

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3981417号  
(P3981417)

(45) 発行日 平成19年9月26日(2007.9.26)

(24) 登録日 平成19年7月6日(2007.7.6)

(51) Int.CI.

F 1

C 12 M 1/20 (2006.01)  
G O 1 N 33/48 (2006.01)C 12 M 1/20  
G O 1 N 33/48

M

請求項の数 3 (全 16 頁)

(21) 出願番号

特願平10-542728

(86) (22) 出願日

平成9年8月8日(1997.8.8)

(65) 公表番号

特表2001-522242(P2001-522242A)

(43) 公表日

平成13年11月13日(2001.11.13)

(86) 國際出願番号

PCT/US1997/014134

(87) 國際公開番号

W01998/045406

(87) 國際公開日

平成10年10月15日(1998.10.15)

審査請求日

平成16年8月9日(2004.8.9)

(31) 優先権主張番号

08/838,397

(32) 優先日

平成9年4月9日(1997.4.9)

(33) 優先権主張国

米国(US)

(73) 特許権者

スリーエム カンパニー  
アメリカ合衆国55144-1000ミネ  
ソタ州セント・ポール、スリーエム・セン  
ター

(74) 代理人

弁理士 青山 葉

(74) 代理人

弁理士 山本 宗雄

(72) 発明者

ウィリアムズ,マイケル・ジー  
アメリカ合衆国55133-3427ミネ  
ソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス  
・ボックス33427

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生物試料液体を微容量に分割するための方法と装置

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

水性液体試料を別個の容量に分割して最確数分析を行うための方法であって、

a ) 微生物を培養するための装置を提供するステップであって、該装置が複数の組の親水性液体保持ゾーンと、該ゾーンの間の疎水性ランド領域とを具備するアッセイ面を有し、該親水性液体保持ゾーンにおいて、各々の組は、均一なサイズのゾーンを有し、該親水性液体保持ゾーンの組は液体保持能力が異なり、該装置が少なくとも2つの組のゾーンを有する、ステップと、

b ) 該液体試料が該親水性液体保持ゾーンに分割されるように、該液体試料を該アッセイ面に接触させるステップと、

c ) 該装置をインキュベーションするステップと、

d ) ゾーン中で微生物が増殖していることを指示する信号を検出するステップと、

e ) 信号が検出されたゾーンの数に基づいて最確数分析を行うステップとを、包含する方法。

## 【請求項 2】

前記ゾーンがアッセイ試薬の被覆または付着を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

請求項1に記載の方法を実施する際に使用するための培養装置であって、該装置は、複数の組の親水性液体保持ゾーンと、該ゾーンの間の疎水性ランド領域とを具備するアッセイ面を有し、該親水性液体保持ゾーンにおいて、各々の組は、均一なサイズのゾーンを有し

、該親水性液体保持ゾーンの組は液体保持能力が異なり、該装置が少なくとも2つの組のゾーンを有し、該ゾーンの少なくともいくつかがアッセイ試薬を含み、該アッセイ試薬が栄養培地を含み、該アッセイ試薬が該親水性液体保持ゾーン中の被覆として存在する、装置。

#### 【発明の詳細な説明】

本発明は、水性液体が本発明の装置の親水性ゾーン内に保持されると同時に、本発明の疎水性領域から実質的に排除される傾向に基づいて、生物試料を微容量分量に分割するための方法と装置とに関する。

#### 背景技術

微生物の検出および列挙は、食品加工業界（大腸菌（E. coli）および黄色ブドウ球菌（S. aureus）などの微生物による食品の汚染について試験する）、医療業界（感染または汚染について患者の試料または他の臨床試料を試験する）、環境試験業界、医薬品業界並びに化粧品業界を含む数多くの状況において実施されている。 10

増殖に基づいた微生物の検出および列挙は、液体栄養培地（最確数分析（MPN））または半固体栄養培地（寒天シャーレ）のどちらかを使用して普通に実施されている。液体MPN法を使用した列挙は、一般に、選択培地および化学的指示薬を入れた一連の重複培養試験管に関心のある試料の連續10倍希釀液を入れることによって実施されている。試験管を高温で（24～48時間）インキュベーションし、次に生物の増殖を調査する。各組の陽性および陰性の試験管の数に基づいて統計式を使用して最初の試料に存在する生物の数を推定する。 20

MPN分析を実施するこの方法にはいくつかの欠点がある。この分析を実施するのに必要な多数回の希釀ステップおよび分注ステップのために、この方法は労働集約的である。また、実際には各希釀について約3～5本の試験管による重複培養組を使用するのが実用的である。結果として、微生物濃度のMPN推定値の95%信頼限界は極めて広くなる。例えば、試験管3本のMPN推定値20は95%信頼限界が7～89である。

上記の方法とは異なって、試料中の目に見える細菌の直接的な計数は、ゲル化剤を入れた栄養培地を使用して、規定された領域に試料を塗抹することによって実施することができる。ゲル化剤（寒天）はインキュベーション中（24～48時間）の生物の拡散を予防し、最初の生物を付着させた領域にコロニーを形成する。しかし、近隣のコロニーと融合して計数を困難にする前に栄養培地の所定の領域に適合することができるコロニーの数には限界がある。これは、通常は、各試料について数回の希釀を実施することを必要とする。また、混じり合った集団の中に存在する個々の種類の微生物を同定するために使用することができる部類の化学的指示薬分子は、ゲル化培地に不溶性である生成物を生成するものに限定される。 30

これらの欠点に加えて、現在使用されているMPN分析およびゲル化システムは共に、陽性の結果を検出することができる前に比較的長期のインキュベーション時間を必要とする。

#### 発明の開示

本発明は、生物液体試料を操作者の側の最小の操作だけで別個の微容量に分割することができるという発見に基づいている。分割方法は、疎水性「ランド」エリアに囲まれた親水性液体保持ゾーンを具備する装置を使用する。本発明の方法と装置は、現在使用されているシステムによる問題を解決する、微生物および他の生物材料を検出および列挙するためのシステムを提供する。本発明のシステムは液体系システムで、試験をするために試料を別個の微容量に効率的且つ効果的に分割することを可能にし、迅速な検出および列挙を可能にする。 40

微生物を検出および列挙するためのMPN分析の場合には、本明細書に記載する方法は水溶性指示薬種の使用を可能にし、現在のMPN分析に一般に必要とされているいくつかの希釀液の必要性が少ないし、または必要性がない。

一般に、本発明は水性液体試料を別個の微容量に分割するための方法であって、

a) 微生物を培養するための装置を提供するステップであって、前記装置が親水性液体保 50

持ゾーンと、前記ゾーンの間の疎水性ランド領域とを具備するアッセイ面を有し、各ゾーンが微容量収容能力の液体保持性を有するステップと、

b) 液体試料が親水性液体保持ゾーンに分割されるように、液体試料とアッセイ面とを接觸させるステップと、

を含む方法を特徴とする。

ゾーンは栄養培地または指示薬物質などのアッセイ試薬の被覆または付着を有してもよい。適当な指示薬物質は発色指示薬、蛍光指示薬、発光指示薬および電気化学的指示薬を含むが、これらに限定されない。本発明の用途のために、「電気化学的」という用語は微生物と反応する結果、試料の抵抗すなわち伝導率を変化させる化学的指示薬を意味する。

ゾーンはサイズが均一であることができ、各ゾーンは約0.01～約25マイクロリッタ  
ー、さらに好ましくは約1～約2マイクロリッターの液体保持能力を有する。

培養装置は、例えば、約10～約10,000個の親水性液体保持ゾーン、さらに好ましくは約400～約600個の親水性液体保持ゾーンを有することができる。

親水性液体保持ゾーンは疎水性ランド領域に囲まれた微容量ウェルを有してもよい。または、培養装置は処理済みのナノ構造フィルムを具備するランド領域を有してもよい。さらに別の実施態様では、親水性液体保持ゾーンはアッセイ面から突出する親水性纖維材料を具備してもよい。纖維材料は親水性吸着性ディスクまたは親水性不織纖維ループ材料から構成されてもよい。

