

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年6月18日(18.06.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/122185 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01) *G01N 1/28* (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/048731

(22) 国際出願日: 2019年12月12日(12.12.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2018-233784 2018年12月13日(13.12.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人千葉大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

(72) 発明者: 土田 祥央 (TSUCHIDA, Sachio); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学部附属病院内 Chiba (JP). 村田 正太 (MURATA, Syota); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学部附属病院内 Chiba (JP). 宮部 安規子 (MIYABE, Akiko); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学部附属病院内 Chiba (JP). 佐藤 守 (SATO, Mamoru); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学部附

属病院内 Chiba (JP). 松下一之 (MATSUSHITA, Kazuyuki); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学部附属病院内 Chiba (JP). 野村 文夫 (NOMURA, Fumio); 〒2608677 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学部附属病院内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号 アドレスビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISM IN BLOOD SAMPLE

(54) 発明の名称: 血液試料中の微生物の検出方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method which has excellent simplicity and rapidness and can detect a microorganism in a blood sample with high accuracy. A method comprising the following steps (a) to (c) in this order: (a) subjecting a culture of a blood sample collected from a subject to a centrifugation treatment at a relative centrifugal force of about $213 \times g$ for about 1 minute to separate the culture into a supernatant fraction and a precipitate fraction; (b) producing a microorganism fraction from the supernatant fraction obtained in step (a); and (c) analyzing as to whether or not a microorganism is contained in the microorganism fraction using a mass spectrometer. By employing the method, it becomes possible to detect as to whether or not the subject is infected with a specific microorganism with high accuracy.

(57) 要約: 本発明の課題は、簡便性や迅速性に優れ、かつ、血液試料中の微生物を精度よく検出できる方法を提供することにある。被験者から採取された血液試料の培養物を、 $213 \times g$ 前後の相対遠心力で1分間前後、遠心処理し、上清画分と沈殿画分とに分離する工程(a); 工程(a)で得られた上清画分から微生物画分を得る工程(b); 及び前記微生物画分に微生物が含まれているか否かを、質量分析計を用いて解析する工程(c); の工程(a)~(c)を順次含む方法を用いると、前記被験者が特定の微生物に感染しているか否かを精度よく検出することができる。

DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：血液試料中の微生物の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、被験者由来血液試料中の微生物の有無を検出する方法；被験者由来の、微生物を含む試料を調製する方法；被験者由来血液試料中の微生物の有無を検出するためのシステム（装置等の手段の組合せ、以下同じ）；被験者由来の、微生物を含む試料を調製するためのシステム；及び、微生物を含む試料；に関する。

背景技術

[0002] 微生物感染症、特に敗血症のように、細菌や真菌（以下、「細菌等」ということがある）による重度の感染症の場合、早期に適切な抗菌薬を投与することが、感染症の治癒や良好な予後の面から重要である。細菌等による感染症に対しては、起炎菌を想定し効果のある抗菌薬を選択し、経験的治療が施される。それと同時に、起炎菌を明らかにするための血液培養検査が実施されるが、起炎菌が明らかになるまで数日間を要する。このため、迅速に起炎菌を明らかにし、経験的治療を根拠ある抗菌薬適正使用とすることが求められていた。

[0003] 最近、細菌タンパク質又は全細菌について、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）を用いた質量分析法を行うと、細菌の属、種、及び株固有のバイオマーカーを生成できることが報告されている（特許文献1）。また、尿を2000×gで30秒間の低速回転の遠心処理を行うことにより、細菌と、生体内由来の細胞（白血球）とを比重の違いでそれぞれ上清画分と沈殿画分に分離し、MALDI-TOFMSを用いた質量分析法を行い、細菌を同定する方法が報告されている（非特許文献1）。さらに、比重やサイズが他の細菌よりも大きい連鎖やクラスター形成の著しい細菌は、低速回転の遠心処理では生体内由来の細胞と分離することができないため、遠心処理前に、細菌の連鎖やクラスター形

成を解消することを目的とし、超音波発生装置を使用する方法が知られている（非特許文献2）。

[0004] 一方、本発明者らは、塩化アンモニウムにより溶血処理した被験者由来血液培養物を、細菌を通過させない孔径を有する濾過膜で濾過処理し、濾過膜に捕捉された残渣を回収して得られた残渣試料中の細菌を、質量分析計を用いて解析すると、他の溶血剤（例えば、NP-40、Tween 20、Triton X-100）を用いて溶血処理した場合と比べ、前記残渣試料中に、細菌が含まれているか否かを、感度よく検出することができることを見出している（特願2018-61903）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許第6, 177, 266号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：J Clin Microbiol 48: 2110-2115.

非特許文献2：日本臨床微生物学会誌 Vol. 26 No. 2 79-89
2016

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、簡便性や迅速性に優れ、かつ、血液試料中の微生物を精度よく検出できる方法等を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、溶血剤を用いずに、血液培養物中の微生物と血球成分との分離する方法について検討を行った。高速回転の遠心操作では、多くの細菌は血球成分とともに沈殿するため、両者を分離できないことが予想され、また、低速回転の遠心操作では、前述のとおり、比重やサイズが他の細菌よりも大きい連鎖やクラスター形成の著しい細菌や真菌は、血球成分と分離できないことが懸念されたが、相対遠心力と遠心時間の検討を重ねたところ、血

液培養物を、 $213 \times g$ 前後の相対遠心力で1分間前後、遠心処理すると、遠心処理後の上清画分に細菌（特に、ブドウ球菌属細菌や連鎖球菌属細菌等の連鎖やクラスター形成の著しい細菌）や真菌が含まれているか否かを、質量分析により精度よく検出することができることを見出した。

[0009] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕以下の工程（a）～（c）を含むことを特徴とする、血液試料中の微生物の検出方法。

（a）被験者から採取された血液試料の培養物（以下、「被験者由来血液培養物」ということがある）を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で40～80秒間、遠心処理し、上清画分と沈殿画分とに分離する工程；

（b）工程（a）で得られた上清画分から微生物画分を得る工程；

（c）前記微生物画分に微生物が含まれているか否かを解析する工程；

〔2〕工程（c）において、質量分析計を用いて解析することを特徴とする上記〔1〕に記載の方法。

〔3〕質量分析計が、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）であることを特徴とする上記〔2〕に記載の方法。

〔4〕以下の工程（a）及び（b）を含むことを特徴とする、微生物を含む試料の調製方法。

（a）被験者から採取された血液試料の培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で40～80秒間、遠心処理し、上清画分と沈殿画分とに分離する工程；

（b）工程（a）で得られた上清画分から微生物画分を得る工程；

〔5〕試料が、質量分析用試料であることを特徴とする上記〔4〕に記載の方法。

〔6〕工程（b）において、以下の工程（p）及び（q）を実施することにより微生物画分を得ることを特徴とする上記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

(p) 工程 (a) で得られた上清画分を、微生物を通過させない孔径を有する濾過膜で濾過処理する工程；

(q) 前記濾過処理後の濾過膜に捕捉された残渣を回収し、微生物画分として得る工程；

〔7〕工程 (q) において、濾過処理後の濾過膜を純水中に浸し、遠心分離により残渣を回収し、微生物画分として得ることを特徴とする上記〔6〕に記載の方法。

〔8〕工程 (p) と工程 (q) の間に、濾過処理後の濾過膜を、純水を用いて洗浄する工程 (r) を含むことを特徴とする上記〔6〕又は〔7〕に記載の方法。

〔9〕微生物が、細菌又は真菌であることを特徴とする上記〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の方法。

〔10〕以下の (A) ～ (C) の手段を備えることを特徴とする、血液試料中の微生物の検出システム。

(A) 被験者から採取された血液試料の培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で $40 \sim 80$ 秒間の条件下で、上清画分と沈殿画分とに分離する遠心手段；

(B) 上清画分に基づく、微生物画分の取得手段；

(C) 微生物画分に微生物が含まれているか否かを解析する分析手段；

〔11〕分析手段が、質量分析手段であることを特徴とする上記〔10〕に記載のシステム。

〔12〕質量分析手段が、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) であることを特徴とする上記〔11〕に記載のシステム。

〔13〕以下の (A) 及び (B) の手段を備えることを特徴とする、微生物を含む試料の調製システム。

(A) 被験者から採取された血液試料の培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で $40 \sim 80$ 秒間の条件下で、上清画分と沈殿画分とに分離する遠

心手段；

（Ｂ）上清画分に基づく、微生物画分の取得手段；

〔１４〕試料が、質量分析用試料であることを特徴とする上記〔１３〕に記載のシステム。

〔１５〕微生物画分の取得手段が、微生物を通過させない孔径を有する濾過膜であることを特徴とする上記〔１０〕～〔１４〕に記載のシステム。

〔１６〕微生物が、細菌又は真菌であることを特徴とする上記〔１０〕～〔１５〕のいずれかに記載のシステム。

〔１７〕少なくとも 1×10^5 個のブドウ球菌属細菌を含み、かつ、ヘモグロビンを実質的に含まないことを特徴とする、微生物を含む試料。

〔１８〕質量分析用試料であることを特徴とする上記〔１７〕に記載の試料。

[0010] また本発明の実施の他の形態として、

上記工程（ａ）～（ｃ）を含み、さらに、上記工程（ｃ）の後、前記微生物画分に微生物が含まれていた場合、前記被験者は、前記微生物に感染している可能性が高いと診断し、前記微生物画分に微生物が含まれていない場合、前記被験者は、前記微生物に感染している可能性が低いと診断する工程（ｘ）；を含む、被験者が微生物に感染しているか否かを診断する方法；や、上記工程（ａ）～（ｃ）、及び（ｘ）を含み、さらに、微生物に感染している可能性が高いと診断された被験者に対して、当該微生物に対する抗生物質やワクチン等の薬剤を用いて治療処理を施す工程（ｙ）を含む、被験者が微生物に感染しているか否かを診断し、微生物感染症を予防又は治療する方法；

