

(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
2014 年 2 月 6 日(06.02.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/021352 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/070663
- (22) 国際出願日: 2013 年 7 月 30 日(30.07.2013)
- (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 2012-173251 2012 年 8 月 3 日(03.08.2012) JP
- (71) 出願人: 森永乳業株式会社(MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1088384 東京都港区芝五丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 副島 隆志(SOEJIMA, Takashi); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 食品基盤研究所内 Kanagawa (JP). 南淳一(MINAMI, Junichi); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 食品基盤研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 1 0 号 アクロポリス 2 1 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, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: MICROORGANISM DETECTION METHOD AND MICROORGANISM DETECTION KIT

(54) 発明の名称: 微生物検出法及び微生物検出キット

(57) Abstract: Living cells of a microorganism in a test sample are distinguished from dead cells or damaged cells and detected by the following steps: a) a step in which a palladium complex is added to the test sample; b) a step in which a target domain of the DNA or RNA of the microorganism in the test sample is amplified by a nucleic acid amplification technique; and c) a step in which the amplification product is analysed.

(57) 要約: 以下の工程により、被検試料中の微生物の生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出する。
a) 前記被検試料にパラジウム錯体を添加する工程、 b) 被検試料に含まれる微生物の DNA 又は RNA のターゲット領域を核酸増幅法により増幅する工程、及び c) 増幅産物を解析する工程。



WO 2014/021352 A1

明 細 書

発明の名称：微生物検出法及び微生物検出キット

技術分野

[0001] 本発明は、食品や生体試料中に含まれる微生物、工業用水や市水等の環境中に含まれる微生物の検出法、及び微生物検出キットに関する。さらに詳しくは、食品や生体試料、拭き取り試料、工業用水や市水等の環境中に含まれる微生物の生細胞の選択的な検出が可能な検出法及び微生物検出キットに関する。

背景技術

[0002] 食品や生体試料、拭き取り試料、又は環境中の一般生菌数の測定には、従来、平板培養法が用いられてきた。しかし、平板培養法は結果が得られるまでに2日間から一ヶ月程度の時間を要し、細菌の同定も困難であるという問題があった。

[0003] 近年では、被検試料をエチジウムモノアザイド（EMA、ethidium monoazide）等のDNAを架橋する架橋剤や、トポイソメラーゼ阻害剤及び／又はDNAジャイレース阻害剤で処理した後、試料中の微生物中の染色体DNAを選択的に核酸増幅反応により増幅することによって、試料中の生菌を検出する技術が提案され、成果を挙げている（特許文献1～4）。

[0004] 上記のような架橋剤、トポイソメラーゼ阻害剤及びDNAジャイレース阻害剤は、細胞内に侵入すると、DNAに結合もしくはインターカレートしたりしてトポイソメラーゼやDNAジャイレース（酵素）の働きを阻害したり、又はDNAを架橋し、その結果、染色体DNAが破壊（断片化・切断）される。これらの薬剤は、生菌の細胞壁よりも死菌及び損傷菌の細胞壁の方が透過しやすいため、生菌よりも損傷菌や死菌の染色体DNAが優先的に断片化される。したがって、染色体DNAの特定の領域をターゲットとしたPCRにより、生菌を損傷菌や死菌に比べて選択的に検出することができる。

[0005] 尚、上記PCRの鋳型としては、従来、被検試料に含まれる微生物細胞か

ら抽出した核酸が用いられていたが、細胞からの核酸の抽出を行わずに、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤の存在下でPCRを行うことで、迅速に生菌を検出する方法が開示されている（特許文献4）。

[0006] 前記EMAは、DNAに水素結合した後、350～700nmの波長の光照射を行うことによりDNAの分子間を架橋する。したがって、試料への光照射が必須であるが、光源による試料への加熱を防ぐため、通常、氷水中に試料を浸漬して光照射が行われており、工程が煩雑となっている。また、光源にLEDを用いる方法も提案されているが、光強度が不十分であり、また、経時的に架橋剤の架橋能の低下がみられる等の問題がある。さらに、EMA等の薬剤やそれを含む試料は、薬剤の変性等を防ぐため、前記の試料への光照射を除いて、暗室中などの遮光下におく必要がある。

[0007] また、これまでの方法では、生菌を死菌及び損傷菌と区別するために、PCRのターゲット領域としては、一定以上の長さ、例えば900塩基（bp）以上の長さを有する領域を用いるのが一般的である。しかしながら、現在一般的な定量PCRにて使用されている80～200bp程度のターゲット領域に比べて、900bp以上の領域をPCRにより増幅するためには、各サイクルに数倍の時間を要し、また、定量性にも問題がないとはいえない。

[0008] 一方、試料を架橋剤で処理した後、試料に培地を加えて加温し、再度架橋剤による処理を行うこと（特許文献3）、又は、EMAとトポイソメラーゼ阻害剤又はDNAジャイレース阻害剤とを併用すること（特許文献2）により、100bp程度のターゲット領域であっても、生菌と死菌又は損傷菌との区別が可能ながことが知られている。しかしながら、これらの方法は、工程または薬剤調製が煩雑である。

[0009] ところで、シスプラチン（cisplatin、cis-ジアンミンプラチナム(II)ジクロライド、cis-diammineplatinum (II) dichloride）、カルボプラチン（Carboplatin）等のプラチナ錯体は、抗悪性腫瘍剤として知られている（非特許文献1、2）。それらの作用機序は、腫瘍細胞のDNA合成の阻害であり、殺細胞の作用様式は濃度依存的速効性といわれている。なかでも、シスプラ

チン及びカルボプラチンは、核酸（アデニン(A)又はグアニン(G)：これらは生物無機化学では中間的（メデイウム）なルイス塩基として定義される）への配位結合（共有結合）を介した抗癌剤として近年臨床でも利用されている薬剤である。

[0010] 通常抗生物質は、細菌の対数増殖期に最も威力を発揮するといわれているが、シスプラチンは腫瘍細胞の如何なる時期においても抗腫瘍効果を発揮する（非特許文献3）。

[0011] また、白金族元素であるパラジウムに関しては、ジアンミンジクロロパラジウム（II）（diamminedichloro-palladium（II））等のパラジウム錯体について、抗ウイルス効果・抗腫瘍効果を期待して基礎的研究がなされたものの（非特許文献4）、これまで臨床現場でも利用実績はない。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：特許第4340734号

特許文献2：国際公開第2007/094077

特許文献3：国際公開第2009/022558

特許文献4：国際公開第2011/010740

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Rosenberg, B. et al., Nature, 205:698-699, 1965

非特許文献2：Lovejoy, K.S. et al., PNAS, 105(26):8902-8907, 2008

非特許文献3：「ブリプラチン注10 mg、ブリプラチン注25 mg、ブリプラチン注50 mg BRIPLATIN INJECTION（シスプラチン注射液）製品情報概要」、ブリストール・マイヤーズ株式会社、2007年12月

非特許文献4：Graham, R.D. et al., J. Inorg. Nucl. Chem., 41:1245-1249, 1979

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、簡便な工程で、かつ、好ましい形態ではターゲット領域が比較的短くても、微生物の生細胞の検出が可能な方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、被検試料を薬剤で処理し、試料中の微生物中の染色体DNAを選択的に核酸増幅反応により増幅することによって、試料中の生細胞を検出する技術において、使用する薬剤について検討した。そして、パラジウム錯体を用いると、試料への光照射、冷却、及び遮光環境を必要とせずに、微生物の生細胞の検出ができること、及び、ターゲット領域として比較的短鎖長の領域を設定した場合でも、高精度で微生物の生細胞を検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0016] すなわち、本発明は、被検試料中の微生物の生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出する方法であって、以下の工程を含む方法：

- a) 前記被検試料にパラジウム錯体を添加する工程、
 - b) 被検試料に含まれる微生物のDNA又はRNAのターゲット領域を核酸増幅法により増幅する工程、及び
 - c) 増幅産物を解析する工程、
- を提供する。

[0017] 前記方法は、前記ターゲット領域の増幅が、細胞からの核酸の抽出を行わずに行われることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記ターゲット領域の増幅が、微生物細胞内で行われることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記ターゲット領域の増幅が、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、マグネシウム塩、及び有機酸塩又はリン酸塩を前記被検試料に添加して行われることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記ターゲット領域の増幅が、界面活性剤の存在下で行われることを好ましい態様としている。

[0018] また、前記方法は、前記被検試料が、食品、生体試料、飲料水、工業用水

、環境用水、排水、土壌、又は拭き取り試料のいずれかであることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記微生物が、細菌、又はウイルスであることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記細菌が、グラム陰性細菌、又はグラム陽性細菌であることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記ターゲット領域が、50～5000塩基のターゲット領域であることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記ターゲット領域が、被検試料のDNAの5S rRNA遺伝子、16S rRNA遺伝子、23S rRNA遺伝子、及びtRNA遺伝子から選択される遺伝子に対応するターゲット領域であることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記核酸増幅法が、PCR法、RT-PCR法、LAMP法、SDA法、LCR法、TMA法、TRC法、HC法、SMAP法、又はマイクロアレイ法であることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記PCR法がリアルタイムPCR法により行われ、PCRと増幅産物の解析が同時に行われることを好ましい態様としている。

また、前記方法は、前記増幅産物の解析が、微生物の標準試料を用いて作成された微生物量及び増幅産物との関連を示す標準曲線を用いて行われることを好ましい態様としている。

[0019] また、本発明は、核酸増幅法により、被検試料中の微生物の生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出するためのキットであって、下記の要素を含むキット：

1) パラジウム錯体、又は、

配位子としてパラジウムに結合し得る有機溶媒、もしくは配位子としてパラジウムに結合し得る物質を含む溶液に溶解したときにパラジウム錯体を生成するパラジウム化合物、

2) 検出対象の微生物のDNA又はRNAのターゲット領域を核酸増幅法

により増幅するためのプライマー、
を提供する。

[0020] 前記本発明のキットは、さらに配位子としてパラジウムに結合し得る有機溶媒を含むことを好ましい形態としている。

前記本発明のキットは、さらに、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、マグネシウム塩、及び有機酸塩又はリン酸塩を含むことを好ましい形態としている。

また、前記キットは、さらに界面活性剤を含むことを好ましい形態としている。

[0021] また、本発明の方法及びキットは、前記パラジウム錯体が、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素、カルボキシレート基、 H_2O 、 CO_3^{2-} 、 OH^- 、 NO_3^- 、 ROH 、 N_2H_4 、 PO_4^{3-} 、 R_2O 、 RO^- 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ 、 R_2S 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、 R^- （ただし、前記「R」の表記は、いずれも飽和又は不飽和有機基を表す）、 NO_2^- 、 Ar-NH_2 、 Ar-CN （Arは不飽和有機基）、 N_2 、 SO_3^{2-} 、イミダゾール環、不飽和環状有機基、及び N_3^- から選ばれる配位子を含むものであることを好ましい形態としている。

また、前記方法及びキットは、前記配位子が、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素、カルボキシレート基、 R_3P 、及び Ar-CN からなる群から選ばれることを好ましい形態としている。

[0022] また、前記方法及びキットは、前記パラジウム錯体が、ジクロロ（ η -シクロオクタ-1,5-ジエン）パラジウム（II）、ビス（ベンゾニトリル）ジクロロパラジウム（II）、ジアンミンジクロロパラジウム（II）、ジクロロ（エチレンジアミン）パラジウム（II）、及びビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（II）ジアセテートからなる群から選ばれることを好ましい形態としている。

[0023] また、前記方法及びキットは、前記パラジウム錯体が、パラジウム化合物を、配位子としてパラジウムに結合し得る有機溶媒、又は配位子としてパラジウムに結合し得る物質を含む溶液に溶解することにより生成するパラジウ

ム錯体であることを好ましい形態としている。

[0024] また、前記方法及びキットは、前記パラジウム化合物が、塩化パラジウム、フッ化パラジウム、臭化パラジウム、ヨウ化パラジウム、水酸化パラジウム、二硝酸パラジウム (II)、四硝酸パラジウム (IV)、酢酸パラジウム、リン酸パラジウム、ジメトキシパラジウム、メトキシリン酸パラジウム、亜硫酸パラジウム、ジニトロパラジウム、及びパラジウムジアジドからなる群から選ばれることを好ましい形態としている。

また、前記方法及びキットは、前記パラジウム化合物が塩化パラジウム (I)、又は酢酸パラジウム (II) であることを好ましい形態としている。

[0025] また、本発明の方法及びキットは、前記有機溶媒がジメチルスルホキシドであることを好ましい形態としている。

発明を実施するための形態

[0026] 次に、本発明の好ましい実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されず、本発明の範囲内で自由に変更することができるものである。尚、本明細書において百分率は特に断りのない限り質量による表示である。

[0027] < 1 > 本発明の方法

本発明の方法は、被検試料中の微生物の生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出する方法であって、以下の工程を含む方法である。

- a) 前記被検試料にパラジウム錯体を添加する工程、
- b) 被検試料に含まれる微生物の DNA 又は RNA のターゲット領域を核酸増幅法により増幅する工程、及び
- c) 増幅産物を解析する工程。

[0028] 本発明の方法においては、増幅の対象は核酸全般のいずれであってもよく、具体的には 1 本鎖 DNA、2 本鎖 DNA、1 本鎖 RNA、及び 2 本鎖 RNA を例示することができる。

[0029] 本明細書において、「被検試料」とは、その中に存在する微生物の生細胞を検出する対象であり、核酸増幅法による染色体 DNA、又は RNA の特定

領域の増幅によって存在を検出することが可能なものであれば特に制限されないが、食品、生体試料、飲料水、工業用水、環境用水、排水、土壌、又は拭き取り試料等が挙げられる。

[0030] 特に、食品としては、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果汁飲料、乳酸菌飲料等の飲料（これらの飲料の濃縮原液及び調製用粉末を含む）；アイスクリーム、アイスシャーベット、かき氷等の氷菓；加工乳、乳飲料、発酵乳、バター等の乳製品；経腸栄養食品、流動食、育児用ミルク、スポーツ飲料；特定保健用食品、健康補助食品等の機能性食品等が好ましい。

[0031] また、生体試料としては、血液試料、尿試料、髄液試料、滑液試料、胸水試料、喀痰試料、糞便試料、鼻腔粘液試料、喉頭粘液試料、胃洗浄液試料、胆汁試料、皮膚粘膜試料、口腔粘液試料、呼吸器粘膜試料、消化器粘膜試料、眼結膜試料、胎盤試料、生殖細胞試料、産道試料、母乳試料、唾液試料、嘔吐物、又は水疱内容等が例示される。

さらに、環境用水としては、市水、地下水、河川水、又は雨水等が例示される。

[0032] 本発明においては、被検試料は、前記のような食品、生体試料、飲料水、工業用水、環境用水、排水、土壌、又は拭き取り試料等そのものであってもよく、これらを希釈もしくは濃縮したもの、又は本発明の方法による処理以外の前処理をしたものであってもよい。前記前処理としては、加熱処理、濾過、遠心分離等が挙げられる。

