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩；2-（ジメチルアミノエトキシ）エチル（メタ）アクリレート、2-（ジエチルアミノエトキシ）エチル（メタ）アクリレート、3-（ジメチルアミノエトキシ）プロピル（メタ）アクリレート等のアミノアルコキシアルキル基含有（メタ）アクリル酸エステル類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩；N-（2-ジメチルアミノエチル）（メタ）アクリルアミド、N-（2-ジエチルアミノエチル）（メタ）アクリルアミド、N-（2-ジメチルアミノプロピル）（メタ）アクリルアミド、N-（3-ジメチルアミノプロピル）（メタ）アクリルアミド等のN-アミノアルキル基含有（メタ）アクリルアミド類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩等が挙げられる。なかでも、2-ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、N-（2-ジメチルアミノエチル）（メタ）アクリルアミド、及びこれらの塩化メチレンによる4級塩が好ましい。これらは、他の重合性モノマーと共重合させてもよい。カチオン性モノマーと共重合するモノマーとしては、下記に示すような架橋性モノマーならびに非架橋かつ非イオン性モノマーを挙げることができる。

【0013】架橋性モノマーとしては、ジビニルベンゼン、ジビニルピフェニル、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ジエチレングリコールジ（メタ）ア

クリレート、トリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、テトラエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、プロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、ジプロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリプロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、テトラプロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、1,4-ブタンジオールジ（メタ）アクリレート、1,6-ヘキサジオールジ（メタ）アクリレート、ネオペンチルグリコールジ（メタ）アクリレート、2,2'-ビス〔4-（メタ）アクリロイルオキシプロピオキシフェニル〕プロパン、2,2'-ビス〔4-（メタ）アクリロイルオキシジエトキシフェニル〕プロパン、グリセリントリ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、ペンタエリスリトールテトラ（メタ）アクリレート等のジビニル系モノマー、トリビニル系モノマー及びテトラビニル系モノマーが挙げられる。なかでも、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレートおよびトリメチロールプロパントリメタクリレートが好ましい。共重合可能な非架橋性かつ非イオン性モノマーは、カチオン性モノマーあるいは架橋性モノマーのいずれかと共重合可能であって、非架橋性かつ非イオン性のモノマーである。

【0014】このようなモノマーとして、スチレン、-メチルスチレン、p-メチルスチレン、ハロゲン化スチレン等の芳香族ビニル単量体；アクリロニトリル等の不飽和ニトリル；メチルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルアクリレート、エチルメタクリレート、ブチルアクリレート、ブチルメタクリレート、シクロヘキシルメタクリレート、2-エチルヘキシルアクリレート、2-エチルヘキシルメタクリレート、ラウリルアクリレート、ラウリルメタクリレート、グリシジルアクリレート、グリシジルメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等のアクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステル；ブタジエン、イソプレン等のジオレフィン；酢酸ビニル等のカルボン酸ビニルエステル；塩化ビニル、塩化ビニリデン等のハロゲン化ビニリデン等を挙げることができる。なかでも、スチレン、-メチルスチレン、アクリロニトリル、メチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、シクロヘキシルメタクリレートが好ましい。

【0015】カチオン性を有する重合開始剤を使用してモノマーを重合して得た重合体の例：カチオン性を有するラジカル重合開始剤は、これを用いたラジカル重合により得られたポリマーがその末端に該ラジカル重合開始剤に由来するカチオン性を有するようになるものである。好ましいカチオン性を有するラジカル重合開始剤としては、アミジノ基、イミジノ基あるいはピリジウム基を有するアゾビス型の開始剤が挙げられる。また、10時間半減期温度が40～95の範囲にあるも

のが温和な条件下で重合を行うことができるので好ましい。

【0016】カチオン性基を有する化合物を重合体担体に結合させてなる重合体

粒子表面にカルボキシル基、ハイドロキシル基、エポキシ基、アミノ基、アミド基などを共重合やシード重合などにより導入し、それらの基を結合部として反応させることにより、カチオン性基を有する化合物を重合体表面に導入することができる。カチオン性基を有する化合物としては、ポリエチレンイミン、ポリプロピレンイミン、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリプロピレンアミンなどのポリアミン化合物、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリヒスチジンなどの遊離アミノ酸類、前述のカチオン性基を有するモノマーを共重合したポリマーなどを挙げるができる。

