

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6587643号
(P6587643)

(45) 発行日 令和1年10月9日(2019.10.9)

(24) 登録日 令和1年9月20日(2019.9.20)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/04 (2006.01) C 1 2 Q 1/04
C 1 2 M 1/34 (2006.01) C 1 2 M 1/34 B

請求項の数 18 外国語出願 (全 17 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2017-27372 (P2017-27372) (22) 出願日 平成29年2月16日 (2017.2.16) (62) 分割の表示 特願2014-513306 (P2014-513306) の分割 原出願日 平成24年6月4日 (2012.6.4) (65) 公開番号 特開2017-113018 (P2017-113018A) (43) 公開日 平成29年6月29日 (2017.6.29) 審査請求日 平成29年3月17日 (2017.3.17) (31) 優先権主張番号 105744 (32) 優先日 平成23年6月3日 (2011.6.3) (33) 優先権主張国・地域又は機関 ポルトガル (PT)</p>	<p>(73) 特許権者 513303795 ウニベルシダージ ド ポルト UNIVERSIDADE DO PORTO ポルトガル ペー 4099-002 ポルト サラ 419 ブラッサ ゴメス テイシェイラ 4 アンダール ガビネテ イ ウーペーイーエー (74) 代理人 110000800 特許業務法人創成国際特許事務所</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療薬耐性微生物の検出キット及び治療薬耐性微生物の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体サンプル中における治療薬耐性微生物の存在の検出方法であって、

a) 少なくとも1つの治療薬をともなう第1のチューブと、前記治療薬をともなわない第2のチューブとに、前記生体サンプルを接種し、該生体サンプルをインキュベートする工程と；

b) 前記第1のチューブと前記第2のチューブに、蛍光マーカーを添加する工程と；

c) 前記第1のチューブと前記第2のチューブの各々に対して、1又は複数の蛍光パラメータを得るために蛍光分析を実行する工程と；

を備え、

前記生体サンプルは、微生物を単一種集団に単離するための処理を経ずに該微生物を含むサンプルであり、

前記治療薬に対して耐性表現型の微生物を含む該生体サンプルが、前記第1のチューブと前記第2のチューブの間の1又は複数の蛍光パラメータを比較することによって鑑別されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

生体サンプル中における治療薬耐性微生物の存在の検出方法であって、

a) 少なくとも1つの治療薬をともなう第1のチューブと、前記治療薬をともなわない第2のチューブとに、前記生体サンプルを接種し、該生体サンプルをインキュベートする工程と；

b) 前記第 1 のチューブと前記第 2 のチューブに、蛍光マーカーを添加する工程と；
 c) 前記第 1 のチューブと前記第 2 のチューブの各々に対して、1 又は複数のフローサイトメトリックパラメータを得るためにフローサイトメトリック分析を実行する工程と；
 を備え、

前記生体サンプルは、微生物を単一種集団に単離するための処理を経ずに該微生物を含むサンプルであり、

前記治療薬に対して耐性表現型の微生物を含む該生体サンプルが、前記第 1 のチューブと前記第 2 のチューブの間の 1 又は複数のフローサイトメトリックパラメータを比較することによって鑑別されることを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 2 記載の方法であって、

前記 1 又は複数のフローサイトメトリックパラメータは、前方散乱、及び/又は、側方散乱、及び/又は、蛍光パラメータを含むことを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 3 記載の方法であって、

前記蛍光散乱シグナルのパラメータは、強度、スペクトルプロファイル、及び/又は、細胞数を含むことを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 a) 工程の該チューブには、少なくとも 1 つの溶解剤及び/又は緩衝液が更に接種されることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法であって、

i) 前記生体サンプル中に存在する微生物の種類を同定し、前記種類がグラム陽性のバクテリア、グラム陰性のバクテリア、又は真菌である場合、それに応じて治療薬を選択する工程；及び/又は

ii) 前記生体サンプルを濃縮し、残渣が存在するときはその有機堆積物を除去する工程；

の準備工程の 1 又は複数の工程をさらに備えることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 6 記載の方法であって、

前記 ii) 工程は、遠心分離、又は、濾過によりなされることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 a) 工程において、前記生体サンプルが適切な培地に接種されることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記蛍光マーカーを用いた前記 b) 工程の反応時間は 5 分 ~ 60 分の間であることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 c) 工程の前記生体サンプルは、基質特異性拡張型ラクタマーゼの存在を検出した場合、酵素阻害剤がさらに添加されることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 記載の方法であって、

前記酵素阻害剤は、クラブラン酸又はタゾバクタムであることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法によって得られた、前記治療薬に対して微生物耐性表現型の生体サンプルを、カルバペネムを含有する試験溶液に接種してインキュ

10

20

30

40

50

ベートし、

インキュベート後の試験溶液を、カルバペネム感受性のコントロール菌株による感受性テストにかけ、

前記生体サンプルの中からカルバペネマーゼ産生サンプルを検出する、
工程をさらに備えることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記微生物は、バクテリア、真菌、又は原生生物であることを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 13 記載の方法であって、

前記バクテリアは、グラム陽性、グラム陰性、グラム染色に対し不安定又は不可能であるモリクテス綱、又は、アルコール - 酸耐性バクテリアであることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 13 記載の方法であって、

前記微生物は、ブドウ球菌属、ストレプトコッカス属、エンテロコッカス属、エンテロバクテリアシー科、大腸菌、クレブシエラ肺炎桿菌、プロテウス属、緑膿菌、アシネトバクター・バウマンニ、セパシア菌、ネイセリア属、ヘモフィルス属、マイコバクテリウム属、ノカルジア属、レジオネラ属、カンジダ属、クリプトコッカス・ネオフォルマンス、ニューモシスチス肺炎菌、アスペルギルス属、又は、ジアルジア属であることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記治療薬は、ペニシリン、セファロsporin、カルバペネム、アズトレオナム、マクロライド、キノロン、アミノグリコシド、グリコペプチド、リポペプチド、テトラサイクリン、コリスチン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、ホスホマイシン、リネゾリド、ニトロフラントイン、スルホンアミド、リファンピン、トリメトプリム、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、又は、チゲサイクリンの抗バクテリア薬、5 - フルオロシトシン、あるいは、エキノキャンディンであることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記蛍光マーカーは、核酸染色剤、代謝染色剤、又は、膜電位染色剤であることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 17 記載の方法であって、

前記蛍光マーカーは、アクリジン色素、シアニン色素、フルオロン色素、オキサジン色素、フェナトリジン色素、又は、ローダミン色素であることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療薬耐性微生物の検出キット及び治療薬耐性微生物の検出方法、並びに、
基礎的な体制メカニズムの分析に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、微生物の検出と、何より微生物の感受性評価を行うための現状の実験手順の短縮及び改良という大きなニーズがある。理想的な診断技術は、感受性プロファイルに基づく適切な治療の策定を可能にするために、感受性プロファイルをタイムリーに提供することである。