[0033] また、被検試料中に存在する微生物以外の細胞、タンパク質コロイド粒子、脂肪及び糖質等の夾雑物は、これらを分解する活性を有する酵素による処理等によって除去又は低減させてもよい。前記被検試料中に存在する微生物以外の細胞としては、被検試料が乳、乳製品、乳又は乳製品を原料とする食品である場合には、ウシ白血球及び乳腺上皮細胞等が挙げられる。また、被検試料が血液試料、尿試料、髄液試料、滑液試料又は胸水試料等の生体試料の場合には、赤血球、白血球（顆粒球、好中球、好塩基球、単球、リンパ球等）、及び血小板等が挙げられる。

[0034] 前記酵素としては、前記夾雑物を分解することができ、かつ、検出対象の微生物の生細胞を損傷しないものであれば特に制限されないが、例えば、脂質分解酵素、タンパク質分解酵素、及び糖質分解酵素が挙げられる。前記酵素は、1種類の酵素を単独で用いてもよいし、2種又はそれ以上の酵素を併用してもよいが、脂質分解酵素及びタンパク質分解酵素の両方、又は脂質分解酵素、タンパク質分解酵素、及び糖質分解酵素の全てを用いることが好ましい。

[0035] 脂質分解酵素としては、リパーゼ、フォスファターゼ等が、タンパク質分解酵素としてはセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、プロテイナーゼK、プロナーゼ等が、糖質分解酵素としてはアミラーゼ、セルラーゼ、N-アセチルムラミダーゼ等が挙げられる。

[0036] 「微生物」は、本発明の方法により検出される対象であり、核酸増幅法により検出することが可能であって、かつ、DNA結合性タンパク質又はRNA結合性タンパク質に結合するパラジウム錯体の微生物に対する作用が生細胞と死細胞や損傷細胞とで異なるものであれば、特に制限されないが、好ましくは細菌、糸状菌、酵母、又はウイルス等が挙げられる。細菌としては、グラム陽性菌及びグラム陰性菌のいずれもが含まれる。

[0037] グラム陽性菌としては、ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）等の*Staphylococcus*属細菌、肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）、*Streptococcus pyogenes*等の*Streptococcus*属細菌、*Listeria monocytogenes*等の*Listeria*属細菌、*Bacillus cereus*、炭疽菌（*Bacillus anthracis*）等の*Bacillus*属細菌、*Mycobacterium tuberculosis*）、*Mycobacterium bovis*）、*Mycobacterium avium*）、*Mycobacterium intracellulare*）等の*Mycobacterium*属細菌、

ボツリヌス菌（クロストリジウム・ボツリヌム(*Clostridium botulinum*))、
ウェルシュ菌（クロストリジウム・パーフリンジエンス(*Clostridium perfringens*))等のクロストリジウム属細菌等が挙げられる。

[0038] また、グラム陰性菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)
等のエシェリヒア属細菌、クロノバクター・サカザキ (*Cronobacter sakazakii*) (旧名、エンテロバクター・サカザキ (*Enterobacter sakazakii*)) 等のエンテロバクター属細菌、シトロバクター・コーセリ (*Citrobacter koseri*) 等のシトロバクター属細菌、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) 等のクレブシエラ属細菌に代表される腸内細菌群、サルモネラ属細菌、ビブリオ属細菌、シュードモナス属細菌、レジオネラ属細菌等が挙げられる。

[0039] ウイルスとしては、エンベロープを有するインフルエンザウイルス等のウイルス、及び、エンベロープを有さずヌクレオカプシドのみを有するノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどが挙げられる。

[0040] ウイルスに関しては、後記実施例 1～4、6～8に示されるように、パラジウム錯体であるジクロロ (η -シクロオクタ-1,5-ジエン) パラジウム (II) (*dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)*)、ビス (ベンゾニトリル) ジクロロパラジウム (II) (*bis(benzonitrile)dichloropalladium (II)*)、ジアンミンジクロロパラジウム (II) (*diamminedichloropalladium (II)*)、ジクロロ (エチレンジアミン) パラジウム (II) (*dichloro(ethylenediamine)palladium (II)*)、もしくはビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) ジアセテート (*bis(triphenylphosphine)palladium(II)diacetate*) 又は、塩化パラジウムをジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して得られる錯体による処理により、グラム陰性細菌であるクロノバクター・サカザキ、又はエシェリヒア・コリの生細胞と死細胞の識別が可能であることが示されたことにより、グラム陰性細菌細胞壁外膜と同成分であるインフルエンザウイルス等の最外殻エンベロープについても、完全性を保ったエンベロープを有する活性型ウイルス (生きたウイルス) は上記のようなパラジウム錯体

は透過せず、損傷エンベロープを有する不活性型ウイルス（死んだウイルス）はパラジウム錯体を容易に透過することが類推できる。さらに、実施例5に示されるように、diamminedichloropalladium (II)により、スタフィロコッカス・アウレウスの生細胞と死細胞の識別が可能であることが示された。これらの結果から、パラジウム錯体は、微生物全般について生細胞と死細胞の識別に使用できると考えられる。

[0041] 本発明において「生細胞」（Live cell）とは、一般に好適な培養条件によって培養した際に増殖が可能であって、その微生物が有する代謝活性を示す状態（Viable-and-Culturable state）であり、細胞壁の損傷はほとんど無い微生物をいう。なお、ここでいう代謝活性とはATP活性やエステラーゼ活性を例示することができる。本発明においては、ウイルス粒子も、便宜的に「細胞」と呼ぶ。「生細胞」は、ウイルスに関しては、哺乳動物細胞に感染し、増殖できる状態をいう。

[0042] 「死細胞」（Dead cell）とは、好適な培養条件によって培養した場合であっても増殖は不可能であって、代謝活性を示さない状態（Dead）の微生物である。また、細胞壁の構造は維持されているものの、細胞壁自体は高度に損傷を受けており、ヨウ化プロピジウムのような弱透過性の核染色剤等が細胞壁を透過する状態である。ウイルスに関しては、哺乳動物細胞に感染できない状態をいう。

[0043] 「損傷細胞」（Injured cell又はViable-but-Non Culturable cell）とは、人為的ストレス又は環境的ストレスにより損傷を受けているために、一般に好適な培養条件によって培養した場合であっても、増殖は困難であるが、その微生物が有する代謝活性は、生細胞と比較すると低下しているものの死細胞と比較すると有意に活性を有する状態の微生物である。ウイルスに関しては、哺乳動物細胞に感染したとしても、細胞中で増殖できない状態をいう。

本明細書においては、特記しない限り、「生細胞」、「死細胞」及び「損傷細胞」は、微生物の生細胞、死細胞及び損傷細胞を意味する。

[0044] 特に、食品衛生検査や臨床検査において、穏和な加熱処理や抗生物質投与により、損傷細胞の状態を呈した細菌の検出が注目されており、本発明においては、生細胞の検出のみならず、生細胞と死細胞又は損傷細胞との識別も可能な微生物の検出方法を提供するものである。

[0045] 尚、生細胞、損傷細胞及び死細胞の細胞数単位は、通常、いずれも細胞数 (cells) / ml で表される。

生細胞の細胞数は、好適な平板培地上で好適な条件で培養したときのコロニー形成数 (cfu/ml (colony forming units / ml)) で近似させることができる。また、損傷細胞の標準試料は、例えば、生細胞けん濁液を加熱処理、例えば沸騰水中で加熱処理することにより調製することができるが、その場合は、損傷細胞の細胞数は、加熱処理する前の生細胞けん濁液の cfu / ml で近似させることができる。尚、損傷細胞を調製するための沸騰水中での加熱時間は、微生物の種類により異なるが、例えば実施例に記載された細菌では、50秒程度で損傷細胞を調製することができる。

さらに、損傷細胞の標準試料は、抗生物質処理によっても調製することができるが、その場合は、損傷細胞の細胞数は、生細胞けん濁液を抗生物質で処理した後、抗生物質を除去し、可視光 (波長600nm) の透過度、すなわち濁度を測定し、生細胞数濃度が予め判っている生細胞けん濁液の濁度と比較することにより、好適な平板培地上で好適な条件で培養したときのコロニー形成数 (cfu/ml) で近似させることができる。

ウイルスでは、細胞数単位は、プラーク形成単位 (pfu又はPFU (plaque-forming units)) で表される。

[0046] 尚、本発明の方法は、生細胞の検出が目的であり、生細胞と区別される微生物は、損傷細胞であっても死細胞であってもよい。

[0047] 本発明において、「生細胞の検出」とは、被検試料中の生細胞の有無の判別及び生細胞の量の決定のいずれをも含む。また、生細胞の量とは、絶対的な量に限られず、対照試料に対する相対的な量であってもよい。また、「生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出する」とは、死細胞又は損傷細胞

胞に比べて選択的に検出することを意味する。尚、「生細胞と死細胞又は損傷細胞との識別」には、生細胞と、死細胞及び損傷細胞の両方との識別も含まれる。

[0048] 以下、本発明の方法を工程毎に説明する。尚、前記したように、以下の工程の前に、任意の工程として、被検試料を、被検試料中に存在する微生物以外の細胞、タンパク質コロイド粒子、脂肪、又は糖質を分解する活性を有する酵素で処理する工程を含んでいてもよい。

[0049] (1) 工程 a)

被検試料に、パラジウム錯体（以下、「本発明の薬剤」、又は単に「薬剤」とも記載する。）を添加する。すなわち、被検試料中の微生物を、前記薬剤で処理する。

微生物細胞内では、前記薬剤は核酸には実質的に結合せず、DNA結合性タンパク質（例えばHUヒストン様タンパク質）やRNA結合性タンパク質（例えばSynaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein「SYNCRIP」分子量66 kDa（特開2002-101890号公報）や核内RNA-タンパク質複合体・パラスペックル（paraspeckle）（Sasaki, Y. T. et. al., (2009), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 : 2525-2530）を形成するタンパク質、もしくはリボゾームタンパク質のようなタンパク質を介して、ターゲット領域のPCR反応を阻害すると推定される。従って、DNA結合性タンパク質もしくはリボゾームタンパク質のようなタンパク質と核酸が存在する細胞内では、主として同タンパク質に結合する薬剤であり得る。本発明の薬剤とタンパク質との結合は、配位結合（共有結合）であり得る。

[0050] 前記薬剤は、生細胞と、損傷細胞又は死細胞及びウシ白血球等の体細胞、白血球、血小板等に対する作用が異なるものであることが好ましく、より具体的には、生細胞の細胞壁よりも損傷細胞もしくは死細胞の細胞壁、又はウシ白血球等の体細胞、白血球、血小板等の細胞膜に対して透過性が高いものであることが好ましい。

[0051] パラジウム錯体としては、生細胞と損傷細胞又は死細胞の細胞壁に対する透過性が異なり、かつ、細胞内の核酸結合性タンパク質（DNA結合タンパク質又はRNA結合タンパク質）に直接結合してターゲット領域のPCR反応を阻害し得る限り、特に制限されないが、例えば、配位子として、少なくともNH₃、RNH₂、ハロゲン元素（Cl、F、Br、I、At）、カルボキシレート基、H₂O、CO₃²⁻、OH⁻、NO₃⁻、ROH、N₂H₄、PO₄³⁻、R₂O、RO⁻、ROPO₃²⁻、(RO)₂PO₂⁻、R₂S、R₃P、RS⁻、CN⁻、RSH、RNC、(RS)₂PO₂⁻、(RO)₂P(O)S⁻、SCN⁻、CO、H⁻、R⁻（ただし、前記「R」の表記は、いずれも飽和又は不飽和有機基を表す）、NO₂⁻、Ar-NH₂、Ar-CN（Arは芳香環等の不飽和有機基）、N₂、SO₃²⁻、N₃⁻、イミダゾール環、不飽和環状有機基、又はN₃⁻から選ばれる一つを含むパラジウム錯体が挙げられる。パラジウム錯体は、上記のような配位子を一つ含んでいてもよく、同一又は異なる配位子を複数含んでいてもよい。

[0052] 前記飽和有機基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、シクロブチル基、ペンチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等のアルキル基等が挙げられる。また、不飽和有機基としては、ベンジル基（ベンゼン環）、ナフチル基（ナフタレン環）、アリル基、シクロオクタジエニル基等の不飽和環状有機基、等が挙げられる。これらの飽和有機基及び不飽和有機基は置換基を有していてもよい。

[0053] 上記配位子としては、NH₃、RNH₂、ハロゲン元素（Cl、F、Br、I、At）、カルボキシレート基、H₂O、CO₃²⁻、OH⁻、NO₃²⁻、ROH、N₂H₄、PO₄³⁻、R₂O、RO⁻、ROPO₃²⁻、(RO)₂PO₂⁻、R₃P、Ar-CN、不飽和環状有機基が好ましい。これらの中では、NH₃、RNH₂、ハロゲン元素、カルボキシレート基、R₃P、及びAr-CNが特に好ましい。

ハロゲン元素としては、Cl（塩素）が好ましい。

[0054] Lippardら（生物無機化学 Lippard, S.J. and Berg, J.M. 著；松本和子監修、21-23頁“生物無機化学の研究における配位化学の原理”）の表2・1には、金属（ソフト、中間、ハードのルイス酸）と配位子（ソフト、中間、ハードのルイス塩基）の関係が記載されており、個々の例外はあるものの、パラ

ジウムのようなソフトなルイス酸と各ルイス塩基との結合性は、[ソフトなルイス塩基]（システイン[スルフヒドリル基]やメチオニン[チオエーテル部位]のようなタンパク質構成アミノ酸など）＞[中間のルイス塩基]（アデニン（A）やグアニン（G）など）＞[ハードなルイス塩基]（ClやNH₃基など）の順であることが示唆されている（hard-soft acid-base theory；Lippardら、21-22頁参照）。

このように、パラジウムは、ソフトなルイス塩基であるシステインやメチオニンを配位結合の相手として一番好むので、ハード又は中間のルイス塩基とパラジウムを予め配位結合させたパラジウム錯体は、細胞中でタンパク質中のアミノ酸に配位結合して安定化されると推定される。したがって、核酸結合性タンパク質を介した核酸増幅抑制能の観点からは、本発明の薬剤は、ハード又は中間のルイス塩基とパラジウムが配位結合した化合物が好ましく、ハードなルイス塩基とパラジウムが配位結合した化合物がより好ましい。

尚、ソフトなルイス塩基、例えばR₂S、R₃P、RS⁻、CN⁻、RSH、RNC、(RS)₂PO₂⁻、(RO)₂P(O)S⁻、SCN⁻、CO、H⁻、R⁻（ただし、前記「R」の表記は、いずれも飽和又は不飽和有機基を表す）を配位子として含むパラジウム錯体であっても、本発明に使用できる。

[0055] 一方、一般に生細胞と比較して死細胞は形態学的に損傷が激しく（損傷の程度が軽度なのが損傷細胞）、ハード又は中間のルイス塩基を配位子として含む錯体は、一般に生細胞より死細胞（損傷細胞も含む）の方が透過性は高いと考えられる。また、錯体は、全体としてプラスチャージかマイナスチャージの方が、無極性の場合よりも、一般には生細胞内へ透過し難いといわれている。したがって、本発明の薬剤は、薬剤全体としてプラスチャージかマイナスチャージであることが好ましいと考えられる。しかしながら、実施例に示すように、化合物全体として無極性であっても、作用時間をある程度短くすることによって、生細胞への透過は有意に抑制され得るので、無極性であってもよい。