別の実施態様では、培養装置は複数の組の親水性液体保持ゾーンを具備し、組の各々は均一なサイズのゾーンを有し、組は液体保持能力が異なり、本発明の装置は少なくとも2つの組のゾーンを具備してもよい。

別の態様では、本発明は微生物を検出または列挙するための培養装置であって、親水性液体保持ゾーンと、前記ゾーンの間の疎水性ランド領域とを具備するアッセイ面を有し、各ゾーンが微容量収容能力の液体保持性を有し、ゾーンの少なくともいくつかがアッセイ試薬を有する装置を特徴とする。

本明細書に使用する「微生物」という用語は、細菌、マイコプラズマ、リケッチア、スピロヘータ、酵母、糸状菌、原生動物を含むがこれらに限定されない全ての顕微鏡的生生物および生細胞並びに例えば、単細胞（組織もしくは器官から直接培養もしくは誘導されたもの）または小集団の細胞のような顕微鏡的形態の真核細胞を含む。微生物は、細胞全体が直接検出されたときだけでなく、このような細胞が、細胞画分、細胞性生物分子または細胞副産物の検出または定量によるなどして間接的に検出されたときも検出および／または列挙される。

「疎水性」および「親水性」という用語は、本明細書において、当技術分野において普通に理解されている意味を与える。このように、「疎水性」材料は水または水性媒体に対する親和性が相対的に少ないまたは全くないが、「親水性」材料は水または水性媒体に対する親和性が相対的に強い。本明細書に記載する装置の相対的な疎水性および親水性は、液体試料を、試料適用時に本明細書に記載する親水性液体保持ゾーンに実質的に確実に分割するものである。疎水性および親水性の必要な程度は試料の性質に応じて変わってもよいが、装置への適用時に、液体試料を単純に実験的に観察する事に基づいて容易に調整することができる。

本発明の他の利点は以下の詳細な説明および図面によりあきらかになる。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、アッセイ装置の一実施態様の斜視図である。

図2は、微容量収容能力の液体保持性が異なる親水性液体保持ゾーンの組を具備するアッセイ装置の上面図を示す。

図3は、疎水性ナノ構造フィルムを具備するアッセイ装置の概略図である。

図4は、親水性液体保持ゾーンが紙ディスクから構成されているアッセイ装置の概略図である。

図5aは、親水性液体保持ゾーンが不織纖維ループ材料から構成されているアッセイ装置の斜視図である。

10

20

30

40

50

図 5 b は、図 5 a に示す装置の拡大上面図である。

図 6 a は、アッセイ面が親水性であるアッセイ装置の上面の写真である。

図 6 b は、親水性液体保持ゾーンと疎水性ランド領域とを有するアッセイ装置の上面図の写真である。

#### 詳細な説明

本発明は、液体試料中の微生物を信号に基づいて検出および列挙するために、生物試料を微容量の液体試料分量に分割することに関する。

微生物の液体試料の試験に関する分野において遭遇される問題には、相対的に長いインキュベーション時間、試験する分量に分割するために多数回の分注操作を行う必要性および試験するために相対的に大容量の試料の必要性がある。 10

本発明はこのような試験に関連するこれらの問題および他の問題の解決法を提供する。実験室の技術者または他の操作者に必要な液体試料の操作を最小にして、液体試料を試験装置の微容量小部屋に分割するための方法と装置とを提供する。本明細書において使用する「微容量」は約 25 マイクロリッターより少ない容量をいい、マイクロリッターより少ない範囲の容量を含む。本発明の発明者らは、液体試料中の微生物を信号に基づいて検出する際に微容量を使用することにより、検出可能な信号を生成するのに必要なインキュベーション時間を顕著に短縮することができるこを発見した。インキュベーション時間の短縮は当分野においてかなり望ましいので、本発明のこの特徴は別個の利点となる。

インキュベーション時間の短縮を達成することに加えて、液体試料を試験する際に微容量を使用することにより、実質的により少量の試験試料を使用することが可能となる。ときには、試料原料の容量が非常に少量であることにより非常に小容量の試験試料が必要になることがある。例えば、試料の取り扱いまたは試験施設への試料の輸送を容易にするためにも小容量の試験試料が望ましいときがある。 20

本発明の発明者らは生物液体試料を親水性液体保持ゾーン（また、本明細書において「液体保持ゾーン」または「ゾーン」ともいう）に別個の微容量で分割するための多数の新規な装置を開発した。これらの装置の限定的でない例には、液体保持ゾーンとして機能する、例えば微容量ウェルのような複数の微小部屋とウェルの間の疎水性である領域（「ランド」領域）とを有する微細型押またはプレス加工フィルム；フィルムの別個の液体保持ゾーンが親水性で、試験するための微容量の液体試料を保持するように調節されたナノ構造疎水性フィルム；および、親水性液体保持ゾーンと疎水性ランド領域を具備し、所定の親水性ゾーンが親水性繊維材料から製造され、周囲のランド領域の平面から上方または下方に突出する装置が含まれる。 30

有利なことに、上記の装置は 1 つの装置に微容量の分量を使用して、このような試験に別個の容器を使用する必要性をなくして、液体試料を試験することを可能にする。試験試料を数百個または数千個もの別個の液体保持ゾーンに分配することができ、液体試料の試験においてデータ採取時点数を実質的に増やすことができる。

本発明の方法と装置特に有用な用途は液体試験試料の増殖に基づいた微生物の検出および列挙である。このような増殖に基づいた検出および列挙は、微生物による汚染について食物試料、環境試料、臨床試料、化粧品試料および他の試料を試験する際に非常に重要である。本発明の方法と装置はこのような試料の効率的で、正確で、簡便で、費用効果のある試験を可能にする。 40

このような微生物試験における本発明の方法と装置の好ましい用途は M P N においてである。伝統的な M P N では、関心のある試料を連続（10 倍）希釈し、選択増殖培地および化学的指示薬を入れた重複培養試験管の組に等量ずつ分注する。試験管を高温において約 24 ~ 48 時間インキュベーションし、次に生物の増殖を調査する。各組の陽性および陰性の試験管の数に基づいて、統計式を使用して最初の試料に存在する生物の数を推定する。現在使用されているこの伝統的な方法にはいくつかの欠点がある。分析を実施するに必要な多数回の希釈および分注ステップのために労働集約的である。実際には、各希釈について約 3 ~ 5 本の試験からなる重複培養組が普通に使用されている。結果として、この方法を使用した微生物濃度の M P N 推定値の 95 % 信頼限界は極めて広い。例えば、9 本 50

の試験管（3種類の10倍希釈液）によるMPN推定値20は95%信頼限界が7～89である。

MPN分析に本発明の方法と装置を使用することにより、上記のいくつかの欠点が克服される。個々の試験管への分注操作の必要がなくなり、攪拌または他の操作がほとんどまたは全く必要なくなるので、労働量は大幅に削減される。それに代わり、液体試料を装置に単純に接触させることによって、液体試料を微容量液体保持ゾーンに分配する。また、大多数の液体保持ゾーンが装置に存在する場合には、より少ない本数の試料希釈液が必要になるだけである。比較的大多数の液体保持ゾーンはまた、より正確な微生物濃度の推定値を提供する。これは、データ採取時点の数が多いほど、信頼限界区間は狭くなるからである。