を挙げることができる。

発明の効果

[0011] 近年、血液培養物の検体数が増加傾向ある状況において、血液培養物を、本発明の方法を用いて、 $213 \times g$ 前後の相対遠心力で１分間前後と比較的短時間、遠心処理することにより、多検体の血液培養物であっても、迅速か

つ効率的に処理することができる。また、上記遠心処理により、血液培養物中の微生物（特に、ブドウ球菌属細菌、連鎖球菌属細菌等の連鎖及び／又はクラスター形成の著しい細菌や真菌）と、血球成分とを精度よく分離することができるため、分離後の微生物を含む上清画分を基に、分析用サンプルを調製し、質量分析計等の分析手段を用いて解析すると、血液培養物中に特定の微生物が含まれているか否かを精度よく判定・評価することができる。特に、溶血剤を用いずに本発明の方法を実施すると、溶血剤により微生物に与えるダメージがないため、より高効率に微生物を回収し、より精度よく微生物を同定することができる。以上のことから、本発明によると、被験者が特定の微生物に感染しているか否かを診断する上で有用なデータを提供することができるため、微生物感染症の診断の他、微生物感染症の早期予防や早期治療が期待される。

[0012] また、本発明において、遠心処理後の微生物を含む上清画分を、微生物を通過させない孔径を有する濾過膜で濾過処理すると、濾過処理は、シリンジを用いた手動操作により行うことが可能であるため、真空ポンプ等の大掛かりな機器がなくても、本発明を実施することができる。

[0013] 敗血症を診断する血液培養検査は、被験者から採取された血液試料を、培養液中で培養し、血液培養物の濁度の変化、細菌等による培養液中のガス発生、pHの変化等を指標にして、1～7日間、細菌等の増殖の有無を確認することから行われる。次いで、細菌等の増殖が確認された場合、血液培養物を採取し、グラム染色とサブカルチャー（二次培養）が行われ、グラム染色による大まかな細菌等の種の分類結果から、経験的治療に使用した抗菌薬の評価が行われる。一方、本発明の検出法を用いると、細菌等を効率よく集菌し、細菌等の種同定を迅速かつ正確に行うことができるため、起炎菌の細菌等の種を正確に同定することが可能となり、抗菌薬適正治療につながる。このため、本発明は、細菌等の感染症患者の予後の改善、耐性細菌等の増加抑制、コスト削減等に貢献できる。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の血液試料中の微生物の検出方法としては、被験者由来血液培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力（RCF；relative centrifugal force；相対遠心加速度ともいう）で40～80秒間、遠心処理し、上清画分と沈殿画分とに分離する工程（a）；前記工程（a）で得られた上清画分から微生物画分を得る工程（b）；及び前記微生物画分に微生物が含まれているか否かを解析する工程（c）；の工程（a）～（c）を順次含む方法（以下、「本件検出法」ということがある）であれば特に制限されず、本件検出法は、前記被験者由来の血液試料中に、微生物が存在するか否かを検出する方法であって、医師による診断行為を含まない。また、本発明の微生物を含む試料の調製方法としては、上記工程（a）及び（b）を順次含み、微生物を含む試料を調製する方法（以下、「本件調製法」ということがある）であれば特に制限されない。なお、本件検出法及び本件調製法を総称して、以下、「本件方法」ということがある。

[0015] 本発明の血液試料中の微生物の検出システムとしては、被験者由来血液培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で40～80秒間の条件下で、上清画分と沈殿画分とに分離する遠心手段（A）；上清画分に基づく、微生物画分の取得手段（B）；及び微生物画分に微生物が含まれているか否かを解析する分析手段（C）；の（A）～（C）の手段を備えるシステム（以下、「本件検出システム」ということがある）であれば特に制限されず、また、本発明の微生物を含む試料の調製システムとしては、上記工程（A）及び（B）の手段を備えるシステム（以下、「本件調製システム」ということがある）であれば特に制限されない。なお、本件検出システム及び本件調製システムを総称して、以下、「本件システム」ということがある。

[0016] 本明細書において、「少なくとも 1×10^5 個のブドウ球菌属細菌」には、例えば、少なくとも 1×10^6 個のブドウ球菌属細菌、少なくとも 1×10^7 個のブドウ球菌属細菌、少なくとも 1×10^8 個のブドウ球菌属細菌等が含まれる。

[0017] 本明細書において、「ヘモグロビンを実質的に含まない」とは、ヘモグロ

ビンをほとんど又は全く含まないことを意味し、より具体的には、微生物を含む試料（すなわち、微生物画分）の一部又は全部を、MALDI-TOF MSを用いた質量分析法を行って検出・定量した場合、1又は2種以上のヘモグロビン由来のピークが、ほとんど検出されないこと（例えば、5 mg/mL以下の検出）又は全く検出されないこと（すなわち、検出感度以下であることを）を意味する。

[0018] 上記被験者としては、特に制限されず、例えば、微生物感染の有無が不明な者（例えば、健常者；がん患者、糖尿病患者等の非微生物感染症患者）や、特定の微生物に感染しているか否かが不明な者（例えば、健常者；敗血症患者、上気道感染症患者等の微生物感染症患者）を挙げることができる。

[0019] [本件方法における工程（a）について]

上記工程（a）において、170～800×gのRCFで40～80秒間、遠心処理を行うことにより、被験者由来血液培養物中に含まれる微生物の一部又は大部分と、血球成分の一部又は大部分とが、それぞれ上清画分と沈殿画分とに分離される。被験者由来血液培養物は任意の遠心機（例えば、遠心管が所定の角度で配置されているアングルロータ式遠心機；や、遠心管の角度が可変であり遠心処理中に遠心管が水平又はほぼ水平にあるスイングロータ式遠心機；）を用いて遠心処理することができる。遠心機は、後述する本実施例で用いたテーブルトップ遠心機4000（久保田商事社製）、ベックマンGPR（himac CF7D2、HITACHI社製）、卓上低速遠心機（LT-015、TOMY社製）等の市販品を用いることができる。そして、本件システムにおける遠心手段としては、被験者由来血液培養物を、170～800×gの相対遠心力で40～80秒間の条件下で、上清画分と沈殿画分とに分離できる手段、例えば、前述した、任意の遠心機や市販品の遠心機を挙げることができる。

[0020] 本明細書において、RCFは、下記式（1）を基に算出することができる。

$$RCF (\times g) = 1118 \times R \times N^2 \times 10^{-8} \dots (1)$$

[式中、「R」は回転半径 (cm) を示し、「N」は1分間当たりの回転数 ($\text{rpm} = \text{min}^{-1}$) を示す。]

[0021] 上記工程 (a) において、式 (1) 中の回転半径 R として、回転軸から遠心処理中の遠心管までの半径のうち、最大となる半径 (すなわち、最大半径 $[R_{\text{max}}]$) と、最小となる半径 (すなわち、最小半径 $[R_{\text{min}}]$) とを基に算出した平均半径 ($R_{\text{av}} = [R_{\text{max}} + R_{\text{min}}] / 2$) の値を用いて、RCF が $170 \sim 800 \times g$ の範囲内となるように回転数 N を設定し、遠心処理を行う。

[0022] 上記RCFとしては、 $170 \sim 800 \times g$ の範囲内であればよく、例えば、 $170 \sim 700 \times g$ 、 $170 \sim 600 \times g$ 、 $170 \sim 500 \times g$ 、 $170 \sim 400 \times g$ 、 $170 \sim 300 \times g$ 、 $170 \sim 250 \times g$ 、 $170 \sim 230 \times g$ 、 $170 \sim 220 \times g$ 、 $175 \sim 800 \times g$ 、 $180 \sim 800 \times g$ 、 $185 \sim 800 \times g$ 、 $190 \sim 800 \times g$ 、 $195 \sim 800 \times g$ 、 $200 \sim 800 \times g$ 、 $175 \sim 700 \times g$ 、 $180 \sim 700 \times g$ 、 $185 \sim 700 \times g$ 、 $190 \sim 700 \times g$ 、 $195 \sim 700 \times g$ 、 $200 \sim 700 \times g$ 、 $175 \sim 700 \times g$ 、 $175 \sim 600 \times g$ 、 $175 \sim 500 \times g$ 、 $175 \sim 400 \times g$ 、 $175 \sim 300 \times g$ 、 $175 \sim 250 \times g$ 、 $175 \sim 230 \times g$ 、 $175 \sim 220 \times g$ 、 $180 \sim 700 \times g$ 、 $180 \sim 600 \times g$ 、 $180 \sim 500 \times g$ 、 $180 \sim 400 \times g$ 、 $180 \sim 300 \times g$ 、 $180 \sim 250 \times g$ 、 $180 \sim 230 \times g$ 、 $180 \sim 220 \times g$ 、 $185 \sim 700 \times g$ 、 $185 \sim 600 \times g$ 、 $185 \sim 500 \times g$ 、 $185 \sim 400 \times g$ 、 $185 \sim 300 \times g$ 、 $185 \sim 250 \times g$ 、 $185 \sim 230 \times g$ 、 $185 \sim 220 \times g$ 、 $190 \sim 700 \times g$ 、 $190 \sim 600 \times g$ 、 $190 \sim 500 \times g$ 、 $190 \sim 400 \times g$ 、 $190 \sim 300 \times g$ 、 $190 \sim 250 \times g$ 、 $190 \sim 230 \times g$ 、 $190 \sim 220 \times g$ 、 $195 \sim 700 \times g$ 、 $195 \sim 600 \times g$ 、 $195 \sim 500 \times g$ 、 $195 \sim 400 \times g$ 、 $195 \sim 300 \times g$ 、 $195 \sim 250 \times g$ 、 $195 \sim 230 \times g$ 、 $195 \sim 220 \times g$ 、 $200 \sim 700 \times g$ 、 $200 \sim 600 \times g$ 、 $200 \sim 500 \times g$ 、 $200 \sim 400 \times g$ 、 $200 \sim 3$