【0017】陰イオン交換樹脂

ジピニルベンゼン架橋ポリスチレンに第4級アンモニウム基 $-CH_2N^+(CH_3)_3$ (I型) あるいは $-CH_2N^+(CH_3)_3(C_2H_4OH)$ (II型) を導入した強塩基性陰イオン交換樹脂、 $-NH(CH_3)_2$ 、 $-NH(CH_2CH_2NH)_nH$ 、 $-CONH(CH_2)_3N(CH_3)_2$ を導入した弱塩基性陰イオンなど。

無機ポリマーまたは無機化合物の表面にカチオン性基を有する重合体またはカチオン性基含有水溶性高分子を有するもの。さらにキレート樹脂といわれる供与体原子(O, N, S)を有する樹脂も挙げるができる。キレート樹脂としては、イミノ二酢酸型、イミノプロピオン酸型、エチレンジアミン三酢酸型、キノリン型、アミノカルボン酸型、アミンリン酸型、アミドキシム型、クリプタント型、ポリアミン型、ピリジン型、ピコリルアミン型、チオール型、リン酸型、多価フェノール型、ジチオカルバミン酸型、チオ尿素型、イソチウロニウム型およびジチゾン型などが挙げられる。

【0018】また、本発明において目的物質吸着体には検査の自動化、分離操作の自動化のための有効な強磁性体、超常磁性体などの磁性体を含有させることができる。目的物質吸着体の形状は特に限定されず種々有り得る。例えば、粒子状、フィルター状、繊維状、シート状、チューブ状、板状などである。目的物質吸着体の形状が粒子状の場合、粒径は試料中に分散して使用する場合には $0.1 \sim 200 \mu m$ 程度、カラムに充填して使用する場合には $0.1 \sim 1 mm$ 程度の粒径を有することが好ましい。

【0019】フィルターの場合には、好ましくは、平均孔径が $0.1 \sim 50 \mu m$ の範囲にあるフィルターであり、平膜、中空系膜、不織布、織布などを例示できる。血漿や培養液などを対象とした場合は、平均孔径が $0.1 \mu m \sim 10 \mu m$ が好ましい。平均孔径が $0.1 \mu m$ 以下だと、孔径が小さくなるため十分な濾過量が得られなくなる。平均孔径は、ASTM-F316に記載されたパームポロメーター(ポラスマテリアル社製)を用い

て求めた値であり、実際の透過孔を反映する値である。また、フィルターの通水量は、 $0.7 kg/cm^2$ の圧力下で、 25 ± 2 で測定した値で、 $10 mL/min/m^2/mmHg$ 以上、好ましくは $100 mL/min/m^2/mmHg$ 以上であることが、濾過圧を低くできるため好ましい。また、不織布状の基材の場合、フィルター材を形成するフィラメントは、モノフィラメントであってもマルチフィラメントであってもよいが、平均直径(走査型電子顕微鏡で観察したフィラメントの長径と短径の平均値)が $100 \mu m$ 以下、好ましくは、 $50 \mu m$ 以下であると、膜の表面積が大きくなり吸着部位が増加することとなるため好ましい。さらに、異形フィラメントであっても多孔質フィラメントであっても良い。さらに、フィルターの空孔部の割合(空孔率)は、 20% 以上、好ましくは 50% 以上である。

【0020】目的物質吸着体がシート状、チューブ状または板状である例としては、採血管、真空採血管、試験管、ウェルプレート、マイクロプレート、マイクロテストチューブ、エッペンドルフチューブ(商品名)などを挙げるができる。これらの形状の目的物質吸着体を得るには、上記に例示された有機ポリマーのうちポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ノルボルネン系樹脂などの熱可塑性樹脂はそのまま所望の形状に成形することができる。また、ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレートなどからなる汎用の採血管などの表面をイオン化することにより、本発明に適した目的物質吸着体とすることもできる。

【0021】[試料]本発明の検出方法の適用対象は、微生物、生体由来物質を含有する可能性のある試料である。試料としては、例えば血液、血漿、血清、尿、唾液等の各種体液、尿、糞便などの排泄物、組織、細胞、細胞破碎液、培養細胞破碎液、生鮮食品、乳加工品、インスタント食品などの食品、湖沼河川水、水道水、循環浴槽、冷却塔などの循環水、環境水などであり、それらを溶解、懸濁、分散させたものである。本発明において、試料中の目的物質吸着体の濃度は、試料を直接測定した場合に、適用使用とする検出手段では測定することのできない濃度範囲である。