[0056] パラジウム錯体として具体的には、下記の化合物が挙げられる。

ジクロロ(η -シクロオクタ-1,5-ジエン)パラジウム(II)、ビス(ベンゾニトリル)ジクロロパラジウム(II)、ジアンミンジクロロパラジウム(II)、ジクロロ(エチレンジアミン)パラジウム(II)、クロロ(η^2 -P,C(-)トリス(2,4-ジ-tert-ブチルフェニル)ホスファイト)(トリシクロフェニルホスフィン)パラジウム(II)、ジ- μ -クロロ-ビス-[5-ヒドロキシ-2-[1-(ヒドロキシイミノ- κ N)-エチル]-フェニル- κ C]-パラジウム(II) ダイマー、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II) ジクロリド、ブromo(トリ-tert-ブチルホスフィン)パラジウム(I) ダイマー、1,2-ビス(フェニルスルフィニル)エタン パラジウム(II) アセテート、クロロ[2-(ジシクロヘキシルホスフィノ)-3,6-ジメトキシ-2',4',6'-トリイソプロピル-1,1'-ビフェニル][2-(2-アミノエチル)フェニル]パラジウム(II)、クロロ-(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジイソプロポキシ-1,1'-ビフェニル)[2-(2-アミノエチル)フェニル]パラジウム(II)、クロロ[2-(ジ-tert-ブチルホスフィノ)-2',4',6'-トリイソプロピル-1,1'-ビフェニル][2-(2-アミノエチル)フェニル]パラジウム(II)、クロロ(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',4',6'-トリイソプロピル-1,1'-ビフェニル)[2-(2-アミノエチル)フェニル]パラジウム(II)、クロロ(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジメトキシ-1,1'-ビフェニル)[2-(2-アミノエチル)フェニル]パラジウム(II)、クロロ(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジメトキシ-1,1'-ビフェニル)[2-(2-アミノエチル)フェニル]パラジウム(II)、クロロ(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジメトキシ-1,1'-ビフェニル)[2-(2-アミノエチル)フェニル]パラジウム(II)、クロロ(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジメトキシ-1,1'-ビフェニル)[2-(2-アミノエチル)フェニル]パラジウム(II)、ビス[(ジシクロヘキシル)(4-ジメチルアミノフェニル)ホスフィン]パラジウム(II) クロリド、ビス[ジ-(tert-ブチル)(4-トリフルオロメチルフェニル)ホスフィン]パラジウム(II) クロリド、2-(ジメチルアミノメチル)フェロセン-1-イル-パラジウム(II) クロリド ジノルボルニルホスフィン、1,3-ビス(2,4,6-トリメチルフェニル)イミダゾール-2-イリデン (1,4-ナフトキノン)パラジウム(0) ダイマー、サリチルアルデヒド チオセミカルバゾン パラジウム(II) クロリド、2-[ビス(2,4-ジ-tert-ブチル-フェノキシ)ホスフィノキシ]-3,5-ジ(tert-ブチル)フェニル-パ

ラジウム(II) クロリド ダイマー、ジ- μ -クロロビス[5-クロロ-2-[(4-クロロフェニル)(ヒドロキシイミノ- κ N)メチル]フェニル- κ C]パラジウム ダイマー、パラジウム(II) アセテート-S-Phos(Pd:P 1:2)、トリス[ジベンジリデンアセトン]ジパラジウム(0)-S-Phos (Pd:P 1:2)、2-(ジメチルアミノ)-2-ビフェニリル-パラジウム(II) クロリド ジノルボルニルホスフィン コンプレックス、パラジウム ピバレート、ビス(ベンゾニトリル)パラジウム(II) クロリド、パラジウム(II) トリフルオロアセテート、パラジウム(π -シンナミル) クロリド ダイマー、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II) ジアセテート、1,4-ビス(ジフェニルホスフィノ)ブタン-パラジウム(II) クロリド、パラジウム(II) シアニド、パラジウム(II) プロピオネート、(2-メチルアリル)パラジウム(II) クロリド ダイマー、[2,6-ビス[(ジ-1-ピペリジニルホスフィノ)アミノ]フェニル]パラジウム(II) クロリド、[1,2-ビス(ジシクロヘキシルホスフィノ)エタン]パラジウム(II) クロリド、トリフェニルホスフィン パラジウム(II) ジクロリド ホスファアダマンタン エチル シリカ、ジクロロビス(トリシクロフェニルホスフィン)パラジウム(II)、ジクロロ(1,5-シクロオクタジエン)パラジウム(II)、(1,3-ビス(ジフェニルホスフィノ)プロパン)パラジウム(II) クロリド、1,1'-ビス(ジ-イソプロピルホスフィノ)フェロセン パラジウム ジクロリド、ジクロロビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)、クロロ(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',4',6'-トリイソプロピル-1,1'-ビフェニル)[2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II)、ビス(3,5,3',5'-ジメトキシジベンジリデンアセトン)パラジウム(0)、ジクロロ(1,10-フェナンスロリン)パラジウム(II)、ジクロロビス(トリ-*o*-トリルホスフィン)パラジウム(II)、trans-ベンジル(クロロ)ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)、トリス(3,3',3''-ホスフィニジントリス(ベンゼンスルホナト)パラジウム(0) 九ナトリウム塩九水和物、[(R)-(+)-2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-biナフチル]-ジアクオ-パラジウム(II) ビス(トリフレート)、trans-ビス(ジシクロヘキシルアミン)パラジウム(II) アセテート、(R)-1-[(S_p)-2-(ジシクロヘキシルホスフィノ)フェロセニル]

エチルジ-tert-ブチルホスフィン パラジウム(II) ジクロリド、ジクロロ[2-(4,5-ジヒドロ-2-オキサゾリル)キノリン]パラジウム(II)、ポリマー修飾のビス[(ジフェニルホスファニル)メチル]アミン パラジウム(II) ジクロリド、trans-ジブロモビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)、[(R)-(+)-2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-biナフチル]パラジウム(II) クロリド、2-[ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ブロミド]ベンジルアルコール、[(R)-(+)-2,2'-ビス(ジ-p-トリルホスフィノ)-1,1'-biナフチル]パラジウム(II) クロリド、[ビス[(R)-(+)-2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル)パラジウム(II)]ビス(μ -ヒドロキソ)]ビス(トリフレート)、ジクロロビス(トリエチルホスフィン)パラジウム(II)、[(S)-(-)-2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル]-ジアクオ-パラジウム(II)ビス(トリフレート)、ジアセトビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(I)、[ビス[(S)-(-)-2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル)パラジウム(II)]ビス(μ -ヒドロキソ)]ビス(トリフレート)、[(S)-(-)-2,2'-ビス(ジ-p-トリルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル]パラジウム(II) クロリド、クロロ[(1,2,5,6- η)-1,5-シクロオクタジエン](2,2-ジメチルプロピル)-パラジウム、クロロ[(トリシクロフェニルホスフィン)-2-(2'-アミノビフェニル)]パラジウム(II)、クロロ(トリフェニルホスフィン) [2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II)、ジクロロ[(S)-(-)-2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル]パラジウム(II)、ビス(ベンゾニトリル)パラジウム(II) ブロミド、クロロ[(トリ-tert-ブチルホスフィン)-2-(2'-アミノビフェニル)]パラジウム(II)、ジブロモ[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]パラジウム(II)、ジブロモ(1,5-シクロオクタジエン)パラジウム(I)、ジクロロ[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]パラジウム(II) アセトン付加物、ジクロロ[8-(ジ-tert-ブチルホスフィノキシ)キノリン]パラジウム(II)、ジクロロ(クロロ-tert-ブチルシクロヘキシルホスフィン)パラジウム(ii) ダイマー、ジクロロ(クロロジ-tert-ブチルホスフィン)パラジウム(ii) ダイマー、ジクロロ(クロロジシクロヘキシルホスフィン)パラジウム

(ii) ダイマー、ジクロロビス(クロロ t -ブチルシクロヘキシルホスフィン)パラジウム(ii)、ジクロロビス(クロロ j -tert-ブチルホスフィン)パラジウム(ii)、ジクロロビス(メチルジフェニルホスフィン)パラジウム(II)、trans-ジブromo[ビス(トリ- o -トリルホスフィン)]パラジウム(II)、トリス[μ -[(1,2- η :4,5- η)-(1E,4E)-1,5-ビス(4-メトキシフェニル)-1,4-ペンタジエン-3-オン]]ジ-パラジウム、[1,3-ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)イミダゾール-2-イリデン]クロロ[3-フェニルアリル]パラジウム(II)、クロロ(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジイソプロポキシ-1,1'-ビフェニル)[2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II)、ジクロロ(N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)パラジウム(II)、クロロ(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジメトキシ-1,1'-ビフェニル)[2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II)、[1,3-ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)-4,5-ジヒドロイミダゾール-2-イリデン]クロロ[3-フェニルアリル]パラジウム(II)、ジクロロ[1,3-ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)-1,3-ジヒドロ-2H-イミダゾール-2-イリデン]パラジウム(II) ダイマー、ジクロロ-[1,3-ビス(ジイソプロピルフェニル)イミダゾリデン-2-イリデン]パラジウム(II) ダイマー、ビス[トリス(4-(1H,1H,2H,2H-パーフルオロデシル)フェニル)ホスフィン]パラジウム(II) ジクロリド、ブromo[(2-(ヒドロキシ- κ O)メチル)フェニルメチル- κ C](トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)、[(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-3,6-ジメトキシ-2',4',6'-トリイソプロピル-1,1'-ビフェニル)-2-(2'-アミノ1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II) メタンスルホネート、(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジイソプロポキシ-1,1'-ビフェニル)[2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II) メタンスルホネート、[(4,5-ビス(ジフェニルホスフィノ)-9,9-ジメチルキサンテン)-2-(2'-アミノ1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II) メタンスルホネート、[(ジ(1-アダマンチル)-ブチルホスフィン)-2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II) メタンスルホネート、アリルクロロ[1,3-ビス(2,4,6-トリメチルフェニル)イミダゾール-2-イリデン]パラジウム(ii)、ビス[トリス(4-(ヘプタデカフルオロオクチル)フェニ

ル)ホスフィン]パラジウム(II) ジクロリド、クロロ[(1,3,5,7-テトラメチル-5-フェニル-2,4,8-トリオキサ-6-ホスファアダマンタン)-2-(2-アミノビフェニル)]パラジウム(II)、クロロ[(4,5-ビス(ジフェニルホスフィノ)-9,9-ジメチルキサンテン)-2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II)、クロロ[(ジ(1-アダマンチル)-N-ブチルホスフィン)-2-(2-アミノビフェニル)]パラジウム(II)、クロロ(ソディウム-2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ジメトキシ-1,1'-ビフェニル-3'-スルホネート)[2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II)、ジクロロ[(S)-N,N-ジメチル-1-[(R)-2-(ジフェニルホスフィノ)フェロセニル]エチルアミン]パラジウム(II)、ジクロロ[ビス(2-(ジフェニルホスフィノ)フェニル)ether]パラジウム(II)、ジクロロビス(3,7-ジアセチル-1,3,7-トリアザ-5-ホスファビシクロ[3.3.1]ノナン)パラジウム(II)、[(2-[ビス[3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ホスフィン]-3,6-ジメトキシ-2',4',6'-トリスプロピル-1,1'-ビフェニル)-2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II) メタンスルホネート、クロロ[(2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2',6'-ビス(N,N-ジメチルアミノ)-1,1'-ビフェニル)-2-(2'-アミノ-1,1'-ビフェニル)]パラジウム(II)、アリル[1,3-ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)イミダゾール-2-イリデン]クロロパラジウム(II)、(1,3-ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)イミダゾリデン)(3-クロロピリジル)パラジウム(II)ジクロリド、2-(2'-ジ-tert-ブチルホスフィン)ビフェニルパラジウム(II) アセテート、テトラクロロパラジウム酸(II)ナトリウム、ビス(アセトニトリル)ジクロロパラジウム(II)、テトラクロロパラジウム酸(II)アンモニウム、ヘキサクロロパラジウム酸(IV)アンモニウム、テトラクロロパラジウム酸(II)カリウム、ヘキサクロロパラジウム酸(IV)カリウム、(2,2'-ビピリジン)ジクロロパラジウム(II)、(ビシクロ[2.2.1]ヘプタ-2,5-ジエン)ジクロロパラジウム(II)、アリル[1,3-ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)-2-イミダゾリジニリデン]クロロパラジウム(II)、ジ- μ -クロロビス[1-[(1R)-1-(ジメチルアミノ)エチル]-2-ナフチル-C,N]ジパラジウム(II)、(2,2'-ビピリジン)ジクロロパラジウム(II)、(ビシクロ[2.2.1]ヘプタ-2,5-ジエン)ジ

クロロパラジウム(II)、アリル[1,3-ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)-2-イミダゾリジニリデン]クロロパラジウム(II)、ジ- μ -クロロビス[1-[(1R)-1-(ジメチルアミノ)エチル]-2-ナフチル-C,N]ジパラジウム(II)、ビス(ジ-tert-ブチル(4-ジメチルアミノフェニル)ホスフィン)ジクロロパラジウム(II)、trans-ビス(アセタト)ビス[o-(ジ-o-トリルホスフィノ)ベンジル]ジパラジウム(II)、アリル[1,3-ビス(メシチル)イミダゾール-2-イリデン]クロロパラジウム(II)、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)、テトラクロロパラジウム酸(II)カリウム、ヘキサクロロパラジウム酸(IV)カリウム、アリルパラジウム(II) クロリド ダイマー、[1,1'-ビス(ジ-tert-ブチルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)、(2-ブテニル)クロロパラジウム ダイマー

