(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-524814
(P2013-524814A)
(43)公表日　平成25年6月20日(2013.6.20)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12Q 1/02	**(2006.01)**	C12Q 1/02		2G045
G01N 33/50	**(2006.01)**	G01N 33/50	P	4B024
G01N 33/543	*(2006.01)*	G01N 33/543	541A	4B063
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12N 15/00	A	
C12Q 1/68	*(2006.01)*	C12Q 1/68	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 19 頁）

(21)出願番号　特願2013-506301(P2013-506301)
(86)(22)出願日　平成23年4月21日(2011.4.21)
(85)翻訳文提出日　平成24年11月26日(2012.11.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/033410
(87)国際公開番号　WO2011/133759
(87)国際公開日　平成23年10月27日(2011.10.27)
(31)優先権主張番号　61/326,588
(32)優先日　平成22年4月21日(2010.4.21)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　512271309
ナノマー，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニューメキシコ　８７１０６，　アルバカーキ，　レナード　プレイス　エスイー　２３０５，　スイート　１１０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　エッシュ，　ビクター　シー．
アメリカ合衆国　ニューメキシコ　８７１１１，　アルバカーキ，　キャニオン　ビスタ　ドライブ　エヌイー　５８０８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】試料からの低濃度の細菌の抽出

(57)【要約】
本発明は、試料について、試料から細菌を単離するアッセイを実行することに一般に関し、そこで、アッセイは試料中の約１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離する。本発明の方法は、標的特異的結合部分を含む磁気粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、この混合物をインキュベートして上記粒子を標的に結合させること、磁場を加えて表面上に標的／磁気粒子複合体を捕捉すること、および粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄し、それによって標的／磁気粒子複合体を単離することを含むことができる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料から細菌を単離するための方法であって、
細菌を含む試料を得る工程と；
前記試料について、前記試料から前記細菌を単離するアッセイを実行する工程であって、前記アッセイは、前記試料中の約１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離する工程と
を含む、方法。
【請求項２】
前記試料がヒトの組織または体液である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記体液が血液である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記細菌が血液由来細菌である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記試料が食物試料である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記細菌が食物由来細菌である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記細菌を特徴づける工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
特徴づける工程が前記細菌を同定する工程を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
同定する工程が前記細菌に由来する核酸を配列決定する工程、または前記細菌に由来する核酸を増幅する工程から選択される、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記細菌がグラム陽性細菌である、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記細菌がグラム細菌である、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
試料から細菌を単離するための方法であって、
細菌を含む試料を得る工程と；
前記試料から前記細菌を単離するために磁気粒子を用いてアッセイを行う工程であって、前記磁気粒子は、前記アッセイが前記試料中の約１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離するようなサイズであり、かつそのような量の磁性材料を含む工程と
を含む、方法。
【請求項１３】
前記磁気粒子が細菌特異的結合部分を含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記細菌特異的結合部分が抗体である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記試料がヒトの組織または体液である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１６】
前記体液が血液である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記細菌が血液由来細菌である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記試料が食物試料である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１９】
前記細菌が食物由来細菌である、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】
前記細菌を特徴づける工程をさらに含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項２１】
特徴づける工程が、前記細菌を同定する工程を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
同定する工程が、前記細菌に由来する核酸を配列決定する工程、または前記細菌に由来する核酸を増幅する工程から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記細菌がグラム陽性細菌である、請求項１２に記載の方法。
【請求項２４】
前記細菌がグラム細菌である、請求項１２に記載の方法。
【請求項２５】
試料から細菌を単離するための方法であって、
細菌を含む試料を得る工程と；
前記試料から前記細菌を単離するために磁気粒子を用いてアッセイを行う工程であって、前記磁気粒子は、前記試料中の約１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌の単離を可能にする磁気モーメントを有する工程と
を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、２０１０年４月２１日に出願された米国仮特許出願第６１／３２６，５８８号の利益および優先権を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。
【０００２】
発明の分野
本発明は、試料について、試料から細菌を単離するアッセイを実行することに一般に関し、そこで、アッセイは試料中の約１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離する。
【背景技術】
【０００３】
背景
血液由来病原体は、健康管理上重要な問題である。細菌感染症の診断の遅れまたは不適切な診断は、感染への重大でしばしば致命的な炎症性応答である敗血症をもたらすことがある。敗血症は、米国で１０番目の主要な死因である。血液中の細菌感染症の早期発見は、敗血症の開始の阻止での鍵である。血液由来感染症の伝統的な検出および同定の方法には、血液培養および抗生物質感受性アッセイが含まれる。それらの方法は細胞を培養することを一般に必要とし、それは費用がかかり、７２時間という長い時間を要することがある。細胞培養結果が得られる前に敗血症性ショックが起こることがしばしばある。
【０００４】
病原体、特に細菌の検出のための代替方法は、他の者によって記載されている。それらの方法には、分子検出方法、抗原検出方法および代謝産物検出方法が含まれる。ハイブリッド捕捉またはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を含むかどうかにかかわらず、分子検出方法は検出のために高濃度の精製されたＤＮＡを必要とする。抗原検出および代謝産物検出方法の両方も比較的多量の細菌を必要として高い検出限界（通常＞１０^{4}ＣＦＵ／ｍＬ）を有し、したがって検出の前に濃縮工程を必要とする。このインキュベーション／濃縮期間は、同定をより容易に助けるために、細菌の増殖および細菌細胞数の増加を可能にすることを目的とする。多くの場合では、標的細菌を単離するために一連の２つまたは３つの別々のインキュベーションが必要である。しかし、そのような濃縮工程はかなりの時間（例えば、少なくとも数日から一週間）を必要とし、測定しようとする細胞のいくつかを

死滅させることによって試験感度を損なう可能性がある。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
追加の濃縮工程なしで、血液試料などの試料から細菌などの標的分析物を単離するための方法の必要性がある。患者処置の決定のためのデータを、臨床的に妥当な時間枠内で提供するために、速くて感度が高い標的分析物の単離方法の必要性がさらにある。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
要旨
本発明は、生物試料中の病原体を単離するための方法およびデバイスを提供する。本発明は、試料中の非常に低いレベルでの病原体の急速な検出を可能にし、したがって、病原体の早期発見および正確な検出および同定を可能にする。特定の態様では、本発明は、標的特異的結合部分を有する磁気粒子を用いて実施される。本発明の方法は、標的特異的結合部分を含む磁気粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、この混合物をインキュベートして上記粒子を標的に結合させること、磁場を加えて表面上に標的／磁気粒子複合体を捕捉すること、および粒子凝集を低減する洗浄溶液で洗浄し、それによって標的／磁気粒子複合体を単離することを含むことができる。本発明の方法の特別な利点は、多くの臨床試料に存在する低い濃度（血液試料に１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌）での、血液試料からの細菌および真菌の直接的な捕捉および単離についてのものである。
【０００７】
標的特異的結合部分は、捕捉する標的によって決まる。この部分は、当該分野で公知の任意の捕捉部分、例えば抗体、アプタマー、核酸、タンパク質、受容体、ファージまたはリガンドであってよい。特定の実施形態では、標的特異的結合部分は抗体である。ある実施形態では、抗体は細菌に特異的である。他の実施形態では、抗体は真菌に特異的である。
【０００８】
標的分析物とは、本発明の方法によって捕捉および単離される標的を指す。標的は、当該分野で公知である細菌、真菌、タンパク質、細胞、ウイルス、核酸、受容体、リガンドまたは任意の分子であってよい。ある実施形態では、標的は病原性細菌である。他の実施形態では、標的はグラム陽性細菌またはグラム陰性細菌である。本発明の方法によって捕捉および単離することができる例示的な細菌種には、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ、Ｂｏｒｒｅｌｉａ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓおよびそれらの組合せが含まれる。
【０００９】
本発明の方法は、任意の種類の磁気粒子を用いて実施することができる。磁気粒子は、２つの広いカテゴリーに一般に分類される。第一のカテゴリーには、永久に磁化可能であるか、強磁性である粒子が含まれ；第二のカテゴリーには、磁場にさらされるときだけバルク磁性挙動を示す粒子が含まれる。後者は、磁気応答粒子と呼ばれる。磁気応答挙動を示す材料は、超常磁性と時々記載される。しかし、バルク強磁性特性を示す材料、例えば磁性酸化鉄は、直径約３０ｎｍ以下の結晶で提供されるとき、超常磁性と特徴づけることができる。強磁性材料のより大きな結晶は、対照的に磁場への曝露の後に永久磁石の特徴を保持し、強力な粒子間相互作用のためにその後凝集する傾向がある。ある実施形態では、粒子は超常磁性ビーズである。他の実施形態では、磁気粒子は少なくとも７０重量％の超常磁性ビーズを含む。ある実施形態では、超常磁性ビーズは、直径が約１００ｎｍから約２５０ｎｍである。ある実施形態では、磁気粒子は鉄含有磁気粒子である。他の実施形態では、磁気粒子は酸化鉄または白金鉄を含む。
【００１０】