【0003】

いわゆる、敗血症ショックにつながる最も深刻な感染症の場合には、スピードは最も重要である。適切な抗菌治療が遅れると、死亡リスクは実質的に、時間単位で増加する。

10

20

30

40

50

【0004】

現在の至適基準の診断方法は、ゆっくりとした、労働集約的な培養に基づき、表現型の特定及び抗微生物薬感受性試験を行い、サンプル収集後、48～72時間を必要とする。広域抗生物質を用いた経験的治療をしばしば開始しなければならず、抗微生物薬耐性の上昇をもたらす。

【0005】

従来の試験を用いると、尿のような生物由来物質が固体培地で培養される必要があり、その後、同定と感受性評価が行える。血液は通常、ブロース培地（血液培地）に植菌され、自動的に分析され；ポジティブになると、血液は少なくとも24時間経過後、固体培地に置かれ、そして、感受性評価のためにコロニーを形成させる。一方、コロニーは薬剤の

10

【0006】

臨床的耐性は、菌株の抗菌薬感受性の欠如と、局部感染での低濃度の活性抗菌薬に関連し得る。生化学的プロトコルでは、ほんの数種類の薬剤、例えば、バンコマイシン、ゲンタマイシン、アミカシンが利用でき、それらは不活性である。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、-単一種の生物体を含む検査培養-で作られた、又は、フローサイトメトリーを使って、培養されていない生物学的サンプルから直接の純粋微生物培養物からなる、

20

【0008】

開示した主題は、生体サンプル中における治療薬耐性微生物の検出方法であって、
 a) 少なくとも1つの治療薬を有する第1のチューブと、前記少なくとも1つの治療薬を有さない第2のチューブに前記サンプルを植菌し、前記サンプルを培養する工程と；
 b) 前記第1のチューブと前記第2のチューブに、蛍光マーカーを添加する工程と；
 c) 前記第1のチューブと前記第2のチューブの各々に対して、1又は複数の蛍光パラメータを得るために蛍光分析を実行する工程と；

30

を備え、
 前記治療薬に対して微生物耐性表現型の生体サンプルが、前記第1のチューブと前記第2のチューブの間の1又は複数の蛍光パラメータ又は成長パラメータを比較することによって得られることを特徴とする方法に関する。

【0009】

開示した主題はまた、生体サンプル中における治療薬耐性微生物（バクテリア、真菌、又は原生生物）の検出方法に関する。言い換えれば、生体サンプル、すなわち、尿、培養血液、水、純粋培地から得られた微生物の懸濁液の（培養されていない）サンプルから直接、治療薬耐性微生物を検出する方法であって、

40

a) 少なくとも1つの治療薬を有する第1のチューブと、前記少なくとも1つの治療薬を有さない第2のチューブに培養されていない前記サンプルを植菌し；好ましくは、少なくとも1つの溶解剤、及び/又は、緩衝剤、及び/又は、適切な培地をさらに含み、あるいは、血清分離チューブにサンプルを置き；前記サンプルを培養する工程と；
 b) 前記第1のチューブと前記第2のチューブに、蛍光マーカーを添加する工程と；
 c) 前記第1のチューブと前記第2のチューブの各々に対して、1又は複数のフローサイトメトリックパラメータを得るためにフローサイトメトリック分析を実行する工程と；

を備え、
 前記治療薬に対して微生物耐性表現型の生体サンプルが、前記第1のチューブと前記第2のチューブの間の1又は複数のフローサイトメトリックパラメータを比較することによ

50

って得られることを特徴とする方法に関する。

【0010】

他の実施形態において、1又は複数のフローサイトメトリックパラメータは、前方散乱、及び/又は、側方散乱、及び/又は、蛍光パラメータを含む。蛍光散乱シグナルのパラメータは、強度、スペクトルプロファイル、及び/又は、細胞数を含む。

【0011】

本発明の他の実施形態において、開示した方法は、

i) 前記生体サンプル中に存在する微生物の種類を同定し、その結果、前記種類がグラム陽性又はグラム陰性である場合、治療薬を選択する工程と；

ii) 前記生体サンプルを濃縮し、有機堆積物、例えば、血液サンプル、尿、又は、他の生物由来物質からの残渣が存在するときは前記有機堆積物を、好ましくは、遠心分離、濾過、又は、血清分離チューブ及び遠心分離機を使用して、除去する工程と；

を含む準備工程の1又は複数の工程をさらに備える。

10

【0012】

本発明の他の実施形態において、前記サンプルのインキュベーション時間は30分～2時間の間、好ましくは30分～60分の間である。

【0013】

本発明の他の実施形態において、前記サンプルのインキュベーション温度は30～40の間、好ましくは25～35の間である。

【0014】

本発明の他の実施形態において、蛍光マーカ－を用いる前記b)工程の反応時間は5分～60分の間であってもよい。

20

【0015】

本発明の他の実施形態において、微生物の耐性メカニズムを分析するために、前記c)工程における前記生体サンプルは、例えば、基質特異性拡張型ラクタマーゼ(ESBLs)の存在を検出する場合、酵素阻害剤をさらに備えてもよい。好ましい酵素阻害剤は、クラバン酸、タゾバクタム、又はこれらの混合物等であってもよい。

【0016】

本発明の他の好ましい態様において、本方法は、例えば、カルバペネマーゼ(カルバペネムを分解する酵素)の存在に起因して、微生物の抵抗メカニズム、(ホッジ試験(Hodge test)は、さらに24時間かけるのが望ましく、解釈するのが煩わしく難しい)重要な耐性メカニズムを検出するために、

30

i) 前記サンプルにカルバペネムを植菌し、前記サンプルを培養する工程と；

ii) 前記生体サンプルの微生物を、好ましくは濾過によって除去する工程と；

iii) 例えば、一連の濃度のカルバペネムと大腸菌ATCC strain 25922等の微生物をフローサイトメトリーによって培養し、公知の作用を有する菌株、すなわち、公知の線量効果曲線を有するコントロール菌株を添加する工程と；

iv) 2種類のサンプルに蛍光マーカ－を添加する工程と；

v) 前記第1のチューブと前記第2のチューブの各々に対して1又は複数のフローサイトメトリックパラメータを得るためにフローサイトメトリック分析を実行する工程と；

40

vi) 生成された前記プロファイルとコントロール菌株とを比較する工程と；をさらに備える。

【0017】

カルバペネマーゼの存在下において、試験された菌株はカルバペネムを分解し、活性薬剤が少なくなり；基準株でのカルバペネムの効果が小さくなる。一定濃度のカルバペネムの効果が予測より低い場合、微生物はカルバペネマーゼ産生株である。