【0022】[接触・結合]本発明では、前記のとおり調製された試料に前記の目的物質吸着体を接触させる。接触の方法は種々有り、特に限定されない。例えば、目的物質吸着体が粒径 $200 \mu m$ 未満の粒子の場合には、目的物質吸着体を試料中に分散させ、振とうすることにより試料と目的物質吸着体を接触させる。目的物質吸着体が粒径 $200 \mu m$ を超える粒子の場合には、カラムに充填し、その中に試料を通過させる。また、目的物質吸着体が直径 $5 \sim 6 mm$ のプラスチックビーズなど大きなもの場合は、 $1 \sim$ 数個を試験管に入れ、試料と接触させる。目的物質吸着体がフィルター状または繊維状の場

合には、フィルターまたは繊維表面と試料が充分接触するように、フィルターまたは繊維で試料を濾過する。目的物質吸着体が試験管やウェルプレートなどの試験器具である場合には、該試験器具の中に試料を入れ振とうする。目的物質吸着体の使用量としては、例えば目的物質吸着体が粒子の場合、試料1mlあたりに粒子の表面積が50~10000平方cmとなる程度の割合で試料に添加する。

【0023】目的物質吸着体に試料を接触させる際には、必要に応じて多価金属イオンなどをさらに添加することもできる。目的物質吸着体に試料を接触させる際の試料の温度は通常5~37、接触時間は特に制限はないが十分に特異的な吸着効率を得られるよう対象によって調整する事が好ましい。本発明でいう特異的な吸着とは、目的とする微生物、生体由来物質を共存する微生物、生体由来物質、他物質から高効率、高選択的に吸着することである。低濃度微生物の検出には既述のPCRなど核酸増幅法の利用が効果的であるが、生菌死菌の判別が通常つかず、核酸増幅法で検出の結果、陽性の判定が出て例えばヒト、動物、食品、環境への影響を判断することができず、最終的な判断には結局微生物を含むと推定される試料の一部をサンプリングし、培養後検出することが不可避となり、核酸増幅法の適用の大きな阻害要因になっていた。

【0024】また、高感度な核酸増幅方法または免疫化学測定法において、試料中の微生物、生体由来物質の検出を行う場合、実際には存在しなくとも存在を疑うシグナルが出るといった擬陽性判定になる場合が多く、実用面で大きな障害となってきた。しかしながら、本発明による、微生物、生体由来物質を特異的に吸着することのできる吸着体を接触させた後、試料中から前記吸着体を分離し、次に吸着体に結合した微生物、生体由来物質の検出を行うことを特徴とする微生物、生体由来物質の検出方法とすることにより、この擬陽性の率を大幅に低減することが可能となる。

【0025】[微生物、生体由来物質の検出]目的物質吸着体と試料を接触させた後、目的物質吸着体を試料から分離する。この際、目的物質吸着体が粒径200μm未満の粒子の場合には、例えば遠心により分離する。また、目的物質吸着体に磁性体を含有させておくことにより、試料から磁気により容易に分離することができる。試料から分離された目的物質吸着体上の微生物、生体由来物質は濃縮されている。こうして濃縮された微生物、生体由来物質は次に検出に供される。但し、検出に供する前に必要に応じて目的物質吸着体を低濃度の緩衝液で洗浄したり、微生物および生体由来物質を目的物質吸着体から分離した後に検出に移行してもよい。例えば、微生物、生体由来物質が原生動物、菌類、細菌類、リケッチャまたはマイコプラズマである場合にはこれを分離し、核酸である場合には抽出することができる。また、

微生物、生体由来物質が目的物質吸着体上に結合したまま検出に移ることもできる。微生物、生体由来物質の種類、目的物質吸着体の材質等に応じて適宜の方法を選択すればよい。

【0026】微生物、生体由来物質を目的物質吸着体から分離する方法としては、塩溶液および界面活性剤あるいは両者の混合物を作用させて微生物、生体由来物質を目的物質吸着体から解離させる方法がある。塩溶液としては高濃度の、例えば2~8Mの臭化カリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、グアニジンイソチオシアネート、グアニジンチオシアネート、塩酸グアニジン、硫酸グアニジン、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸カリウムおよびその塩の水溶液、1.5~6M塩化ナトリウム水溶液、0.5~5mMリンタングステン酸水溶液等を用いることができる。界面活性剤としては、SDS、トライトンX-100、Tween20、80、NP-40などがある。