ある実施形態では、インキュベーション工程は、細胞溶解を阻害するバッファー中で混合物をインキュベートすることを含む。ある実施形態では、バッファーは、約５０ｍＭから約１００ｍＭの間、好ましくは約７５ｍＭの濃度のトリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン塩酸塩を含む。他の実施形態では、本発明の方法は、洗浄工程の間、磁気粒子を磁場に保持することをさらに含む。本発明の方法は、任意の体液で用いることができる。例示的な体液には、血液、痰（ｓｐｕｔｕｍ）、血清、血漿、尿、唾液、汗および脳脊髄液が含まれる。

【００１１】

本発明の別の態様は、体液試料から標的微生物を単離するための方法であって、標的特異的結合部分を有する磁気粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、この混合物をインキュベートして粒子を標的に結合させること、標的が結合している磁気粒子を表面上に単離するために磁場を加えること、粒子凝集を低減する洗浄溶液中で混合物を洗浄すること、および捕捉された細菌を溶解して、ＰＣＲ、マイクロアレイハイブリダイゼーションまたは配列決定によるさらなる分析のためにＤＮＡを抽出することを含む方法を提供する。

【００１２】

本発明の別の態様は、血液試料中の１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離するための方法であって、約１００ｎｍから約２５０ｎｍの直径を有し、細菌特異的結合部分を有する超常磁性粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、上記混合物をインキュベートして上記粒子を細菌に結合させること、細菌／磁気粒子複合体を表面上に単離するために磁場を加えること、および粒子凝集を低減する洗浄溶液で混合物を洗浄し、それによって血液試料中の生存可能な１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離することを含む方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

詳細な説明

本発明は、試料から細菌を単離するアッセイを試料で実行することに一般に関し、そこで、アッセイは試料中の１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離する。試料中の１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離することができる任意のアッセイを用いることができる。ある態様では、本発明の方法は、体液試料中の標的病原体を捕捉する特定の磁気モーメントを有する磁気粒子（粒径および磁性材料の重量％で決定される）、および標的を単離するための磁石を用いて、試料中の１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌を単離する。

【００１４】

ある態様では、本発明の方法は、標的特異的結合部分を含む磁気粒子を体液試料に導入して混合物を作製すること、この混合物をインキュベートして上記粒子を標的に結合させること、磁場を加えて表面上に標的／磁気粒子複合体を捕捉し、それによって標的／磁気粒子複合体を単離することを含む。本発明の方法は、粒子凝集を低減する洗浄溶液中で混合物を洗浄することをさらに含むことができる。磁性材料を標的実体に結合させ、その後磁場および勾配の利用によって分離することには、特定の基盤技術および原理が関連する。そのような基盤技術および原理は当該分野で公知であり、その内容は参照により完全に本明細書に援用されるＪａｎｅｗａｙ（Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ、６版、Ｇａｒｌａｎｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ）に記載されるものなど、以前に記載されている。

【００１５】

本発明の方法は、標的分析物を有する体液を、血液収集管（例えば、Ｂｅｃｔｏｎ、Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ａｎｄ　ｃｏｍｐａｎｙから市販されている、静脈穿刺のために特別に設計された試験管であるＶＡＣＵＴＡＩＮＥＲ）などの容器に収集することを含む。ある実施形態では、血液の場合ヘパリンなどの、内在性凝集因子の凝集を阻止または低減する溶液が加えられる。

【００１６】
体液は、例えばヒトまたは他の哺乳動物に由来する液状物質を指す。そのような体液には、粘液、血液、血漿、血清、血清誘導体、胆汁、痰（ｐｈｌｅｇｍ）、唾液、汗、羊水、乳液（ｍａｍｍａｒｙ　ｆｌｕｉｄ）、尿、痰（ｓｐｕｔｕｍ）、および脳脊髄液（ＣＳＦ）（例えば、腰椎または脳室のＣＳＦ）が含まれるが、これらに限定されない。体液は、針吸引液であってもよい。体液は、細胞または生物学的物質を含む媒体であってもよい。特定の実施形態では、上記体液は血液である。

【００１７】
本発明の方法は、任意の標的分析物を検出するために用いられ得る。標的分析物とは、本発明の方法によって捕捉および単離される試料中の物質を指す。標的は、細菌、真菌、タンパク質、細胞（例えば癌細胞、白血球、ウイルス感染細胞または母体循環中に循環する胎児細胞）、ウイルス、核酸（例えばＤＮＡまたはＲＮＡ）、受容体、リガンド、ホルモン、薬剤、化学物質または当該分野で公知の任意の分子であってよい。ある実施形態では、標的は病原性細菌である。他の実施形態では、標的はグラム陽性細菌またはグラム陰性細菌である。本発明の方法によって捕捉および単離することができる例示的な細菌種には、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ、Ｂｏｒｒｅｌｉａ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓおよびそれらの組合せが含まれる。本発明の方法の特別な利点は、多くの臨床試料に存在する低濃度（血液試料に１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌）の血液試料からの細菌および真菌の直接的な捕捉および単離のためである。

【００１８】
次に、試料は、特定の磁気モーメントを有し、さらに標的特異的結合部分を含む磁気粒子と混合されて、混合物を生成し、それは、上記粒子が血液試料中の細菌などの試料中の標的に結合するようにインキュベートされる。上記混合物は、上記粒子を標的分析物に結合させるのに十分な時間インキュベートされる。磁気粒子を標的分析物に結合させるプロセスは、磁気モーメントを標的分析物と結びつけ、このようにして、附加された磁気モーメントへの、磁場によって生み出される力を介した、標的分析物の操作を可能にする。

【００１９】
一般に、インキュベーション時間は、標的分析物と磁気ビーズとの間の所望の結合程度（例えば、標的に所望通りに附加されるモーメントの量）、標的あたりのモーメントの量、混合時間、混合の型、結合を促進するために存在する試薬、および採用される結合化学系によって決まる。インキュベーション時間は、約５秒から数日までの任意の時間であってよい。例示的なインキュベーション時間は、約１０秒から約２時間までである。結合は、広範囲の温度、一般に１５℃から４０℃の間の温度で起こる。