10

従って、本発明は液体試験試料中の微生物を検出（列挙を含む）するための方法を提供する。本発明の方法は、アッセイ装置の複数の親水性液体保持ゾーンに微容量の試験試料を分配するステップを含む。アッセイ装置は、複数の親水性液体保持ゾーンを有し、各ゾーンは微容量収容能力の液体保持性を有するアッセイ面を具備するいかなる装置であってもよい。装置はまた、疎水性であり、生物試料が液体保持ゾーンに分配された後も液体を実質的に含まないでいるランド領域をゾーンの間に具備する。このようなアッセイ装置の限定期的でない例は本明細書に記載するものを含む。

アッセイ装置の液体保持ゾーンはサイズが均一で、各ゾーンは約0.01～約25マイクロリッターの液体試料の液体保持能力を有する。好ましくは、各ゾーンは約0.1～約10マイクロリッター、さらに好ましくは約1～約2マイクロリッターの液体保持能力を有する。アッセイ装置は、好ましくは、1～約100,000個の液体保持ゾーン、さらに好ましくは約10～約10,000個のゾーン、よりさらに好ましくは約200～約5,000個のゾーン、最も好ましくは約400～約600個のゾーンを有する。

20

約400～約600個の親水性液体保持ゾーンを有する装置の使用は、MPNを使用して微生物濃度について液体試料を試験する場合に特に有用である。ある種の規制要件は、試験方法は1～5ミリリッターの試料中の1個の細菌を検出できなければならないと指示している。このような試料サイズは微生物を試験する食品加工業界では標準的である。従って、例えば各ゾーンが約2マイクロリッターの液体収容能力を有する、500個の親水性液体保持ゾーンを有するアッセイ装置は1-mlの試料を試験するために非常に有用であると思われる。2マイクロリッターの収容能力を有する液体保持ゾーンは本発明による検出可能な信号の迅速な発生を可能にし、約400～約600個のゾーンの使用はMPN算出の信頼区間を実質的に改善するのに十分に大きい数のデータ採取時点を提供する。また、微生物陽性の試験結果を示す液体保持ゾーンを手動で計数することが可能である。実質的に400個より多い液体保持ゾーンを有する装置の使用は、実際には、機器の補助、すなわち自動計数装置を必要とすることがある。

30

液体試験試料はいかなる起源の関心のあるいかなる試料であってもよい。試料は複数の液体保持ゾーンに直接分配されても、ゾーンに分配される前に試料を希釈してもよい。試料の希釈が必要であるかどうかに関する決定は試料の起源および材齢などの種々の要因に依存し、このような決定は当業者には日常的なことである。

液体試験試料は関心のある微生物の選択栄養増殖培地および/または増殖中の微生物の存在下において信号を生成する指示薬物質を含んでもよい。必要に応じて、栄養培地は、増殖中の微生物を「封入する」助けをするゲル化剤を含んでもよい。このようなゲル化剤は当業者に周知であり、水性液体の添加によりゲル化する任意の吸水性材料を含む。

40

または、選択栄養増殖培地および指示薬物質の一方および両方が、微容量の液体試験試料をゾーンに分配するとき、望ましい濃度を達成するのに十分な量で、液体保持ゾーン内に被覆または他の形態の付着物として存在してもよい。このような被覆は、例えば栄養培地（ゲル化剤を含有または含有しない）および/または指示薬物質の溶液を液体保持ゾーンに入れるまたは分配して、溶液を乾燥してゾーンの中に栄養培地および/または指示薬物質の被覆または付着物を形成することによって得ることができる。

関心のある多種多様の微生物の多種多様の選択増殖培地が周知であり、同様に多種多様の

50

微生物の多種多様の指示薬も周知であり、これらの培地または指示薬物質のいかなるものも本発明の方法に使用するのに好適である。本発明の利点は、可溶性指示薬を使用することができるということである。その理由は、水性生物試料の液体を親水性液体保持ゾーンにだけとどめることによって拡散を防げるからである。

種々の方法を使用して液体試験試料を液体保持ゾーンに分配することができる。1つの特定の装置には複数の方法を適用することができるが、好ましい方法はある程度は特定のアッセイ装置の構造に依存する。例えば、親水性微容量ウェルを有するフィルム装置またはゾーンがアッセイ表面の平面から突出する親水性纖維材料を有する装置では、試料を装置の上に注ぐかまたは分注し、装置を傾斜または揺らすことによって試料を液体保持ゾーンに拡散することができる。または、実施例4に記載するように、装置のアッセイ面を試料に浸漬することができる。液体試料からアッセイ面を取り出すると、液体は親水性液体保持ゾーンに保持され、疎水性ランド領域からは実質的に排除される。10

試料をアッセイ装置の親水性液体保持ゾーンに分布した後、望ましい用途に応じて種々のアッセイを実施することができる。微生物を検出または列挙するためには、アッセイ装置を、微生物の少なくとも1回の細胞分裂周期を可能にするのに十分な時間の間インキュベーションすることができる。これらの目的のためには、装置を、一般に、約25～約45、さらに好ましくは約30～約37においてインキュベーションする。細菌の検出のインキュベーション時間はさまざまである。インキュベーションされた液体試験試料中の指示薬物質によって証明される検出可能な増殖を生成するためには、大抵の細菌の検出時間は約20分～約24時間の範囲である。この比較的短いインキュベーション時間は、一般に約24時間以上のインキュベーション時間を必要とする、現在使用されている検出方法を上回る別個の利点となる。20

アッセイ装置のインキュベーション後、液体保持ゾーン（従って、液体試験試料中）の微生物の有無を検出する。検出様式は本発明の方法に使用する指示薬物質の種類に依存する。検出可能な信号を提供することができるいかなる指示薬物質を使用することができる。このような指示薬には、蛍光指示薬、発色指示薬、発光指示薬および電気化学的指示薬が含まれるが、これらに限定されない。発色指示薬または発光指示薬を使用する場合には、ゾーンの微生物の有無は、裸眼または顕微鏡により目視的に検出することもできる。蛍光指示薬物質を使用する場合には、蛍光信号を検出するための装置と方法を検出のために使用することができる。微生物を検出する分野に周知であり、電気化学的变化を検出するためのシステムを含む多数の指示薬物質および信号検出システムが存在し、このようないかなる物質またはシステムを本発明によって使用することができる。30

液体試験試料中の微生物の検出は液体試験試料中の微生物計数値の列挙を含む。好ましい態様において、列挙はMPNを使用して実施される。関心のある微生物を含有する液体保持ゾーンの数が決定されると、既知のMPN技法を使用してMPN算出を実施することができる。望ましい場合には、例えば、既知の標準と比較した信号強度のような既知の技法を使用して、またはゾーンの内容物を平板培養することによって、個々のゾーンの微生物の数を求めることができる。有利なことには、本発明の方法に使用される大多数の液体保持ゾーンは液体試験試料のMPN分析の95%信頼限界の間隔が狭い。

1つの装置で操作することができる大多数の液体保持ゾーンのために、本発明の利点を保持しながら、関心のある多数の微生物の検出および列挙に1つの装置を使用することができる。例えば、1つの液体試験試料を大腸菌(E. coli)と黄色ブドウ球菌(S. aureus)の存在または濃度について試験することができる。アッセイ装置の一部はこれらの微生物の1つの検出および列挙のための親水性液体保持ゾーンを有することができ、同時にゾーンに第の組は関心のある別の微生物の検出および列挙に使用することができる。これは、例えば、液体保持ゾーンのそれぞれの組に微生物に特異的な栄養および/または指示薬物質を入れることによって実施することができる。または、全ての液体保持ゾーンは多数の微生物を同時に検出するために作成されたアッセイ試薬を含有することができる。例えば、蛍光指示薬物質を用いて大腸菌(E. coli)を検出することができるが、同時に発色指示薬物質を用いて他の大腸菌群が検出される。4050