(英名：dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium(II)、bis(benzonitrile)dichloropalladium(II)、diamminedichloropalladium(II)、dichloro(ethylenediamine)palladium(II)、chloro(η^2 -P,C(-)tris(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphite)(tricyclohexylphosphine)palladium(II)、di- μ -chlorobis-[5-hydroxy-2-[1-(hydroxyimino- κ N)-ethyl]-phenyl- κ C]-palladium(II) dimer、bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride、bromo(tri-tert-butylphosphine)palladium(I) dimer、1,2-bis(phenylsulfinyl)ethane palladium(II) acetate、chloro[2-(dicyclohexylphosphino)-3,6-dimethoxy-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl][2-(2-aminoethyl)phenyl]palladium(II)、chloro-(2-Dicyclohexylphosphino-2',6'-diisopropoxy-1,1'-biphenyl)[2-(2-aminoethyl)phenyl]palladium(II)、chloro[2-(di-tert-butylphosphino)-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl][2-(2-aminoethyl)phenyl]palladium(II)、chloro(2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl)[2-(2-aminoethyl)phenyl]palladium(II)、chloro(2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxy-1,1'-biphenyl)[2-(2-aminoethylphenyl)]palladium(II)、chloro(2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxy-1,1'-biphenyl)[2-(2-aminoethylphenyl)]palladium(II)、chloro(2-dicyclohexylphosp

hino-2',6'-dimethoxy-1,1'-biphenyl)[2-(2-aminoethylphenyl)]palladium(II)、bis[(dicyclohexyl)(4-dimethylaminophenyl)phosphine] palladium(II) chloride、bis[di-(tert-butyl)(4-trifluoromethylphenyl)phosphine]palladium(II) chloride、2-(dimethylaminomethyl)ferrocen-1-yl-palladium(I) chloride dinorbornylphosphine、1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)imidazol-2-ylidene (1,4-naphthoquinone)palladium(0) dimer、salicylaldehyde thiosemicarbazone palladium(II) chloride、2-[bis(2,4-di-tert-butylphenoxy)phosphinoxy]-3,5-di(tert-butyl)phenyl-palladium(II) chloride dimer、di- μ -chlorobis[5-chloro-2-[(4-chlorophenyl)(hydroxyimino- κ N)methyl]phenyl- κ C]palladium dimer、palladium(II) acetate-S-Phos(Pd:P 1:2)、tris[dibenzylideneacetone]dipalladium(0)-S-Phos (Pd:P 1:2)、2-(dimethylamino)-2-biphenyl-yl-palladium(II) chloride dinorbornylphosphine complex、palladium pivalate、bis(benzonitrile)palladium(II) chloride、palladium(II) trifluoroacetate、palladium(π -cinnamyl) chloride dimer、bis(triphenylphosphine)palladium(II) diacetate、1,4-bis(diphenylphosphino)butane-palladium(II) chloride、palladium(II) cyanide、palladium(II) propionate、(2-methylallyl)palladium(II) chloride dimer、[2,6-bis[(di-1-piperidinyphosphino)amino]phenyl]palladium(II) chloride、[1,2-bis(dicyclohexylphosphino)ethane]palladium(II) chloride、triphenylphosphine palladium(II) dichloride phosphadamantane ethyl silica、dichlorobis(tricyclohexylphosphine)palladium(II)、dichloro(1,5-cyclooctadiene)palladium(II)、(1,3-bis(diphenylphosphino)propane)palladium(II) chloride、1,1'-bis(di-isopropylphosphino)ferrocene palladium dichloride、dichlorobis(triphenylphosphine)palladium(II)、chloro(2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl)[2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II)、bis(3,5,3',5'-dimethoxydibenzylideneacetone)palladium(0)、dichloro(1,10-phenanthroline)palladium(II)、dichlorobis(tri-o-tolylphosphine)palladium(II)、trans-benzyl(chloro)bis(triph

enylphosphine)palladium(II)、tris(3,3',3''-phosphinidynetris(benzenesulfonato)palladium(0) nonasodium salt nonahydrate、[(R)-(+)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]-diaquo-palladium(II) bis(triflate)、trans-bis(dicyclohexylamine)palladium(II) acetate、(R)-1-[(S_p)-2-(dicyclohexylphosphino)ferrocenyl]ethyldi-tert-butylphosphine palladium(II) dichloride、dichloro[2-(4,5-dihydro-2-oxazolyl)quinoline]palladium(II)、bis[(diphenylphosphanyl)methyl]amine palladium(II) dichloride, polymer-bound、trans-dibromobis(triphenylphosphine)palladium(II)、[(R)-(+)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]palladium(II) chloride、2-[bis(triphenylphosphine)palladium(II)bromide]benzyl alcohol、[(R)-(+)-2,2'-bis(di-p-tolylphosphino)-1,1'-binaphthyl]palladium(II) chloride、[bis[(R)-(+)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]palladium(II)]bis(μ-hydroxo)] bis(triflate)、dichlorobis(triethylphosphine)palladium(II)、[(S)-(-)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]-diaquo-palladium(II) bis(triflate)、diacetobis(triphenylphosphine)palladium(II)、[bis[(S)-(-)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]palladium(II)]bis(μ-hydroxo)] bis(triflate)、[(S)-(-)-2,2'-bis(di-p-tolylphosphino)-1,1'-binaphthyl]palladium(II) chloride、chloro[(1,2,5,6-η)-1,5-cyclooctadiene](2,2-dimethylpropyl)-palladium、chloro[(tricyclohexylphosphine)-2-(2'-aminobiphenyl)]palladium(II)、chloro(triphenylphosphine) [2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II)、dichloro[(S)-(-)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]palladium(II)、bis(benzonitrile)palladium(II) bromide、chloro[(tri-tert-butylphosphine)-2-(2-aminobiphenyl)] palladium(II)、dibromo[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II)、dibromo(1,5-cyclooctadiene)palladium(II)、dichloro[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II) acetone adduct、dichloro[8-(di-tert-butylphosphinooxy)quinoline]palladium(II)、dichloro(chloro-tert-butylcyclohexylphosphine)palladium (

ii) dimer, dichloro(chlorodi-*t*-butylphosphine)palladium(ii) dimer, dichloro(chlorodicyclohexylphosphine)palladium (ii) dimer, dichlorobis(chloro-*t*-butylcyclohexylphosphine)palladium(ii), dichlorobis(chlorodi-*tert*-butylphosphine) palladium (ii), dichlorobis(methyldiphenylphosphine)palladium(II), trans-dibromo[bis(tri-*o*-tolylphosphine)]palladium (II), Tris[μ -[(1,2- η :4,5- η)-(1*E*,4*E*)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one]]di-palladium, [1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene]chloro[3-phenylallyl]palladium(II), chloro(2-dicyclohexylphosphino-2',6'-diisopropoxy-1,1'-biphenyl)[2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II), dichloro(*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine)palladium(II), chloro(2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxy-1,1'-biphenyl)[2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II), [1,3-bis(2,6-di-isopropylphenyl)-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene]chloro[3-phenylallyl]palladium(II), dichloro[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-1,3-dihydro-2*H*-imidazol-2-ylidene]palladium(II) dimer, dichloro-[1,3-bis(diisopropylphenyl)imidazoliden-2-ylidene]palladium(II) dimer, bis[tris(4-(1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodecyl)phenyl)phosphine]palladium(II) dichloride, bromo[(2-(hydroxy- κ O)methyl)phenylmethyl- κ C](triphenylphosphine)palladium (II), [(2-di-cyclohexylphosphino-3,6-dimethoxy-2',4',6'- triisopropyl-1,1'-biphenyl)-2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II) methanesulfonate, (2-dicyclohexylphosphino-2',6'-diisopropoxy-1,1'-biphenyl)[2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II) methanesulfonate, [(4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene)-2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II) methanesulfonate, [(di(1-adamantyl)-butylphosphine)-2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II) methanesulfonate, allylchloro[1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)imidazol-2-ylidene]palladium(ii), bis[tris(4-(heptafluorooctyl)phenyl)phosphine]palladium(II) dichloride, chloro[(1,3,5,7-tetramethyl-5-phenyl-2,4,8-trioxa-6-phosphaadamantane)-2-(2-amin

obiphenyl)]palladium(II)、chloro[(4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene)-2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II)、chloro[(di(1-adamantyl)-N-butylphosphine)-2-(2-aminobiphenyl)]palladium(II)、chloro(sodium-2-dicyclohexylphosphino-2',6'-dimethoxy-1,1'-biphenyl-3'-sulfonate)[2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II)、dichloro[(S)-N,N-dimethyl-1-[(R)-2-(diphenylphosphino)ferrocenyl]ethylamine]palladium(II)、dichloro[bis(2-(diphenylphosphino)phenyl)ether]palladium(II)、dichlorobis(3,7-diacetyl-1,3,7-triaza-5-phosphabicyclo[3.3.1]nonane)palladium(II)、[(2-[bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]phosphine]-3,6-dimethoxy-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-biphenyl)-2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II) methanesulfonate、chloro[(2-dicyclohexylphosphino-2',6'-bis(N,N-dimethylamino)-1,1'-biphenyl)-2-(2'-amino-1,1'-biphenyl)]palladium(II)、allyl[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene]chloropalladium(II)、(1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazolidene)(3-chloropyridyl)palladium(II)dichloride、2-(2'-di-tert-butylphosphine)biphenylpalladium(II) acetate、sodium tetrachloropalladate(II)、bis(acetonitrile)dichloropalladium(II)、ammonium tetrachloropalladate(II)、ammonium hexachloropalladate(IV)、potassium tetrachloropalladate(II)、potassium hexachloropalladate(IV)、(2,2'-bipyridine)dichloropalladium(II)、(bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene)dichloropalladium(II)、allyl[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-2-imidazolidinylidene]chloropalladium(II)、di- μ -chlorobis[1-[(1R)-1-(dimethylamino)ethyl]-2-naphthyl-C,N]dipalladium(II)、(2,2'-bipyridine)dichloropalladium(II)、(bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene)dichloropalladium(II)、allyl[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-2-imidazolidinylidene]chloropalladium(II)、di- μ -chlorobis[1-[(1R)-1-(dimethylamino)ethyl]-2-naphthyl-C,N]dipalladium(II)、bis(di-tert-butyl(4-dimethylaminophenyl)phosphine)dichloropalladium(II)、trans-bis(acetato)bis[o-(di-o-tolylphosphino)benzyl]dipalladium(II)、al

lyl[1,3-bis(mesityl)imidazol-2-ylidene]chloropalladium(II)、[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II)、potassium tetrachloropalladate(II)、potassium hexachloropalladate(IV)、allylpalladium(II) chloride dimer、[1,1'-bis(di-tert-butylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II)、(2-butenyl)chloropalladium dimer) から選ばれるパラジウム錯体が挙げられる。

[0057] 好ましい錯体としては、下記の化合物が挙げられる。

ジクロロ (η -シクロオクタ-1,5-ジエン) パラジウム(II) (dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium(II)) (化1、分子量285.51)、

ビス (ベンゾニトリル) ジクロロパラジウム(II) (bis(benzonitrile)dichloropalladium(II)) (化2、分子量383.57)、

ジアンミンジクロロパラジウム(II) (diamminedichloropalladium(II)) (化3、分子量211.39)、

ジクロロ (エチレンジアミン) パラジウム(II) (dichloro(ethylenediamine)palladium(II)) (化4、分子量237.41)、

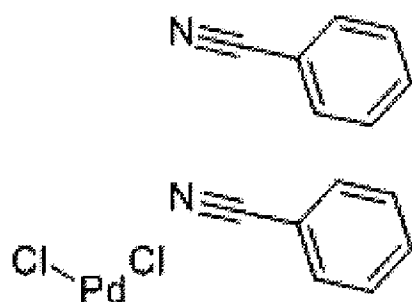
ビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム(II) ジアセテート (bis(triphenylphosphine)palladium(II)diacetate) (化5、分子量749.08)。

[0058] [化1]

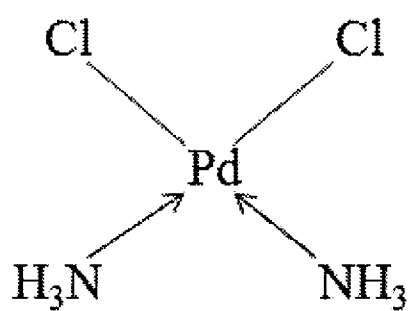


[0059]

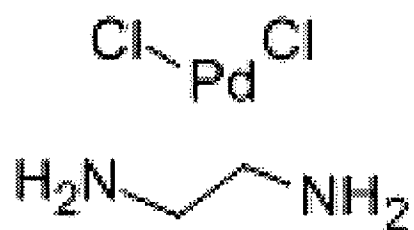
[化2]



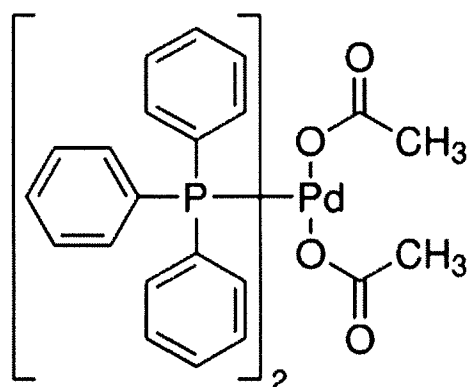
[0060] [化3]



[0061] [化4]



[0062] [化5]



[0063] また、パラジウム錯体として、パラジウム化合物を、配位子としてパラジ

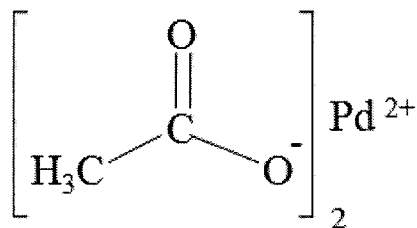
ウムに結合し得る有機溶媒、又は配位子としてパラジウムに結合し得る物質を含む溶液に溶解することにより生成するパラジウム錯体が挙げられる。このようなパラジウム化合物としては、例えば、パラジウムと他の元素又は基との共有結合により巨大分子を形成するパラジウム化合物が挙げられる。

前記元素又は基としては、ハロゲン元素 (Cl、F、Br、I、At)、 OH^- 、 NO_3^- 、 CH_3COO^- 、 NO_2^- 、 CO_3^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 RO^- 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ (ただし、前記「R」の表記は、いずれも飽和又は不飽和有機基を表す)、 SO_3^{2-} 、及び N_3^- 等が挙げられる。

[0064] 前記パラジウム化合物として具体的には、塩化パラジウム、フッ化パラジウム、臭化パラジウム、及び、ヨウ化パラジウム、水酸化パラジウム、二硝酸パラジウム(II)、四硝酸パラジウム(IV)、酢酸パラジウム、ジニトロパラジウム、炭酸パラジウム、リン酸パラジウム、ジメトキシパラジウム、メトキシリン酸パラジウム、亜硫酸パラジウム、ジニトロパラジウム、及びパラジウムジアジド等が挙げられる。これらのうち、好ましい化合物としては塩化パラジウム、臭化パラジウム、フッ化パラジウム、及びヨウ化パラジウムが挙げられ、特に好ましい化合物として塩化パラジウムが挙げられる。塩化パラジウムとしては、塩化パラジウム (II)、及び塩化パラジウム (IV) が挙げられる。酢酸パラジウムとしては、酢酸パラジウム (II) (palladium(II) acetate、化6、分子量224.5) が挙げられる。

[0065] 有機溶媒としては、DMSO等が挙げられる。塩化パラジウムをDMSOに溶解して得られる錯体としては、ジクロロビス (ジメチルスルホキシド) パラジウム (II)、及び、テトラキス (ジメチルスルホキシド) パラジウム (II) が挙げられる。

[0066] [化6]



[0067] また、配位子としてパラジウムに結合し得る物質を含む溶液としては、ハ

ルマリリン (harmaline) 溶液、例えばハルマリリン塩酸塩の水溶液等、及び、ジフェロセニル・ホスフィン (diferrocenyl-phosphine) 溶液、例えばジフェロセニル・ホスフィンのDMSO溶液等、が挙げられる。前記のようなパラジウムを含む巨大分子をこれらの溶液に溶解すると、パラジウムはハルマリリンやジフェロセニル・ホスフィンにこれらを配位子として結合し直し、パラジウム錯体として低分子化される。このようにして生成するパラジウム錯体も、本発明に使用することができる。