【0018】

本発明のより好ましい実施形態において、本方法は、例えば、カルバペネマーゼの存在に起因して、微生物の耐性メカニズムを検出するために、

・フローサイトメトリック線量効果曲線を得て、一連の濃度のカルバペネムと大腸菌ATCC

50

strain 25922等の微生物をフローサイトメトリーによって培養する工程と；
 ・カルバペネムに抵抗菌株を接触させ、一定濃度のカルバペネムで培養した後、菌株を有するテストチューブ（試験管）から濾過によって微生物を除去する工程と；
 ・ろ液が基準株（ATCC）を用いて培養され、その効果がフローサイトメトリーによって分析され；その効果が線量効果曲線について予測した結果と比較される工程と；
 をさらに備える。

【0019】

他の好ましい実施形態において、生体液中の薬剤の治療量はさらに同じ方法に基づいて評価され得る。

【0020】

生体サンプル中における治療薬に対する抵抗菌の検出方法の最も好ましい実施形態において、前記微生物は、ブドウ球菌属、ストレプトコッカス属、エンテロコッカス属；大腸菌等のエンテロバクテリアシー科、クレブシエラ肺炎桿菌、プロテウス属；緑膿菌、アシネトバクター・バウマンニ、又はセパシア菌等の非発酵菌；ネイセリア属、ヘモフィルス属；マイコバクテリウム属、ノカルジア属；レジオネラ属、嫌気性菌；カンジダ属等の真菌、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ニューモシスチス肺炎菌、アスペルギルス属のようなカビ；又は、ジアルジア属等の寄生体、又は他の類似の微生物である。

【0021】

生体サンプル中における治療薬に対する抵抗菌の検出方法の他の好ましい実施形態において、治療薬は、ペニシリン、セファロスポリン、他のラクタム（カルバペネム、アズトレオナム）、マクロライド、キノロン、アミノグリコシド、グリコペプチド、リポペプチド、テトラサイクリン、及び他の薬剤（例えば、コリスチン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、ホスホマイシン、リネゾリド、ニトロフラントイン、スルホンアミド、リファンピン、トリメトプリム、トリメトプリム - スルファメトキサゾール、又は、チゲサイクリン）；ポリエン、5 - フルオロシトシン、アゾール、エキノキャンディン等の抗菌薬、又は、他の類似の治療薬であってもよい。

【0022】

生体サンプル中における治療薬に対する抵抗菌の検出方法の他の好ましい実施形態において、蛍光マーカーは、核酸染色剤、代謝染色剤、膜電位染色剤、細胞小器官用のプローブ、細胞形態及び細胞流動の蛍光トレーサ、細胞生存性、細胞増殖及び細胞機能用のプローブ、又は、活性酸素種用プローブであってもよい。最も好ましくは、蛍光マーカーは、アクリジン色素、シアニン色素、フルオロン色素、オキサジン色素、フェナトリジン色素、又は、ローダミン色素である。

【0023】

別の実施形態において、カビへの抗真菌感受性がさらに実行され、アムホテリシン B、ポリコナゾール、及びフルコナゾール等の抗真菌剤の有無とは無関係に、Bactec社のMyco sis IC/Fバイアル又はMGITチューブでカビ胞子を培養し；ポジティブ（蛍光発光）になる時刻がBactec社の装置によって記録される。抗真菌感受性を有する感受性菌株バイアルは、抗真菌感受性を有さないコントロールバイアルと比較してポジティブになるのに、少なくとも2倍の時間がかかる。

【0024】

さらに、本発明の主題は、上述した方法を備える、治療薬に対する抵抗菌を検出するキットである。

【0025】

本発明のもう一つの実施形態において、キットはさらに、治療薬、及び/又は、蛍光マーカーをさらに備える。

【0026】

また、本発明の他の実施形態において、キットはさらに、緩衝剤、溶解剤、及び/又は、培地、及び/又は、酵素阻害剤、及び/又は、コントロール菌株を備えてもよい。

【0027】

10

20

30

40

50

さらに、本発明の主題は、上述の方法を実行するための蛍光デバイスである。蛍光デバイスは、フローサイトメーター又はBACTEC社のMGIT（マイコバクテリア成長インジケータチューブ：Mycobacteria Growth Indicator Tube）である。

【0028】

開示した主題は、コロニー又は生体サンプルから主要な抗菌薬に対する、微生物、すなわち、感染病原体の感受性を評価することを可能にする。そして、真菌類はカビ毎に異なるプロトコルを有する。開示した主題はさらに、様々な生体サンプルにおける、抵抗メカニズムの検出及び薬剤の微生物学的アッセイの定量化ですら可能にする。

【0029】

日常的な臨床検査室で使用される感受性プロファイルのための検査室内方法は、最短でも48時間の時間を要求する。この遅れは、公知の方法が微生物の成長に基づくという事実に起因する。予想以上に、蛍光分析、すなわち、短期間の薬剤への暴露の後、細胞の生理状態の評価に基づくフローサイトメトリーによって、抗菌感受性評価を遅らせる。形態的障害（morphological lesion）又は生理活性の測定は古典的手法では困難である。

【0030】

数多くの研究が微生物学の分野で、特に分子生物学的技術を用いる微生物の特定に関して、行われた。しかしながら、このような技術はゲノムが公知である生物だけに適用できるので、このような技術には限界がある。他の欠点は、非常に費用がかかる点に関する。さらに、分子生物学は非常にごくまれに、特定の遺伝子の存在が特定の薬剤耐性を付与することがごくまれに知られているように分子生物学では、微生物の感受性に関する情報を提供することがごくまれにある。このような直接的な関係は、結核菌の耐性及びスタフィロコッカス・アウレウスでのメチシリンへの耐性に対して、リファンピシンのような特殊な場合で確立している。

【0031】

生成物から直接試験も行える特性は、以下の通りである。

- ・これらの生成物が、フローサイトメトリースクリーニングに対して（好ましくは 10^5 を超える）十分な細胞密度を有するという事実。

- 培養血液が、事前培養に供し、後でポジティブになった際、微生物が感受性試験を実行するのに必要とされる細胞密度となる；

- 尿サンプル、すなわち感染基準は、1 mLにつき 10^5 個を超える細胞密度に相当する。

- ・両生成物において、微生物は、対数期で発見されることが認められる。この点は、幾つかのタイプの抗菌薬の感受性評価がその作用様式のために対数期にある微生物を有する必要があるので、要求される。

【0032】

フローサイトメトリーの革新的利用は、継時的に微生物の細胞集団のマルチパラメータ評価を実行できることあり、微生物の増殖能力の研究と関連付けることである。従来方法によって薬剤の急激な致死活性を立証するために、我々は細胞が増殖できないことを証明しなければならない。フローサイトメトリーによって、我々は、特定の薬剤を用い、数分の培養時間経過後、死滅を意味する、細胞膜の重大な損傷を証明することができる。さらに、作用メカニズム、及びより重要な抵抗メカニズムは、フローサイトメトリーによって調べられる。さらに、このような新規なアプローチは、薬剤組合せの研究を、以前のようなインビトロ（in vitro）での相乗効果の結果を用いることなく重症患者にしばしば利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】フローサイトメトリー前に、陽性の（ポジティブな）培養血液又は尿サンプルから直接、迅速な抗菌感受性評価の方法を説明する図。