【００２０】
本発明の方法は、試料中の１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度の細菌の単離を可能にする磁気モーメントを有する磁気粒子を用いて実施される。磁気粒子の生産は、例えばＧｉａｅｖｅｒ（米国特許第３，９７０，５１８号）、Ｓｅｎｙｉら（米国特許第４，２３０，６８５号）、Ｄｏｄｉｎら（米国特許第４，６７７，０５５号）、Ｗｈｉｔｅｈｅａｄら（米国特許第４，６９５，３９３号）、Ｂｅｎｊａｍｉｎら（米国特許第５，６９５，９４６号）、Ｇｉａｅｖｅｒ（米国特許第４，０１８，８８６号）、Ｒｅｍｂａｕｎ（米国特許第４，２６７，２３４号）、Ｍｏｌｄａｙ（米国特許第４，４５２，７７３号）、Ｗｈｉｔｅｈｅａｄら（米国特許第４，５５４，０８８号）、Ｆｏｒｒｅｓｔ（米国特許第４，６５９，６７８号）、Ｌｉｂｅｒｔｉら（米国特許第５，１８６，８２７号）、Ｏｗｎら（米国特許第４，７９５，６９８号）およびＬｉｂｅｒｔｉら（国際公開第９１／０２８１１号）に示され、それぞれの内容は参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【００２１】
磁気粒子は、２つの広いカテゴリーに一般に分類される。第一のカテゴリーには、永久

に磁化可能であるか、強磁性である粒子が含まれ；第二のカテゴリーには、磁場にさらされるときだけバルク磁性挙動を示す粒子が含まれる。後者は、磁気応答粒子と呼ばれる。磁気応答挙動を示す材料は、超常磁性と時々記載される。しかし、バルク強磁性特性を示す材料、例えば磁性酸化鉄は、直径約３０ｎｍ以下の結晶で提供されるとき、超常磁性と特徴づけることができる。強磁性材料のより大きな結晶は、対照的に磁場への曝露の後に永久磁石の特徴を保持し、強力な粒子間相互作用のためにその後凝集する傾向がある。ある実施形態では、粒子は超常磁性ビーズである。ある実施形態では、磁気粒子は鉄含有磁気粒子である。他の実施形態では、磁気粒子は酸化鉄または白金鉄を含む。

【００２２】

ある実施形態では、磁気粒子は少なくとも１０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約２０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約３０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約４０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約５０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約６０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約７０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約８０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約９０重量％の超常磁性ビーズ、少なくとも約９５重量％の超常磁性ビーズ、または少なくとも約９９重量％の超常磁性ビーズを含む。特定の実施形態では、磁気粒子は少なくとも７０重量％の超常磁性ビーズを含む。

【００２３】

ある実施形態では、超常磁性ビーズは、直径１００ｎｍ未満である。他の実施形態では、超常磁性ビーズは、直径約１５０ｎｍ、直径約２００ｎｍ、直径約２５０ｎｍ、直径約３００ｎｍ、直径約３５０ｎｍ、直径約４００ｎｍ、直径約５００ｎｍ、または直径約１０００ｎｍである。特定の実施形態では、超常磁性ビーズは、直径が約１００ｎｍから約２５０ｎｍである。

【００２４】

ある実施形態では、粒子は、磁性材料、または官能基化された磁性材料、または当該分野で公知である他の構造を組み込むビーズ（例えば、ナノ粒子）である。ある実施形態では、ナノ金属材料（複数可）などの磁性材料（複数可）を組み込む高分子物質を含むナノ粒子を用いることができる。それらのナノ金属材料（複数可）または結晶（複数可）、例えばFe_3O_4が超常磁性である場合、それらは外部磁場によって磁化すること、および外部磁場が除去されたときに消磁することが可能なことなどの有利な特性を提供することができる。このことは、試料が過度のビーズ凝集なしで処理される領域への、およびそこからの試料の輸送を促進するために有利であるかもしれない。

【００２５】

安定性を提供するコアーシェル構造のFe_3O_4、ＦｅＰｔもしくはＦｅ、および／または当該分野で公知であり得る他の様々なものなど、１つまたは複数、または多くの異なるナノ金属（複数可）を使用することができる。多くの適用では、勾配に関連する力を最大にすることができ、そして／またはビーズの存在と関連するシグナルを増強することができるので、容量あたりの可能な限り高い飽和モーメントを有するナノ金属を有することが有利であり得る。同じであるかまたは類似した理由（複数可）のために、ビーズにおける容量負荷をできるだけ高くすることも有利であり得る。磁化可能なナノ金属によって提供されるモーメントを最大にするために、特定の飽和場を提供することができる。例えば、Fe_3O_4超常磁性粒子について、この場は約０．３Ｔ程度であり得る。

【００２６】

ナノ金属含有ビーズのサイズは、特定の適用のために最適化することができ、例えば、標的に負荷されるモーメントを最大にすること、許容される検出性で標的上のビーズの数を最大にすること、所望の力誘導運動を最大にすること、および／または標識標的と非特異的結合標的もしくはビーズ凝集体もしくは個々のビーズとの間の、附加されるモーメントの差を最大にすることができる。最大にすることが上の例で言及されているが、条件を最小にするか、さもなければ所望通りに条件に影響を及ぼすことなどの、他の最適化または変更が企図される。

【００２７】

例示的な実施形態では、８０重量％のＦｅ$_3$Ｏ$_4$超常磁性粒子を含むポリマービーズ、または例えば９０重量％以上の超常磁性粒子が、ポリマーコーティングで超常磁性粒子を被包して約２５０ｎｍの直径を有するビーズを生成することによって生成される。

【００２８】

本発明の方法で用いるための磁気粒子は、粒子が試料中の、対象とする標的に特異的に結合することを可能にする標的特異的結合部分を有する。標的特異的部分は、当該分野で公知である任意の分子であってよく、捕捉および単離される標的によって決まる。例示的な標的特異的結合部分には、核酸、タンパク質、リガンド、抗体、アプタマーおよび受容体が含まれる。

【００２９】

特定の実施形態では、標的特異的結合部分は、特定の細菌に結合する抗体などの抗体である。抗血清の産生のための、動物を選択するときに考慮すべき基準を含む、抗体生成のための一般方法は、Ｈａｒｌｏｗら（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、９３～１１７頁、１９８８年）に記載される。例えば、ヤギ、イヌ、ヒツジ、マウスまたはラクダなどの適したサイズの動物が、免疫応答をもたらすのに有効な免疫原（例えば、標的細菌）の量の投与によって免疫化される。例示的なプロトコルは以下の通りである。動物は、動物のサイズに依存して、アジュバント（例えばフロインド完全アジュバント）に再懸濁させた１００ミリグラムの抗原を注射され、続いて３週後に、動物のサイズに依存して、アジュバント（例えばフロインド不完全アジュバント）とともに１００マイクログラムから１００ミリグラムの免疫原を皮下注射される。動物血液中の抗体の適する力価が達成されるまで、二週間ごとのアジュバント（例えばフロインド不完全アジュバント）とともにさらなる皮下または腹腔内注射が投与される。例示的な力価としては、少なくとも約１：５０００の力価または１：１００，０００以上の力価（すなわち検出可能な活性を有する希釈率）があげられる。抗体は、例えば、タンパク質Ｇ樹脂または標的特異的親和性樹脂を含むカラムで親和性精製によって精製される。