00×g、200～250×g、200～230×g、200～220×g等を挙げることができる。

[0023] 上記工程（a）における遠心処理時間としては、40～80秒間の範囲内であればよく、例えば、40～76秒間、40～73秒間、40～70秒間、40～66秒間、40～63秒間、43～80秒間、46～80秒間、50～80秒間、53～80秒間、56～80秒間、43～76秒間、46～76秒間、50～76秒間、53～76秒間、56～76秒間、43～73秒間、46～73秒間、50～73秒間、53～73秒間、56～73秒間、43～70秒間、46～70秒間、50～70秒間、53～70秒間、56～70秒間、43～66秒間、46～66秒間、50～66秒間、53～66秒間、56～66秒間、43～63秒間、46～63秒間、50～63秒間、53～63秒間、56～63秒間等を挙げることができる。

[0024] 遠心処理中の温度は、通常0～40℃の範囲内であり、室温（例えば、10～30℃）を好適に例示することができる。

[0025] 被験者由来血液培養物は、例えば、被験者から採取された血液試料を、培養温度35℃の条件下で12～48時間培養することにより得ることができる。

[0026] 上記工程（a）における遠心処理により、被験者由来血液培養物中の血球成分（例えば、ヘモグロビン）は、その後の工程（b）及び／又は工程（c）の操作に妨げのならない程度まで除去することができる。このため、上記工程（a）で得られた上清画分を、溶血剤を用いて溶血処理しなくてもよいが、上記工程（a）で得られた上清画分中に含まれるおそれがある血球成分を溶血処理し、血液試料中の微生物の検出精度をより高めるために、上記工程（b）の前に、上記工程（a）で得られた上清画分を、溶血剤と混合し、溶血処理してもよい。また、上記工程（a）において、予め溶血剤で溶血処理した被験者由来血液培養物を遠心処理してもよい。

[0027] 上記溶血剤としては、例えば、本発明者らの先願（特願2018-61903）に記載の塩化アンモニウム他、界面活性剤、低張液等を挙げること

ができる。ここで、塩化アンモニウム以外の溶血剤としては、例えば、界面活性剤、低張液等を挙げることができる。かかる界面活性剤としては、Triton X-100 (Tritonは登録商標) (ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル)、Triton X-114 (ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル)、Triton X-405 (ポリオキシエチレン(40)イソオクチルフェニルエーテル)、NP-40 (Nonidet P-40) (ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル)等のポリオキシエチレンp-t-オクチルフェニルエーテル (Triton系界面活性剤) ; Tween 20 (Tweenは登録商標)、Tween 40、Tween 60、Tween 80、Tween65、Tween 85等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル (Tween系界面活性剤) ; Brij 35 (Brijは登録商標) (ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル)等のポリオキシエチレンアルキルエーテル (Brij系界面活性剤) ; Dodecyl- β -D-maltose ; Octyl- β -D-glucoside等の非イオン性界面活性剤やドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 等の陰イオン性界面活性剤や塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ジデシルジメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド等の陽イオン性界面活性剤やCHAPS (3-(3-cholamidepropyl)dimethylammonio-1-propanesulphonate)、塩化アルキルポリアミノエチルグリシン等の両性界面活性剤を挙げることができる。

[0028] 上記低張液としては、体液 (例えば血漿) や細胞液の浸透圧よりも低くなるようにナトリウムやカリウムなどによって塩や糖濃度等を調整した低張液であれば特に制限されない。本明細書において「低張」とは、浸透圧が250 mOsm/Lよりも低いことを意味する。

[0029] [本件方法における工程 (b) について]

上記工程 (a) で得られた上清画分は、血球成分の一部又は大部分が除去された被験者由来血液培養物である。上記工程 (b) においては、かかる上清画分中に含まれる微生物を分離し、微生物画分 (すなわち、微生物を含む試料) を得る。上清画分から微生物を分離する方法としては、非溶解成分である微生物と、溶解成分とを分離できる方法であればよく、例えば、上記工

程（a）で得られた上清画分を遠心処理により、沈殿画分と、上清画分とに分離し、沈殿画分を微生物画分として得る方法や、上記工程（a）で得られた上清画分を、微生物を通過させない孔径を有する濾過膜で濾過処理する工程（p）と、前記濾過処理後の濾過膜に捕捉された残渣を回収し、微生物画分として得る工程（q）とを実施することにより微生物画分を得る方法を挙げることができ、これらの中でも上記工程（p）及び（q）を実施することにより微生物画分を得る方法を好適に例示することができる。本明細書において、「微生物を含む試料」は、液体試料であっても、固体試料（例えば、液体試料を乾燥処理したもの）であってもよい。そして、本件システムにおける微生物画分の取得手段としては、上清画分から微生物画分を得ることができる手段、例えば、前述した、任意の遠心機や市販品の遠心機や、微生物を通過させない孔径を有する濾過膜を挙げることができ、微生物を通過させない孔径を有する濾過膜を好適に例示することができる。

[0030] 遠心処理により微生物画分を得る場合、上清画分中に含まれる微生物が十分沈殿するように、RCF及び時間を設定し、遠心処理を行う。遠心処理におけるRCFは、例えば、 $3000 \times g$ 以上であり、好ましくは $6000 \times g$ 以上、より好ましくは $9000 \times g$ 以上である。また、遠心時間は、例えば、3分以上であり、好ましくは5分以上、より好ましくは10分以上である。

[0031] [本件方法における工程（p）について]

上記工程（p）の濾過処理により、溶解成分は、濾過膜を通過する。このため、上記工程（a）で得られた上清画分中に微生物が含まれる場合、微生物は、残渣として濾過膜に捕捉され、上記工程（a）で得られた上清画分の溶解成分と分離することができる。

[0032] 上記濾過処理する方法としては、例えば、上記工程（a）で得られた上清画分を、濾過膜を備え、プラスチック、金属、ガラス等の材質により製造された容器内に移し、シリンジ、真空ポンプ、アスピレーター、コンプレッサー等の機器を用いて吸引又は加圧することにより濾過処理する方法や、濾過

膜を備え、プラスチック、金属、ガラス等の材質により製造された遠沈管又は試験管内に移し、遠心することにより濾過処理する方法を挙げることができ、大掛かりな機器を使用しないで、より簡便に濾過処理する観点から、シリンジを手動操作することにより加圧又は減圧し、濾過処理する方法や、遠心することにより濾過処理する方法が好ましい。また、微生物のコンタミネーションを防ぐ観点から、濾過処理は密閉系で行うことが好ましく、濾過膜は、ディスポーザブルのものが好ましい。

[0033] 上記濾過膜の孔径としては、微生物を通過させない孔径であればよく、例えば、微生物が細菌の場合、通常 $1.5\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $1.2\mu\text{m}$ 以下、より好ましくは $0.8\mu\text{m}$ 以下、さらに好ましくは $0.7\mu\text{m}$ 以下、さらにより好ましくは $0.6\mu\text{m}$ 以下、最も好ましくは $0.5\mu\text{m}$ 以下であり、ヘモグロビン等の血球成分による目詰まりを回避する観点から、通常 $0.1\mu\text{m}$ 以上、好ましくは $0.2\mu\text{m}$ 以上、より好ましくは $0.25\mu\text{m}$ 以上、さらに好ましくは $0.3\mu\text{m}$ 以上、さらにより好ましくは $0.35\mu\text{m}$ 以上、最も好ましくは $0.4\mu\text{m}$ 以上である。したがって、細菌の濾過処理に使用する濾過膜の孔径としては、通常 $0.1\sim 1.5\mu\text{m}$ の範囲内、好ましくは $0.2\sim 1.2\mu\text{m}$ 、より好ましくは $0.25\sim 0.8\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $0.3\sim 0.7\mu\text{m}$ 、さらにより好ましくは $0.35\sim 0.6\mu\text{m}$ 、最も好ましくは $0.4\sim 0.5\mu\text{m}$ である。また、微生物が真菌の場合、上記濾過膜の孔径としては、通常 $15\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $12\mu\text{m}$ 以下、より好ましくは $8\mu\text{m}$ 以下、さらに好ましくは $7\mu\text{m}$ 以下、さらにより好ましくは $6\mu\text{m}$ 以下、最も好ましくは $5\mu\text{m}$ 以下であり、ヘモグロビン等の血球成分による目詰まりを回避する観点から、通常 $0.1\mu\text{m}$ 以上、好ましくは $0.2\mu\text{m}$ 以上、より好ましくは $0.25\mu\text{m}$ 以上、さらに好ましくは $0.3\mu\text{m}$ 以上、さらにより好ましくは $0.35\mu\text{m}$ 以上、最も好ましくは $0.4\mu\text{m}$ 以上である。したがって、真菌の濾過処理に使用する濾過膜の孔径としては、通常 $0.1\sim 15\mu\text{m}$ の範囲内、好ましくは $0.2\sim 12\mu\text{m}$ 、より好ましくは $0.25\sim 8\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $0.3\sim 7\mu\text{m}$ 、さら