【図2】本発明の2つの異なる実施形態の図。供されたポジティブな培養血液又は尿サンプルを用いて、治療薬に対する微生物の感受性を検出する方法と、典型的な感受性及び抵

10

20

30

40

50

抗性を有する菌株を用いて得られた結果を示す。

【図3】2時間の培養時間経過後、FDAで染色した、オキサシリン(MRSA)に対する感受性(MSSA)及び抗性を有するスタフィロコッカス・アウレウスの典型的な実施例のフローサイトメトリーヒストグラム。

【図4】1時間の培養時間経過後、FDAで染色した、バンコマイシンに対する感受性及び抗性を有するエンテロコッカス・フェカリスの典型的な実施例のフローサイトメトリーヒストグラム。

【図5】1時間の培養時間経過後、サイバークリーン(SYBR Green)で染色した、キノロン、すなわちシプロフロキサシンに対する感受性及び抗性を有する大腸菌の典型的な実施例のフローサイトメトリーヒストグラム。

【図6】クラブラン酸(CLA)の有無に関わらずCTXを含むCTX培養物に耐性があり、DiBAC₄(3)で染色された場合の、1時間の培養後、DiBAC₄(3)で染色したセフトキシム(CTX)に対する感受性及び抗性を有する大腸菌の典型的な実施例のフローサイトメトリーヒストグラム。CLAで培養されると、ESBLポジティブ菌株は、感受性菌株として振る舞う。

【図7】アニデュラファンギン、フルコナゾール、又はその両方の混合物を用いて、1時間の培養時間経過後、DiBAC₄(3)で染色した、カンジダ・アルビカンス菌株の典型的な実施例のフローサイトメトリーヒストグラム。aは(抗真菌薬を用いない)コントロール細胞を、C(C1:アニデュラファンギン, C2:フルコナゾール, C3:アニデュラファンギン及びフルコナゾール)は薬剤を用いた培養後の細胞数を示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

添付図面は、発明を説明するために好ましい実施形態を与えるが、本発明の範囲を限定するものとみなすべきではない。

【0035】

従来の感受性判定方法は、固体培地における純粋培地に基づく。微生物の懸濁液は、微生物に応じて、自動化方法(VITEK 1 or VITEK 2 System - BioMerieux社; BD Phoenix System - Becton-Dickinson Biosciences社; MicroScan WalkAway System - Dade Behring社)において適切な感受性カード/パネル(例えば、グラム陽性の桿菌; グラム陽性の球菌; 真菌等)に調製される。

【0036】

他の手動試験は、ブロー大量希釈試験及びブロー微量希釈試験(broth macrodilution and microdilution tests)、E-テスト(E-test)(AB BIODISK社)、ディスク拡散試験(Disc diffusion test)、及び、ドライフォームパネル(TREK Diagnostics社)等を利用できる。

【0037】

上記試験の全ては、様々な抗菌剤の存在下での、微生物の増殖能力の研究に基づく。

【0038】

初めに、最大の欠点は、上記試験が、成長するために少なくとも24時間必要である固体培地におけるコロニーから実行されるということである。利用可能な半自動化方法であるけれども、上記試験は結果を得るのに時間がかかる(最低18~24時間)成長検出法に基づき、非常に経験豊富な人材を必要とし、費用がかかる。

【0039】

[生体分子方法(BioMolecular method)(全ての日常検査では実行されない)]

生体分子方法は、微生物同定と最も関連した微生物学的診断臨床検査の革命であり、ごくまれに感受性評価(マルチプレックスPCR、マイクロアレイ等)に役立つ。

【0040】

実際、抵抗メカニズムにはいくつもの遺伝子が含まれ、後工程に多くの時間をもたらすことになる。通常、遺伝子型と表現型の間に関連性の欠如がある。非常に感受性があり、特異性があるものの、生存能力に関する情報が得られず、高価である。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

[1 . 微生物懸濁液の調整]

[1 . 1 培養血液又は尿サンプル]

ポジティブな培養血液又は尿サンプルから：

- ・ 後に続く解析に導くために、（最大 10 分の）グラム染色又は質量分析（Maldi-TOF）を実行する。このような前工程は、微生物、すなわち、
 - バクテリア：球菌又は桿菌；グラム陽性又はグラム陰性で、検査される抗生物質の選択に繋がる；
 - 真菌

について、不可欠な情報を発明者等に提供し、

- ・ （血液学的な細胞と大きな壊死組織片を取り除くために）濾過し、溶血溶液（ NH_4Cl 、 KHCO_3 、及び EDTA の水溶液）を含むバイアルに、培養血液又は尿を移し、
- ・ 分離リンパ液チューブ（パキュテナーゲルチューブ）に移しかえ、遠心分離機にかける。血液細胞は、ゲルの底部に、微生物がゲルの上部にとどまり、
- ・ 無菌の微生物懸濁液、濾過された培地を作成する。

10

【 0 0 4 2 】

[1 . 2 純粋培地由来]

無菌で濾過されたブロース培地（例えば、ミュラー・ヒントン培地）のコロニーから微生物懸濁液を作成し、対数増殖期まで培養する。

1 . バクテリアが、無菌で濾過された（ $0.22 \mu\text{m}$ ）ミュラー・ヒントンブロース（Difco（登録商標））において、初期の対数増殖期（好ましくは、 600 nm の波長で急吸光度 0.2 ）に到達するまで、 37°C で、1 分間につき 150 ストロークで、バクテリア懸濁液を培養する。

20

2 . ブロース培地を $\text{O.D.} = 0.06$ （フローサイトメーターで読める最適細胞密度である、 1 ml につき略 10^6 細胞数）に希釈し、又は、その代わりに 0.5 （MacFarland）に調整され、その後、好ましくはブロース培地で $1:100$ に希釈される。

【 0 0 4 3 】

[2 . インビトロ抗微生物処理]

- フローサイトメーターによる感受性試験のために、細胞密度、例えば、 10^6 細胞数 / ml を調べる。

30

- （抗菌薬を含まない）コントロールバイアルと、（ブレイクポイント濃度で）様々な抗菌薬を含む一連のバイアルに微生物懸濁液を移し、培養し；

- （ $0.5 \sim 2$ 時間）抗菌薬に応じてバイアルを培養し；

- 事前に最適化されたプロトコルに従って、（抗菌薬に応じて）適切な蛍光色素を添加する。

【 0 0 4 4 】

[3 . フローサイトメトリック分析]