別の実施態様において、分配ステップは、複数の組のゾーンを具備するアッセイ装置の複数の親水性液体保持ゾーンに液体試験試料の少量を分配するステップを含む。各組は均一なサイズのゾーンを有し、装置は少なくとも2つの組のゾーンを有する。例えば、アッセイ装置は複数のレーンを有してもよく、特定のレーンの親水性液体保持ゾーンは同じ液体保持能力を有する。この特徴により、1つのアッセイ装置に異なる試験容量サイズずつの液体試験試料を分配することが可能になる。MPNでは、高濃度の試料について、適当な容量サイズを選択し、連続希釈の必要なく1つの装置で1つの分配ステップを使用してMPN分析を実施することができるという点において、この特徴は重要な利点となる。

上記のように、実施される特定の実施態様に応じて、親水性液体保持ゾーンと疎水性ランド領域とを具備する任意のアッセイ装置を使用して、本発明の方法を実施することができる。本発明の発明者らは本発明の方法に使用するのに好適ないくつかの新規な装置を開発した。以下はこのような装置の限定的ではない例である。

図1を参照すると、装置10は親水性微容量ウェル14の形態の複数の親水性液体保持ゾーンを具備する基材12を含む。基材12は、微容量ウェルを形作り、装置10の有効寿命期間にわたってそれぞれの形状を維持するいかなる材料から製造されてもよい。基材12は、例えば、ポリマーフィルムまたは他の適当な材料から製造されてもよい。適当なポリマーには、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリイミド、フルオロポリマー、ポリカーボネート、ポリウレタンおよびポリスチレンが含まれるが、これらに限定されない。特定のポリマーが十分に親水性でない場合には、親水性を与えるように処理することができる。例えば、界面活性剤をフィルムに添加して親水性を与えることができる。当業者は表面の親水性を与えるための他の手段を認識している。基材12の材料に適当に任意に加工処理することによって微容量ウェル14を形成することができる。このような加工処理には、加熱型押加工、キャスト型押加工、レーザードリル加工、反応性材料によるエッチングまたは複数の小開口部を有するパターン化材料シートの支持フィルムへの積層を含むが、これらに限定されない。ポリエチレンまたはポリプロピレンフィルムは、例えば、プレス型押加工または押出型押加工されてもよく、種々の顔料または界面活性剤を含んでもよい。

再び図1を参照すると、微容量ウェル14の間の領域13(「ランド領域」)は疎水性であるように製造される。これは、微容量ウェル14の間に水性液体が橋かけしないように作用し、それによって交差汚染を防ぐ。ランド領域13は種々の方法で疎水性にしておくことができる。例えば、界面活性剤の添加によってすでに親水性にされている押出型押加工済みポリエチレンのランド領域は、アクリレート化シリコーンまたは他の疎水性材料の薄層をランド領域に転写することによって疎水性にすることができる。

装置10は任意の望ましい数の微容量ウェルを具備することができる。また、装置10は、装置内の適当な湿度レベルを維持するためにより大容量の液体を保持するように調節した比較的大きい受け器または他の小部屋を具備してもよい。予備的なスクリーニングなどのある種の用途のためには、微容量ウェルの数は比較的小くてもよいが(例えば、2~50)、微容量ウェルのサイズは小さいので、1つの装置10に比較的大多数のウェルを製造することができる。好ましくは、本発明の装置は約10~約10,000個の液体保持ゾーンを有し、よりさらに好ましくは約200~約5,000個のゾーンを有し、最も好ましくは約400~約600個のゾーンを有する。装置10は、サイズが均一な微容量ウェル14の集団を有するが、ウェルは均一なサイズである必要はない。例えば、図2に示す装置16は、容量が同一組内では同じであるが、組が異なると変わる微容量ウェルの組(例えば、列)を有してもよい。図2に示すように、容量はウェルの組の配列に従って変化して増加してよく、小さい方のウェル18はマイクロリッターより少ない容量を保持し、大きい方のウェル20はマイクロリッター容量を保持する。図2に示すような装置の最も大きいウェルが「微容量」ウェルと分類されないようなウェル22を有することさえもできる。このようなウェルは、例えば、実質的に25マイクロリッターより多い液体保持能力を有してもよい。

別の実施態様では、基材12は疎水性ナノ構造フィルムで被覆されてもよい。特許出願国

10

20

30

40

50

際公開公報第96/34697号に記載されているように、例えば、ポリイミドまたはフルオロポリマーウェブは、有機顔料、鉛、金および他の材料を蒸着被覆して特殊なナノ構造フィルムを形成し、次いでオクタデシルメルカプタンまたはフルオロカーボン・炭化水素チオールなどの有機分子集成物で被覆することによって疎水性にすることができる。相対的に親水性の微容量ウェルおよび他の液体保持ゾーンは、基材12の選択された領域から疎水性ナノ構造構成要素を除去することによって形作られてもよい。これは、以下の実施例3に記載するように、封入/剥離およびレーザー研磨を含むがこれに限定されない種々の方法で実施することができる。

代表的な疎水性ナノ構造フィルム装置24は、図3に概略図を示す。このような装置は、水性試料溶液に浸漬することによって簡単に試料を入れることができる。この目的のために、装置24はハンドル26を具備してもよい。ハンドル26により、液体試料に装置24の全体を浸漬することを含む望ましい深さまで、操作者は装置24を液体試料に入れることができると、操作者の指を試料に接触させない。試料から装置24を取り出すと、液体試料は、装置の親水性液体保持ゾーン28の部位にだけ付着したままである。次いで、上記のようにインキュベーションと検出を実施する。

アッセイ装置はまた、疎水性面に配列された親水性吸収材料から構成された親水性液体保持ゾーンで製造されてもよい。例えば、ゾーンは、円形、卵形、四角形、多角形または他の適当な形状を有する吸収性の紙から構成されてもよい。図4に示すように、例えば、綿リンター結合剤無添加紙30をシリコーン被覆フィルム32に積層して、周囲の疎水性面36の平面から突出する親水性液体保持領域32を形成することができる。または、不織纖維ループ材料から、周囲の疎水性ランド領域の平面から突き出る(突出する)親水性液体保持ゾーンを構成してもよい。例えば、図5aおよび図5bに示すように、アッセイ装置38は、界面活性剤を含有するポリプロピレン不織纖維ループ材料から製造された突出部42の配列を有する疎水性ポリプロピレンフィルム40のシートを含んでもよい。

アッセイ装置の液体保持ゾーンにアッセイ試薬を被覆または付着させてもよい。このようなアッセイ試薬は微生物増殖の栄養;ゲル化剤;発色指示薬、蛍光指示薬、発光指示薬および電気化学的指示薬などの指示薬物質を含んでもよいが、これらに限定されない。アッセイ試薬は、当業者に周知の固体の基材にアッセイ試薬を固定するための多数の方法のいかなる方法によって液体保持ゾーンに固定されてもよい。このような方法には、例えば、アッセイ試薬を含有する液体をゾーンの中で乾燥する方法、並びに生物分子および他のアッセイ試薬を固体の基材に非共有結合的に結合するための他の方法が含まれる。または、当業者に周知の方法によって種々の方法を使用して、アッセイ試薬をウェル14内の基材12材料に共有結合で結合することができる。

上記に考察するように、アッセイ装置内に微容量液体保持能力を有する親水性液体保持ゾーンが存在することにより、液体試験試料を相対的に大多数の試験容量に分離することができる。液体試料を微容量分量に分離し、分量間の交差汚染を生じることなくMPNまたは他のアッセイを実施する能力は本発明の方法と装置の一利点である。

本明細書に引用した全ての参考文献および出版物はその内容が参考として本明細書において本発明の開示内に組み入れられている。本発明の特定の実施態様は詳細に考察され、本発明の範囲内において可能な形態について言及されている。当業者が利用可能であり、本発明を同様にうまく実施させると思われる種々の別の技法および手順が存在する。