により好ましくは $0.35 \sim 6 \mu\text{m}$ 、最も好ましくは $0.4 \sim 5 \mu\text{m}$ である。

[0034] 上記濾過膜の材質としては、例えば、セルロース混合エステル(MCE ; Mixed cellulose esters)、ポリビニリデンフロライド(PVDF)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、親水性PTFE、ポリエーテルスルホン(PES)、親水性ポリエーテルスルホン(hydrophilic polyethersulfone)、親水性ポリプロピレン(GHP)、ナイロン(NYL)、セルロースアセテート(CA ; cellulose acetate)、ポリスルフォン(PSF)、アクリル系共重合体(acrylic copolymer)、ポリアミド、ナイロン6, 6、ポリエステル、ポリカーボネート、ニトロセルロース、ニトロセルロースとセルロースエステルの混合物等を挙げることができる。

[0035] [本件方法における工程(q)について]

上記工程(q)において、残渣を回収し、微生物画分として得る方法としては、工程(p)の濾過処理後の濾過膜から、残渣を遊離させ、回収できる方法であればよく、薬さじ等を用いて上記濾過膜に捕捉された残渣を掻き取る方法であってもよいが、残渣に含まれる微生物の回収効率の観点から、上記濾過膜の一部又は全部を純水中に浸し、濾過膜及び／又は純水を攪拌した後、残渣を含む水から遠心分離により残渣を回収する方法が好ましく、ここで遠心分離は、微生物等のコンタミネーションを防ぐ観点から、密閉系で行うことが好ましい。また、残渣を回収する前に、上記濾過膜を、純水を用いて洗浄することが好ましい。洗浄回数としては、少なくとも1回であればよく、複数回(2、3、4回等)であってもよいが、時間対効果及び費用対効果を考慮すると、1回が好ましい。また、濾過膜の洗浄は、工程(p)の濾過処理後の濾過膜に純水を添加し、濾過処理と同様の吸引又は加圧方法により、純水を濾過膜内に通過させることにより行うことができる。

[0036] 本明細書において、「純水」とは、不純物やイオン性物質を除去した水のことを意味し、具体的には、電気伝導率が $24 \sim 26^\circ\text{C}$ 条件下で、 $10 \mu\text{S} / \text{cm}$ 以下の水を意味する。純水は、水道水を、蒸留及び／又はイオン交換

することにより、調製することができる。

[0037] [本件検出法における工程(c)について]

上記工程(c)において、解析する方法としては、微生物の有無を検出・定量できる方法であれば特に制限されず、例えば、質量分析計を用いて解析（より具体的には、微生物由来のタンパク質を検出・定量）する方法；リアルタイムPCR装置、次世代シーケンサー[NGS; Next Generation Sequencer]等のDNA分析手段を用いて解析（より具体的には、微生物由来のゲノムDNAを検出・定量）する方法；近赤外分光測定装置等の成分分析手段を用いて解析（より具体的には、微生物由来の成分を検出・定量）する方法；などを挙げることができ、これらの中でも質量分析計を用いて解析する方法を好適に例示することができる。

[0038] 上記「質量分析計を用いて解析する方法」としては、上記工程(b)で得られた微生物画分を、イオン源を用いて気体状のイオンとし（イオン化）、分析部において、真空中で運動させ電磁気力を用いて、あるいは飛行時間差によりイオン化した微生物画分を質量電荷比に応じて分離し、検出できる質量分析計を用いた解析方法であれば特に制限されない。ここで、イオン源を用いてイオン化する方法としては、電子イオン化(EI)法、化学イオン化(CI)法、電界脱離イオン化(FD)法、高速原子衝撃(FAB)法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法等の方法を適宜選択することができ、また、分析部において、イオン化した微生物画分を分離する方法としては、磁場偏向型、四重極型、イオントラップ型、飛行時間(TOF)型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型等の分離方法を適宜選択することができる。また、2以上の質量分析法を組み合わせたタンデム型質量分析(MS/MS)を利用することができる。また、ガスクロマトグラフィー(GC)や液体クロマトグラフィー(LC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、SBPやメチルシステインを夾雑物から分離・精製して分析することができる。質量分析計としては、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型

質量分析計（MALDI-TOFMS）が好ましい。

[0039] 本明細書において、「次世代シーケンサー」とは、第2世代シーケンサーとも呼称され、数千万のDNA断片のヌクレオチド配列を同時並行的に決定できるヌクレオチド配列決定装置を意味する。次世代シーケンサーにおけるシーケンシング原理としては、例えばブリッジPCR法とSequencing-by-synthesis法により、フローセル上で検出対象のDNAを増幅させ、合成しながらシーケンシングを行うといった原理や、エマルションPCR法とDNA合成時に放出されるピロリン酸の量を測定することで配列決定を行なうパイロシーケンス法とによりシーケンシングを行うといった原理を挙げることができる。次世代シーケンサーとしては、より具体的には、イルミナ（Illumina）社製のMiniSeq、MiSeq、NextSeq、HiSeq及びHiSeq Xシリーズ、ロシュ社製のRoche 454 GS FLXシーケンサー等を挙げることができる。

[0040] 本件システムにおける分析手段としては、微生物画分に微生物が含まれているか否かを解析できる分析手段、例えば、質量分析手段（例えば、前述した質量分析計）、DNA分析手段（例えば、次世代シーケンサー、リアルタイムPCR装置）、分光分析手段（例えば、近赤外分光測定装置）を挙げることができ、質量分析手段が好ましく、MALDI-TOFMSを好適に例示することができる。

[0041] 上記工程（c）において、微生物画分中に微生物が含まれているか否かは、微生物画分から解析に適したサンプルを調製し、解析する。微生物画分における解析対象物としては、微生物における物質（例えば、タンパク質、ペプチド、化合物）であればよく、微生物における発現量が多く；イオン化されやすく；トリプシン等のタンパク質分解酵素によりペプチド断片化処理することなく、分子量が約4000～15,000Daの範囲内でTOFMSに検出されやすい；微生物の種類を判別することができるマススペクトルパターンが、多数の種類の微生物について既に知られている；等の理由から、微生物が、細菌や真菌等の生体外由来の細胞の場合、当該生体外由来の細胞

におけるリボソームタンパク質が好ましい。

[0042] 上記工程（c）において、微生物画分中に特定の微生物が検出された場合、上記被験者は、前記特定の微生物に感染している可能性が高いと診断するためのデータを取得することができ、微生物画分中に特定の微生物が検出されない場合、上記被験者は、前記特定の微生物に感染している可能性が低いと診断するためのデータを取得することができる。このため、本発明の実施の他の形態として、上記工程（a）～（c）を含み、さらに、これらのデータを取得する工程を含む、被験者が微生物に感染しているか否かを診断するためのデータを収集する方法を挙げることができる。

[0043] 上記微生物としては、例えば、細菌、真菌等の生体外由来の細胞やウイルスを挙げることができ、細菌又は真菌を好適に例示することができる。かかる細菌や真菌の具体例としては、例えば、後述する実施例に記載の細菌や真菌を挙げることができる。

[0044] 本発明の「微生物を含む試料」は、調製後の解析（例えば、質量分析、DNA分析、成分分析）用途に用いることができ、質量分析のために用いることが好ましい。

[0045] 本発明において、被験者由来血液培養物を、 $213 \times g$ 前後と比較的弱い相対遠心力で、かつ、1分間前後と比較的短い遠心処理時間で遠心処理を行う。かかる特定の条件での遠心処理により、血液培養物中に含まれる微生物、特に、比重やサイズが他の細菌よりも大きい連鎖及び／又はクラスター形成の著しい細菌（例えば、ブドウ球菌属細菌、連鎖球菌属細菌）や真菌であっても、超音波発生装置を使用して、細菌の連鎖やクラスター形成を解消することなく、血球成分とともに沈殿する菌体数が抑えられ、検出可能な多くの菌体を上清画分に分画することができる。このため、本件方法には、通常、被験者由来血液培養物を、超音波発生装置を使用して処理する工程は含まれず、また、本件システムには、超音波発生手段は含まれない。

[0046] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。なお、本実施例で用いる血液

培養物は、2016年6月～2017年4月の間に、重症感染症患者から採取された血液試料を、培養温度35℃の条件下で12～48時間培養することにより得られた培養物のうち、血液培養自動分析装置（BACTEC FX SYSTEM、BD Bioscience社製）により培養陽性となった培養物（ $n = 120$ ）である。

実施例

[0047] 実施例1．血液培養物の分離条件の検討1

本発明者らは、血液培養物中の細菌と血球成分との分離する場合、相対遠心力が強い高速遠心操作では、菌体が血球成分とともに沈殿画分に分画されることが予想されるため、相対遠心力が比較的弱い（具体的には、相対遠心力が $37 \sim 213 \times g$ ）低速遠心操作での検討を行った。なお、本実施例において、相対遠心力は、回転半径として平均半径（ R_{av} ）の値を用いて算出したものである。

[0048] 1-1 方法

以下の手順〔1〕～〔7〕に従って行った。

〔1〕3 mLの血液培養物を15 mLコニカル管に移し、3 mLのPBS溶液で希釈した後、テーブルトップ遠心機 4000（ロータ半径：13.29、15 mLコニカル管×16チューブラック、スイングロータ、久保田商事社製）を用いて、相対遠心力が5種類の条件（ $213 \times g$ [回転数換算で1200 rpm]、 $148 \times g$ [回転数換算で1000 rpm]、 $95 \times g$ [回転数換算で800 rpm]、 $53 \times g$ [回転数換算で600 rpm]、又は $37 \times g$ [回転数換算で500 rpm]）、室温で1分間、遠心処理した。