取得設定（Acquisition setting）は、全ての蛍光チャンネルの第 3 常用対数（third logarithmic (log) decade）に電位を調整することによって、微小球サンプルを用いて規定される。FSC 閾値が使用される。サンプルは、蛍光プローブに応じて FL1、FL2、FL3 蛍光チャンネルで分析され、2 つのドットプロット（SSC 対 FSC、及び、SSC 対 蛍光）を使用する。数値結果は、染色した細胞の蛍光強度、及び / 又は、割合を使用して表せられる。装置は、標準フィルター（FL1：BP 530 / 30 nm；FL2：BP 585 / 42 nm；FL3：LP 670 nm）と、 15 mW 488 nm アルゴンレーザとを装備した 3 つの PMT を有し、cell Quest Pro software（version 4.0.2, BD Biosciences 社，シドニー）で操作するフローサイトメーターである（例えば、FACSCalibur BD Biosciences 社，オーストラリア シドニー）。使用したフローサイトメーターデータファイルフォーマットは FCS 2.0^a であった。

40

【 0 0 4 5 】

50

[実施例]

以下の実施例は、好ましい実施形態を提供するが、本発明の範囲を限定するとみなされるべきではない。

【 0 0 4 6 】

[実施例 no . 1]

[キノロンに対する大腸菌の感受性評価]

- ・微生物剤：大腸菌
- ・試験した薬：キノロン - シプロフロキサシン（2つのブレイクポイント濃度：1 $\mu\text{g} / \text{m l}$ 及び 4 $\mu\text{g} / \text{m l}$ ）
- ・使用した蛍光色素：サイバークリーン（SYBR Green）、2本鎖DNA構造に結合する膜浸透性色素

1 . 以下の通り、

- ・シプロフロキサシン 1 $\mu\text{g} / \text{m l}$;
- ・シプロフロキサシン 4 $\mu\text{g} / \text{m l}$;
- ・（シプロフロキサシンを有さない）生育可能なコントロール

を含む一連のバイアルに、1 ml につき 10^6 細胞数の濃度にバクテリア懸濁液を希釈する。

2 . 35 で、1分間につき150ストロークで30分間培養した後、5分間、1000 rpm で一連のバイアルを遠心分離機にかける。

3 . 暗闇の中で30分間、1 : 100000の最終希釈物となるようにサイバークリーンを（TEで調整、pH = 7 . 5）に添加する。

4 . 530 / 30 nm - FL 1でフローサイトメトリック収集を実行し、未処理の細胞と処理された細胞の蛍光強度を比較する。

【 0 0 4 7 】

[結果解釈基準：]

シプロフロキサシンは、DNAジャイレースを阻害することによって作用し、DNA複製をブロックし、蛍光色素のサイバークリーンへのターゲットである1本鎖DNA（less double stranded DNA）に導く。従って、シプロフロキサシンの感受性菌株（MIC値 < 1 $\mu\text{g} / \text{m l}$ ）が（より低い蛍光強度に相当する）2本鎖DNAの削減（reduction）を示すことが期待される。

【 0 0 4 8 】

処理された細胞と未処理の細胞（生育可能なコントロール）の緑色蛍光の強度（530 / 30 nm ; FL - 1）の比率に基づいて増殖能（SI : staining index）を計算する。

- ・シプロフロキサシン 1 $\mu\text{g} / \text{m l}$ で SI < 1 の場合、感受性バクテリア（Susceptible bacteria）

- ・シプロフロキサシン 4 $\mu\text{g} / \text{m l}$ で SI = 1 の場合、耐性バクテリア（Resistant bacteria）

【 0 0 4 9 】

[実施例 no . 2]

[カルバペネムに対するグラム陰性バクテリアの感受性評価]

- ・微生物剤：緑膿菌
- ・試験した薬：カルバペネム - メロペネム（3つのブレイクポイント濃度：1 , 2 及び 4 $\mu\text{g} / \text{m l}$ ）
- ・使用した蛍光色素：ビス（1, 3 - ジブチルバルピツル酸）トリメチンオキソノール（DiBAC₄（3）） - 膜電位測定用の電位感受性親油性アニオン；脱分極させた細胞の蛍光強度が高いほど、分極した細胞はより低い値を示す。

1 . 以下の通り、

- ・メロペネム 1 $\mu\text{g} / \text{m l}$;
- ・メロペネム 4 $\mu\text{g} / \text{m l}$;

・生育可能なコントロール（メロペネム未添加）を含む一連のバイアルに、1 mlにつき 10^6 細胞数の濃度にバクテリア懸濁液を希釈する。

2. 35 で、1分間につき150ストロークで30分間培養した後、暗闇の中で30分間、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終希釈物となるようにDiBAC₄(3)を添加する。

3. 530/30nm-FL1でフローサイトメトリック収集を実行し、未処理の細胞と処理された細胞の蛍光強度を比較する。

【0050】

[結果解釈基準:]

メロペネムは、バクテリア細胞壁のペプチドグリカン層の合成を阻害することによって作用する殺菌剤である。メロペネム細胞膜の脱分極は、感受性菌株でDiBAC₄(3)によって迅速に検出される。脱分極した細胞は蛍光強度が高ければ高いほど、分極した細胞はより低い値を示す。

【0051】

抗菌薬と（未処理の）コントロール細胞での以下の処理が行われた脱分極した細胞の緑色蛍光の強度（530/30nm; FL-1）の比率に基づいて増殖能（SI: staining index）を計算する。

・メロペネム $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ でSI < 1の場合、感受性バクテリア（Susceptible bacteria）

・メロペネム $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ でSI = 1の場合、耐性バクテリア（Resistant bacteria）

【0052】

[実施例 no. 3]

[オキサシリンに対するスタフィロコッカス・アウレウスの感受性評価]

・微生物剤：スタフィロコッカス・アウレウス

・試験した薬：オキサシリン（2つの濃度： $24 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）

・使用した蛍光色素：FDA（フルオレセイン二酢酸）、細胞生存率の蛍光指示薬；エステラーゼによってFDAが加水分解し、生育可能な細胞はフルオレセインを形成する。

1. 以下の通り、

・オキサシリン $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；

・オキサシリン $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；

・生育可能なコントロール（オキサシリン未添加）

を含む一連のバイアルに、1 mlにつき 10^6 細胞数の濃度にバクテリア懸濁液を希釈する。

2. 35 で、120分間培養した後、FDA $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し、同じ条件で60分間培養する。

3. 530/30nm-FL1でフローサイトメトリック収集を実行し、未処理の細胞と処理された細胞の蛍光強度を比較する。

【0053】

[結果解釈基準:]

オキサシリンは、バクテリア細胞壁のペプチドグリカン層の合成を阻害することによって作用する殺菌剤である。従って、オキサシリンに対する感受性菌株（MIC値 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）は、より低い蛍光フルオレセインの強度に対応するように、代謝活性（metabolic activity）の低下を示す。

【0054】

処理された細胞と未処理の細胞（生育可能なコントロール）の緑色蛍光の強度（530/30nm; FL-1）の比率に基づいて増殖能（SI: staining index）を計算する。