パラジウム錯体は、二量体等の多量体であってもよい。

[0068] パラジウム錯体、及び、パラジウムと他の元素又は基との共有結合により巨大分子を形成するパラジウム化合物は、各種市販されており（例えば、和光純薬工業、シグマ）、それらを使用することができる。また、例えばNishiyama M, Yamamoto T. (1998) Tetrahedron Lett, 39: 617-620やJ. Am. Chem. Soc. (1999) 121: 9550-9561等に記載の方法にしたがって合成することもできる。

[0069] 本発明の方法において、薬剤は1種類を単独で用いてもよいし、2種又はそれ以上を併用してもよい。

[0070] 薬剤による処理の条件は、適宜設定することが可能であり、例えば、検出対象の微生物の生細胞及び死細胞もしくは損傷細胞のけん濁液に、種々の濃度の薬剤を加えて、種々の時間置いた後、遠心分離等によって菌体を分離し、核酸増幅法で分析することによって、生細胞と死細胞もしくは損傷細胞を区別しやすい条件を決定することができる。さらに、検出対象の微生物の生細胞、及びウシ白血球等の体細胞又は血小板等のけん濁液に、種々の濃度の薬剤を加えて、所定時間放置した後、遠心分離等によって菌体及び前記各種細胞を分離し、核酸増幅法で分析することによって、生細胞と各種細胞を区別しやすい条件を決定することができる。

[0071] このような条件として、具体的には、ジクロロ (η -シクロオクタ-1,5-ジエン) パラジウム (II) では終濃度 10 ~ 3000 μ M、好ましくは 10 ~ 100 μ M、4 ~ 43 °C、5分 ~ 2時間が例示される。ビス (ベンゾニトリル

）ジクロロパラジウム（II）では終濃度 $10 \sim 3000 \mu\text{M}$ 、好ましくは $10 \sim 100 \mu\text{M}$ 、 $4 \sim 43^\circ\text{C}$ 、5分～2時間が例示される。ジアンミンジクロロパラジウム（II）では終濃度 $10 \sim 3000 \mu\text{M}$ 、好ましくは $10 \sim 100 \mu\text{M}$ 、 $4 \sim 43^\circ\text{C}$ 、5分～2時間が例示される。ジクロロ（エチレンジアミン）パラジウム（II）では終濃度 $10 \sim 3000 \mu\text{M}$ 、好ましくは $10 \sim 250 \mu\text{M}$ 、 $4 \sim 43^\circ\text{C}$ 、5分～2時間が例示される。ビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（II）ジアセートでは終濃度 $10 \sim 3000 \mu\text{M}$ 、好ましくは $10 \sim 100 \mu\text{M}$ 、 $4 \sim 43^\circ\text{C}$ 、5分～2時間が例示される。

[0072] また、塩化パラジウム（II）をDMSOに溶解して得られる錯体では、塩化パラジウム（II）の量として終濃度 $10 \sim 3000 \mu\text{M}$ 、好ましくは $10 \sim 100 \mu\text{M}$ 、 $4 \sim 43^\circ\text{C}$ 、5分～2時間が例示される。酢酸パラジウム（II）をDMSOに溶解して得られる錯体では、酢酸パラジウム（II）の量として終濃度 $1 \sim 300 \mu\text{M}$ 、好ましくは $1 \sim 10 \mu\text{M}$ 、 $4 \sim 43^\circ\text{C}$ 、5分～2時間が例示される。

[0073] 被検試料への薬剤の添加は、上記のように被検試料のけん濁液に薬剤を添加することによって行ってもよいが、薬剤の溶液に被検試料を添加することによって行ってもよい。

[0074] 尚、エチジウムモノアザイド等を用いる従来の方法では、それらの架橋剤をDNA又はRNAと水素結合させた後に、DNA又はRNAの分子間を架橋させるために $350 \text{ nm} \sim 700 \text{ nm}$ の波長の光照射を必要としているが、本発明の薬剤を用いる本発明の方法では、光照射を必要としない。また、そのため、光照射による試料の加熱を防ぐための冷却、例えば氷水への試料の浸漬も必要としない。

また、EMA等の薬剤では、露光による薬剤の変性を防ぐため、試料への光照射を除けば、暗室中などの遮光下におく必要があるが、本発明の薬剤を用いる場合は、遮光の必要もない。

[0075] 本発明の薬剤は、生細胞の細胞壁よりも、死細胞及び損傷細胞の細胞壁の方が透過しやすい。したがって、前記に示す作用時間内であれば微生物の生

細胞の細胞壁・細胞膜は実質的に透過せず、微生物の損傷細胞もしくは死細胞または死細胞になっている体細胞の細胞膜は透過すると考えられる。その結果、薬剤は、体細胞の死細胞及び微生物の死細胞並びに損傷細胞の細胞内に進入し、続いて、前記薬剤は前記核酸結合性タンパク質のシステインやメチオニン部位に配位結合するため、薬剤自身は直接核酸には作用していないものの、核酸と核酸結合性タンパク質は複合体様に一体化している（円状の核酸結合性タンパク質に糸状の核酸が巻き付いている）。その結果、核酸伸長酵素（DNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼ等）が伸長反応を行っている時に、鋳型核酸の近隣で多数の本パラジウム錯体が前記タンパク質に固定化されて存在しているので、前記伸長酵素の伸長反応が著しく阻害されると推定される。

[0076] 生細胞よりも損傷細胞や死細胞に優先的に薬剤が透過すると、生細胞では染色体DNA又はRNAのターゲット領域が核酸増幅法により増幅されるのに対し、損傷細胞や死細胞では染色体DNA結合性タンパク質又はRNA結合性タンパク質に薬剤が配位結合することにより、核酸伸長酵素の伸長反応を阻害するため、生細胞を損傷細胞や死細胞に比べて選択的に検出することができる。

[0077] 工程a)の薬剤による処理は、一回でもよく、又はそれ以上の回数を繰り返して行ってもよい。薬剤の濃度は、一回目の薬剤処理では、二回目以降よりも高くし、二回目以降の薬剤処理では、一回目よりも低くすることが好ましい。

また、一回目の薬剤処理では、二回目以降の薬剤処理よりも処理時間を短くすることが好ましい。

[0078] 先の薬剤処理と、それ以降の薬剤の間で、未反応の薬剤を除去する工程を追加してもよい。薬剤を除去する方法としては、被検試料を遠心分離して、微生物を含む沈殿と薬剤を含む上清とを分離し、上清を除去する方法が挙げられる。この場合、薬剤を除去した後、適宜、洗浄剤で微生物を洗浄する工程を追加することも可能である。更には、本薬剤はシステインやメチオニン

というアミノ酸残基を有するタンパク質には、核酸より好んで配位結合するので、一回目の高濃度薬剤の作用を無効化するために、ウシ血清アルブミン溶液や酵母エキス等タンパク質を含む培地（ラクトースブロスやブレイン・ハート・インフュージョン培地）を添加し、未反応のパラジウム錯体は前記タンパク質に結合・吸着させ（パラジウムがタンパク質に配位結合するため）てもよい。

また、薬剤処理した試料は、下記工程 b）の前に、未反応の薬剤を除去しておくことが好ましい。

[0079] （２）工程 b）

次に、薬剤処理後の被検試料に含まれる微生物の DNA 又は RNA のターゲット領域を、核酸増幅法により増幅する。

[0080] 核酸増幅の鋳型となる DNA 又は RNA は、微生物の細胞から抽出したものをを用いてもよいし、細胞からの核酸の抽出を行わずに薬剤処理した試料をそのまま用いてもよいが、細胞からの核酸の抽出を行わないことが好ましい。

細胞からの核酸の抽出を行わずに核酸増幅を行う場合は、被検試料を含む核酸増幅反応液に、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤を添加して、核酸増幅反応を行うことが好ましい（特許第4825313号、W02011/010740参照）。また、被検試料を含む核酸増幅反応液に、さらにマグネシウム塩、及び有機酸塩又はリン酸塩を添加することがより好ましい。また、被検試料を含む核酸増幅反応液に、さらに界面活性剤を添加することが特に好ましい。

[0081] さらに、増幅反応液には、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤に追加して、界面活性剤、マグネシウム塩、又は有機酸塩又はリン酸塩を添加することも可能である。これらは、いずれか一種、又は任意の二種以上の組合わせで使用することができる。これらの全てを添加することが特に好ましい。前記核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、界面活性剤、マグネシウム塩、及び有機酸塩又はリン酸塩の添加の順序は問わず、また、同時に添加してもよい。必要に応じ、核酸伸長酵素も通常の PCR 法で使用している濃度の

2 倍～10 倍の濃度で添加してもよい。

[0082] 核酸増幅阻害物質とは、核酸増幅反応又は核酸伸張反応を阻害する物質であって、例えば、核酸（DNA 又は RNA）の鋳型に吸着する正電荷阻害物質、又は核酸合成酵素（DNA ポリメラーゼなど）に吸着する負電荷阻害物質等が挙げられる。前記正電荷阻害物質としては、カルシウムイオン、ポリアミン、ヘム（heme）等が挙げられる。また、負電荷阻害物質としては、フェノール、フェノール系化合物、ヘパリン、グラム陰性細菌細胞壁外膜等が挙げられる。食品や臨床検体中には、このような核酸増幅反応を阻害する物質が多く含まれているといわれている。

[0083] 上記のような核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤としては、アルブミン、デキストラン、T4 ジーン 32 プロテイン、アセトアミド、ベタイン、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、大豆トリプシンインヒビター、 $\alpha 2$ -マクログロブリン、テトラメチルアンモニウムクロライド、リゾチームから、ホスホリラーゼ、及び乳酸脱水素酵素選択される 1 種又は複数種を例示することができる。

[0084] 前記ポリエチレングリコールとしては、ポリエチレングリコール 400 又はポリエチレングリコール 4000 が例示される。ベタインとしては、トリメチルグリシンやその誘導体等が挙げられる。また、ホスホリラーゼ及び乳酸脱水素酵素としては、ウサギ筋肉由来のグリコーゲンホスホリラーゼ及び乳酸脱水素酵素が挙げられる。なお、グリコーゲンホスホリラーゼとしては、グリコーゲンホスホリラーゼ b が好ましい。

特に、アルブミン、デキストラン、T4 ジーン 32 プロテイン、又はリゾチームを使用することが好ましい。

[0085] 血液、糞便、及び肉を検査材料として想定し、それら検査材料中に含まれる核酸増幅阻害物質の阻害作用を低減させる試みとして上記のような物質を PCR 反応液に加えて、前記阻害作用の低減が評価されている（Abu Al-Soud, W. et al, Journal of Clinical Microbiology, 38:4463-4470, 2000）。

[0086] BSA（ウシ血清アルブミン）に代表されるアルブミンは、ヘム（heme）

のような核酸増幅阻害物質に結合することにより、核酸増幅阻害を低減させている可能性が示唆されている（前記Abu Al-Soudら）。また、T4ジーン32プロテインは1本鎖DNA結合性タンパク質であり、核酸増幅過程で鋳型となっている1本鎖DNAに予め結合して鋳型が核酸分解酵素による分解から免れ、核酸増幅反応が阻害されず促進されるか、又は、BSAと同様の核酸増幅阻害物質に結合することにより、核酸増幅が阻害されず進行する、という二つの可能性が考えられている（前記Abu Al-Soudら）。

さらに、BSA、T4ジーン32プロテイン、及びタンパク質分解酵素阻害剤（proteinase inhibitor）はタンパク質分解酵素（proteinase）に結合することによりタンパク質分解活性を低減させ、核酸合成酵素の働きを最大限に引き出す可能性が示唆されている。事実、牛乳や血液にはタンパク質分解酵素が残存していることもあり、その際、BSA又はタンパク質分解酵素阻害剤（大豆トリプシンインヒビターや α 2-マクログロブリン）の添加により核酸合成酵素が分解を受けず、核酸増幅反応が良好に進行したケースも紹介されている（前記Abu Al-Soudら）。

[0087] また、デキストランは一般にグルコースを原料として乳酸菌が合成する多糖類である。ムチンという同様の多糖類－ペプチド複合体が腸管粘膜に接することとも報告されており（Ruas-Madiedo, P., *Applied and Environmental Microbiology*, 74:1936-1940, 2008）、デキストランが負電荷阻害物質（核酸合成酵素に吸着）、又は正電荷阻害物質（核酸に吸着）に予め吸着することにより、それら阻害物質に結合する可能性は十分あるものと推察される。

また、リゾチームは、牛乳中に多数含まれていると考えられる核酸増幅阻害物質と吸着しているものと推察される（前記Abu Al-Soudら）。

[0088] 以上のことから、アルブミン、T4ジーン32プロテイン、デキストラン、及びリゾチームに代表される上記物質は、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤であるといえる。

[0089] アルブミンとしては、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、乳アルブミン、ヒト血清アルブミン等が挙げられる。これらの中ではウシ血清アルブミ

ン（BSA）が好ましい。アルブミンは精製品でもよく、本発明の効果を損わない限りグロブリン等の他の成分を含んでいてもよい。また、分画物であってもよい。被検試料（核酸増幅反応液）中のアルブミンの濃度は、例えば、通常0.0001～1質量%、好ましくは0.01～1質量%、より好ましくは0.2～0.6質量%である。

[0090] デキストランとしては、デキストラン40やデキストラン500等が挙げられる。これらの中ではデキストラン40が好ましい。被検試料（核酸増幅反応液）中のデキストランの濃度は、例えば、通常1～8%、好ましくは1～6%、より好ましくは1～4%である。

[0091] T4ジーン32プロテイン（例えば、ロシュ社製：gp32とも呼ばれる）の被検試料（核酸増幅反応液）中の濃度は、通常0.01～1%、好ましくは0.01～0.1%、より好ましくは0.01～0.02%である。

[0092] リゾチームとしては、卵白由来のリゾチームが挙げられる。被検試料（核酸増幅反応液中のリゾチームの濃度は、例えば、通常1～20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは6～15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは9～13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

[0093] 界面活性剤としては、Triton（ユニオンカーバイド社の登録商標）、Nonidet（シエル社）、Tween（ICI社の登録商標）、Brij（ICI社の登録商標）等の非イオン系界面活性剤、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）等の陰イオン系界面活性剤、塩化ステアリルジメチルベンジルアンモニウム等の陽イオン界面活性剤が挙げられる。TritonとしてはTriton X-100（ポリエチレングリコールtert-オクチルフェニルエーテル）等が、NonidetとしてはNonidet P-40（オクチルフェニルポリエチレングリコール）等が、TweenとしてはTween 20（ポリエチレングリコールソルビタンモノラウラート）、Tween 40（ポリエチレングリコールソルビタンモノパルミタート）、Tween 60（ポリエチレングリコールソルビタンモノステアラート）、Tween 80（ポリエチレングリコールソルビタンモノオレアート）等が、BrijとしてはBrij56（ポリオキシエチレン(10)セチルエーテル）、Brij58（ポリオキシエチレン(20)セチルエー

テル)等が挙げられる。

[0094] 被検試料(核酸増幅反応液中の界面活性剤の種類及び濃度は、微生物の細胞内へのPCR試薬の透過を促進し、核酸増幅反応を実質的に阻害しない限り特に制限されない。具体的には、SDSの場合は、例えば、通常0.0005～0.01%、好ましくは0.001～0.01%、より好ましくは0.001～0.005%、より好ましくは0.001～0.002%である。