### 実施例

以下の実施例は本発明を理解する際の助力とするために提供されており、本発明の範囲を限定するものと考えられるものではない。特に示さない限り、全ての部および割合は重量による。

#### 実施例1

##### 型押フィルム培養装置

複数の微小小部屋を具備し、液体試験試料中の微生物の検出に使用することができる型押フィルム培養装置をこの実施例に記載するように構成した。

親水性液体保持ゾーンは、例えば加熱型押フィルム加工、キャスト型押加工、レーザード

10

20

30

40

50

リル加工のような多数の方法によって、および反応性材料を用いて表面をエッティングすることによって基材に形成されてもよい。ポリマーフィルムに窪みすなわち微容量ウェルを形成する方法についての詳細な説明は、米国特許第5,192,548号；同第5,219,462号；同第5,344,681号および同第5,437,754号に提供されている。以下の説明はこの後の実施例に使用する特殊な型押フィルム培養装置の代表である。

#### A. 複数の微容量ウェルを含有するプレス加工

10重量%のTiO<sub>2</sub>(50%TiO<sub>2</sub>/50%ポリエチレン顔料濃縮物)と0.5重量%トリトンX-35界面活性剤(シグマケミカルカンパニー(Sigma Chemical Company))を含有するポリエチレン(イーストマンケミカルカンパニーレジン(Eastman Chemical Company Resin) #18BOA)またはポリプロピレンをフィルム(厚さ4mil)に押出キャスト成型した。フィルムをシートに切断し、米国特許第5,219,462号に記載するように、複数の微容量ウェルを形成するように設計した、フォトリソグラフィーによりエッティングしたマグネシウム合金工具に積層した(~20シート)。エッティング加工したマグネシウム工具は、この後の実施例に記載するパターンで配列された突出部を有した。積層したポリエチレンシートは米国特許第5,219,462号に記載されているように、加熱液圧プレス(132、1.4N/m<sup>2</sup>、120秒滞留時間)で型押加工した。微容量ウェルは6角形に配列し(~19ウェル/cm<sup>2</sup>)、各ウェルは、表面の直径約1.9mm、深さ約1.1mmでの直径1.0mmを有する逆切頭円錐の形状であった。微容量ウェルは米国特許第5,219,462号に記載されているように、かみそりの刃の端で希釈した試料溶液をフィルムに描くことによって充填した。試料を冷却し、その温度で工具をはずして、工具の「陰」像を有する単層フィードバックを得た。

#### B. 複数の微容量ウェルを具備する押出型押しフィルム

フォトリソグラフィーによりエッティングしたマグネシウムマスター工具を感圧転写接着剤を使用してスチール工具に取り付けた。実施例1Aに記載したポリエチレン、顔料および界面活性剤組成物をブレンドし、米国特許第5,192,548号に記載されているようにロールに押出鋳造した。トリトンX-35界面活性剤を含有しない型押フィルムもこの方法で製造した。

#### C. 疎水性「ランド」領域を有する押出型押フィルム

トリトンX-35界面活性剤を含有する押出型押ポリエチレンフィルムを実施例1Bにより製造した。ロール対ロール被覆装置(スクラブデザイン社(Scrub Design Co.))を用いて、4.8%の架橋剤を含有するアクリレート化シリコーン(ゴールドシユミット(Goldsmith)FC711)の薄層を転写することによって、微容量ウェルの間の領域(「ランド」領域)を疎水性にした。85ミリジュール/cm<sup>2</sup>の線量を提供するHバルブ付きフュージョンシステムズ(Fusion Systems)社製UVランプを使用し、窒素大気中でフィルムを紫外線に暴露することによって疎水性被覆を硬化した。

#### 実施例2

##### 接種方法

(複数の微容量ウェルを使用する方法)

#### A. 指示薬溶液の接種

フェノール赤指示薬(コントラストを提供するため)を含有する水性溶液をピペットで、複数の微容量ウェルを具備するシリコーン処理およびシリコーン未処理ポリエチレン型押フィルムに適用した(それぞれ、実施例1Cおよび1B)(約1.3μl/ウェル)。微容量ウェルは6角形に配列し(~19ウェル/cm<sup>2</sup>)、各ウェルは、表面の直径約1.9mm、深さ約1.1mmでの直径1.0mmを有する逆切頭円錐の形状であった。微容量ウェルは米国特許第5,219,462号に記載されているように、かみそりの刃の端で希釈した試料溶液をフィルムに描くことによって充填した。疎水性シリコーン被覆で処理した試料は、ウェルの間に流体の橋かけを生ずることなく液体を個々の微容量に分配す

10

20

20

30

40

50

ることを示したが、未処理のフィルムでは液体の橋かけが観察された。

#### B . 微生物を含有する試料の接種

複数の微容量ウェルを具備する型押フィルム培養装置に細菌を含有する試料を接種する方法をこの実施例で明らかにする。接種した装置を使用して、細菌の大腸菌 (E . c o l i) を検出し、列挙した。

大腸菌 (E . c o l i) ATCC 51813の一晩プロス培養物 (トリプシン大豆プロス (T S B ) 培地中 ~ 10<sup>9</sup> C F U / m l ) を、4 - メチルウンベリフェリル - D - グルクロニド (0 . 5 mg / m l ) (MUG、バイオシンスインターナショナル (Bio synthesis International)、イリノイ州ナバービル) を含有するバイオレットレッド胆汁 (V R B ) 培地 (7 . 0 g / l のバクトペプトン、3 . 0 g / l の酵母抽出液および 1 . 5 g / l の胆汁酸塩) 中で連続希釈した。希釈液はおおよその細菌濃度 100 C F U / m l に調製した。実施例 2 A に記載するように、希釈した試料 (0 . 5 m l ) をピペットでシリコーン処理およびシリコーン未処理ポリエチレン型押フィルム (406 個の微容量ウェル) に適用した。接種した型押フィルム 43 をペトリ皿の中に入れて、37 において 12 時間インキュベーションした。シリコーン処理フィルム 46 の 28 個の微容量ウェル 44 が、鮮明な別個の蛍光スポットを示した (図 6 b )。一方、未処理のフィルムではかなりのウェル間の交差汚染が観察された。シリコーン処理したフィルムでは、28 個の陽性ウェルは、式  $M P N = N \ln(N/N-X)$  (式中、N は充填されたウェルの総数で、X は陽性反応を示すウェルの総数である) を使用して算出した、最確数 (M P N) 58 C F U / m l に相当する。

この実施例の結果は、微生物は、複数の微容量ウェルを具備する型押フィルム培養装置を使用して容易に検出および列挙することができ、ウェルの間のランドエリアに疎水性物質を被覆することによってウェル間の交差汚染を排除することができることを示す。

#### 実施例 3

##### ナノ構造フィルム培養装置

疎水性ナノ構造フィルムを被覆した基材に配列した複数の親水性微容量液体保持ゾーンを具備するナノ構造フィルム培養装置をこの実施例に記載するように構成した。

#### A . ナノ構造フィルム

ナノ構造面を作成するための方法は米国特許第 4 , 812 , 352 号および同第 5 , 039 , 561 号に開示されている。簡単に説明すると、有機顔料 C . I . 顔料赤 149 (アメリカン ヘキスト - セラネス (American Hoechst - Celanese) 、ニュージャージー州ソメルセット) を、予め 700 のプラチナで金属蒸着しておいた厚さ 0 . 0125 - nm 、 30 × 30 cm のポリイミドウェブシートに 250 nm の厚さまで真空蒸着した。PR 149 顔料をウェブ基材に垂直に濃い分布で配向した別個のひげ結晶に変換させるのに十分である、264 の真空オーブンで 30 分より長く試料を焼きなました。2500 の厚さに相当する質量の金をひげ結晶に蒸着し、SEM で測定したとき、高さ ~ 2 μm 、直径 ~ 0 . 15 μm 、面積数密度 5 / ( μm )<sup>2</sup> の金粒子の配座被覆を形成した。