【００３０】

モノクローナル抗体を生成するために、ヒトリンパ球のｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫化技術が用いられる。ヒトリンパ球のｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫化技術は、当業者に周知である。例えば、Ｉｎａｉら、Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、９９巻（５号）：３３５～３６２頁、１９９３年5月；Ｍｕｌｄｅｒら、Ｈｕｍ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、３６巻（３号）：１８６～１９２頁、１９９３年；Ｈａｒａｄａら、Ｊ．　Ｏｒａｌ　Ｐａｔｈｏｌ．　Ｍｅｄ．、２２巻（４号）：１４５～１５２頁、１９９３年；Ｓｔａｕｂｅｒら、Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｍｅｔｈｏｄｓ、１６１巻（２号）：１５７～１６８頁、１９９３年；およびＶｅｎｋａｔｅｓｗａｒａｎら、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ、１１巻（６号）：７２９～７３９頁、１９９２年を参照。これらの技術は、抗原特異的ＩｇＧおよびＩｇＭモノクローナル抗体を含む、抗原反応性モノクローナル抗体を生成するために用いることができる。

【００３１】

対象とする細菌に対して親和性および特異性を有する任意の抗体またはその断片は、本明細書で提供される本発明の範囲内である。Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａに対する免疫磁気ビーズが、Ｖｅｒｍｕｎｔら（Ｊ．　Ａｐｐｌ．　Ｂａｃｔ．７２巻：１１２頁、１９９２年）で提供される。Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓに対する免疫磁気ビーズが、Ｊｏｈｎｅら（Ｊ．　Ｃｌｉｎ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２７巻：１６３１頁、１９８９年）で提供される。Ｌｉｓｔｅｒｉａに対する免疫磁気ビーズが、Ｓｋｊｅｒｖｅら（Ａｐｐｌ．　Ｅｎｖ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５６巻：３４７８頁、１９９０年）で提供される。Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉに対する免疫磁気ビーズが、Ｌｕｎｄら（Ｊ．　Ｃｌｉｎ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２９巻：２２５９頁、１９９１年）で提供される。

【００３２】

標的特異的結合部分を磁気粒子に付着させる方法は、当該分野で公知である。磁気粒子

を抗体でコーティングすることは当該分野で周知であり、例えばHarlowら（Antibodies、Cold Spring Harbor Laboratory、1988年）、Huntersら（Immunoassays for Clinical Chemistry、147～162頁、eds, Churchill Livingston、Edinborough、1983年）およびStanley（Essentials in Immunology and Serology、Delmar、152～153頁、2002年）を参照。他のタイプの標的特異的結合部分を磁気粒子に結合するために、当業者はそのような方法を容易に改変することができる。機能的部分でコーティングされたある種類の磁気粒子が、Sigma－Aldrich（St. Louis、MO）から市販されている。

【００３３】

ある実施形態では、磁気ビーズとともにバッファー溶液が試料に加えられる。例示的なバッファーは、約７５ｍＭの濃度のトリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン塩酸塩を含む。バッファー組成、混合パラメータ（速度、混合形式（例えば回転、振盪など）、および温度）が結合に影響を与えることが分かっている。高い標識効率を維持するために、最終溶液（例えば、血液＋バッファー）のオスモル濃度を維持することが重要である。ある実施形態では、本発明の方法で用いられるバッファーは、血液細胞の溶解を防止し、標的と磁気ビーズとの効率的な結合を促進し、ビーズ凝集体の形成を低減するように設計される。３００ｍＭのＮａＣｌ、７５ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．０および０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０を含むバッファー溶液がこれらの設計目標を満たすことが分かっている。

【００３４】

いかなる特定の理論または作用機構によっても限定されることなく、イオン相互作用を通して塩化ナトリウムが溶液のオスモル濃度の維持および磁気ビーズの非特異的結合の低減を主に担うと考えられている。

【００３５】

トリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン塩酸塩は、溶液のｐＨを維持するために生物学で多用される十分に確立されたバッファー化合物である。７５ｍＭ濃度が有益であり、これは高い結合効率のために十分であることが分かっている。同様に、疎水性相互作用によって非特異的付着を低減する穏やかな界面活性剤として、Ｔｗｅｅｎ２０が広く使われている。様々なアッセイは、０．０１％から１％の濃度でＴｗｅｅｎ２０を用いる。血液細胞をそのままの状態に保ちながらの細菌の効率的な標識のために、０．１％濃度が最適のようである。

【００３６】

結合工程のために必要とされる時間を短縮しつつ、高い結合効率を達成する代替手法は、スタティックミキサー、または例えば５ｍＬ／分前後の高い流動速度で粘性試料の効率的混合を提供する他の混合デバイスを用いることである。一実施形態では、試料は、混合インタフェースコネクタを用いて、１：１前後の比で結合バッファーと混合される。希釈された試料は次に混合インタフェースコネクタを通って流れ、そこで、それは標的特異的ナノ粒子と混合される。結合効率を向上させるために、試料と抗原特異的ナノ粒子との混合を提供するさらなる混合インタフェースコネクタを下流に付けることができる。標識試料の合わせた流速は、下流の処理に適合するように選択される。

【００３７】

標的／磁気粒子複合体を形成するために混合物中で磁気粒子を標的分析物に結合させた後、表面上に複合体を捕捉するために磁場が混合物に加えられる。磁気粒子に結合しない混合物の成分は、磁場に影響を受けず、混合物中に遊離のままである。標的／磁気粒子複合体を混合物の他の成分から分離するための方法および装置は、当該分野で公知である。例えば、スチールメッシュを磁石と組み合わせること、線形チャンネル（複数可）を隣接する磁石を用いて構成すること、または環状流動を有する四極磁石を用いることができる。標的／磁気粒子複合体を混合物の他の成分から分離するための他の方法および装置は、

Ｒａｏら（米国特許第６，５５１，８４３号）、Ｌｉｂｅｒｔｉら（米国特許第５，６２２，８３１号）、Ｈａｔｃｈら（米国特許第６，５１４，４１５号）、Ｂｅｎｊａｍｉｎら（米国特許第５，６９５，９４６号）、Ｌｉｂｅｒｔｉら（米国特許第５，１８６，８２７号）、Ｗａｎｇら（米国特許第５，５４１，０７２号）、Ｌｉｂｅｒｔｉら（米国特許第５，４６６，５７４号）およびＴｅｒｓｔａｐｐｅｎら（米国特許第６，６２３，９８３号）で示され、それぞれの内容は参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【００３８】

ある実施形態では、磁気による捕捉は、試料の流れに直角に置かれた多数の強力な希土類の棒磁石を有するフロースルー捕捉セルを利用することによって、高効率で達成される。流路断面０．５ｍｍ×２０ｍｍ（ｈ×ｗ）および７個のＮｄＦｅＢ棒磁石を有する流動チャンバーを用いる場合、１００％近くの捕捉効率を達成しながら、流速は５ｍＬ／分以上という速さであり得た。

【００３９】

上記の形式の磁気分離は、標的分析物の効率的な捕捉および試料混合物の残りの成分の過半数の除去をもたらす。しかし、そのようなプロセスは、標的分析物に結合しない一定パーセントの磁気粒子、ならびに非特異的標的実体を含む試料を生成することがある。非特異的標的実体は、例えば大幅に低下した効率、例えば表面積の１％で結合してもよいが、対象とする標的は利用できる表面積または利用できる抗原部位の５０％またはほぼ１００％で負荷することができる。しかし、磁気勾配流セルまたは試料チャンバー内で捕獲するのに必要な力を付与するために、１％の負荷でさえ十分かもしれない。