・オキサシリン $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ でSI < 1の場合、感受性バクテリア（Susceptible bacteria）

・オキサシリン $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ でSI = 1の場合、耐性バクテリア（Resistant bacteria）

10

20

30

40

50

)

【 0 0 5 5 】

[実施例 no. 4]

[バンコマイシンに対するグラム陽性バクテリアの感受性評価]

・微生物剤：エンテロコッカス・フェカリス
 ・試験した薬：グリコペプチド - バンコマイシン（2つのブレイクポイント濃度：4 μ g / ml 及び 16 μ g / ml）
 ・使用した蛍光色素：FDA（フルオレセイン二酢酸）、細胞生存率の蛍光指示薬；エステラーゼによる加水分解で生育可能な細胞、FDAはフルオレセインを形成し、蛍光発光を増加する。

10

1. 以下の通り、

- ・バンコマイシン 4 μ g / ml ;
- ・バンコマイシン 16 μ g / ml ;
- ・生育可能なコントロール（バンコマイシン未添加）

を含む一連のバイアルに、1 ml につき 10^6 細胞数の濃度にバクテリア懸濁液を希釈する。

2. 35 で、1 分間につき 150 ストロークで、60 分間培養した後、FDA 1 μ g / ml を添加し、同じ条件で 30 分間培養する。

3. 530 / 30 nm - FL 1 でフローサイトメトリック収集を実行し、未処理の細胞と処理された細胞の蛍光強度を比較する。

20

【 0 0 5 6 】

[結果解釈基準：]

バンコマイシンは、バクテリア細胞壁のペプチドグリカン層の合成を阻害することによって作用する殺菌剤である。従って、バンコマイシンに対する感受性菌株（MIC 値 2 μ g / ml）は、より低い蛍光フルオレセインの強度に対応するように、代謝活性の低下を示す。

【 0 0 5 7 】

処理された細胞と未処理の細胞（生育可能なコントロール）の緑色蛍光の強度（530 / 30 nm ; FL - 1）の比率に基づいて増殖能（SI : staining index）を計算する。

30

・バンコマイシン 4 μ g / ml で SI < 1 の場合、感受性バクテリア（Susceptible bacteria）

・バンコマイシン 16 μ g / ml で SI = 1 の場合、耐性バクテリア（Resistant bacteria）

【 0 0 5 8 】

[実施例 no. 5 - 抵抗メカニズムの研究]

[基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（ESBLs）による耐性]

・微生物剤：肺炎桿菌（Klebsiella pneumoniae）
 ・試験した薬：セフトキシム（CTX）、及び、セフトジジム（CAZ）（2つのブレイクポイント濃度：CTX に対して、1 μ g / ml 及び 4 μ g / ml、CAZ に対して、4 μ g / ml 及び 16 μ g / ml）
 ・試験した薬阻害剤：クラブラン酸（CLA） - 4 μ g / ml
 ・使用した蛍光色素：ビス（1,3 - ジブチルバルビツル酸）トリメチンオキシノール（DiBAC₄（3）） - 膜電位測定用の電位感受性親油性アニオン

40

1. 以下の通り、

- ・CTX 1 μ g / ml ;
- ・CTX 4 μ g / ml ;
- ・CTX 1 μ g / ml + CLA 4 μ g / ml ;
- ・CTX 4 μ g / ml + CLA 4 μ g / ml ;
- ・CAZ 4 μ g / ml ;

50

- ・ C A Z 16 μ g / m l ;
- ・ C A Z 4 μ g / m l + C L A 4 μ g / m l ;
- ・ C A Z 16 μ g / m l + C L A 4 μ g / m l ;
- ・ 生育可能なコントロール (セファロスポリン未添加)

を含む一連のバイアルに、1 m l につき 10^6 細胞数の濃度にバクテリア懸濁液を希釈する。

2.35 で、1 分間につき 150 ストロークで、30 分間培養した後、暗闇の中で 30 分間、1 μ g / m l の最終希釈物に D i B A C₄ (3) を添加する。

3. 適切なプロトコルでフローサイトメトリック収集を実行し、530 / 30 nm - F L 1 で読み込む。

【0059】

[結果解釈基準 :]

E S B L s は、セファロスポリン (C T X 及び C A Z) を加水分解させる能力に基づいて検出されるが、クラブラン酸 (C L A) によって阻害される。すなわち、E S B L s が C L A と関連するセファロスポリンへの暴露によって感受性を獲得するとき、E S B L s の生成を介してセファロスポリン耐性バクテリアを検出することが考えられる。

【0060】

C L A の存在の有無と無関係に、最も高い濃度の両セファロスポリン (4 μ g / m l のセフォタキシム (C T X) 及び 16 μ g / m l のセフトジジム (C A Z)) で以下の処理が行われ、脱分極した細胞の緑色蛍光の強度 (530 / 30 nm ; F L - 1) の比率に基づいて増殖能を計算する。このように特殊な場合、C L A 指数と呼ぶ。

- ・ (少なくとも1つのセファロスポリンに対して) C L A 指数 > 1.5 の場合、E S B L 製造バクテリア (ESBL producer bacteria)

- ・ C L A 指数 1.5 の場合、E S B L 産生陰性バクテリア (ESBL negative producer bacteria)

【0061】

[実施例 no. 6]

[酵母菌に対する陽性培養血液由来の薬剤の組合せの感受性評価]

濾過及び溶血剤の使用、又は分離チューブ及び遠心分離器の使用。

- ・ グラム - 酵母菌又はカンジダ・アルピカンスのMaldiTof分析を実行する。
- ・ 試験した薬剤：分離され、関連性のある、アニデュラファンギン及びフルコナゾールの単独及び混合 (anidulafungin and fluconazole isolated and in association)

- ・ 使用した蛍光色素：F U N - 1、酵母菌の生存率を研究するために使用される蛍光マーカー (注：生存能を有さない細胞は、生存能を有する (未処理の) 細胞より高い蛍光強度を示す)

- ・ 単独及び混合と抗真菌薬とを 37 で 60 分間培養した後、暗闇の中で 30 分間、0.5 μ g / m l の最終希釈物となるように F U N - 1 を添加する。

【0062】

575 nm - F L 2 でフローサイトメトリック収集を実行し；蛍光指数 (index of fluorescence) は、抗真菌薬と関連する処理された細胞の蛍光と、抗真菌薬にてそれぞれ単独で処理された細胞の蛍光との割合の合計として計算される。関連性は、相乗的 (synergic)、不関 (indifferent)、又は拮抗 (antagonistic) として分類される。

【0063】

[結果解釈基準 :]

インビトロでの薬剤相互作用の評価は、増殖能 (S I) に従って分析された。S I は、

薬剤の組合せ (0.5 \times M I C の各薬剤) で処理された細胞によって表された平均蛍光強度の合計を、薬剤のみの蛍光で除すことで算出した。従って、

$$S I = (M I F \text{ AND} + F L U / M I F \text{ AND}) + (M I F \text{ AND} + F L U / M I F \text{ F L U})$$