【0027】また、核酸抽出は、微生物、生体由来物質が目的物質吸着体に結合したままでも行うことができる。標的核酸を効果的に増幅して検出するためには、通常、その核酸を細胞やその他の被試料残渣から単離しなければならない。様々な分離方法が知られており、凍結法、プロテアーゼ(例、プロテイナーゼK)などの消化酵素による処理法、煮沸法、各種洗剤を使用する方法(例えば、1988年4月6日出願のHiguchiの米国特許出願第178,202号明細書および1991年5月22日発行の欧州特許出願公開第07828197号公報参照)、溶剤析出法並びに加熱プロトコールがある。分離された目的物質吸着体に少量の緩衝液を加え、加熱することで直接、微生物、生体由来物質の核酸を抽出することも可能であるし、市販されている核酸抽出試薬を直接添加して微生物、生体由来物質の核酸を抽出することも可能である。

【0028】上記のようにして目的物質吸着体上に濃縮され、場合によってはさらに濃縮された状態で分離、抽出された微生物、生体由来物質の検出が行われる。検出方法は、微生物、生体由来物質の種類に応じて公知の方法を採用することができ、例えば核酸増幅検査、免疫化学測定法等が挙げられる。核酸増幅検査(NAT; nucleic acid amplification test)の方法は特に限定されず、例えば、ロシュ社のPCR(Polymerization chain reaction)法、ジェン・プローブ社のTMA(Transcript ion Mediated amplification-hybridization protection assay)法、アボット社のLCR(Ligase chain reaction)法、NASBA(Nucleic Acid Sequence-based Amplification)(RNAをターゲット、温度一定が特徴)、栄研化学社のLAMP法、宝酒造社のICAN法、CPT(Cyclic Probe Tech)(DNAをターゲット、DNA/RNAキメラprobeを使用し、ピオチン標識probeを増幅)、Q Replicase Amplification(RNAをターゲット、ストレプトアビジン粒子でRNAを単離)、Inva

der Assay等を利用することができる。

【0029】免疫化学測定法としては、例えば酵素免疫反応(EIA)法、化学発光法(CTLA)、蛍光法(FIA)などを挙げることができる。本発明の微生物、生体由来物質検出方法で検出することのできる微生物、生体由来物質は原生動物、菌類、細菌類、リケッチャ、マイコプラズマ、核酸、抗原、抗体またはタンパク質などを挙げることができる。原生動物としては、アメーバ、トリコモナス、マラリア病原虫、トキソプラズマ、クリソモナス、ミドリムシなどが挙げられる。菌類としては、コウボ菌、アオカビ、コウジカビ(アスペルギルス)などの子嚢菌類、カンジダ、クリプトコッカスなどの不完全菌類に代表される真菌類などが挙げられる。細菌類としては、枯草菌、ジフテリア菌、ボツリヌス菌、インフルエンザ菌、淋菌、ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、連鎖球菌、大腸菌、メタン菌、コレラ菌、緑膿菌、レジオネラ属菌などが挙げられる。リケッチャとしては、トラコーマ病原、オウム病病原、Q熱病原、発疹チフス病原などが挙げられる。マイコプラズマとしては、肺炎マイコプラズマ、ウレアマイコプラズマなどが挙げられる。核酸としては、DNA、RNA、mRNA、tRNAなどが挙げられる。抗原、抗体としてはフェリチン、ASO、T₃、T₄、 α -フェトブロテイン、HBs抗原、CEA(癌胎児性抗原)、HCV表面抗原、HIV表面抗原、抗トレポネーマパリダム、抗カルピオライピン抗原、抗HBC抗体、抗HIV抗体など免疫反応で測定されるすべての物が挙げられる。タンパク質としては、 α -リポ蛋白、 β -リポ蛋白などが挙げられる。

【0030】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。以下の記載においては、特記しない限り「部」は「重量部」を意味する。