[0095] 他の界面活性剤の場合、例えば、Nonidet P-40の場合は、通常、0.001～1.5%、好ましくは0.002～1.2%、より好ましくは0.9～1.1%、Tween 20の場合は、通常、0.001～1.5%、好ましくは0.002～1.2%、より好ましくは0.9～1.1%、Brij56及びBrij58の場合は、通常0.1～1.5%、好ましくは0.4～1.2%、より好ましくは0.7～1.1%である。

核酸増幅反応に用いる酵素溶液に界面活性剤が含まれている場合は、同酵素溶液由来の界面活性剤のみでもよいし、さらに同種又は異なる界面活性剤を追加してもよい。

[0096] マグネシウム塩としては、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、炭酸マグネシウム等が挙げられる。被検試料(核酸増幅反応液)中のマグネシウム塩の濃度は、例えば、通常1～10mM、好ましくは2～6mM、より好ましくは2～5mMである。

[0097] 有機酸塩としては、クエン酸、酒石酸、プロピオン酸、酪酸等の塩が挙げられる。塩の種類としては、ナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられる。また、リン酸塩として、ピロリン酸等が挙げられる。これらは、1種でもよく、2種又は3種以上の混合物であってもよい。被検試料(核酸増幅反応液)中の有機酸塩又はリン酸塩の濃度は、例えば、通常合計量で0.1～20mM、好ましくは1～10mM、より好ましくは1～5mMである(特許第4127847号、W02007/094077参照)。

[0098] 被検試料から核酸を抽出する場合は、抽出方法は、抽出されたDNAが核酸増幅における鋳型として機能し得る限り特に制限されず、一般的に用いら

れている微生物のDNAの抽出法にしたがって行うことができる。但し、核酸抽出操作又はその後の操作において、タンパク質分解酵素処理操作は行わない。

[0099] DNAの抽出法は、例えば、Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に記載されている。

[0100] 被検試料からの核酸の抽出を行わない場合は、上記核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、及び必要に応じて他の各成分の存在下で、細胞内に存在していたDNA又はRNAのターゲット領域を核酸増幅法により増幅する。核酸増幅の鑄型には、微生物細胞けん濁液、又はタンパク質分解酵素、脂質分解酵素、又は糖分解酵素等で処理した微生物細胞のけん濁液を用い、鑄型調製のための核酸の抽出は行わない。

[0101] 被検試料から核酸の抽出を行う場合は、抽出したDNA又はRNAを鑄型として、通常の方法によりターゲット領域を核酸増幅法により増幅する。

[0102] 核酸増幅法は、高温、例えば90～95℃、好ましくは93～95℃、より好ましくは94～95℃における核酸の熱変性のステップを含むことが好ましい。

[0103] 核酸増幅法としては、PCR法 (White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185(1989))、LAMP法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification: 新規遺伝子増幅法 (LAMP法) の原理と応用、納富継宣、長谷哲、BIO INDUSTRY, Vol.18, No.2, 15-23, 2001)、SDA法 (Strand Displacement Amplification: Edward L. Chan, et al., Arch. Pathol. Lab. Med., 124:1649-1652, 2000)、LCR法 (Ligase Chain Reaction: Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.88, p.189-193, 1991)、TMA法 (Transcription-Mediated-Amplification: Sarrazin C. et al., J. Clin. Microbiol., vol.39: p.2850-2855 (2001))、TRC法 (Transcription-Reverse Transcription-Concerted method: Nakaguchi Y. et al., J. Clin. Microbiol., vol.42: p.4248-4292 (2004))、HC法 (Hybrid Capture: Nazarenko I., Kobayashi L. e

t al., J. Virol. Methods, vol.154: p.76-81, 2008)、SMA P法 (Smart Amplification Process、Smart Amp法 ; Mitani Y., et al., Nature Methods, vol.4, No.3, p.257-262 (2007))、マイクロアレイ法 (Richard P. Spence, et al., J. Clin. Microbiol., Vol.46, No.5, p.1620-1627, 2008)等がそれぞれ例示される。なお、本発明においては、PCR法を利用することが特に好ましいが、これに制限されない。

[0104] 本発明において「ターゲット領域」とは、染色体DNA、又はRNAのうち、本発明に用いるプライマーを用いた核酸増幅法により増幅され得る領域であり、検出対象の微生物を検出することができるものであれば特に制限されず、目的に応じて適宜設定することができる。例えば、被検試料に検出対象の微生物と異なる種類の細胞が含まれる場合には、ターゲット領域は、検出対象の微生物に特異的な配列を有することが好ましい。また、目的によっては、複数種の微生物に共通する配列を有するものであってもよい。さらに、ターゲット領域は単一であっても、複数であってもよい。

[0105] 検出対象の微生物に特異的なターゲット領域に対応するプライマーセットと、広汎な微生物の核酸に対応するプライマーセットを用いると、検出対象の微生物の生細胞量と、多数種の微生物の生細胞量を、同時に測定することができる。ターゲット領域の長さとしては、通常50～5000塩基、又は50～3000塩基が挙げられる。

本発明の方法では、ターゲット領域が従来法よりも短い、例えば400塩基程度の長さであっても、生細胞と死細胞及び損傷菌との識別が可能である。

[0106] 核酸の増幅に用いるプライマーは、各種核酸増幅法の原理に基づいて、適宜設定することが可能であって、上記ターゲット領域を特異的に増幅することができるものであれば特に制限されない。

[0107] 好ましいターゲット領域の例は、5S rRNA遺伝子、16S rRNA遺伝子、23S rRNA遺伝子、tRNA遺伝子、及び病原遺伝子等の各種特異遺伝子である。これらの遺伝子の一つ又はその一部をターゲットとして

もよく、2又はそれ以上の遺伝子にまたがる領域をターゲットとしてもよい。例えば、配列番号1及び2に示すプライマーセットを用いることにより、クロノバクター・サカザキ特異的16S rRNA遺伝子の一部を増幅することができる。また、市販されている16S rRNA遺伝子増幅用プライマーを用いてもよい。

[0108] また、検出対象の微生物が病原性細菌である場合には、ターゲット領域としては病原遺伝子が挙げられる。病原遺伝子としては、リステリア属細菌のリステリオリシンO (hlyA) 遺伝子、サルモネラ属細菌のenterotoxin (エンテロトキシン) 遺伝子やinvasion (invA) 遺伝子、病原性大腸菌O-157、O-26、O-111等のベロ毒素遺伝子、エンテロバクター属又はクロノバクター属細菌のouter-membrane-proteinA (ompA) 遺伝子 (クロノバクター・サカザキ菌) 及びmacromolecular synthesis (MMS) オペロン (クロノバクター・サカザキ菌)、レジオネラ属細菌のmacrophage-invasion protein (mip) 遺伝子、腸炎ビブリオ細菌の耐熱性溶血毒遺伝子、耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子、赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌のipa遺伝子 (invasion plasmid antigen gene) や、invE遺伝子 (invasion gene)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子、バチルス・セレウス菌のセレウリド (嘔吐毒素) 遺伝子やエンテロトキシン遺伝子、ボツリヌス菌の各種毒素遺伝子等が挙げられる。

[0109] また、エンベロープを有するインフルエンザウイルスの場合、ヘマグルチニン (Hタンパク質) 遺伝子やノイラミニダーゼ (Nタンパク質) 遺伝子、ノロウイルスに代表されるカリシウイルス科ウイルスのRNAポリメラーゼ遺伝子、各種カプシドタンパクをコードしている遺伝子領域等が挙げられる。食中毒ウイルスとしてノロウイルスの他、ロタウイルス、アデノウイルスもあり、対象遺伝子はノロウイルス同様、RNAポリメラーゼ遺伝子、カプシドタンパクをコードしている遺伝子領域が標的領域となる。

[0110] 複数種の微生物に共通するプライマーを用いると、被検試料中の複数種の微生物の生細胞を検出することができる。また、特定の細菌に特異的なプラ

イマーを用いると、被検試料中の特定の菌種の生細胞を検出することができる。

[0111] 核酸増幅反応の条件は、各核酸増幅法（PCR法、LAMP法、SDA法、LCR法、TMA法、TRC法、HC法、SMAP法、及びマイクロアレイ法等）の原理に則った特異的な増幅が起る限り特に制限されず、適宜設定することができる。

[0112] (3) 工程c)

核酸増幅法により増幅した増幅産物を解析する。増幅産物の解析は、工程b)で採用する核酸増幅法に応じて、工程b)に続いて行われるか、又は、工程b)と同時にされる。例えば、リアルタイムPCRの場合は、工程c)は工程b)と同時にされ得る。

解析法は、核酸増幅産物の検出又は定量が可能なものであれば特に制限されず、電気泳動法等が例示される。尚、核酸増幅法にPCR法を用いた場合は、リアルタイムPCR法(Nogva et al., Appl. Environ. Microbiol., vol. 66, 2000, pp. 4266-4271, Nogva et al., Appl. Environ. Microbiol., vol. 66, 2000, pp. 4029-4036)を利用することが可能である。

[0113] 電気泳動法によれば、核酸増幅産物の量、及びその大きさを評価することができる。また、リアルタイムPCR法によれば、迅速にPCR増幅産物の定量を行うことができる。

リアルタイムPCR法を採用する場合、一般に増幅サイクル数1~10までは蛍光強度の変化はノイズレベルでありゼロに等しいので、それらを増幅産物ゼロのサンプルブランクと見なし、それらの標準偏差SDを算出し、そのSD値に10を乗じた値をスレッシュホールド値とし、そのスレッシュホールド値を最初に上回るPCRサイクル数をサイクルスレッシュホールド値(Ct値)という。従って、PCR反応溶液に初期のDNA鋳型量が多い程、Ct値は小さな値となり、鋳型DNA量が少ない程、Ct値は大きな値となる。また、鋳型DNA量が同じでも、その鋳型内のPCRのターゲット領域に切断が生じている割合が多くなる程、同領域のPCR反応のCt値は大きな値

となる。

[0114] また、増幅産物の有無は、増幅産物の融解温度（T_M）パターンを解析することによっても行うことができる。

上記の各方法は、本発明の方法における諸条件の最適化に際しても使用することができる。

[0115] 本発明の方法によって生細胞を検出する場合、核酸増幅産物の解析は、同定されている微生物の標準試料を用いて作成された微生物量及び増幅産物との関連を示す標準曲線を用いると、生細胞の有無又は定量の精度を高めることができる。標準曲線は予め作成しておいたものを用いることができるが、被検試料と同時に標準試料について本発明の各工程を行って作成した標準曲線を用いることが好ましい。また、予め微生物量とDNA量又はRNA量との相関を調べておけば、その微生物から単離されたDNA又はRNAを標準試料として用いることもできる。

[0116] <2>本発明のキット

本発明のキットは、核酸増幅法により、被検試料中の微生物の生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出するためのキットであって、パラジウム錯体を含む。

[0117] 本発明のキットは、さらに、検出対象の微生物のDNA又はRNAのターゲット領域を核酸増幅法により増幅するためのプライマーを含んでいてもよい。

[0118] 本発明のキットは、好ましい態様では、さらに核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、マグネシウム塩、及び有機酸塩又はリン酸塩のいずれか、又はこれらの2種以上を含んでいてもよい。より好ましい態様では、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、マグネシウム塩、及び有機酸塩又はリン酸塩のすべてを含んでいてもよい。更に、核酸伸長酵素を、通常のPCRもしくは通常のリアルタイムPCR時に使用する濃度の2倍～10倍濃度を含んだ方が、より好ましい。また、本発明のキットは、さらに界面活性剤を含んでいてもよい。

本発明のキットは、前記本発明の方法を実施するために用いることができる。

また、本発明のキットには、被検試料中に存在する微生物以外の細胞、タンパク質コロイド粒子、脂肪、又は糖質を分解する活性を有する酵素を追加することが可能である。

[0119] 酵素、パラジウム錯体、及び必要に応じて、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、並びにマグネシウム塩、有機酸塩又はリン酸塩、及び界面活性剤は、これらの成分を全て含む単一の組成物であってもよいし、各成分を任意の組合わせで含む複数の溶液又は組成物であってもよい。

[0120] 前記核酸増幅反応は、PCR法、LAMP法、SDA法、LCR法、TMA法、TRC法、HC法、SMAF法、又はマイクロアレイ法であることが好ましい。なお、上記キットにおいて、架橋剤や培地は、本発明の方法で説明したものと同様である。

[0121] 本発明のキットに含まれるパラジウム錯体として好ましいものは、前記本発明の方法について記載した化合物と同様である。

[0122] また、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤としては、アルブミン、デキストラン、及びT4ジーン32プロテイン、アセトアミド、ベタイン、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド、グリセロール、ポリエチレングリコール、大豆トリプシンインヒビター、 α 2-マクログロブリン、テトラメチルアンモニウムクロライド、リゾチーム、ホスホリラーゼ、及び乳酸脱水素酵素から選択されるいずれか一種又は複数種を例示することができる。

[0123] また、マグネシウム塩としては、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、炭酸マグネシウム等が挙げられる。

[0124] また、有機酸塩としては、クエン酸、酒石酸、プロピオン酸、酪酸等の塩が挙げられる。塩の種類としては、ナトリウム塩、カリウム塩等が挙げられる。また、リン酸塩として、ピロリン酸等が挙げられる。これらは、1種でもよく、2種又は3種以上の混合物であってもよい。

[0125] また、酵素としては、被検試料中に存在する微生物以外の細胞、タンパク

質コロイド粒子、脂肪及び糖質等の夾雑物を分解することができ、かつ、検出対象の微生物の生細胞を損傷しないものであれば特に制限されないが、例えば、脂質分解酵素、タンパク質分解酵素、及び糖質分解酵素が挙げられる。前記酵素は、1種類の酵素を単独で用いてもよいし、2種又はそれ以上の酵素を併用してもよいが、脂質分解酵素及びタンパク質分解酵素の両方、又は脂質分解酵素、タンパク質分解酵素、及び糖質分解酵素の全てを用いることが好ましい。

脂質分解酵素としては、リパーゼ、フォスファターゼ等が、タンパク質分解酵素としてはセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、プロテイナーゼK、プロナーゼ等が、糖質分解酵素としてはアミラーゼ、セルラーゼ、N-アセチルムラミダーゼ等が挙げられる。

[0126] 本発明のキットは、さらに、希釈液、パラジウム錯体による反応用の反応液、核酸増幅用の酵素及び反応液、本発明の方法を記載した説明書等を含めることもできる。

実施例

[0127] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

尚、以下の実施例において、特記しない限り、各操作は非遮光下で行った。

[0128] [実施例1] dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)、bis(benzonitrile)dichloropalladium (II)、又はdiamminedichloropalladium (II)による、クロノバクター・サカザキの生細胞・死細胞の識別

クロノバクター・サカザキを対象として、各パラジウム錯体を用いて細菌の生細胞と死細胞との識別を明瞭とするための条件の検討を行った。

[0129] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) クロノバクター・サカザキATCC29544をBHIブロスを用いて、37℃、16時間培養した。