(処理された細胞と生育可能な細胞の平均蛍光強度の間の M I F - 割当)。

10

20

30

40

50

関連性は、 $SI < 1$ に対して「拮抗 (antagonism)」、 $SI = 1 \sim 4$ に対して「不関 (in different)」、 $SI > 4$ に対して「相乗的 (synergy)」として規定された。

【 0 0 6 4 】

[実施例 no. 7]

[アスペルギルス・フミガーツスの抗真菌薬感受性]

- ・アスペルギルス・フミガーツスの高密度懸濁液の調製；
- ・一連のBactec社のMycosis IC/Fバイアル、又は自動化したBactec社の装置 (Becton Dickinson) のMGITチューブでの、 10^7 孢子/mlの培養；
- ・各々は抗真菌薬 (コントロール) を有さない1つのバイアル又はチューブを、アムホテリシンBを有する1つのバイアル又はチューブを、ボサコナゾールを有する1つのバイアル又はチューブを、そして、ボリコナゾールを有する1つのバイアル又はチューブを含み；
- ・バイアル又はチューブは、それぞれのBactec社の装置において培養し、陽性になるまでの時間を記録した。

10

【 0 0 6 5 】

[結果解釈基準：]

抗真菌薬と培養された感受性菌株は、コントロールと比較して、陽性になるまでの時間が2倍以上かかる。MGITチューブは、Bactec社のバイアルより迅速に結果を出す (例．コントロールサンプルは、Bactec社のバイアルで 7 ± 1 時間かかるのに対して、MGITチューブで 11 ± 1 時間かかる)。

20

【 0 0 6 6 】

[実施例 no. 8]

[生体液由来の微生物抗菌性数量化]

- ・定量化したい抗菌剤と培養する場合、公知のフローサイトメトリック線量効果曲線を有するコントロール菌株を使用；
- ・コントロール菌株と微生物サンプルを培養；
- ・抗菌効果を評価する適切な蛍光マーカーで上述の2サンプルをラベルする；
- ・フローサイトメーター蛍光・点在シグナルの取得し、前記微生物のプロファイルを生成する。

【 0 0 6 7 】

[結果解釈基準：]

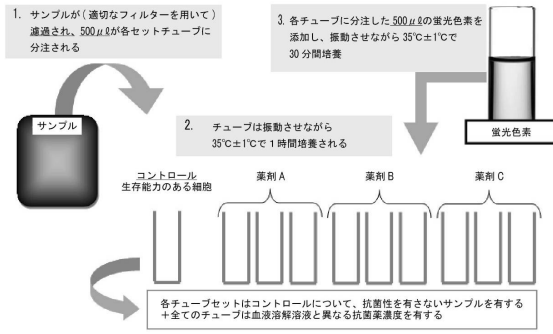
コントロールサンプル曲線と、生成されたフローサイトメトリックプロファイルを比較し、サンプルでの現濃度を推定する。