〔2〕遠心処理後の上清画分を、孔径が $0.45 \mu m$ の濾過膜（37 mmクオリティモニター [日本PALL社製]）上に添加した。

〔3〕上清画分を、37 mmクオリティモニターに装着したシリンジによる手動操作により濾過した。なお、上記5種類の条件うち、3種類の条件（ $95 \times g$ 、 $53 \times g$ 、及び $37 \times g$ ）下での遠心処理により得られた上清画分

では、濾過処理により濾過膜が目詰まりした。このため、以降の操作は、2種類の条件（ $213 \times g$ 及び $148 \times g$ ）下での遠心処理により得られた上清画分についてのみ行った。

〔4〕 2 mL の蒸留水を 37 mm クオリティモニター上に添加し、37 mm クオリティモニターに装着したシリンジによる手動操作により濾過洗浄した。

〔5〕 洗浄後の 37 mm クオリティモニターを取り出し、1 mL の蒸留水中に浸し、30 秒間ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、遠心処理（ $20630 \times g$ 、3 分間、室温）し、上清を除去した。

〔6〕 得られた沈殿物（すなわち、微生物画分）のうち、数 μg を MALDI サンプルターゲット（Bruker Daltonics 社製）上に載せ、1 μL の 70% ギ酸と、1 μL のマトリックス溶液（2, 5-ジヒドロキシ安息香酸、80 mg/mL、30% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸）を添加し、乾燥処理による結晶化を行った。

〔7〕 乾燥後のサンプルに、 α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA) マトリックス試薬（Bruker Daltonics 社製）を 1 μL 添加し、乾燥後に MALDI-TOF MS (Microflex [Bruker Daltonics 社製]) に導入し、2 重測定を行い、その平均値を算出した。マススペクトルの取得は、Flex Control ソフトウェア（Bruker Daltonics 社製）を用いて行い、リボソームタンパク質のフィンガープリント（マススペクトルパターン）を基にした 3 種類のブドウ球菌属細菌（*S. aureus*、*S. epidermidis*、及び *S. capitis*）の同定は、MALDI バイオタイパー 3.1 ソフトウェア（Bruker Daltonics 社製）を用いて行った。スコア値が 2.0 以上の場合、菌種レベルの一致が高いと評価し、スコア値が 1.7 以上～2.0 未満の場合、属レベルの一致が高いと評価し、スコア値が 1.7 未満の場合、同定不能と評価した。

[0049] 1-2 結果

血液培養物を相対遠心力が $213 \times g$ で 1 分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて上記 3 種類のブドウ球菌属細菌を検出した場合、種

レベル（スコア値 ≥ 2.0 ）の同定確率は100%（7/7）であったのに対して、血液培養物を相対遠心力が $148 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて上記3種類のブドウ球菌属細菌を検出した場合、種レベルの同定確率は0%（0/7）であり、すべて属レベル（ $1.7 \leq$ スコア値 < 2.0 ）での同定にとどまった（表1参照）。

この結果は、血液培養物中に含まれる微生物（特に、ブドウ球菌属細菌等のクラスター形成の著しい細菌）を精度よく検出するためには、血液培養物を1分間前後の時間で遠心処理するときの相対遠心力は、少なくとも $148 \times g$ よりも大きく、かつ $213 \times g$ に近い値とすることが必要であることを示している。

[0050] [表1]

Staphylococcus属細菌	検体	$213 \times g$ の相対遠心力	$148 \times g$ の相対遠心力
S. aureus	1	2.263	1.714
	2	2.293	1.881
	3	2.304	1.721
S. epidermidis	4	2.047	1.879
	5	2.049	1.894
	6	2.051	1.847
S. capitis	7	2.202	1.992

[0051] 実施例2. 血液培養物の分離条件の検討2

血液培養物中の細菌と血球成分との分離する遠心処理条件として、 $213 \times g$ よりも強い相対遠心力（具体的には、 $1337 \times g$ ）について検討を行った。

[0052] 2-1 方法

以下の手順〔1〕～〔7〕に従って行った。

〔1〕3mLの血液培養物を15mLコニカル管に移し、3mLのPBS溶液で希釈した後、テーブルトップ遠心機4000（ロータ半径：13.29、15mLコニカル管×16チューブラック、久保田商事社製）を用いて、相対遠心力が2種類の条件（ $213 \times g$ [回転数換算で1200rpm]、

又は $1337 \times g$ [回転数換算で 3000 rpm])、室温で1分間、遠心処理した。

〔2〕遠心処理後の上清画分を、孔径が $0.45 \mu\text{m}$ の濾過膜 (37 mm クオリティモニター [日本PALL社製]) 上に添加した。

〔3〕上清画分を、 37 mm クオリティモニターに装着したシリンジによる手動操作により濾過した。

〔4〕 2 mL の蒸留水を 37 mm クオリティモニター上に添加し、 37 mm クオリティモニターに装着したシリンジによる手動操作により濾過洗浄した。

〔5〕洗浄後の 37 mm クオリティモニターを取り出し、 1 mL の蒸留水中に浸し、30秒間ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、遠心処理 ($20630 \times g$ 、3分間、室温) し、上清を除去した。

〔6〕得られた沈殿物 (すなわち、微生物画分) のうち、数 μg をMALDIサンプルターゲット (BrukerDaltonics社製) 上に載せ、 $1 \mu\text{L}$ の70%ギ酸と、 $1 \mu\text{L}$ のマトリックス溶液 (2, 5-ジヒドロキシ安息香酸、 80 mg/mL 、30%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸) を添加し、乾燥処理による結晶化を行った。

〔7〕乾燥後のサンプルに、CHCAマトリックス試薬 (Bruker Daltonics社製) を $1 \mu\text{L}$ 添加し、乾燥後にMALDI-TOFMS (Microflex [Bruker Daltonics社製]) に導入し、2重測定を行い、その平均値を算出した。マススペクトルの取得は、Flex Controlソフトウェア (Bruker Daltonics社製) を用いて行い、リボソームタンパク質のフィンガープリント (マススペクトルパターン) を基にした8種類のブドウ球菌属細菌 (*S. aureus*、*S. capitis*、*S. caprae*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. hominis*、*S. lugdunensis*、及び*S. warneri*)、3種類の連鎖球菌属細菌 (*S. dysgalactiae*、*S. mitis*、及び*S. pneumoniae*)、2種類のバクテロイデス属細菌 (*B. fragilis* 及び *B. vulgatus*)、1種類のプロピオニバクテリウム属細菌 (*P. acnes*)、1種類のシトロバクター属細菌 (*C. freundii*)、3種類のエンテロバクタ

一属細菌 (*E. cloacae*、*E. faecalis*、及び *E. faecium*)、1 種類のクロストリジウム属細菌 (*C. septicum*)、1 種類のコリネバクテリウム属細菌 (*C. striatum*)、1 種類のクレブシエラ属細菌 (*K. oxytoca*)、1 種類のプロテウス属細菌 (*P. mirabilis*)、1 種類のプロビデンシア属細菌 (*P. rettgeri*)、及び 1 種類のシュードモナス属細菌 (*P. aeruginosa*) の同定は、MALDI バイオタイパー 3.1 ソフトウェア (Bruker Daltonics 社製) を用いて行った。スコア値が 2.0 以上の場合、菌種レベルの一致が高いと評価し、スコア値が 1.7 以上～2.0 未満の場合、属レベルの一致が高いと評価し、スコア値が 1.7 未満の場合、同定不能と評価した。

[0053] 2-2 結果

上記 8 種類のブドウ球菌属細菌の種レベル (スコア値 ≥ 2.0) の同定確率は、血液培養物を相対遠心力が $213 \times g$ で 1 分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、すべての種において 100% (*S. aureus* [16/16]、*S. capitis* [7/7]、*S. caprae* [4/4]、*S. epidermidis* [13/13]、*S. haemolyticus* [1/1]、*S. hominis* [5/5]、*S. lugdunensis* [2/2]、及び *S. warneri* [1/1]) であったのに対して、血液培養物を相対遠心力が $1337 \times g$ で 1 分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、*S. warneri* では 100% (1/1) であったものの、*S. aureus* では 37.5% (6/16)、*S. capitis* では 28.6% (2/7)、*S. caprae* では 25% (1/4)、*S. epidermidis* では 7.70% (1/13)、*S. haemolyticus* では 0% (0/1)、*S. hominis* では 0% (0/5)、*S. lugdunensis* では 0% (0/2) と大幅に低下していた (表 2 参照)。

[0054] また、上記 3 種類の連鎖球菌属細菌の種レベルの同定確率は、血液培養物を相対遠心力が $213 \times g$ で 1 分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、すべての種において 100% (*S. dysgalactiae* [1/1]、*S. mitis* [1/1]、及び *S. pneumoniae* [2/2]) であったのに対して、血液培養物を相対遠心力が $1337 \times g$ で 1 分間遠心処理するこ

とにより得られた上清画分を用いて検出した場合、すべての種において0% (*S. dysgalactiae* [0/1]、*S. mitis* [0/1]、及び*S. pneumoniae* [0/2])であった(表3参照)。

[0055] また、上記2種類のバクテロイデス属細菌の種レベルの同定確率は、血液培養物を相対遠心力が $213 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、すべての種において100% (*B. fragilis* [1/1] 及び*B. vulgatus* [1/1])であったのに対して、血液培養物を相対遠心力が $1337 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、すべての種において0% (*B. fragilis* [0/1] 及び*B. vulgatus* [0/1])であった(表4参照)。

[0056] また、上記1種類のプロピオニバクテリウム属細菌 (*P. acnes*) の種レベルの同定確率は、血液培養物を相対遠心力が $213 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、100% (1/1)であったのに対して、血液培養物を相対遠心力が $1337 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、0% (0/1)であった(表5参照)。