【００４０】

標的／磁気粒子複合体を含む表面に、標的分析物に結合していない磁気粒子および非特異的標的実体が存在していると、対象とする標的を首尾よく検出する能力を妨害し得る。生じた混合物の磁気捕捉、ならびに磁気粒子の相互の近接接触および磁気粒子の結合標的との近接接触は、分配するのが困難であり、以降の処理または分析工程に抵抗性または不適切であるかもしれない凝集体の形成をもたらす。標的分析物に結合していない磁気粒子および非特異的標的実体を除去するために、本発明の方法は、粒子凝集を低減する洗浄溶液で表面を洗浄し、それによって、標的分析物に結合していない磁気粒子および非特異的標的実体から標的／磁気粒子複合体を単離することをさらに含むことができる。洗浄溶液は、凝集体の形成を最小にする。

【００４１】

本発明の方法は、磁気粒子に、磁気粒子の標的特異的部分と標的分析物の間の相互作用を破壊するのに十分でない正味の負電荷を付与する、任意の洗浄溶液を用いることができる。いかなる特定の理論または作用機構によっても限定されることなく、洗浄溶液中の負荷電分子の磁気粒子への付着は、粒子へ正味の負電荷を提供して、非特異的凝集粒子の分散を促進すると考えられている。同時に、正味の負電荷は、磁気粒子の標的特異的部分と標的分析物との間の強力な相互作用（例えば、抗体抗原相互作用）を破壊するのに十分でない。例示的な溶液には、ヘパリン、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、Ｔｒｉｓ－ボレート－ＥＤＴＡ（ＴＢＥ）、Ｔｒｉｓ－アセテート－ＥＤＴＡ（ＴＡＥ）、Ｔｒｉｓ－カコジレート、ＨＥＰＥＳ（４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸、ＰＢＳ（リン酸緩衝食塩水）、ＰＩＰＥＳ（ピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス（２－エタンスルホン酸）、ＭＥＳ（２－Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸）、トリシン（Ｎ－（トリ（ヒドロキシメチル）メチル）グリシン）および類似した緩衝剤が含まれる。ある実施形態では、一度の洗浄サイクルだけが実施される。他の実施形態では、複数の洗浄サイクルが実施される。

【００４２】

特定の実施形態では、洗浄溶液はヘパリンを含む。体液試料が血液である実施形態については、ヘパリンは磁気捕捉の後の血液成分の凝固の可能性も低減する。血液成分を除去し、そして凝集体の形成を低減するために、結合した標的はヘパリン含有バッファーで１～３回洗浄される。

【００４３】
標的／磁気粒子複合体が単離されると、標的は、多数の既存の技術、例えば小規模ＮＭＲ（ｍｉｎｉａｔｕｒｅ　ＮＭＲ）、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、質量分析、蛍光標識および顕鏡観察を用いる可視化、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）、増殖に基づく抗生物質感受性試験（ｇｒｏｗｔｈ－ｂａｓｅｄ　ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ　ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ　ｔｅｓｔ）、ならびに他の試料成分からのかなりの汚染なしで精製された標的で実行することができる他の様々な方法によって分析することができる。一実施形態では、単離された細菌はカオトロピック溶液で溶解し、ＤＮＡをＤＮＡ抽出樹脂へ結合させる。樹脂の洗浄後に、細菌の特定の種、および／またはサブクラスの存在を検出するために、細菌性ＤＮＡを溶出して定量的ＲＴ－ＰＣＲで用いる。

【００４４】
別の実施形態では、捕捉された細菌はそれらが結合している磁気粒子から除去され、処理された試料は細菌に特異的な蛍光標識抗体または蛍光グラム染色物と混合される。インキュベーションの後、反応混合液を０．２μｍから１．０μｍのフィルターで濾過して標識細菌を捕捉しながら、大半の遊離ビーズおよび蛍光標識にフィルターを通過させる。顕微鏡技術、例えば直接顕鏡観察、レーザー走査または画像捕捉の他の自動化方法を用いて、細菌をフィルターの上で可視化する。細菌の存在は、画像分析を通して検出される。視覚的技術による陽性検出の後、ＰＣＲまたはゲノム方法を用いて細菌をさらに特徴づけることができる。

【００４５】
対象とする細菌の検出は、当該分野で公知である手法に従って、核酸プローブの使用によって実施することができる。核酸プローブを用いる細菌の検出に適する手法は、例えばＳｔａｃｋｅｂｒａｎｄｔら（米国特許第５，０８９，３８６号）、Ｋｉｎｇら（国際公開第９０／０８８４１号）、Ｆｏｓｔｅｒら（国際公開第９２／１５８８３号）およびＣｏｓｓａｒｔら（国際公開第８９／０６６９９号）に記載され、それぞれは参照により本明細書に組み込まれる。

【００４６】
適する核酸プローブアッセイは、試料の処理および溶解、選択されたプローブ（複数可）とのハイブリダイゼーション、ハイブリッド捕捉ならびに検出を一般に含む。細菌の溶解は、プローブのための核酸を放出するために必要である。核酸標的分子は、アルカリ（ＮａＯＨなど）、グアニジン塩（チオシアン酸グアニジンなど）、酵素（リゾチーム、ムタノリシンおよびプロテイナーゼＫなど）および界面活性剤を含むいくつかの溶解剤のいずれかによる処理によって放出される。したがって細菌の溶解は、ＤＮＡおよびＲＮＡの両方、特にリボソームＲＮＡおよび染色体ＤＮＡを放出し、その両方は、適するプローブの適当な選択により標的分子として利用することができる。ｒＲＮＡは細胞質量のかなりの成分を構成し、それによって豊富な標的分子を提供するので、標的分子（複数可）としてのｒＲＮＡの使用は有利となり得る。ｒＲＮＡプローブの使用は、対象とする細菌への特異性、すなわち、偽陽性または偽検出につながることがある望ましくない交差反応性のない陽性検出も増進する。

【００４７】
ハイブリダイゼーションは、特異的な核酸プローブの付加を含む。一般に、ハイブリダイゼーションは、特定のおよび安定した水素結合を形成するのと逆平行様式で、既定の反応条件下で２つの部分的または完全に相補的な核酸が合わされる手法である。ハイブリダイゼーション／反応条件の選択またはストリンジェンシーは、プローブ／標的二重鎖の長さおよび塩基組成によって、ならびに２つの核酸鎖間の誤対合のレベルおよび幾何構造によって定義される。ストリンジェンシーは、温度、ハイブリダイゼーション溶液に存在する変性剤の種類および濃度、ならびにハイブリダイゼーション溶液に存在するイオン種の種類および濃度などの反応パラメータによっても支配される。

【００４８】
核酸プローブアッセイのハイブリダイゼーション相は、単一の選択されたプローブを用

いて、または２つ、３つもしくはそれ以上のプローブの組合せ用いて実施される。標的生物体の特異な核酸配列に相同的である配列を有するプローブが選択される。一般に、第一の捕捉プローブは、形成されたハイブリッド分子を捕捉するために利用される。ハイブリッド分子は、次に抗体反応の使用によって、または、放射性同位体（リン３２など）もしくは蛍光標識（フルオレセインなど）もしくは化学発光標識で標識されてもよい第二の検出プローブの使用によって検出される。