30

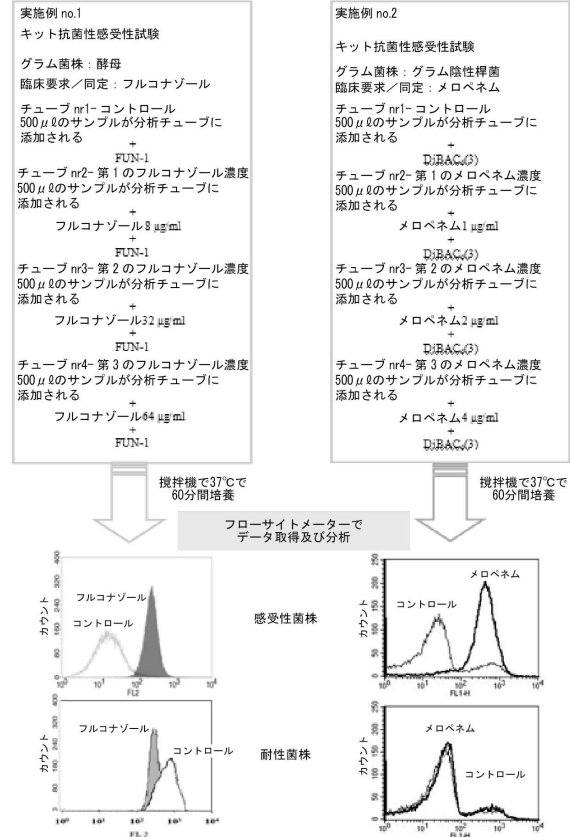
【 0 0 6 8 】

もちろん、本発明は、記載された実施形態に限定されるものではなく、当業者であれば本発明の基本的思想から逸脱することなく、多くの改変を行うことができる。

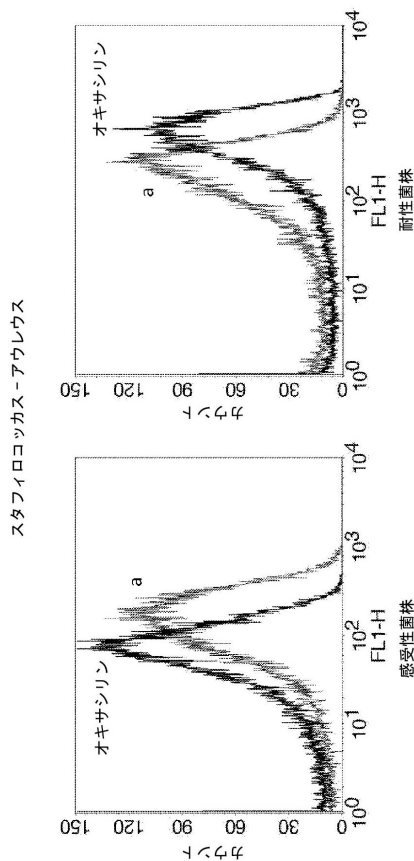
【図 1】



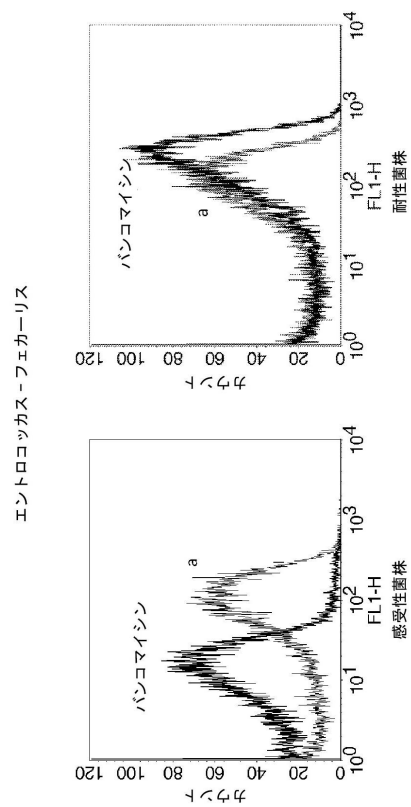
【図 2】



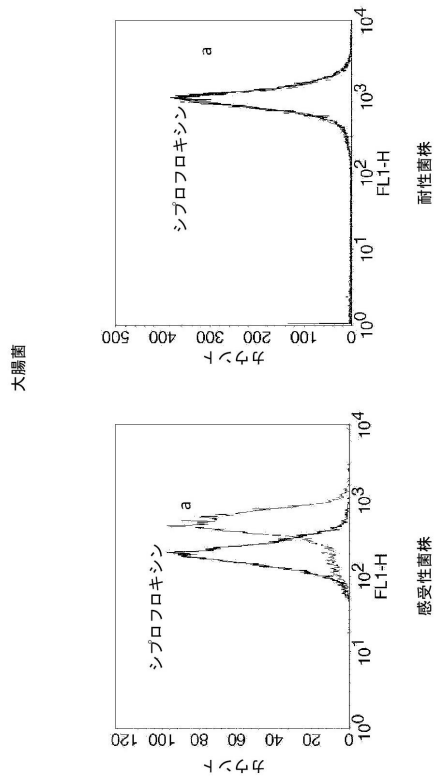
【図 3】



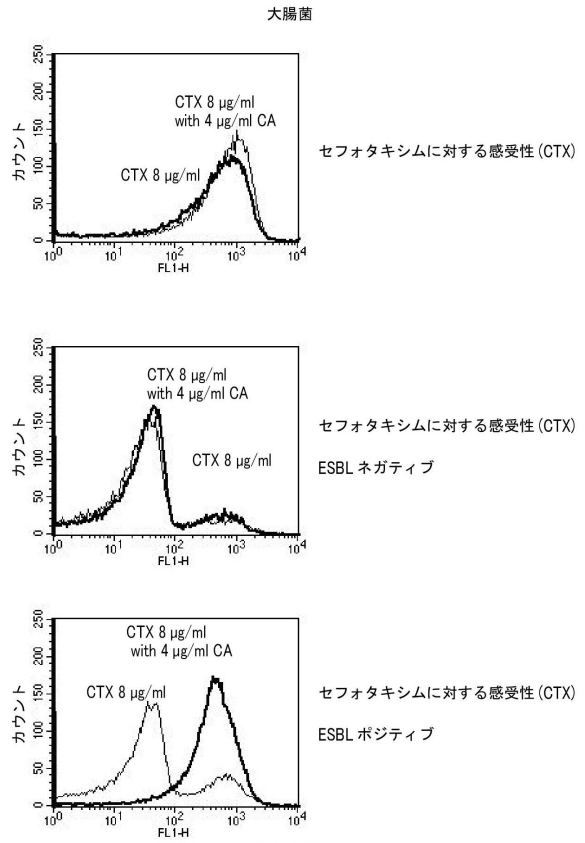
【図 4】



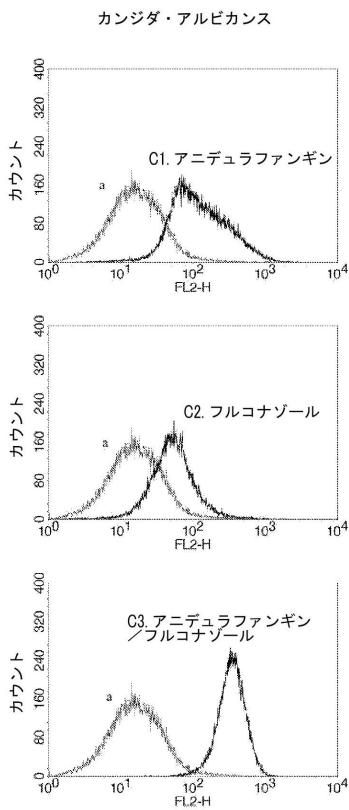
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

- (72)発明者 アゼヴェド・ピーニャ・ヴァス, シダリア・イレネ
 ポルトガル ペー - 4200 - 319 ポルト アラメダ プロフェソール エルナニ モンテイ
 ロ ファクダジ デ メディシナ ダ ウニベルシダージ ド ポルト
- (72)発明者 アゴスティーニョ・ゴンサウヴェス・ロドリゲス, アカシウ
 ポルトガル ペー - 4200 - 319 ポルト アラメダ プロフェソール エルナニ モンテイ
 ロ ファクダジ デ メディシナ ダ ウニベルシダージ ド ポルト
- (72)発明者 サントス・シルヴァ・デ・ファリア・ラモス・アントウネス, イザベル・クリスティーナ
 ポルトガル ペー - 4200 - 319 ポルト アラメダ プロフェソール エルナニ モンテイ
 ロ ファクダジ デ メディシナ ダ ウニベルシダージ ド ポルト
- (72)発明者 ドス・サントス・ロシャ・ド・ロサリオ, リタ・マファルダ
 ポルトガル ペー - 4200 - 319 ポルト アラメダ プロフェソール エルナニ モンテイ
 ロ ファクダジ デ メディシナ ダ ウニベルシダージ ド ポルト
- (72)発明者 キンタ・エ・コスタ・デ・オリヴェイラ・モライス, アナ・ソフィア
 ポルトガル ペー - 4200 - 319 ポルト アラメダ プロフェソール エルナニ モンテイ
 ロ ファクダジ デ メディシナ ダ ウニベルシダージ ド ポルト
- (72)発明者 ピント・エ・シルヴァ, アナ・テレサ
 ポルトガル ペー - 4200 - 319 ポルト アラメダ プロフェソール エルナニ モンテイ
 ロ ファクダジ デ メディシナ ダ ウニベルシダージ ド ポルト

審査官 植原 克典

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第00118274 (EP, A1)
 特表2011-523546 (JP, A)
 特開2008-086279 (JP, A)
 特開2007-093614 (JP, A)
 国際公開第2009/095258 (WO, A1)
 特表昭60-500557 (JP, A)
 JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, 2005年 1月 1日, V54 N1, P77-81
 CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION, 2001年11月 1日, V7 N11, P609-618
 C.Pina-Vaz, et al., J Med Microbiol, 2001, 50, pp375-382
 A.Favel, et al., J Antimicrobial Chemotherapy, 1999, 43, pp227-232
 F.Peyron, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, 41(7), pp1537-1540
 石井良和、モダンメディア、2007年、53巻4号、8 - 14頁
 藤村享滋ら、日本化学療法学会雑誌、2005年、53巻S - 1号、57 - 70頁
 C.Pina-Vaz, et al., J Clin Microbiol, 2004, 42(2), pp906-908
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12Q 1/00 - 3/00
 C12M 1/00 - 3/00
 CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 PubMed