[0057] また、上記1種類のシトロバクター属細菌 (*C. freundii*) の種レベルの同定確率は、血液培養物を相対遠心力が $213 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、100% (2/2)であったのに対して、血液培養物を相対遠心力が $1337 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、50% (1/2)であった(表6参照)。

[0058] また、上記3種類のエンテロバクター属細菌の種レベルの同定確率は、血液培養物を相対遠心力が $213 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、すべての種において100% (*E. cloacae* [1/1]、*E. faecalis* [2/2]、及び*E. faecium* [1/1])であったのに対して、血液培養物を相対遠心力が $1337 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合、*E. cloacae*の種レベ

ルの同定確率は、100% (1/1) であり、*E. faecalis*の種レベルの同定確率は、100% (2/2) であったものの、*E. faecium*の種レベルの同定確率は、0% (0/1) であった (表7参照)。なお、上記1種類のクロストリジウム属細菌 (*C. septicum*)、上記1種類のコリネバクテリウム属細菌 (*C. striatum*)、上記1種類のクレブシエラ属細菌 (*K. oxytoca*)、上記1種類のプロテウス属細菌 (*P. mirabilis*)、上記1種類のプロビデンシア属細菌 (*P. rettgeri*)、及び上記1種類のシュードモナス属細菌 (*P. aeruginosa*) の種レベルの同定確率は、血液培養物を相対遠心力が $213 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合と、血液培養物を相対遠心力が $1337 \times g$ で1分間遠心処理することにより得られた上清画分を用いて検出した場合とで、ともに100%と変わらなかった (表8～13参照)。

[0059] 以上の結果は、血液培養物中に含まれる微生物 (特に、ブドウ球菌属細菌や連鎖球菌属細菌等の連鎖やクラスター形成の著しい細菌；バクテロイデス属細菌；プロピオニバクテリウム属細菌) を精度よく検出するためには、血液培養物を1分間前後の時間で遠心処理するときの相対遠心力は、少なくとも $1337 \times g$ よりも小さく、かつ $213 \times g$ に近い値とすることが必要であることを示している。

[0060]

[表2-1]

Staphylococcus属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
S. aureus	1	2. 1 4 1	2. 0 3 9
	2	2. 0 7 2	1. 7 5 9
	3	2. 1 3 0	2. 0 1 4
	4	2. 0 8 2	1. 5 1 7
	5	2. 1 1 7	2. 0 5 1
	6	2. 0 3 1	1. 7 7 0
	7	2. 2 3 3	1. 7 7 0
	8	2. 3 9 3	1. 8 4 0
	9	2. 2 3 1	1. 9 3 0
	1 0	2. 2 1 8	2. 0 6 7
	1 1	2. 4 3 6	1. 5 6 7
	1 2	2. 2 1 8	2. 1 9 6
	1 3	2. 2 1 7	2. 0 8 5
	1 4	2. 0 8 5	1. 6 1 9
	1 5	2. 2 4 2	1. 5 1 3
	1 6	2. 0 4 9	1. 9 8 8
S. capitis	1 7	2. 1 0 9	2. 0 6 8
	1 8	2. 0 1 9	1. 8 7 0
	1 9	2. 1 8 6	2. 0 4 6
	2 0	2. 1 0 5	1. 6 3 2
	2 1	2. 1 9 0	1. 8 2 0
	2 2	2. 1 1 5	1. 6 9 0
	2 3	2. 2 0 2	1. 8 2 0
S. caprae	2 4	2. 0 3 1	1. 6 8 0
	2 5	2. 2 7 7	1. 7 2 0
	2 6	2. 3 6 7	2. 0 3 1
	2 7	2. 3 3 4	1. 9 6 0

[0061]

[表2-2]

Staphylococcus属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
S. epidermidis	2 8	2. 0 3 7	1. 9 3 3
	2 9	2. 0 5 4	1. 8 8 0
	3 0	2. 0 1 1	1. 8 9 0
	3 1	2. 0 4 6	1. 4 8 0
	3 2	2. 0 4 2	1. 8 8 6
	3 3	2. 1 9 2	2. 1 3 0
	3 4	2. 0 5 7	1. 9 2 0
	3 5	2. 0 0 8	1. 8 8 0
	3 6	2. 1 8 5	1. 4 0 0
	3 7	2. 0 9 1	1. 0 2 6
	3 8	2. 0 8 8	1. 8 1 0
	3 9	2. 1 3 9	1. 8 9 8
	4 0	2. 0 2 2	1. 8 5 2
S. haemolyticus	4 1	2. 1 1 0	1. 8 2 2
S. hominis	4 2	2. 0 7 3	1. 3 0 0
	4 3	2. 1 8 3	1. 3 0 0
	4 4	2. 0 1 2	1. 6 4 6
	4 5	2. 0 5 2	1. 5 7 0
	4 6	2. 0 8 7	1. 5 7 0
S. lugdunensis	4 7	2. 0 8 1	1. 6 4 0
	4 8	2. 0 8 8	1. 9 8 5
S. warneri	4 9	2. 1 3 3	2. 0 1 2

[0062] [表3]

Streptococcus属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
S. dysgalactiae	1	2. 0 0 4	1. 6 8 0
S. mitis	2	2. 0 1 9	1. 7 1 3
S. pneumoniae	3	2. 0 4 4	1. 5 5 6
	4	2. 1 1 0	1. 6 2 0

[0063] [表4]

Bacteroides属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
B. fragilis	1	2. 3 4 1	1. 8 8 0
B. vulgatus	2	2. 4 6 8	1. 9 1 0

[0064] [表5]

Propionibacterium属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
P. acnes	1	2. 0 5 9	1. 5 2 8

[0065] [表6]

Citrobacter属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
C. freundii	1	2. 0 8 2	1. 8 0 8
	2	2. 0 4 3	2. 0 1 4

[0066] [表7]

Enterobacter属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
E. cloacae	1	2. 2 1 6	2. 1 3 0
E. faecalis	2	2. 2 1 9	2. 1 1 4
	3	2. 2 7 6	2. 1 1 5
E. faecium	4	2. 2 2 0	1. 8 9 0

[0067] [表8]

Clostridium属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
C. septicum	1	2. 2 5 1	2. 1 3 7

[0068] [表9]

Corynebacterium属	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
C. striatum	1	2. 2 5 1	2. 1 3 7

[0069] [表10]

Klebsiella属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
K. oxytoca	1	2. 3 9 7	2. 2 6 4
	2	2. 4 9 5	2. 3 6 7

[0070] [表11]

Proteus属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
P. mirabilis	1	2. 2 4 7	2. 1 4 5

[0071] [表12]

Providencia属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
P. rettgeri	1	2. 3 8 8	2. 0 9 4

[0072] [表13]

Pseudomonas属細菌	検体	2 1 3 × g の相対遠心力	1 3 3 7 × g の相対遠心力
P. aeruginosa	1	2. 2 8 1	2. 0 5 8

[0073] 実施例 3. 本件検出法と従来法との比較

血液培養物を 2 1 3 × g 前後の相対遠心力で 1 分間前後、遠心処理し、微生物画分を調製する本件調製法を用いた場合と、血液培養物を溶血剤により微生物画分を調製する従来法を用いた場合とで、その後の質量分析により検出される微生物レベルに違いがあるかどうかを検討した。

[0074] 3-1 方法

3-1-1 本件検出法

本件調製法は、以下の手順〔1〕～〔5〕に従って行い、その後、以下の手順〔6〕及び〔7〕に従って、本件検出法を行った。

〔1〕 3 mL の血液培養物を 1 5 mL コニカル管に移し、3 mL の P B S 溶液で希釈した後、テーブルトップ遠心機 4 0 0 0（ロータ半径：1 3. 2 9、1 5 mL コニカル管×1 6 チューブラック、久保田商事社製）を用いて、相対遠心力の値が 2 1 3 × g（回転数換算で 1 2 0 0 r p m）、室温で 1 分間の条件下で遠心処理を行った。

〔2〕 遠心処理後の上清画分を、孔径が 0. 4 5 μ m の濾過膜（3 7 m m クオリティモニター〔日本PALL社製〕）上に添加した。

〔3〕 上清画分を、3 7 m m クオリティモニターに装着したシリンジによる手動操作により濾過した。

〔4〕 2 mL の蒸留水を 3 7 m m クオリティモニター上に添加し、3 7 m m クオリティモニターに装着したシリンジによる手動操作により濾過洗浄した。

〔5〕 洗浄後の 3 7 m m クオリティモニターを取り出し、1 mL の蒸留水中に浸し、3 0 秒間ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、遠心処理（2 0 6 3 0 × g、3 分間、室温）し、上清を除去し、沈殿物（すなわち、微生物画分）を得た。

〔6〕得られた沈殿物のうち、数 μg をMALDIサンプルターゲット（BrukerDaltonics社製）上に載せ、 $1\mu\text{L}$ の70%ギ酸と、 $1\mu\text{L}$ のマトリックス溶液（2, 5-ジヒドロキシ安息香酸、 80mg/mL 、30%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸）を添加し、乾燥処理による結晶化を行った。