【0031】参考例1

(1)油性磁性流体フェリコロイドHC50[商品名、タイホー工業(株)製]にアセトンを加えて粒子を析出沈殿させた後、これを乾燥することにより、親油化処理された表面を有するフェライト系の超常磁性体(粒子径:0.01 μ m)を得た。ついで、上で得た超常磁性体40部にシクロヘキシルメタクリレート90部、トリメチルアミノエチルメタクリレートの塩化物10部およびベンゾイルペルオキシド(重合開始剤)3部を添加し、この系を混合攪拌することにより超常磁性体を均一に分散させてモノマー組成物を調製した。一方、ポリビニルアルコール10部、ラウリル硫酸ナトリウム0.05部およびポリエチレンオキシドニルフェニルエーテル0.1部を水1000部に溶解して水性モノマー組成物を調製した。こうして調製した水性モノマー組成物中に上記のモノマー組成物を添加し、ホモジナイザーで予備攪拌

した後、超音波分散機で分散処理することにより平均粒子径が1 μ mの油滴(油相)が水性媒体に分散した懸濁液(油滴分散体)を調製した。次に、得られた懸濁液を容量2リットルの攪拌機付き三口フラスコに仕込み、この系を75に昇温し、窒素雰囲気下において攪拌しながら5時間にわたり油滴中のモノマーを重合(懸濁重合)させることにより、磁性ポリマー粒子を作製した。得られた粒子を光学顕微鏡で写真撮影し、粒子200個の直径を計測してその平均を求めた結果1.2 μ mであった。

【0032】(2)上記(1)で得られた磁性ポリマー粒子を5mM水酸化ナトリウム水溶液に分散し、80で12時間処理してカルボキシ変性磁性ポリマー粒子とした。

(3)得られたカルボキシ変性磁性ポリマー粒子1gを20mLの10mM MES緩衝溶液(pH6.0)に懸濁し、ポリエチレンイミン(和光純薬工業株式会社、数平均分子量7万)30%水溶液、33 μ Lおよび水溶性カルボジイミド試薬EDC・塩酸塩(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロライド)0.05gを添加し、2時間室温で反応させて吸着体を得た。

【0033】実施例1

参考例1で得られたポリエチレンイミン固定吸着体の水性懸濁液を精製後、生理食塩水で固形分濃度5%に調整した。冷却塔から採取したレジオネラ菌の存在が推定される冷却塔水からセルロース紙を用いて予め固形異物を除去した検体水1000mlを密閉化できるポリ容器に移して。この検体水に、5%濃度のポリエチレンイミン固定吸着体水性懸濁液20mlを加え、室温で25分間、毎分10回の回転速度で攪拌させ、吸着体への吸着処理を実施した。

【0034】参考例1の吸着処理後、ポリ容器を約15分静置させ吸着体をポリ容器の底部に沈降分離させた。

上清を吸引管で吸引除去し、得られた吸着体に生理食塩水10mlを加え、定量的に20mlの試験管に移し磁気分離スタンドにセットした。磁気操作により菌体吸着体の粒子と上清を分離し、上清を捨てTris-HCl緩衝液(pH7.4)3mlを加え、菌体吸着体粒子分散液を得、同様に磁気操作により、上清を分離し容量20mlの遠心管に移した。同様操作をさら2回繰り返し、得られた菌体懸濁液を30,000rpmで30分遠心分離し、上清を除去後Tris-HCl緩衝液(pH7.4)200 μ Lの菌体懸濁液とした。この菌体懸濁液からDNA Extractor Kit(和光純薬工業株式会社製)を用い、付属の手順書に従い核酸を抽出した。得られた抽出物をNested-PCR法により、35回の1st-PCR、25回の2nd-PCRの増幅過程によりDNAを増幅した。得られた1st-PCR、2nd-PCRそれぞれの増幅産物を3%アガロースを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりDNAを可視化しポ

ラロイド（登録商標）写真に撮影した。得られた目的DN Aの量をバンドの蛍光強度から、-、+、++、+++、++++の5段階で判定した。

【0035】実施例2

実施例1で使用したのと同じの冷却塔水1000mlを、同様にセルロースフィルターで粗大異物をろ過除去後、ポリテトラエチレン製で0.22μmのポアサイズを有するメンブレンフィルター（日本ミリポア社製）で吸引ろ過集菌した。吸引ろ過後、メンブレンフィルター、ノニオン界面活性剤を含有する緩衝液5mlを入れ、密閉可能な20ml試験管に移し、ボルテックスミキサーで5分間振とうし、存在すると推定される菌体をメンブレンフィルターから分離、懸濁させた。懸濁上清を20ml遠心分離管に移し、再度緩衝液5mlで同様操作を繰り返し、菌体懸濁液10mlを得た。以降、実施例と同様の操作によりTris-HCl緩衝液（pH7.4）200μlの菌体懸濁液を得た後、PCR測定により菌体濃度を-、+、++、+++、++++の5段階で判定した。