前記培養液1 mlを冷却遠心処理(4℃、3,000×G、10分間)し、上清除去後

、ペレットに1 mlの滅菌水を添加し、更にその一部を滅菌水にて100倍希釈して、生細胞けん濁液 ($4.7 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ CFU/ml) を調製した。

[0130] また、上記生細胞けん濁液1 mlを、1.5 mlのマикроチューブ (Eppendorf, Hamburg, Germany) に分取し、沸騰水に3分間浸漬処理した後、急冷した。各けん濁液中の細胞は、標準寒天培地 (Eiken, Tokyo, Japan) によりコロニーを形成しないことを確認し、損傷細胞／死細胞けん濁液 ($4.7 \times 10^6 \sim 6.1 \times 10^7$ cells/ml。以下、損傷細胞と死細胞を包括して死細胞けん濁液と表記する。) を得た。

[0131] 上記クロノバクター・サカザキの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液のそれぞれ90 μ l (diamminedichloropalladium処理に供したけん濁液のみ50 μ l) を、下記試験に供した。

[0132] 1 - 2) 各パラジウム錯体溶液の調製及び試料の処理

dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 3.11 mg (10.89 μ mol) を218 μ lのDMSO (D8418-50ML, Sigma)に溶解し、50 mM溶液を調製した。また、bis(benzonitrile)dichloropalladium (II) 4.34 mg (11.31 μ mol)を226 μ lのDMSO (Sigma)に溶解し、50 mM溶液を調製した。これらの50 mMの各パラジウム錯体溶液を、生理食塩水にて希釈し、25 μ M、250 μ M、500 μ M、1mM、5 mM、10mM、25mMの各錯体溶液を調製した。

[0133] また、diamminedichloropalladium (II)(323-04961 Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 2.00 mg (9.46 μ mol)を946 μ lのDMSO (Sigma) に溶解し、10 mM溶液を調製した。この溶液を生理食塩水にて希釈し、1 μ M、2 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、50 μ M、及び100 μ Mのdiamminedichloropalladium (II) 生理食塩水溶液を調製した。

[0134] その後、上記各パラジウム錯体溶液10 μ l (diamminedichloropalladium (I)のみ50 μ l) を、クロノバクター・サカザキ生細胞けん濁液又は死細胞けん濁液90 μ l (diamminedichloropalladium (II)については50 μ l) に添加し、恒温水槽PERSONAL-11 (TAITEC, Tokyo, Japan) にて37°Cで30分間 (diamminedichloropalladium (II)については10分間) 保持した。その後、冷却遠心処

理 (4°C、10,000×G、5分) し、上清を除去し、そのペレットを150 μ lの滅菌水にけん濁させ、よく攪拌した後、同様の冷却遠心処理を行い、上清を除去した。得られたペレット (細胞けん濁液5 μ l相当) をPCR増幅用試料とした。

[0135] 1-3) PCR増幅

細胞からの核酸の抽出を行わずにPCR増幅を効率よく行うために、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤の混合物の濃縮液 (この濃縮液を、濃縮ダイレクトコンポーネント、cDBCと記載する。) を調製した。

具体的には、ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma A7906)、クエン酸三ナトリウム2水和物 (TSC: Tri-Sodium Citrate Dihydrate; 関東化学、東京)、塩化マグネシウム6水和物 (31404-15 ナカライテスク、京都)、卵白リゾチーム (126-02671 Lysozyme from egg white; 和光純薬、大阪)、Brij58 (P5884-100G; Sigma) の各ストック溶液を、表1に示す濃度となるように混合し、cDBCを調製した。

[0136] 例えば、PCR増幅 200検体用として16.6% Brij58、4.8% BSA、333 mM TSC、1 M $MgCl_2$ 、2.5 mg/ml lysozymeの各ストック溶液を、それぞれ250 μ l、200 μ l、15 μ l、15 μ l、20 μ lの容量にて混和すれば、表1に示す500 μ lのcDBC (10×DBC) を調製することができる。尚、後述するTaqManFast Universal PCR Master Mix (2×)を用いて、メーカーマニュアルに従いマスターミックスを調製すると、終濃度として2 mM相当の $MgCl_2$ が含まれていると推察されるため、合計の $MgCl_2$ は5 mM相当と推測された。

[0137] 尚、Brij 58、 $MgCl_2$ 、及びTSCは滅菌水にて溶解後、オートクレーブ (121°C、20分) し、水冷後室温に戻し、ストック溶液として使用した。BSA及びLysozymeは滅菌水にてストック溶液を調製し、0.22 μ mフィルターにて濾過滅菌し、ストック溶液とした。

[0138]

[表1]

表1 cDBC 組成

必要試薬	各ストック溶液	cDBC 組成	終濃度 (PCR反応溶液中)
Brij58	16.6%	8.30%	0.83%
BSA	4.8%	1.92%	0.19%
TSC	333 mM	10 mM	1 mM
MgCl ₂	1 M	30 mM	3 mM
Lysozyme	2.5 mg/ml	100 μg/ml	10 μg/ml

[0139] 次に、表2に示される、細胞からの核酸の抽出を行わずにリアルタイムPCR（細胞からの核酸の抽出せずに行うリアルタイムPCRを、以降「ダイレクト・リアルタイムPCR」と記載する。）行うためのマスターミックス（ダイレクト・リアルタイムPCR用マスターミックス）を調製した。

PCR増幅には、Primer 16S forward: *C. sakazakii*検出用16Sフォワードプライマー（5'-TAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTG-3'：配列番号1）、Primer 16S reverse: *C. sakazakii*検出用リバースプライマー（5'-CGGGTAACGTCAATTGCTGCGGT-3'：配列番号2）をPCR増幅用プライマーとして使用した。増幅されるrRNA遺伝子の断片長は426 bpであった。16S TaqMan probeとしては、配列番号3（5'-CCGCATAACGTCTACGGACCAAA-3'）の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。尚、各プライマー及び16S TaqMan probeの塩基配列情報は、Kang, Eun Sil et al., J. Microbiol. Biotechnol. 17:516-519, 2007から入手した。上記プライマーを用いて、前記PCR増幅用試料を鋳型として、PCR増幅を行った。リアルタイムPCR増幅は2回実施した。

[0140]

[表2]

表2 ダイレクト・リアルタイムPCR用マスターミックスの組成

各試薬	添加量 (μ l)	組成 (終濃度)
2 $\times$ TaqMan Fast	12.5	1 $\times$
16S forward, reverse primer mix (30 μ M each)	0.5	0.6 μ M each
10 μ M 16S TaqMan probe	0.5	0.2 μ M
cDBC (10 $\times$ DBC)	2.5	1 $\times$
Sterile water (SW)	4.0	(-)
Template	5.0	(-)
Total volume	25.0	

2 $\times$ TaqMan Fast : TaqManFast Universal PCR Master Mix (2 $\times$)

(Applied Biosystems Pty Ltd., Victoria, Australia)

[0141] リアルタイムPCR装置 (StepOnePlus Real-Time PCR System; Applied Biosystems) を用いて、下記のPCRサーマルサイクル条件により、リアルタイムPCRを実施した。

3) 95 $^{\circ}$ C, 20秒 (1サイクル)

4) 95 $^{\circ}$ C, 5秒; 55 $^{\circ}$ C, 10秒; 72 $^{\circ}$ C, 30秒 (40サイクル)

[0142] 陽性コントロールとして前記C. sakazakiiの生細胞けん濁液 (4.7×10^7 CFU/ml) 5 μ lを鋳型として使用した。又、陰性コントロールとして滅菌水5 μ lを鋳型として使用した。

[0143] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表3及び4に示す。

[0144]

[表3]

表 3 Dichloro(η-cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 及びbis(benzonitrile)dichloropalladium (II) 処理・リアルタイムPCRによるC. sakazakii 生細胞・死細胞 (滅菌水けん濁液) のCt 値の変化					
パラジウム錯体濃度 (μM)	Dichloro(η-cycloocta-1,5-diene) palladium(II)		bis(benzonitrile) dichloropalladium(II)		
	生細胞 (4.7×10 ⁶ CFU/ml)	死細胞 (4.7×10 ⁶ cells/ml)	生細胞 (4.7×10 ⁶ CFU/ml)	死細胞 (4.7×10 ⁶ cells/ml)	死細胞 (4.7×10 ⁶ cells/ml)
0	19.61 ^{a)}	20.98	20.08		18.76
10	19.19	34.36	22.26		ND
25	19.79	ND ^{b)}	27.54		ND
100	27.36	ND	31.33		ND

a) リアルタイムPCRのCt 値 (増幅産物の蛍光値に対するスレッシュホールドを超えたリアルタイムPCRの始めのサイクル数)

b) ND：ターゲット遺伝子増幅未検出

[表4]

表4 Diamminedichloropalladium (II) 処理・リアルタイムPCRによる
C. sakazakii 生細胞・死細胞（滅菌水けん濁液）のCt値の変化

パラジウム錯体濃度 (μ M)	生細胞 (1.0×10^7 CFU/ml)	死細胞 (1.0×10^7 cells/ml)
0	26.4 $\pm$ 0.92 ^{a)}	24.7 $\pm$ 2.40
0.5	25.5 $\pm$ 1.98	26.7 $\pm$ 2.51
1	26.5 $\pm$ 0.13	27.2 $\pm$ 0.24
2.5	25.7 $\pm$ 0.21	29.5 $\pm$ 0.46
5	25.5 $\pm$ 1.15	31.2 $\pm$ 0.43
10	26.6 $\pm$ 0.98	ND ^{b)}
25	32.1 $\pm$ 0.07	ND
50	34.9 $\pm$ 1.13	ND

a) リアルタイムPCRのCt値（増幅産物の蛍光値に対するスレッショールドを超えたリアルタイムPCRの始めのサイクル数）

b) ND：ターゲット遺伝子増幅未検出

[0146] 3. 考察

表3及び4に示されるように、dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 25 μ Mでは、生細胞のCt値が未処理のそれと比較して殆ど上がっておらず、かつ、死細胞のPCR増幅は完全に抑制された。同様に、bis(benzonitrile)dichloropalladium (II)、及び、diamminedichloropalladium (II) 10 μ Mでは、生細胞のCt値が未処理と比較して殆ど上がっていないか、あるいは、僅かに上がっている程度であり、かつ、死細胞のPCR増幅は完全に抑制された。したがって、パラジウム錯体により、クロノバクター・サカザキの生細胞と死細胞を区別することができることが明らかとなった。本方法は、光照射を必要としない。また、ターゲット領域が短くても（426 bp）、生細胞と死細胞の区別が可能であった。

[0147] [実施例2] パラジウム錯体の作用に関する検討

本実施例2では、パラジウム錯体としてDichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)を用いて、クロノバクター・サカザキの生細胞・死細胞の識別を行った。

[0148] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) 実施例1と同様にして、生理食塩水を用いてクロノバクター・サカザキATCC29544の生細胞けん濁液 (1.5×10^9 CFU/ml) 及び損傷細胞／死細胞けん濁液 (1.5×10^9 cells/ml。以下、包括して「死細胞けん濁液」と表記する。) を調製した。

[0149] 上記クロノバクター・サカザキの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液を滅菌水にて100倍希釈し (1.5×10^7 cells/ml)、それぞれ90 μ lを、下記試験に供した。

[0150] 1-2) Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)溶液の調製及び試料の処理

Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 6.28mg (22.0 μ mol)を正確に秤量し、440 μ lのDMSO (Sigma) に溶解し、50 mM溶液を調製した。その50 mM溶液を生理食塩水にて希釈し、250 μ M及び1 mM溶液 (パラジウム錯体溶液) を調製した。

[0151] 250 μ M又は1 mMのDichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 10 μ lを、上記生細胞けん濁液又は死細胞けん濁液90 μ lに添加し、恒温水槽にて37°C、30分間保持した。その後、滅菌水1 mlを加え、冷却遠心処理 (4°C、3,000 $\times$ G、5分) し、上清を除去し、そのペレットに細胞破碎用ガラスビーズ (10個) を入れ、30秒ボルテックスミキサーにより激しく攪拌し、細菌細胞を破碎した。その後、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を500 μ l加え、緩やかに攪拌後、冷却遠心処理 (3,000 $\times$ G、5分、4°C) し、上清 (500 μ l相当) を新しい2.0 mlマイクロチューブに移した。

[0152] これらの試料をproteinase K処理群、及びproteinase K/SDS処理群に分け、proteinase K処理群には10 μ lのproteinase K (1,250U/ml; Sigma)を加えた。また、proteinase K/SDS処理群には5 μ lの10% SDS、及び10 μ lのproteinase K (1,250U/ml; Sigma)を加えた。これらの試料をブロックインキュベーターにて50°C、14時間保持した。

[0153] その後、各試料に1 M Tris-HCl/フェノール (飽和フェノール) 0.5 mlを加え、15分穏やかに振とうした。更にクロロホルム 0.5 mlを加え、5分穏やか

に振とうした。その後、冷却遠心処理（4℃、15,000×G、10分）し、上清約600 μ lを新しい2 mlマイクロチューブに移し、60 μ lの3M 酢酸ナトリウム水溶液を添加した後、1500 μ lの冷エタノールを加え、緩やかに攪拌し、5分氷上に置いた。

冷却遠心処理（15,000×G、10分、4℃）して上清を除去し、1000 μ lの70%冷エタノールでマイクロチューブ内を洗浄後、同様に冷却遠心処理した。上清を除去後、エタノールを真空乾燥（5分）にて除去し、沈澱物に20 μ lのTEバッファーを加え、37℃にて1時間静置した。その後、試料を穏やかに攪拌後、その5 μ lをPCR増幅用試料とした。

[0154] また、前記細胞破碎用ガラスビーズ投入直前ペレットの1/4量に対して、前記のようなDNA抽出工程を行わず、細菌から直接にリアルタイムPCR（定量PCR）増幅を行った。

[0155] 1－3）PCR増幅

実施例1と同様にして、上記の各PCR増幅用試料のリアルタイムPCR増幅を2回実施した。

[0156] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表5に示す。

[0157]

[表5]

表5 Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 処理・リアルタイムPCRによるC. sakazakii 生細胞・死細胞 (滅菌水けん濁液) のCt値比較