〔7〕乾燥後のサンプルに、CHCAマトリックス試薬（Bruker Daltonics社製）を $1\mu\text{L}$ 添加し、乾燥後にMALDI-TOFMS（Microflex [Bruker Daltonics社製]）に導入し、2重測定を行い、その平均値を算出した。マススペクトルの取得は、Flex Controlソフトウェア（Bruker Daltonics社製）を用いて行い、リボソームタンパク質のフィンガープリント（マススペクトルパターン）を基にした8種類のブドウ球菌属細菌（*S. aureus*、*S. epidermidis*、*S. capitis*、*S. caprae*、*S. hominis*、*S. haemolyticus*、*S. lugdunensis*、及び*S. warneri*）、5種類の連鎖球菌属細菌（*S. agalactiae*、*S. anginosus*、*S. dysgalactiae*、*S. mitis*、及び*S. sanguinis*）、1種類のブドウ糖非発酵菌（*P. aeruginosa*）、2種類の腸球菌属細菌（*E. faecium*及び*E. faecalis*）、6種類の腸内細菌科に属する細菌（*E. coli*、*E. aerogenes*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis*、*R. ornithinolytica*、及び*C. freundii*）、2種類のバシラス属細菌（*B. cereus*及び*B. Subtilis*）、1種類のコリネバクテリウム属細菌（*C. striatum*）、及び1種類のクロストリジウム属細菌（*C. perfringens*）の同定は、MALDIバイオタイパー3.1ソフトウェア（Bruker Daltonics社製）を用いて行った。スコア値が2.0以上の場合、菌種レベルの一致が高いと評価し、スコア値が1.7以上～2.0未満の場合、属レベルの一致が高いと評価し、スコア値が1.7未満の場合、同定不能と評価した。

[0075] 3-1-2 従来法

従来法は、以下の手順〔1〕～〔6〕に従って行い、その後、以下の手順〔7〕及び〔8〕に従って、細菌の検出を行った。

〔1〕 1mL の血液培養物を 1.5mL チューブに移し、 $200\mu\text{L}$ のSepsi

typer lysis buffer (Bruker社製) と混和した後、卓上マイクロ遠心機セントリック3300 アングルロータ (ロータ半径: 8.20 cm、1.5/2 mL×24本、久保田商事社製) を用いて15000 rpm (20630×g) で2分間遠心処理を行った。

〔2〕遠心処理後の上清画分を除去し、沈殿画分に1 mLのSepsityper Washing buffer (Bruker社製) を加え、混和した後、卓上マイクロ遠心機セントリック3300 アングルロータを用いて15000 rpm (20630×g) で1分間遠心処理を行った。

〔3〕上清画分を除去し、沈殿画分に300 μLの精製水を加え、混和した。

〔4〕900 μLの100%エタノールを加え、混和した後、卓上マイクロ遠心機セントリック3300 アングルロータを用いて15000 rpm (20630×g) で2分間遠心処理を行った。

〔5〕上清画分を除去した後、卓上マイクロ遠心機セントリック3300 アングルロータを用いて15000 rpm (20630×g) で2分間遠心処理を行った。

〔6〕チューブの蓋を開けた状態で5分間乾燥させ、沈殿物 (すなわち、微生物画分) を得た。

〔7〕得られた沈殿物に、30 μLの70%ギ酸及び30 μLのアセトニトリルを添加し、分散・混和した後、卓上マイクロ遠心機セントリック3300 アングルロータを用いて15000 rpm (20630×g) で3分間遠心処理した。

〔8〕上清を回収し、MALDI-TOF MS (Microflex [Bruker Daltonics社製]) に導入し、2重測定を行い、その平均値を算出した。マススペクトルの取得や、細菌種の同定は、上記「3-1-1 本件検出法」の項目の手順〔7〕に記載の方法に従って行った。

[0076] 3-2 結果

上記8種類のブドウ球菌属細菌の種レベル (スコア値 $\geq$ 2.0) の同定確

率は、本件検出法を用いた場合、100% (24/24 ; *S. aureus*では100% [10/10]、*S. epidermidis*では100% [6/6]、*S. capitis*では100% [1/1]、*S. caprae*では100% [1/1]、*S. hominis*では100% [1/1]、*S. haemolyticus*では100% [2/2]、*S. lugdunensis*では100% [2/2]、及び*S. warneri*では100% [1/1])であったのに対して、従来法を用いた場合、58.4% (14/24 ; *S. aureus*では80% [8/10]、*S. epidermidis*では50% [3/6]、*S. capitis*では100% [1/1]、*S. caprae*では0% [0/1]、*S. hominis*では100% [1/1]、*S. haemolyticus*では0% [0/2]、及び*S. warneri*では100% [1/1])であった(表14参照)。なお、微生物画分中に含まれるブドウ球菌属細菌の菌体量は、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 個であった。

[0077] また、上記5種類の連鎖球菌属細菌の種レベルの同定確率は、本件検出法を用いた場合、71.4% (5/7 ; *S. agalactiae*では100% [1/1]、*S. anginosus*では100% [1/1]、*S. dysgalactiae*では100% [2/2]、*S. mitis*では50% [1/2]、及び*S. sanguinis*では0% [0/1])であったのに対して、従来法を用いた場合、42.9% (3/7 ; *S. agalactiae*では100% [1/1]、*S. anginosus*では100% [1/1]、*S. dysgalactiae*では0% [0/2]、*S. mitis*では50% [1/2]、及び*S. sanguinis*では0% [0/1])であった(表15参照)。また、上記5種類の連鎖球菌属細菌の属レベル(スコア値 ≥ 1.7)の同定確率は、本件検出法を用いた場合、100% (7/7 ; *S. agalactiae*では100% [1/1]、*S. anginosus*では100% [1/1]、*S. dysgalactiae*では100% [2/2]、*S. mitis*では100% [2/2]、及び*S. sanguinis*では100% [1/1])であったのに対して、従来法を用いた場合、71.4% (5/7 ; *S. agalactiae*では100% [1/1]、*S. anginosus*では100% [1/1]、*S. dysgalactiae*では50% [1/2]、*S. mitis*では100% [2/2]、及び*S. sanguinis*では0% [0/1])であった(表15参照)。

[0078] また、上記1種類のブドウ糖非発酵菌 (*P. aeruginosa*) の種レベルの同定確率は、本件検出法を用いた場合、100% (1/1) であったのに対して、従来法を用いた場合、0% (0/1) であった (表16参照)。

[0079] また、上記2種類の腸球菌属細菌の種レベルの同定確率は、本件検出法を用いた場合、100% (3/3 ; *E. faecium*では100% [2/2]、及び*E. faecalis*では100% [1/1]) であったのに対して、従来法を用いた場合、66.7% (2/3 ; *E. faecium*では100% [2/2]、及び*E. faecalis*では0% [0/1]) であった (表17参照)。

[0080] また、上記6種類の腸内細菌科に属する細菌の種レベルの同定確率は、本件検出法を用いた場合、100% (17/17 ; *E. coli*では100% [10/10]、*E. aerogenes*では100% [1/1]、*K. pneumoniae*では100% [2/2]、*P. mirabilis*では100% [1/1]、*R. ornithinolytica*では100% [1/1]、及び*C. freundii*では100% [2/2]) であったのに対して、従来法を用いた場合、94.1% (16/17 ; 17/17 ; *E. coli*では100% [10/10]、*E. aerogenes*では100% [1/1]、*K. pneumoniae*では100% [2/2]、*P. mirabilis*では100% [1/1]、*R. ornithinolytica*では100% [1/1]、及び*C. freundii*では50% [1/2]) であった (表18参照)。なお、上記2種類のバシラス属細菌 (*B. cereus*及び*B. Subtilis*)、上記1種類のコリネバクテリウム属細菌 (*C. striatum*)、及び上記1種類のクロストリジウム属細菌 (*C. perfringens*) の種レベルの同定確率は、本件検出法を用いた場合と、従来法を用いた場合とで、ともに100%と変わらなかった (表19~21参照)。

[0081] 以上の結果を総合すると、全細菌の同定率は、従来法を用いた場合、属レベルでは90%、種レベルでは72%にとどまったのに対して、本件検出法を用いた場合、属レベルでは100%、種レベルでは96%と高かった。

また、血球成分の1つであるヘモグロビンは、従来法を用いた場合、検出されたのに対して、本件検出法を用いた場合、検出されなかった (すなわち、検出感度以下であった)。

[0082] 以上の結果は、本件調製法を用いると、従来法を用いた場合と比べ、血液培養物中の微生物（特に、ブドウ球菌属細菌や連鎖球菌属細菌等の連鎖やクラスター形成の著しい細菌）を効率よく回収することができ、その結果、当該微生物を高い精度で検出できることを示す。また、本件調製法は、従来法とは異なり、溶血剤を用いることなく、1分前後と比較的短時間の遠心処理により、血球成分と微生物とを分離することができ、その後の微生物画分の調製も比較的短時間でを行うことができるため、簡便性及び迅速性にも優れていることを示している。

[0083] [表14]

Staphylococcus属細菌	検体数	本件検出法のスコア値			従来技術の検出法のスコア値		
		≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7	≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7
S. aureus	10	10	0	0	8	0	2
S. epidermidis	6	6	0	0	3	2	1
S. capitis	1	1	0	0	1	0	0
S. caprae	1	1	0	0	0	1	0
S. hominis	1	1	0	0	1	0	0
S. haemolyticus	2	2	0	0	0	2	0
S. lugdunensis	2	2	0	0	0	1	1
S. warneri	1	1	0	0	1	0	0
合計	24	24	0	0	14	6	4

[0084] [表15]

Streptococcus属細菌	検体数	本件検出法のスコア値			従来技術の検出法のスコア値		
		≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7	≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7
S. agalactiae	1	1	0	0	1	0	0
S. anginosus	1	1	0	0	1	0	0
S. dysgalactiae	2	2	0	0	0	1	1
S. mitis	2	1	1	0	1	1	0
S. sanguinis	1	0	1	0	0	0	1
合計	7	5	2	0	3	2	2

[0085] [表16]