【００４９】

対象とする細菌の検出は、ＰＣＲ技術の使用によっても実施することができる。適するＰＣＲ技術は、例えばＶｅｒｈｏｅｆら（国際公開第９２／０８８０５号）に記載される。そのようなプロトコルは、磁気ビーズの上で捕捉される細菌へ直接に適用することができる。細菌は溶解バッファーと合わされ、収集された核酸標的分子はＰＣＲ反応のための鋳型として次に利用される。

【００５０】

抗体の使用により選択される細菌の検出のために、単離された細菌を、対象とする細菌に特異的な抗体と接触させる。上記したように、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを利用することができるが、いずれの場合にも検出される特定の細菌に親和性を有する。これらの抗体は、特異的な標的細菌に由来する物質に接着／結合する。抗体の標識化に関して、これらは、他の公知のイムノアッセイで用いられる標識で直接または間接に標識される。直接的な標識には、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、放射性標識、金属標識、ビオチンまたは酵素分子を含めることができる。これらの標識を抗体または他の巨大分子と合わせる方法は、当業者に周知である。例としては、フルオレセインイソチオシアネートについてはＨｉｊｍａｎｓ，　Ｗ．ら（１９６９年）、Ｃｌｉｎ．　Ｅｘｐ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．４巻、４５７～頁の方法、テトラメチルローダミンイソチオシアネートについてはＧｏｄｉｎｇ，　Ｊ．　Ｗ．（１９７６年）、Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｍｅｔｈ．１３巻、２１５～頁の方法、酵素についてはＩｎｇｒａｌｌ，　Ｅ．（１９８０年）、Ｍｅｔｈ．　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．７０巻、４１９～４３９頁の方法が挙げられる。

【００５１】

これらの検出抗体は、間接的に標識することもできる。この場合には、実際の検出分子は、抗細菌細胞表面抗体への結合親和性を有する二次抗体または他の分子に付着される。二次抗体が用いられる場合、それは好ましくは、抗細菌細胞表面抗体を惹起するために用いられる動物種に由来する抗体のクラス（ＩｇＧおよびＩｇＭ）に対する一般抗体である。例えば、二次抗体をアルカリ性ホスファターゼまたはペルオキシダーゼのいずれかの酵素とコンジュゲートさせることができる。標識を検出するために、対象とする細菌を二次抗体と接触させ、洗浄した後、単離された試料成分を、アルカリ性ホスファターゼまたはペルオキシダーゼのいずれかに対する発色性基質を含む溶液に浸す。発色性基質は、酵素によって切断されて、基質が基礎分子から切断されるときだけ出現するなんらかの種類の検出可能なシグナルの生成をもたらすことができる化合物である。酵素と反応し、濃色生成物が形成されるまで、発色性基質は無色である。したがって、膜シートに接着した細菌コロニーからの物質は、強い青／紫／黒色または茶色／赤色になり、他のコロニーからの物質は無色のままである。検出分子の例には、蛍光物質、例えば４－メチルウンベリフェリルホスフェート、ならびに発色性物質、例えば４－ニトロフェニルホスフェート、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジンおよび２，２’－アジノ－ジー［３－エチルベンゾーチアゾリアンスルホネート（３－ｅｔｈｅｌｂｅｎｚ－ｔｈｉａｚｏｌｉａｎｅ　ｓｕｌｆｏｎａｔｅ）（６）］が含まれる。アルカリ性ホスファターゼおよびペルオキシダーゼに加えて、他の有用な酵素には、β－ガラクトシダーゼ、β－グルクロニダーゼ、α－グルコシダーゼ、β－グルコシダーゼ、α－マンノシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼおよびヘキソキナーゼが含まれる。

【００５２】

ＮＭＲを用いた、対象とする細菌の検出は、以下の通りに達成することができる。試料

が磁石の中心の検出コイルに送達される検出方法としてのＮＭＲの使用では、磁気標識細菌などの対象とする標的は、実質的に水で構成される流体などの流体媒体によって送達することができる。この場合には、磁気標識標的は、非常に低い磁場の領域から高い磁場の領域、例えば約１から約２テスラの磁石によって生成される場に行くことができる。このように、試料は、磁石に向かっておよび磁石から遠ざかって、磁気勾配を横断することができる。下の方程式１および２から分かるように、標的は、磁石に向かう試料流の方向の磁石に引っ張る力、および磁石から遠ざかる反対の流れの方向の磁石への力を経験することができる。流れが勾配力に打ち勝つのに十分でない場合、標的は、標的を磁石に捕獲する保持力を経験することができる。

【００５３】

【化１】

$$m \text{ dot } (\text{del } B)= F \quad \text{式 } 1$$

$$v_t= -F/(6*p*n*r) \quad \text{式 } 2$$

式中、ｎは粘度であり、ｒはビーズ直径であり、Ｆはビーズのベクトル力であり、Ｂはベクトル場であり、ｍはベクトルモーメントである。

【００５４】

磁石への経路の上の磁場は、磁石への流動に関して横方向に一様でなくてよい。このように、磁石への試料流動を提供する容器または導管の側へ標的を引っ張る横方向の力があってよい。一般に、標的が導管の壁に到達するのにかかる時間は、終端速度と関連し、粘度の増加に伴い低下する。終端速度は抵抗力と関連し、それはある場合にはクリープ流れを示すことがある。一般に、標的が磁石に、または導管壁に対して捕獲されることなく磁石を通して流体流で運ばれやすいように、より高い抵抗力を提供するために、高い粘度を有することは有利であり得る。

【００５５】

ニュートン流体は、例えば円形パイプなどの導管内で放物線状の流動特性を有し、したがって流速は壁の所でゼロであり、中心部で最大であり、半径に対して放物線状の特性を有する。速度は壁に向かう方向で低下し、導管壁へ向かう標的に対する横の勾配力で、または任意の位置でパイプ内の標的流動を阻止するのに十分な縦勾配のいずれかで、壁の近くの標的を磁気によって捕獲することがより容易である。良好な流体抵抗力を提供して試料が導管内で捕獲されないようにするために、流体速度が導管内での半径方向の位置の関数として実質的に均一であるプラグフロー状態を有することが有利であり得る。

【００５６】

流動試料に関連してＮＭＲ検出が使用される場合、検出は、磁気標識標的に起因するＮＭＲ水シグナルの摂動に基づくことができる（Ｓｉｌｌｅｒｕｄら、ＪＭＲ（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ）、第１８１巻、２００６年）。この場合には、試料を０時刻に励起させることができ、多少の遅れの後、例えば約５０ミリ秒または約１００ミリ秒遅れて、（検出されるＮＭＲシグナルに基づいて）許容される測定を生成することができる。あるいは、そのような測定を励起直後に生成することができ、検出はある時間、例えば約５０ミリ秒または約１００ミリ秒の間続く。励起後の実質的により長い時間、ＮＭＲシグナルを検出することが有利かもしれない。

【００５７】

例示として、高分解能でスペクトル情報を記録するために、ＮＭＲシグナルの検出を約２秒間続けることができる。放物線状またはニュートンの流動の場合、導管内の半径方向の位置に依存して摂動源周囲の水は異なる速度で移動するので、０時刻に励起させた摂動は一般的に不鮮明である。さらに、シグナル検出の間、試料流体の差示的動作の不鮮明化効果または混合効果のために、スペクトル情報が失われることがある。流動流体試料を含むＮＭＲ検出適用を実行する場合、望ましいＮＭＲコントラストおよび／または望ましいＮＭＲシグナルの検出を促進するために、プラグ様試料流動を提供することが有利なこと