別の方法として、ポリイミドを透明なフルオレノンポリエステル (F P E 、 3 M 社 (3 M Co.)) と交換し、PR 149 の蒸着中の表面の帯電を予防するが、本質的に透明さを保つ 50 の金を蒸着した。

#### B . 疎水性ナノ構造フィルム

次いで、C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>SH の 0 . 1 mM エタノール溶液に 4 時間浸漬し、次に純粋なエタノールですすぎ、空気乾燥して、ナノ構造フィルムを疎水性にした。得られた疎水性の高い面は、水に対する前進および後退接触角が同じ 178° であると測定された。この方法は特許出願国際公開公報第 96 / 34697 号に記載されている。

#### C . ナノ構造フィルム培養装置

米国特許第 5 , 336 , 558 号に記載されているナノ構造フィルムの封入 / 剥離方法を使用して、ナノ構造フィルム培養装置を構成した。簡単に説明すると、ナノ構造疎水性フィルム片を 1 . 5 × 2 . 0 cm の帯状物に切断した。直径 1 . 5 - mm の穴が ~ 4 mm の

10

20

30

40

50

間隔を置いて配置された四角形の配列を有する厚さ 0.25 - mm の貫通しているスチールシートを帯状物のナノ構造側に重ねた。速硬化性ビニルポリシロキサンカプセル剤 (3 M エクスプレス (3 M EXPRESS) 歯科用印象材、3 M 社 (3 M Co.)) をスチール板上に大量に適用し、穴を通じて材料を浸透させ、ナノ構造ひげ結晶を封入した。数分後、印象材を硬化させ、スチールシートを除去することにより、ポリイミドウェブの穴の配列部分だけナノ構造構成要素をきれいに除去した。穴の下の領域の露出した金属被覆ポリイミド基材は、面の残りと比較して相対的に親水性であった。これは、帯状物を水性溶液に浸漬し、露出スポットまたはゾーン領域の配列にだけ小さい液滴が残存していることを観察することによって証明された。

別の方で、好ましくは、ポリイミドウェブからナノ構造構成要素を除去するためにレーザー研磨を使用して、相対的に親水性液体保持ゾーンの望ましい配列を提供した。ナノ構造疎水性フィルムの帯状物を、直径 1 mm の平行ビーム、約 2 ミリジュール、60 ナノ秒パルスの Q - スイッチモードで作動させた Nd - YAG レーザーで研磨した。単パルスを使用して、中心間隔 4 - mm および 5 - mm の直径 1 - mm のゾーンの列を研磨した。9 個の直径 1 - mm のゾーンからなる  $3 \times 3$  マトリックスを重ねることによってより大きいゾーン、 $\sim 1.6 \times 1.6$  mm 平方を作成した。得られた 40 個 ( $4 \times 10$ ) 個のゾーンを有するナノ構造フィルム培養装置を最初に水に 1 分間沈めて、研磨したゾーン領域を親水性にした。板を引き上げると、40 個のゾーンの各々は直径  $\sim 1$  - mm、半球系の液滴が付着していた。

#### 実施例 4

##### 接種方法（ナノ構造フィルム培養装置を使用する方法）

###### A. 水性液体試料による接種

ナノ構造フィルム培養装置（実施例 3 C）によって選択的に回収される液体の量を接種し、測定するために、サイズの直径 1 ~ 2.5 mm（平均 2 mm）の 12 個の親水性液体保持ゾーンを具備する板を純粋な水に浸漬し、ゾーンに抽出された水の量を重量で測定した。最初板を  $\sim 3$  秒 / cm の遅い引き上げ速度で浸漬した。引き上げ後、板の背面をティッシュペーパーに接触させて、ポリイミド板の背面についた全ての水滴を除去し、次いで板を質量平衡計（最小感度 0.1 mg）にのせ、15 秒後に質量を記録した。これを 15 回繰り返し実施した。12 個の水を含んだゾーンの質量の平均値および標準偏差は  $3.7 \pm 0.2$  mg で、平均ゾーン容量は  $0.310 \mu l \pm 5\%$  であった。次いで、この手順を速い引き上げ速度で繰り返し実施し、板を  $\sim 0.1$  秒であると推定される時間内に水から引き上げた。この速度では、親水性ゾーンに残存した液体の量はより多かった。その理由は、液体が「のびて」、動的に平衡になる時間がなかったからである。15 回の試験の平均値および標準偏差は  $6.0 \pm 0.5$  mg で、平均ゾーン容量は  $0.500 \mu l \pm 12\%$  であった。

###### B. 黄色ブドウ球菌 (S. aureus) を含有する試料の接種

複数の微容量液体保持ゾーンを具備するナノ構造フィルム培養装置に細菌を含有する培地を接種する方法をこの実施例で明らかにした。接種した装置を使用して黄色ブドウ球菌 (S. aureus)（実施例 4 B）および大腸菌 (E. coli)（実施例 4 C）の細菌を検出および列挙した。

融解した ( $\sim 60$ ) 細菌増殖培地 BHI（ブレーンハートインフージョン、ベクトンディッキンソン社 (Becton Dickinson and Co.) と寒天 (1.2% 重量 / 容量) の混合物 ( $5 \mu l$ ) を、実施例 3 C に記載したように調製したナノ構造フィルム培養装置の親水性ゾーンにスポットした。寒天「スポット」を室温で冷却させ、固化させた。1 枚の板を BHI プロス培地の黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) の増殖培養物 ( $\sim 10^8$  細胞 / ml) に短時間浸漬した。同様に、他の板をそれぞれ、 $10^7$  および  $10^5$  細胞 / ml である、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 培養物の 1 : 10 および 1 : 1000 希釈液に浸漬した。板を、湿度を維持するために水を飽和させたフィルターペーパーを入れたプラスチック製のペトリ皿に入れ、37 度で 4 時間インキュベーションした。次いで、900  $\mu l$  の HEPES 緩衝液（シグマケミカル

10

20

30

40

50

社 (Sigma Chemical Co.)、pH 8.0) ; 120 μl の蛍光指示薬溶液 (1.0 mg / ml の Boc - Val - Pro - Arg - AMC HCl (ノババイオケム (Novabiochem)、カリフォルニア州サンジエゴ)) を 72 mM トリエタノールアミン、144 mM NaCl に溶解したもの、pH 8.4) ; および、30 μl のヒトプロトロンビン (シグマケミカル社 (Sigma Chemical Co.)、50 mg / ml を 5 mM トリス緩衝液、50 mM NaCl に溶解したもの、pH 8.0) を含有する溶液に板を浸漬した。上記と同じ条件下において板をさらに 1 時間インキュベーションし、次いで、UV 光線下 (~366 nm、ミネラライト (Mineralfite)、UVP 社 (UVP, Inc.)、カリフォルニア州サンガブリエル) で調査した。寒天培地、細菌懸濁液および指示薬溶液を含有するゾーンは全て、細菌を全く添加しないで調製した対照試料の蛍光が見えないものと比較して、目に見える強烈な青みがかった蛍光を示した。ゾーン間の交差汚染は観察されなかった。  
10