ブドウ糖非発酵菌	検体数	本件検出法のスコア値			従来技術の検出法のスコア値		
		≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7	≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7
P. aeruginosa	1	1	0	0	0	1	0
合計	1	1	0	0	0	1	0

[0086] [表17]

Enterococcus属細菌	患者数	本件検出法のスコア値			従来技術の検出法のスコア値		
		≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7	≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7
E. faecium	2	2	0	0	2	0	0
E. faecalis	1	1	0	0	0	1	0
合計	3	3	0	0	2	1	0

[0087] [表18]

腸内細菌科に属する細菌	検体数	本件検出法のスコア値			従来技術の検出法のスコア値		
		≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7	≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7
E. coli	10	10	0	0	10	0	0
E. aerogenes	1	1	0	0	1	0	0
K. pneumoniae	2	2	0	0	2	0	0
P. mirabilis	1	1	0	0	1	0	0
R. ornithinolytica	1	1	0	0	1	0	0
C. freundii	2	2	0	0	1	1	0
合計	17	17	0	0	16	1	0

[0088] [表19]

Bacillus属細菌	検体数	本件検出法のスコア値			従来技術の検出法のスコア値		
		≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7	≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7
B. cereus	2	2	0	0	2	0	0
B. Subtilis	3	3	0	0	3	0	0
合計	5	5	0	0	5	0	0

[0089] [表20]

Corynebacterium属細菌	検体数	本件検出法のスコア値			従来技術の検出法のスコア値		
		≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7	≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7
C. striatum	2	2	0	0	2	0	0
合計	2	2	0	0	2	0	0

[0090] [表21]

Clostridium属細菌	検体数	本件検出法のスコア値			従来技術の検出法のスコア値		
		≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7	≥ 2. 0	1. 7 ~ 2. 0	< 1. 7
C. perfringens	1	1	0	0	1	0	0
合計	1	1	0	0	1	0	0

[0091] 実施例4．本件検出法を用いた真菌の検出

実施例3に記載の本件検出法を用いて、血液培養物中に含まれる3種類の真菌（カンジダ・アルビカンス [Candida albicans]、カンジダ・グラブラータ [Candida glabrata]、カンジダ・トロピカリス [Candida tropicalis]）を検出したところ、種レベルの同定確率は75%（Candida albicansでは67% [2/3]、Candida glabrataでは75% [3/4]、及びCandida tropicalisでは100% [1/1]）と高かった（表22参照）。

この結果は、本件検出法により、細菌よりも比重やサイズが大きい真菌についても同様に、精度よく検出できることを示している。

[0092] [表22]

Candida 属真菌	検体数	本件検出法のスコア値		
		≥ 2.0	1.7 ~ 2.0	< 1.7
Candida albicans	3	2	1	0
Candida glabrata	4	3	1	0
Candida tropicalis	1	1	0	0
合計	8	6	2	0

産業上の利用可能性

[0093] 本発明は、被験者における微生物（特に、ブドウ球菌属細菌や連鎖球菌属細菌等の連鎖やクラスター形成の著しい細菌や真菌）の感染症の診断や、当該感染症の早期予防又は早期治療に資するものである。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程（a）～（c）を含むことを特徴とする、血液試料中の微生物の検出方法。
- （a）被験者から採取された血液試料の培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で40～80秒間、遠心処理し、上清画分と沈殿画分とに分離する工程；
- （b）工程（a）で得られた上清画分から微生物画分を得る工程；
- （c）前記微生物画分に微生物が含まれているか否かを解析する工程；
- [請求項2] 工程（c）において、質量分析計を用いて解析することを特徴とする請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 質量分析計が、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）であることを特徴とする請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 以下の工程（a）及び（b）を含むことを特徴とする、微生物を含む試料の調製方法。
- （a）被験者から採取された血液試料の培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で40～80秒間、遠心処理し、上清画分と沈殿画分とに分離する工程；
- （b）工程（a）で得られた上清画分から微生物画分を得る工程；
- [請求項5] 試料が、質量分析用試料であることを特徴とする請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 工程（b）において、以下の工程（p）及び（q）を実施することにより微生物画分を得ることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の方法。
- （p）工程（a）で得られた上清画分を、微生物を通過させない孔径を有する濾過膜で濾過処理する工程；
- （q）前記濾過処理後の濾過膜に捕捉された残渣を回収し、微生物画

分として得る工程；

[請求項7] 工程（q）において、濾過処理後の濾過膜を純水中に浸し、遠心分離により残渣を回収し、微生物画分として得ることを特徴とする請求項6に記載の方法。

[請求項8] 工程（p）と工程（q）の間に、濾過処理後の濾過膜を、純水を用いて洗浄する工程（r）を含むことを特徴とする請求項6又は7に記載の方法。

[請求項9] 微生物が、細菌又は真菌であることを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載の方法。

[請求項10] 以下の（A）～（C）の手段を備えることを特徴とする、血液試料中の微生物の検出システム。

（A）被験者から採取された血液試料の培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で40～80秒間の条件下で、上清画分と沈殿画分とに分離する遠心手段；

（B）上清画分に基づく、微生物画分の取得手段；

（C）微生物画分に微生物が含まれているか否かを解析する分析手段；

[請求項11] 分析手段が、質量分析手段であることを特徴とする請求項10に記載のシステム。

[請求項12] 質量分析手段が、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）であることを特徴とする請求項11に記載のシステム。

[請求項13] 以下の（A）及び（B）の手段を備えることを特徴とする、微生物を含む試料の調製システム。

（A）被験者から採取された血液試料の培養物を、 $170 \sim 800 \times g$ の相対遠心力で40～80秒間の条件下で、上清画分と沈殿画分とに分離する遠心手段；

（B）上清画分に基づく、微生物画分の取得手段；

- [請求項14] 試料が、質量分析用試料であることを特徴とする請求項13に記載のシステム。
- [請求項15] 微生物画分の取得手段が、微生物を通過させない孔径を有する濾過膜であることを特徴とする請求項10～14に記載のシステム。
- [請求項16] 微生物が、細菌又は真菌であることを特徴とする請求項10～15のいずれかに記載のシステム。
- [請求項17] 少なくとも 1×10^5 個のブドウ球菌属細菌を含み、かつ、ヘモグロビンを実質的に含まないことを特徴とする、微生物を含む試料。
- [請求項18] 質量分析用試料であることを特徴とする請求項17に記載の試料。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/048731

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/34 (2006.01)i; G01N 27/62 (2006.01)i; C12Q 1/04 (2006.01)i; G01N 1/28 (2006.01)i; G01N 33/48 (2006.01)i; G01N 33/569 (2006.01)i
FI: C12Q1/04; G01N27/62 V; G01N33/569 B; G01N33/48 C; G01N27/62 G;
C12M1/34 B; G01N1/28 J

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/34; G01N27/62; C12Q1/04; G01N1/28; G01N33/48; G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2012-526996 A (BIOMERIEUX, INC,) 01.11.2012 (2012-11-01) claims 1, 4, paragraphs [0058], [0104]	10-16
Y	paragraph [0058]	1-18
X	ASHIZAWA, K. et al., "Applications of copolymer for rapid identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry", J. Microbiol. Methods, 2017, vol. 139, pp. 54-60 abstract, page 55, left column, "2.1. Preparation of model samples", page 55, right column, "2.2. Selection of appropriate polyallylamine and reaction conditions"	17-18
A		1-16
Y	US 2013/0089886 A1 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 11.04.2013 (2013-04-11) example 1, paragraphs [0030], [003I], [0033], table 1	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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 application or patent 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
28 February 2020 (28.02.2020)

Date of mailing of the international search report
17 March 2020 (17.03.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/048731

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERNHARDT, M. et al., "Detection of bacteria in blood by centrifugation and filtration", J. Clin. Microbiol., 1991, vol. 29, no. 3, pp. 422-425 abstract, fig. 1	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/048731

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2012-526996 A	01 Nov. 2012	US 2010/0291669 A1 claims 1, 4, paragraphs [0149], [0216]	
US 2013/0089886 A1	11 Apr. 2013	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/34(2006.01)i; G01N 27/62(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; G01N 1/28(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i FI: C12Q1/04; G01N27/62 V; G01N33/569 B; G01N33/48 C; G01N27/62 G; C12M1/34 B; G01N1/28 J		
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）） C12M1/34; G01N27/62; C12Q1/04; G01N1/28; G01N33/48; G01N33/569 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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年 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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
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 請求項の番号
X	JP 2012-526996 A (バイオメリユー・インコーポレイテッド) 01.11.2012 (2012-11-01)	10-16
Y	請求項1, 4, 段落[0058], [0104] 段落[0058]	1-18
X	ASHIZAWA K. et al., Applications of copolymer for rapid identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, J. Microbiol. Methods, 2017, Vol.139, pp.54-60 要約, 55ページ左欄「2.1. Preparation of model samples」, 55ページ右欄「2.2. Selection of appropriate polyallylamine and reaction conditions」	17-18
A		1-16
Y	US 2013/0089886 A1 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 11.04.2013 (2013-04-11) 実施例1, 段落[0030], [0031], [0033], 表1	1-18
Y	BERNHARDT M. et al., Detection of bacteria in blood by centrifugation and filtration, J. Clin. Microbiol., 1991, Vol.29, No.3, pp.422-425 要約, 図1	1-18
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ 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 “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 “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 “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） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “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 “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 “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 28.02.2020		国際調査報告の発送日 17.03.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 市島 洋介 4N 5804 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2019/048731

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2012-526996	A	01.11.2012	US 2010/0291669 A1 請求項1, 4, 段落[0149], [0216]	
US	2013/0089886	A1	11.04.2013	(ファミリーなし)	