【0036】実施例3

アメリカンティッシュカルチャーコレクションATCC No.33152を用いて予め $1.5 \times 10^2 / 100\text{ml}$ の菌体濃度に調整したレジオネラ菌モデル懸濁液1000mlを実施例1と同様な操作で吸着、濃縮した、PCR測定により、菌体濃度を-、+、++、+++、++++の5段階表示で判定した。

実施例4

実施例3と同様のレジオネラ菌モデル懸濁液1000mlを実施例2と同じ操作でPCR測定を実施した。

実施例5

実施例2で得られたTris-HCl緩衝液（pH7.4）200μl菌体懸濁液の100μlを塗布棒にてBCYE 寒天培地（栄研化学株式会社製）に塗布し、インキュベーターにて37℃、5日間培養した。培養後、平板培地表面に菌コロニーの形成が観察され、その形態、コロニーの盛り上がり状態、色からレジオネラ菌の存在が示唆された。また、コロニー数からの算出菌体濃度は $1.8 \times 10^2 / 100\text{ml}$ であった。

【0037】実施例1～4で判定された検体中の菌体濃度をいかにまとめる。

実施例1： ++

実施例2： ++++

実施例3： ++

実施例4： ++

この結果は、本発明による吸着体を使用してPCR測定によりレジオネラ菌の濃度判定をした方が、メンブレンフィルター（日本ミリポア社製）で吸引ろ過集菌した後、PCR測定した場合に比較して、より培養法に近い判定結果を与えることを強く示唆しており、冷却塔の水質の迅速管理により有効であることが分かる。一般にろ

過法では生菌、死菌の区別なく集菌することから、PCR法の判定では、その測定結果が生菌の実際の存在より高くする傾向にあり、それと比較して、本発明による吸着体は、生菌のみを特異的に吸着、濃縮していることが推定される。

【0038】参考例3

(1)参考例1と同様に、油性磁性流体フェリコロイドHC50〔商品名、タイホー工業（株）製〕より、親油化処理された表面を有するフェライト系の超常磁性体（粒子径：0.01μm）を得た。ついで、上で得た超常磁性体75部にスチレン95部、メチルメタクリレート5部およびベンゾイルペルオキシド（重合開始剤）3.5部を添加し、この系を混合攪拌することにより超常磁性体を均一に分散させてモノマー組成物を調製した。一方、ポリビニルアルコール6部、ラウリル硫酸ナトリウム0.23部およびポリエチレンオキシドノニルフェニルエーテル0.5部を水1300部に溶解して水性モノマー組成物を調製した。こうして調製した水性モノマー組成物中に上記のモノマー組成物を添加し、ホモジナイザーで予備攪拌した後、超音波分散機で分散処理することにより平均粒子径が2.6μmの油滴（油相）が水性媒体に分散した懸濁液（油滴分散体）を調製した。次に、得られた懸濁液を容量3リットルの攪拌機付き三口フラスコに仕込み、この系を75℃に昇温し、窒素雰囲気下において攪拌しながら9時間にわたり油滴中のモノマーを重合（懸濁重合）させることにより、磁性ポリマー粒子を作製した。得られた粒子を光学顕微鏡で写真撮影し、粒子200個の直径を計測してその平均を求めた結果2.5μmであった。

【0039】(2)上記で得られた磁性粒子100gr.に乳化剤としてSDS（エマル10N）1部、ノニオン乳化剤エマルゲン910 1部、スチレン50部、TBAS-Q（2-メチル-3-スルホプロピルアクリルアミド）30部、アゾイソブチロニトリル1部を混合、攪拌した。その後70℃、6時間重合を実施し、得られた粒子を光学顕微鏡下200個粒径測定し、平均粒径2.8μmのスルホン化磁性粒子を得た。