#### C. 大腸菌 (E. coli) を含有する試料の接種

以下の成分を合わせて寒天培地を調製した：ゼラチンの臍臓消化物 (10 g、ペプトン (Peptone) G、アクメディアマニュファクチャー社 (Acumedia Manufacturers)、メリーランド州バルチモア)；バクト胆汁酸塩番号 3 (Bacto Bile Salts Number 3) (2.5 g、ディフコラボズ (Defco Labs)、ミシガン州デトロイト)；寒天 (6 g、ディフコラボズ (Defco Labs))；および、脱イオン水 (500 ml)。混合物を攪拌し、寒天が解けるまで 100 までの温度で加熱し、121 で 15 分間蒸気滅菌し、次いで室温まで冷却して固化させた。フィルター滅菌 (0.2 mm) イソプロピル - - D - ガラクトシド (IPTG、カルバイオケム社 (Cal Biochem Corp.)、カリフォルニア州ラジョラ) の脱イオン水溶液 (200 mg / ml) から IPTG ストック溶液を調製し、使用時まで -20 で保存した。4 - メチルウンベリフェリル - - D - ガラクトシド (MU-Gal) の N, N - ジメチルホルムアミド溶液 (10 mg / ml) から MU-Gal ストック溶液を調製し、使用時まで 4 で保存した。使用直前に、寒天培地を 100 で溶かして、25 ml を滅菌した 50 - ml の試験管に移した。次いで、IPTG ストック溶液 (12.5 ml) と MU-Gal ストック溶液 (150 ml) を冷却した (~60) 寒天懸濁液中で混合した。混合物を速やかに、実施例 4 B に記載したナノ構造フィルム培養装置に移した (4 - μl 分量)。室温まで冷却した後、板を大腸菌 (E. coli) ATCC 51813 の指数関数的な増殖培養物 (LB 培地 3 中で ~10<sup>8</sup> 細胞 / ml) の中央に浸漬し、37 において個別の加湿ペトリ皿中でインキュベーションした。4 時間のインキュベーション後、ミネラライト (Mineralight) UV ランプを用いて蛍光について板を調べた。接種したゾーンは、未接種のゾーンで観察されるものよりもわずかに強い蛍光を示した。次いで、板をさらに 16 時間インキュベーションし、再度調べた。接種したゾーンは、未接種のゾーンに比べて有意に強い青い蛍光を示した。透明なフィルム基材 (FPE を使用した実施例 3 A) で調製した板は、一方の側から発光し、もう一方の側から観察または写真撮影することができるので、測定するのに特に便利であった。ゾーン間の交差汚染は観察されなかった。  
20  
30

#### 実施例 5

40

#### 吸収性ディスク培養装置

疎水性面に配列された複数の親水性吸収性ディスクを具備し、液体試験試料中の微生物の検出および列挙に使用することができる吸収性ディスク培養装置をこの実施例に記載するように構成した。

吸収性材料シート (シェイチャー & シュエル (Scheicher & Schuell) 等級 903 ペーパー；約 4.5 g の水 / 100 cm<sup>2</sup> を吸収する) を、発色指示薬 2, 3, 5 - トリフェニル - 2H - テトラゾリウムクロライド (TTC) (アムレスコ (Amresco)、オハイオ州ソロン) を含有するアクリレート感圧接着剤 (PSA) を用いて、レクサム (Rexam) シリコーン被覆フィルム (基材として厚さ 2 - mi 1 の透明ポリエステルを有する等級 #15819D 2 MIL CL PET MM34P / 000、  
50

レクサムリリース (Rexam Release)、イリノイ州オーケブルック)に積層した。材料を0.5%蛍光指示薬4-メチルウンベリフェリルホスフェート(100 $\mu$ g/ml、シグマ(Sigma)、ミズーリ州セントルイス)と4-メチルウンベリフェリル-D-グルコシド(50 $\mu$ g/ml、シグマ(Sigma))を含有するTSB増殖栄養液で飽和し、ワイヤーを巻き付けた棒でぬぐい、110°で10分間乾燥した。直徑約0.635cmの円形ディスクを積層物から抜き取り、シリコーン被覆フィルムバッキングを除去した。次いで、ディスクが等しい間隔の平行な棒状パターンになるように、PSA付きディスクを別のレクサム(Rexam)シリコーン被覆フィルムシートに接着した。フィルムとディスクの集成物を8.9kGyのレベルまでガンマ線照射し、サイズに切断し、次いで角皿が20ディスクのフィルムを1枚有するように、ペトリ皿に貼った。重量測定値に基づいて、得られた培養装置中の角ディスクは約40 $\mu$ lの液体を保持する能力を有した。

#### 実施例 6

##### 接種方法

###### (吸収性ディスク培養装置を使用する方法)

複数の微容量液体保持ゾーンを具備する吸収性ディスク培養装置(吸収性ディスク)に細菌を含有する培地を接種する方法をこの実施例において明らかにした。接種したディスクを使用して大腸菌(E. coli)細菌を検出および列挙した。

大腸菌(E. coli)ATCC51813の培養物を希釈して、約10CFU/mlおよび1CFU/mlを含有する懸濁液を作成した。懸濁液試料(1~2ml)をピペットによって実施例5に記載した吸収性ディスク培養装置に適用した。過剰の液体試料を捨て、それによりディスクに約0.8mlが残った(10ディスク、約40 $\mu$ lの液体/ディスク)。接種した装置を35°で、23時間インキュベーションし、紫外線下で調査した。蛍光を示すディスクの数を角ディスクについて計数し、最確数(MPN)値を実施例2Bに記載した式を使用して算出した。MPN/1ミリリッターは、得られた値を試料の総容量(0.8ml)で割ることによって算出した。結果を表6aに示し、大腸菌群計数登録商標ペトリフィルム(PETRIFILM)プレート(3M社(3M Co.))を用いて試験した標準品によって得られた計数値と比較した。蛍光を示すディスクはしばしば、通常はディスク内の別個のスポットとして、赤いTTC色を示した。吸収性ディスク間の交差汚染は観察されなかった。

表 6a 微生物大腸菌(E. coli)の列挙			
細菌懸濁液 (□ CFU/ml)	陽性ディスク数 (20枚のうち)	MPN (CFU/ml)	大腸菌群数 PETRIFILM™
10	17	47	22
10	19	74	24
1	2	2.6	5
1	3	4.1	4

この実施例の結果は、疎水性フィルムに配列された複数の吸収性ディスクを具備する吸収性ディスク培養装置は細菌を含有する液体試料を容易に接種することができること、および接種したディスクは大腸菌(E. coli)の検出および列挙に使用することができ、得られた値は市販の大腸菌群計数登録商標ペトリフィルム(PETRIFILM)プレートによって得られた値に匹敵することを示す。

#### 実施例 7

##### 接種方法

###### (親水性纖維培養装置を使用する方法)

複数の微容量液体保持ゾーンを具備する親水性纖維培養装置(不織纖維ループ)を構成し、これに指示薬溶液および細菌を含有する培地を接種する方法をこの実施例において明ら

10

20

30

40

50

かにした。接種したディスクを使用して、大腸菌（E. coli）細菌を検出および列挙した。

#### A. 装置の構成

相対的に親水性界面活性剤を含有するポリプロピレン不織繊維ループ突出部の配列を具備する疎水性ポリプロピレンフィルムシートを米国特許第5,256,231号に記載されているように調製した。シートをサイズに切断し、ペトリ皿の底に貼りつけ、培養装置を作成した。各装置は、等しい間隔で平行の棒状で六角形にパターン化された約200本の繊維ループ突出部を有するフィルムを含んだ。角半球形の突出部は基底面が六角形で（辺の長さ約3mm、高さ2mm）、約10μlの液体を保持する能力を有した。

#### B. 指示薬溶液の接種

フェノール赤指示薬（コントラストを与えるため）を含有するリン酸緩衝液（「バッターフィールド（Butterfield）、フィッシャーサイエンティフィック（Fisher Scientific））試料（1ml）をピペットで装置中央のフィルムに適用した。液体は、接種地点から速やかに親水性繊維ループ突出部に進入していくのが観察された。液体は、速やかにループ突出部に分配されると同時に、疎水性ポリプロピレンランド領域から「排水していく」のが観察された。200個の突出部のうち約65個が充填された。ループ突出部の間にあるランド領域の上に着色された液体の橋かけは観察されなかった。