がある。

【００５８】

流動ニュートン流体の中の差示的な動作は、磁気共鳴画像化の場合のように、空間的に局在化されたＮＭＲ検出が所望である状況などの特定の状況では有害作用を有することがある。一例において、磁気標識細菌などの磁気物体は、ＮＭＲ検出器を通して流され、その存在および場所はＭＲＩ技術を用いて検出される。磁気物体の磁場が磁気物体の近くの流体の磁場を不安定化するので、この磁気物体の磁場のために検出が可能になることがある。磁気物体の検出は、物体の近くの流体が物体の近くにとどまる場合には向上する。これらの条件下では、磁気摂動は流体の任意の所与の体積要素により長く作用させることができ、そのように影響を受ける流体の体積要素は空間的に近接したままである。そのようなより強力な、より局在化した磁気摂動は、ＮＭＲまたはＭＲＩ技術を用いてより容易に検出される。

【００５９】

検出器を通して磁気物体を運ぶためにニュートン流体が用いられる場合、流体体積要素の速度は流体導管内の半径方向の位置に依存する。この場合には、物体は検出器を通して流動するので、磁気物体の近くの流体は磁気物体の近くにとどまらない。周囲の流体に及ぼす物体の磁気摂動の効果は空間で不鮮明になることがあり、任意の１つの流体体積要素上の摂動の強度は、その要素が摂動の範囲内にとどまらないので、低減されることがある。試料流体中のより弱く、より局在化していない摂動は、ＮＭＲまたはＭＲＩ技術を用いても検出不能であるかもしれない。

【００６０】

ある液体、または液体の混合物は、円形導管内では非放物線状の流動プロファイルを示す。そのような流体は、他の導管形状では非ニュートン流動プロファイルを示すことがある。そのような流体の使用は、ＮＭＲに基づく検出デバイスを使用する適用で検出流体として有利であると判明するかもしれない。いかなるそのような有利な効果も、流体の高い粘度、流体と関連するプラグ様流動プロファイル、および／または検出を促進する流体に帰される他の特徴（複数可）に帰すことができる。例えば、高粘度のずり減粘性流体は、導管断面の中心領域にわたってかなり均一である流速プロフィルを示すことができる。そのような流体の速度プロファイルは、導管の壁の箇所またはその近くではゼロまたは非常に低い値へ移行することができ、この移行領域は壁の近くの非常に薄い層に限定されることがある。

【００６１】

全ての流体、または全ての流体混合物がＮＭＲ検出方法に適合するわけではない。一例において、グリセロールと水との混合物は高い粘度を提供することができるが、混合物を構成する水およびグリセロール分子から別々のＮＭＲシグナルが検出されるので、ＮＭＲ測定は劣化する。このことは、ＮＭＲ検出器の感度を徐々に低下させ得る。別の例では、流体混合物の水以外の成分は、ＮＭＲシグナルを有さないように選択することができ、それは、例えば過重水素化流体成分を用いるか、過フッ素化流体成分を用いることによって達成することができる。検出コイル中の流体の一部はシグナルを発生しないので、この手法はシグナル強度の減損をこうむることがある。

【００６２】

別の手法は、全体の流体混合物の小画分のみを構成する二次的流体成分を用いることであろう。そのような低濃度二次的流体成分は、水であってよい流体の主成分からのシグナルと比較して無視できる強度のＮＭＲシグナルを生成することができる。検出器でＮＭＲシグナルを生成しない低濃度二次的流体成分を用いることが有利であろう。例えば、過フッ素化または過重水素化された二次的流体成分を用いることができる。ＮＭＲ検出器で用いられる流体混合物は、主な流体成分に加えて１つ、２つまたは３つ以上の二次的成分を含むことができる。採用される流体成分は、高粘度および／またはプラグフローなどの所望の流体流動特性を生むために、協力して作用することができる。この流体成分は、例えばより速い動作またはより高いシグナル強度を可能にするＮＭＲ休止時間を提供すること

によって、ＮＭＲ検出器の性能のために有利である流体特性を提供するために有用であろう。

【００６３】

非ニュートン流体は、ＮＭＲまたはＭＲＩ技術による物体の検出のために、さらなる利点を提供することができる。一例として、検出される物体の全ては、検出コイルを通過するときに、実質的に同じ速度を有することができる。この特徴的速度は、検出データの分析のために、より単純であるかより堅牢なアルゴリズムを可能にすることができる。別の例としては、検出される物体は、一定の、既知の、かつ均一な速度を有することができる。このことは、後の検出される物体の位置が必要とされるデバイスで、例えば、ＮＭＲまたはＭＲＩ検出コイルの下流に隔離チャンバーまたは二次的検出チャンバーを有するデバイスなどで有利であることが判明するかもしれない。

【００６４】

例示的な実施形態では、水に０．１％から０．５％のキサンタンガムを含む流体送達媒体を用いる１．７Ｔの円筒形磁石への、およびそこからの試料送達は、首尾よく達成された。実質的にプラグ様の流れ、高い粘度（例えば約１０ｃＰから約３０００ｃＰ）、および水に関して良好なＮＭＲコントラストを提供するために、そのような送達は適する。キサンタンガムは、当該分野で周知である非ニュートン流体の特徴を有する非ニュートン流体として作用し、望ましい操作様式での良好な検出にとって望ましいＮＭＲシグナル特性を損なわない。

【００６５】

ある実施形態では、本発明の方法は、血液から細菌を直接に検出するために有用である。そのようなプロセスは、本明細書中で記載される。試料は静脈穿刺によってナトリウムヘパリン管に収集され、許容される試料容量は約１ｍＬから１０ｍＬである。試料は結合バッファーで希釈され、標的特異的結合部分を有する超常磁性粒子が試料に加えられ、その後３７℃の振盪インキュベーターでの約３０分間から１２０分間のインキュベーションが続く。代わりの混合法を用いることもできる。特定の実施形態では、試料が混合機を通してポンプ輸送されるときに反応バッファーおよび磁気ビーズが試料に加えられるように、試料は静的ミキサを通してポンプ輸送される。このプロセスは、単一の流体部分への全ての成分の効率的な統合を可能にし、可動部および別個のインキュベーション容器を回避し、インキュベーション時間を短縮する。

【００６６】

標識標的の捕捉は、血液成分の除去および３０ｍＬから５ｍＬへの試料容量の低減を可能にする。捕捉は、様々な磁石／流動構成で実施される。ある実施形態では、方法は、振盪プラットホームの上の試料管中での捕捉、または５ｍＬ／分の流速でのフロースルーデバイスでの捕捉（これは合計６分の捕捉時間をもたらす）を含む。

【００６７】

捕捉の後、試料は、血液成分および遊離ビーズを除去するためのヘパリンを含む洗浄バッファーで洗浄される。洗浄バッファーの組成は、遊離ビーズの凝集を低減し、その一方でビーズ／標的複合体の完全性を維持するように最適化される。

【００６８】

検出方法は、水の磁気共鳴のため調整されたミニチュアＮＭＲ検出器に基づく。試料が磁気的に均一である（結合した標的がない）場合、水からのＮＭＲシグナルは明らかに検出可能であり、強力である。検出器コイル中の磁気材料の存在は磁場を乱し、水シグナルの減少をもたらす。この検出方法の主な有益性の１つは、試料処理のストリンジェンシーの要件を有意に低減する磁気バックグラウンドが生体試料中にないということである。さらに、検出されるシグナルは、水によって生み出されるので、単一の標識細菌の検出を可能にするビルトインシグナル増幅がある。