【0040】実施例6

大腸菌HB101株を培養プレートに植菌し、37℃10時間培養後、液体培地に再植菌、培養し、最終的に培養液で希釈し620nmの波長を使用し光学的に 1×10^3 個大腸菌/mlの大腸菌懸濁液を得、標準懸濁液とした。この標準懸濁液を5ml試験管にとり生理食塩水で順次希釈し、 1×10^2 、 5×10 、 1×10 、5、1個/mlの懸濁液を調製した。この懸濁液に、ヒトの糞便検体5種から調製した濃度20mg/ml糞便懸濁液100μlをそれぞれ添加し、大腸菌懸濁液列とした。

【0041】実施例7

実施例6で調製した大腸菌懸濁液列それぞれに参考例2

で合成したスルホン化粒子5mgを添加しさらに500mM塩化亜鉛水溶液を50 μ l添加した。5ml試験管を振とう器にセットし室温下20分振とうし大腸菌とスルホン化磁性粒子を接触させ、吸着させた。磁石による吸着磁性粒子の集磁分離を行い、Tris-HCl緩衝液(pH7.4)での洗浄操作を行い、Tris-HCl緩衝液100 μ lの懸濁液を得、その後は実施例1と同様の方法にてPCR反応にて大腸菌の存在の判定を実施し、エチジウムブロマイド染色で明瞭に染色されるものを大腸菌の有意存在と判定した(合計25回)。

*【0042】実施例8

実施例6で調製した大腸菌懸濁液列から45,000rpm、30分間超遠心分離し、上清をピペットで除去後、実施例7と同様手順にてTris-HCl緩衝液(pH7.4)100 μ lの懸濁液を得た。その後、実施例と同様の手順でPCR反応を行い、大腸菌の存在有無を判定した。

【0043】実施例7~8において各濃度5種サンプル中で大腸菌の存在が明瞭に判定された数を表1に示す。

*10【表1】

	大腸菌個数 (個/ml)				
	1 \times 10 ²	5 \times 10	1 \times 10	5	1
実施例7	5回	5回	5回	5回	3回
実施例8	5回	5回	4回	2回	1回

実施例8に比較して、本発明によるスルホン化磁性粒子を使用し、大腸菌を特異的に吸着、濃縮した場合は、極低濃度の菌存在条件であっても、極めて高感度に陽性として検出可能であることが分かる。一方従来から多用

ことが強くしされた。

【0044】

【発明の効果】本発明の微生物、生体由来物質検出法では、試料中の微生物、生体由来物質が検出に先だち特異的に、高効率で吸着、濃縮、分離されており、試料に含まれている微生物、生体由来物質が極く微量であっても効率的、選択的に微生物、生体由来物質の検出を行うことができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テームコード(参考)

(C 1 2 Q 1/04

(C 1 2 Q 1/04

C 1 2 R 1:01)

C 1 2 R 1:01)

Fターム(参考) 4B029 AA09 AA21 AA23 BB02 CC04

CC08 HA05

4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ18 QQ42

QR08 QR32 QR55 QR62 QR90

QS10 QS12 QS14 QS25 QS36

QS39 QX02

专利名称(译)	检测微生物和生物材料的方法		
公开(公告)号	JP2002125695A	公开(公告)日	2002-05-08
申请号	JP2000329580	申请日	2000-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	杰瑟股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	JSR株式会社		
[标]发明人	安田健二 村田充弘 日方幹雄		
发明人	安田 健二 村田 充弘 日方 幹雄		
IPC分类号	G01N33/538 C12M1/40 C12Q1/02 C12Q1/04 C12Q1/68 C12R1/01		
FI分类号	C12Q1/04 C12M1/40.B C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/538 C12R1/01		
F-TERM分类号	4B029/AA09 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB02 4B029/CC04 4B029/CC08 4B029/HA05 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ18 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR90 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为了在治疗，临床测试，食品测试和水质测试领域中使用的样品中提供低浓度微生物，一种浓缩生物源物质的特定而有效的方法以及使用该微生物源的微生物和生物源物质。获取检测方法。解决方案：将微生物和/或生物物质专门添加到样品中，其中所含微生物和/或生物物质的浓度应不高于所应用的微生物和/或生物物质的检测手段的检测极限浓度。一种检测微生物和源自生物体的物质的方法，其包括在与能够吸附的吸附剂接触之后应用检测与吸附剂结合的微生物和/或源自生物体的物质的装置。

	大腸菌数 (個/m ^l)				
	1x10 ²	5x10	1x10	5	1
実施例7	5回	5回	5回	5回	3回
実施例8	5回	5回	4回	2回	1回