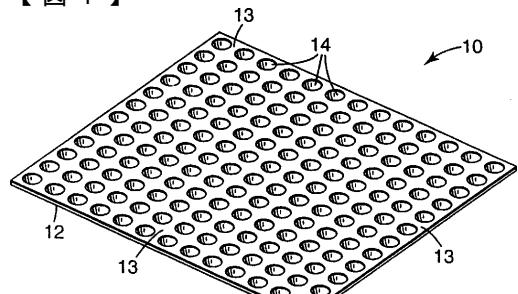
#### C. 微生物を含有する試料の接種

大腸菌（E. coli）（ATCC51813、TSB培地中～10<sup>9</sup>CFU/ml）の一晩培養物を、4-メチルウンベリフェロン-D-グルクロニド（0.5mg/ml）を含有するVRB培地（7.0g/lバクトペプトン（Bacto peptone）、3.0g/l酵母抽出液、1.5g/l胆汁酸塩）で連続希釈した。10<sup>-8</sup>希釈液は、細菌濃度約10CFU/mlに対応して調製した。試料（1ml）を、実施例7Bに記載したように、親水性繊維培養装置（実施例7A）の中央部のフィルムにピペットで適用した。接種後、ペトリ皿の蓋をして、蒸散しないように絶縁テープを使用して密封した。次いで、装置を逆さにし、37℃で19時間インキュベーションした。インキュベーション後、365nmの照射下で蛍光を示す突出部の数を計数した。5つの分離した別個の突出部が、強い蛍光を有することが観察された。突出部の間では蛍光は観察されなかったことにより、交差汚染はなかったことを示している。実施例2Bに記載した式を使用して、MPN値は5CFU/mlであることが算出された。

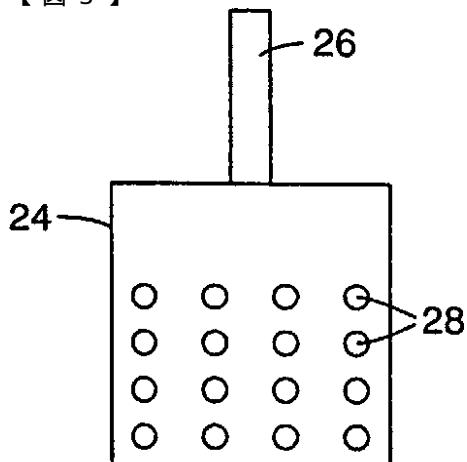
この実施例の結果は、疎水性フィルムの上に配列された複数の親水性繊維ゾーンを具備する親水性繊維培養装置は細菌を含有する液体試料を容易に接種することができること、および接種した装置は大腸菌（E. coli）の検出および列挙に使用することができるこことを示す。

本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本発明の種々の改良および変更を加えられることは当業者にあきらかであり、本発明は本明細書に記載する例示的な実施態様に限定されないことが理解されるべきである。

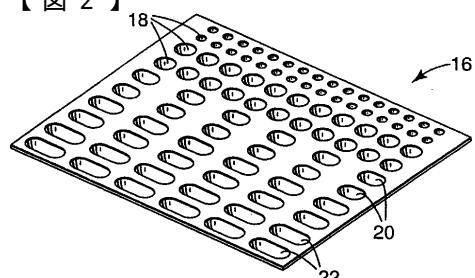
【図 1】

**Fig. 1**

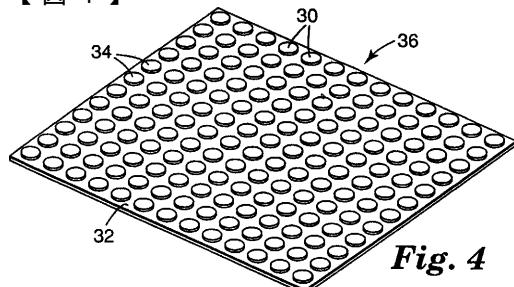
【図 3】

**Fig. 3**

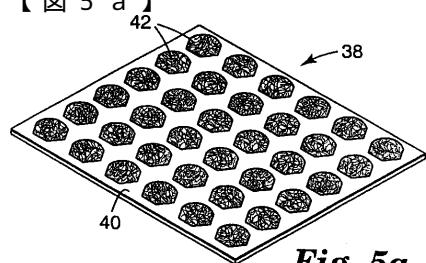
【図 2】

**Fig. 2**

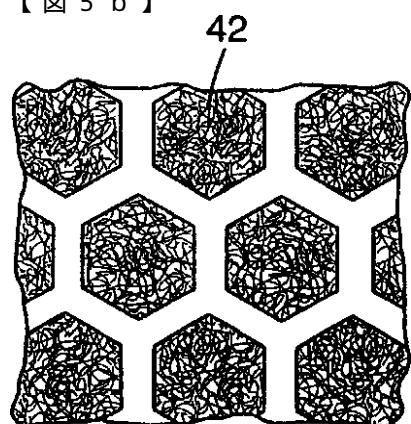
【図 4】

**Fig. 4**

【図 5 a】

**Fig. 5a**

【図 5 b】

**Fig. 5b**

【図 6 A】

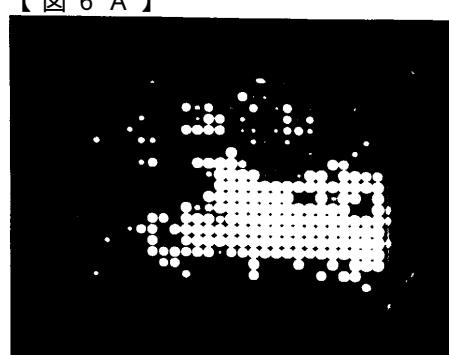


FIG. 6A

【図 6 B】

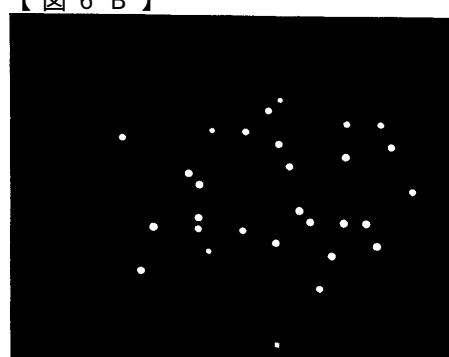


FIG. 6B

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ハリバーソン , カート・ジェイ  
アメリカ合衆国55133 3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス3  
3427
- (72)発明者 クレジカレック , ゲイリー・イー<sup>ー</sup>  
アメリカ合衆国55133 3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス3  
3427
- (72)発明者 ウェイ , アイ - ピン  
アメリカ合衆国55133 3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス3  
3427
- (72)発明者 バーグ , ジェイムズ・ジー  
アメリカ合衆国55133 3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス3  
3427
- (72)発明者 ウィカート , ピーター・ディ  
アメリカ合衆国55133 3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス3  
3427
- (72)発明者 カルハウэн , クライド・ディ  
アメリカ合衆国55133 3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス3  
3427
- (72)発明者 デーブ , マーク・ケイ  
アメリカ合衆国55133 3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス3  
3427
- (72)発明者 キウ , ジュン  
アメリカ合衆国55133 3427ミネソタ州セント・ポール、ポスト・オフィス・ボックス3  
3427

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 国際公開第97/018455 (WO , A1)  
特開平08-224078 (JP , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
C12M 1/00 - 3/10  
C12N 1/00 - 9/99  
C12Q 1/00 - 70  
G01N 33/00 - 98  
PubMed, MEDLINE(STN)  
BIOSIS/WPI (DIALOG)