【００６９】

この方法は、血液試料中の１ＣＦＵ／ｍｌという低い濃度、またはさらに低い濃度の細菌の単離および検出を可能にする。

【００７０】
参照による組込み
この開示全体で、特許、特許出願、特許公報、雑誌、本、論文、ウェブコンテンツなどの他の文書が参照および引用されている。全てのそのような文書は、全ての目的のためにここに参照により完全に本明細書に組み込まれる。
【００７１】
同等物
本明細書で示され、記載されるものに加えて、本発明およびその多くのさらなる実施形態の様々な変更は、本明細書で引用される科学文献および特許文献への参照を含むこの文書の全内容から、当業者に明らかになる。本明細書の対象物は、その様々な実施形態および同等物での本発明の実施へ適合させることができる、重要な情報、例証および指針を含む。
【実施例】
【００７２】
（実施例１）：試料
健康なボランティアからの血液試料に、血流感染症で最も頻繁に見出される細菌種の研究所株および臨床分離物の両方を含む細菌の臨床上の適切な濃度（１～１０ＣＦＵ／ｍＬ）を混入させた。
【００７３】
（実施例２）：抗体調製
ポリクローナルの汎グラム陽性細菌特異的ＩｇＧを生み出すために、最初に完全フロイントアジュバントに懸濁させた細菌抗原をリンパ節内に投与し、続いて不完全フロイントアジュバント中の細菌抗原の皮下注射を２週間隔で行うことによってヤギを免疫化した。細菌を指数増殖期（OD_{600}＝０．４～０．８）まで増殖させることによって、抗原を抗体産生のために調製した。遠心による細菌の集菌の後、３７℃で４時間の４％ホルムアルデヒドでのホルマリン固定を用いて、細菌を不活性化した。ＰＢＳで細菌を３回洗浄した後（１５分間洗浄、４０００ｒｐｍで２０分間の遠心）、ＢＣＡアッセイを用いて抗原濃度を測定し、免疫化のために抗原を１ｍｇ／ｍＬで用いた。グラム陽性細菌特異的ＩｇＧを生み出すために、接種のためにいくつかの細菌種を用いた：Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ、Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆａｅｃｉｕｍおよびＥｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｅｃａｌｉｓ。
【００７４】
親和性クロマトグラフィーを用いてプロテインＧセファロースカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で免疫血清を精製し、反応性はＥＬＩＳＡを用いて判定した。グラム陰性細菌および真菌と交差反応する抗体は、ホルマリン固定グラム陰性細菌および真菌による精製ＩｇＧの吸収によって除去した。ホルマリン固定生物体は前記と同様に調製し、ＩｇＧと混合した。室温で２時間のインキュベーションの後、細菌を除去するために調製物を遠心分離した。最終抗体調製物を遠心によって透明にし、抗原特異的磁気ビーズの調製のために用いた。
【００７５】
（実施例３）：抗原特異的磁気ビーズの調製
超常磁性ビーズは、酸化鉄ナノ粒子（直径５～１５ｎｍ）をラテックスコアに封入し、ヤギＩｇＧで標識することによって合成された。有機溶媒にナノ粒子を含む強磁性流体をエタノールで沈殿させ、スチレンおよび界面活性剤Ｈｉｔｅｎｏｌ　ＢＣ－１０の水溶液にナノ粒子を再懸濁させ、超音波処理を用いて乳化した。混合液を撹拌させながら一晩平衡させ、１．２および０．４５μｍフィルターによって濾過して、均一なミセルサイズを達成した。スチレン、アクリル酸およびジビニルベンゼンを、ｐＨ９．６の炭酸バッファーに加えた。$K_2S_2O_8$の添加により７０℃の混合液で重合を開始させ、反応は一晩完了させた。合成された粒子は、磁気捕捉を用いて０．１％ＳＤＳで３回洗浄し、１．２、

０．８および０．４５μｍフィルターによって濾過し、抗体コンジュゲーションのために用いた。

【００７６】

ビーズの生成は、平均サイズおよび標準偏差で特徴づけることができるサイズの分布をもたらした。血液からの細菌の標識化および抽出の場合、最適性能のための平均サイズは、１００から３５０ｎｍの間、例えば２００ｎｍから２５０ｎｍの間であることが見出された。

【００７７】

精製されたＩｇＧは、標準化学を用いて調製されたビーズとコンジュゲートさせた。コンジュゲーションの後、ビーズ上の非特異的結合部位をブロックし、ビーズ調製物の安定性を増加させるために用いられる０．１％ＢＳＡにビーズを再懸濁させた。

【００７８】

（実施例４）：過量の磁気ナノ粒子を用いる希少細胞の標識

血流感染の間に血液に存在する細菌を、上の実施例３で調製される超常磁性ビーズを用いて磁気標識した。実施例１に記載の混入された試料をトリスベースの結合バッファーおよび標的特異的ビーズで３倍に希釈し、その後３７℃の振盪プラットホーム上で最大２時間インキュベートした。インキュベーションの後、標識標的を磁気によって分離し、その後血液生成物を除去するように設計された洗浄工程を行った。下の実施例５を参照されたい。

【００７９】

（実施例５）：結合した細菌の磁気捕捉

磁気標識標的細菌および過量の遊離ビーズを含む血液を、試料の流れに直角に置かれたいくつかの強力な希土類棒磁石を有するフロースルー捕捉セルに注入した。流路断面０．５ｍｍ×２０ｍｍ（ｈ×ｗ）および７個のＮｄＦｅＢ棒磁石を有するフローチャンバーを用いて、５ｍＬ／分という速さの流速が達成された。磁石の存在下で混合液をチャンネル内に流した後に、ヘパリンを含む洗浄溶液をチャンネル内に流した。血液成分を除去して磁気粒子の凝集体の形成を低減するために、結合した標的をヘパリン含有バッファーで１回洗浄した。結合した標的を効果的に洗浄するために、磁石を取り出し、捕捉された磁性材料を洗浄バッファーに再懸濁させ、その後磁場を再び加え、同じフロースルー捕捉セルで磁性材料を捕捉した。

【００８０】

捕捉された標識標的の除去は、磁石を捕捉チャンバーから遠ざけ、バッファー溶液流により溶出した後に可能であった。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/33410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - G01N 33/48 (2011.01)
USPC - 435/7.32, 436/63, 501
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)
USPC: 435/7.32, 436/63, 501

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 435/7.32, 436/63, 501 (keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar
Search Terms Used: isolating bacteria, one CFU/ml, one bacterium, magnetic, antibody, low concentration

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0098531 A1 (Thacker) 25 July 2002 (25.07.2002) para [0021], [0034]	1
X	WO 2009/048673 A2 (Boedicker et al.) 16 April 2009 (16.04.2009) para [0015], [0020], [0047], [0068], [0073], [00142], [00188]	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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	Date of mailing of the international search report
24 June 2011 (24.06.2011)	19 JUL 2011

Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,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

(72)発明者　ドリガ，　セルゲイ　エー．
アメリカ合衆国　ニューメキシコ　８７１４４，　リオ　ランチョ，　スカッグウェイ　ドライブ　エヌイー　７３１７
(72)発明者　クラリッツァ，　リサージョ　アン
アメリカ合衆国　ニューメキシコ　８７１０６，　アルバカーキ，　ティヘラス　エヌイー　１５１６　ナンバー３１

Ｆターム(参考)　2G045 AA28 BB12 CB21
4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 DA05 GA27 HA11 HA12
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ03 QQ06 QQ16 QR48 QR55 QR83 QS02
QS12 QS25 QS32 QX04 QX10