パラジウム錯体濃度 (μ M)	Cells ^{a)}		PK(+) + ph/Cl + EtOH 法 ^{b)}		SDS(+) + PK(+) + ph/Cl + EtOH 法 ^{c)}	
	生細胞	死細胞	生細胞	死細胞	生細胞	死細胞
	1.5×10 ⁷ CFU/ml	1.5×10 ⁷ cells/ml	1.5×10 ⁷ CFU/ml	1.5×10 ⁷ cells/ml	1.5×10 ⁷ CFU/ml	1.5×10 ⁷ cells/ml
0	22.7 ± 0.16	23.0 ± 0.19	25.3 ± 0.05	24.6 ± 0.06	21.7 ± 1.82	23.7 ± 0.04
25	24.3 ± 0.27	ND ^{d)}	23.1 ± 0.09	23.7 ± 0.06	23.0 ± 0.44	22.8 ± 0.02
100	34.6 ± 2.30	ND	23.7 ± 0.09	25.2 ± 0.06	23.7 ± 0.03	23.3 ± 0.10

a) パラジウム錯体溶液処理後の各細胞のペレット (全ペレットの1/4量) からDNAを抽出せず直接、リアルタイムPCRを実施した (ダイレクト・リアルタイムPCR)。

b) パラジウム錯体溶液処理後の各細胞ペレットからガラスビーズにより細胞を破壊、プロテアーゼK処理後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱によりDNA抽出精製。

c) パラジウム錯体溶液処理後の各細胞ペレットからガラスビーズにより細胞を破壊、SDS/プロテアーゼK処理後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱によりDNA抽出精製。

d) リアルタイムPCRを2回測定し、mean ± SDにて表示した。

e) ターゲット遺伝子増幅せず。

[0158] 表5によれば、細胞をDichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) で処理し、細胞からのDNA抽出を行わずに細胞内に存在する染色体DNAに対して直接PCRを行った場合、パラジウム錯体濃度25 μ Mで、クロノバクター・サカザキの生細胞のCt値は未処理と比較して1.6程度高かったが、死細

胞のPCR増幅は完全に抑制され、明瞭な生死判定が可能であった。

一方、細胞をパラジウム錯体で処理後、ガラスビーズで細胞を破砕した後、プロテアーゼK処理して細胞内のタンパク質（DNA結合性タンパク質であるヒストン様プロテインも含む）を分解し、その後、フェノール／クロロホルム抽出・エタノール沈澱により、それらのタンパクを除去して抽出精製されたDNAを用いてリアルタイムPCR増幅を実施した場合は、パラジウム錯体の濃度、及びSDS存在の有無に関わらず、生細胞及び死細胞のCt値は、いずれも無処理と比較して有意な差異は観測されず、ほぼ一定の値であった。

[0159] 3. 考察

表5に示されるように、パラジウム錯体処理後の細胞のペレットからDNAを抽出せずに、直接、リアルタイムPCR増幅を実施した場合は、生細胞と死細胞の区別が可能であったが、細胞を破砕後プロテアーゼK処理した場合は、生細胞と死細胞を識別できなかった。

[0160] [実施例3] Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)のC. sakazakii死細胞に対する作用機序に関する検討

前述のとおり、パラジウム錯体を微生物細胞に作用させた場合、ほとんどのパラジウム錯体はDNA結合性タンパク質に共有結合する可能性が高いことを示されたが、この可能性についてさらに検討を行った。

具体的には、死細胞にパラジウム錯体を作用させた後、ガラスビーズで細胞を破砕し、その後、プロテアーゼK処理せずにDNAを抽出した場合、パラジウム錯体結合・HUプロテインが死細胞染色体（DNA）に強固に結合した状態を維持しているかどうかを検討した。

[0161] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) クロノバクター・サカザキATCC29544を用いて、実施例2と同様にし、生理食塩水を用いて1 mlの生細胞けん濁液（ 6.7×10^8 CFU/ml）及び損傷細胞／死細胞けん濁液（以下、損傷細胞と死細胞を包括して死細胞けん濁液と表記； 6.7×10^8 cells/ml）を調製した。

[0162] 上記クロノバクター・サカザキの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液を滅菌水にて100倍希釈し(6.7×10^6 cells/ml)、それぞれ90 μ lを、下記試験に供した。

[0163] 1 – 2) Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)溶液の調製及び試料の処理

Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 4.24mg (14.85 μ mol)を正確に秤量し、297 μ lのDMSO (Sigma)に溶解し、50 mM溶液を調製した。その50 mM溶液を生理食塩水にて希釈し、250 μ M及び1 mM溶液（パラジウム錯体溶液）を調製した。

[0164] 250 μ M又は1 mMのDichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 10 μ lを上記生細胞けん濁液又は死細胞けん濁液90 μ lに添加し、恒温水槽にて37°C、30分間保持した。

その後、滅菌水1 mlを加え、冷却遠心処理（4°C、3,000×G、5分）し、上清を除去し、そのペレットに細胞破碎用ガラスビーズ（10個）を入れ、30秒ボルテックスミキサーにより激しく攪拌し、細菌細胞を破碎した。その後、TEバッファを200 μ l加え、緩やかに攪拌後、冷却遠心処理（3,000×G、5分、4°C）し、上清（およそ200 μ l相当）を新しい1.5 mlマイクロチューブに移した。

[0165] その後、各試料に20 μ lの3M 酢酸ナトリウム水溶液を添加し、500 μ lの99.5%冷エタノールを加え、緩やかに攪拌し、5分氷上に置いた。冷却遠心処理（15,000×G、10分、4°C）して上清を除去し、500 μ lの70%冷エタノールでマイクロチューブ内を洗浄後、同様に冷却遠心処理した。上清を除去後、エタノールを真空乾燥（5分）にて除去し、ペレットに20 μ lのTEバッファを加え、4°Cにて1晩静置した。室温に戻した後、穏やかに攪拌し、DNA溶液を得た。その5 μ lをPCR増幅用試料とし、残り15 μ lを以下で使用した。

[0166] 前記DNA溶液15 μ lにTEバッファ200 μ lを加え、1 M Tris-HCl/フェノール（飽和フェノール）0.5 mlを加え、15分穏やかに混合した後、更にクロロホルム0.5 mlを加え、5分穏やかに混合した。その後、冷却遠心処理（4°C

、15,000×G、10分）し、上清およそ300 μ lを新しい1.5mlマイクロチューブに移し、30 μ lの3M 酢酸ナトリウム水溶液を添加した後、750 μ lの99.5%冷エタノールを加え、緩やかに攪拌し、5分氷上に置いた。冷却遠心処理（15,000×G、10分、4℃）して上清を除去し、500 μ lの70%冷エタノールでマイクロチューブ内を洗浄後、同様に冷却遠心処理した。上清を除去後、エタノールを真空乾燥（5分）にて除去し、ペレットに15 μ lの滅菌水を加え、37℃で30分保持して、DNA溶液を調製した。その5 μ lをPCR増幅用試料とした。

[0167] また、パラジウム錯体溶液により処理した後、前記細胞破砕用ガラスビーズ投入直前のペレットに対して、前記のようなDNA抽出を行わず、細菌から直接にリアルタイムPCR（定量PCR）増幅を行った。

[0168] 1－3）PCR増幅

実施例2と同様にして、上記の各PCR増幅用試料を用いてリアルタイムPCR増幅を2回実施した。

[0169] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表6に示す。

[0170]

[表6]

表6 Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 処理・リアルタイムPCRによるC. sakazakii 生細胞・死細胞
(滅菌水けん濁液)のCt値比較

パラジウム錯体濃度 (μ M)	Cells ^{a)}				PK(-) + EtOH 法 ^{b)}		PK(-) + ph/Cl + EtOH 法 ^{c)}	
	生細胞	死細胞	生細胞	死細胞	生細胞	死細胞	生細胞	死細胞
	6.7×10 ⁶ CFU/ml				6.7×10 ⁶ CFU/ml		6.7×10 ⁶ CFU/ml	
0	23.8 ± 0.34 ^{d)}	23.2 ± 0.50	23.7 ± 0.05	27.0 ± 1.87	22.9 ± 0.73	25.8 ± 1.25		
25	26.2 ± 0.37	ND ^{e)}	25.4 ± 0.03	ND	24.3 ± 0.07	ND		
100	35.5 ± 1.02	ND	33.0 ± 0.34	ND	32.0 ± 0.56	ND		

a) パラジウム錯体溶液処理後の各細胞のペレットからDNAを抽出せず直接、リアルタイムPCRを実施した
(ダイレクト・リアルタイムPCR)。

b) パラジウム錯体溶液処理後の各細胞ペレットからガラスビーズにより破砕、プロテアーゼK処理せず、
フェノール/クロホルム抽出せず、直接エタノール沈澱によりDNA抽出精製。

c) パラジウム錯体溶液処理後の各細胞ペレットからガラスビーズにより細胞を破砕、プロテアーゼK処理せず、
フェノール/クロホルム抽出しエタノール沈澱によりDNA抽出精製。

d) リアルタイムPCRを2回測定し、mean ± SDにて表示した。

e) ターゲット遺伝子増幅せず。

[0171] 表6に示されるように、Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II) 処理し、細胞からのDNA抽出を行わずに細胞内に存在する染色体DNAに対して直接PCRを行った場合、同パラジウム錯体25 μ Mでクロノバクター・サカザキの生細胞と死細胞の明瞭な生死判定が可能であることを確認した。

[0172] また、パラジウム薬剤で細胞を処理後、ガラスビーズで細胞を破砕し、直

接エタノール沈澱によりDNAを抽出してリアルタイムPCR増幅を実施した場合は、上記と同様にパラジウム錯体25 μ Mで明瞭な生細胞と死細胞の識別が可能であった。

さらに、エタノール沈殿の前にフェノール／クロロホルム抽出を行った場合でも、パラジウム錯体25 μ Mで明瞭な生細胞と死細胞の識別が可能であった。

[0173] 3. 考察

本実施例3（表6）と前述実施例2（表5）の大きな違いは、ガラスビーズで細胞を破碎した後のプロテアーゼK処理の有無である。本実施例3では、プロテアーゼK処理を行っていない。

すなわち、プロテアーゼK処理を行った実施例2では、精製した死細胞DNAを用いたリアルタイムPCR増幅では生細胞と死細胞を識別できなかったのに対して、プロテアーゼK処理を行っていない本実施例3では生細胞と死細胞の識別が可能であった。

[0174] [実施例4] Dichloro(ethylenediamine)palladium (II)のC. sakazakii死細胞に対する作用機序に関する追加検討

パラジウム錯体として、Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)に代えて、Dichloro(ethylenediamine)palladium (II)を用いて、C. sakazakii死細胞に対する作用を検討した。

[0175] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) クロノバクター・サカザキATCC29544を用いて、実施例1と同様にし、滅菌水にて1 mlの生細胞けん濁液 (6.1×10^8 CFU/ml) 及び損傷細胞／死細胞けん濁液（以下、損傷細胞と死細胞を包括して死細胞けん濁液と表記; 6.1×10^8 cells/ml）を調製した。

上記のクロノバクター・サカザキの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液を滅菌水にて10倍希釈し (6.1×10^7 CFU/ml、又はcells/ml)、それぞれ90 μ lを、下記試験に供した。

[0176] 1-2) Dichloro(ethylenediamine)palladium (II)溶液の調製及び試料の処

理

Dichloro(ethylenediamine)palladium (II) 3.60 mg (15.16 μmol)を正確に秤量し、303 μl のDMSO (Sigma)に溶解し、50 mM溶液を調製した。その50 mM溶液を生理食塩水にて希釈し、250 μM 及び1 mM溶液 (パラジウム錯体溶液)を調製した。

[0177] 各Dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)溶液10 μl を、上記生細胞けん濁液又は死細胞けん濁液90 μl に添加し、恒温水槽にて37°Cで30分間保持した。その後、滅菌水0.5 mlを加え、冷却遠心処理 (4°C、3,000×G、5分)し、上清を除去し、そのペレットにQuickGene SP kit DNA tissue (SP-DT) (界面活性剤を含む。FUJIFILM、東京、日本)を添付したMDT (Tissue Lysis Buffer; 細胞溶解バッファ) 180 μl 、及びEDT (Proteinase K) 20 μl を加え、55°Cで3時間インキュベートした。そこへ20 μl の3M 酢酸ナトリウム水溶液を添加した後、500 μl の99.5%冷エタノールを加え、緩やかに攪拌し、5分水氷上に置いた。

[0178] 冷却遠心処理 (15,000×G、10分、4°C)にて上清を除去し、500 μl の70%冷エタノールでマイクロチューブ内を洗浄後、同様に冷却遠心処理した。上清を除去後、エタノールを真空乾燥 (5分)にて除去し、ペレットに50 μl 滅菌水を加え、37°Cで1時間保持し、DNA溶液を調製した。その5 μl をPCR増幅用試料とした。

[0179] 前記パラジウム錯体溶液にて処理した後、遠心分離処理により得たペレットに対して、前記のようなDNA抽出を行わず、細菌から直接にリアルタイムPCR (定量PCR) 増幅を行った。

[0180] 1-3) PCR増幅

前記の実施例と同様にして、各PCR増幅用試料のリアルタイムPCR増幅を2回実施した。

[0181] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表7に示す。

[0182]

[表7]

表7 Dichloro(ethylenediamine)palladium (II) 処理・リアルタイムPCRによる
C. sakazakii 生細胞・死細胞 (滅菌水けん濁液) のCt値比較

パラジウム錯体濃度 (μ M)	Cells ^{a)}		PK(+) + Detergent + EtOH 法 ^{b)}	
	生細胞 (6.1×10^7 CFU/ml)	死細胞 (6.1×10^7 cells/ml)	生細胞 (6.1×10^7 CFU/ml)	死細胞 (6.1×10^7 cells/ml)
0	21.1 $\pm$ 0.43 ^{c)}	22.1 $\pm$ 0.05	20.9 $\pm$ 0.18	19.7 $\pm$ 0.32
25	24.7 $\pm$ 0.42	35.5 $\pm$ 0.16	20.7 $\pm$ 0.54	20.3 $\pm$ 0.53
250	30.4 $\pm$ 0.26	ND ^{d)}	20.9 $\pm$ 0.28	20.8 $\pm$ 0.38

a) パラジウム錯体溶液処理後の各細胞のペレットからDNAを抽出せず直接、リアルタイムPCRを実施した
(ダイレクト・リアルタイムPCR)。

b) パラジウム錯体溶液処理後の各細胞ペレットから界面活性剤存在下プロテアーゼK処理、
フェノール/クロホルム抽出はせず、直接エタノール沈澱によりDNA抽出精製。

c) リアルタイムPCRを2回測定し、mean $\pm$ SDにて表示した。

d) ターゲット遺伝子増幅せず。

[0183] 表7によれば、Dichloro(ethylenediamine)palladium (II)で処理し、細胞内に存在する染色体DNAに対して直接PCRを行った場合(表中の"Cells"の欄)、パラジウム錯体濃度25 μ Mで、クロノバクター・サカザキの生細胞のリアルタイムPCRのCt値は、未処理に比較して3.6上昇したのに対し、死細胞のCt値は、未処理と比較して13.4上昇し、上昇幅の違いにより生細胞と死

細胞の生死判定の可能性が示唆された。また、パラジウム錯体 $250\mu\text{M}$ では、死細胞のPCRは完全に抑制された。

[0184] 一方、細胞をパラジウム錯体溶液で処理した後、界面活性剤存在下でプロテアーゼKにて処理し、エタノール沈澱により抽出精製したDNAを鋳型としてリアルタイムPCRを行った場合（表中の”PK(+) + Detergent + EtOH法”の欄）は、死細胞及び生細胞のいずれにおいてもCt値の有意な上昇は認められなかった。

3. 考察

[0185] 上記の結果からは、dichloro(η -cycloocta-1,5-diene)palladium (II)に限られず、パラジウム錯体は一般に、死細胞の膜を透過後、ほとんどがHUTANパク質に代表されるDNA結合性タンパク質に結合する可能性が高いと考えられる。

[0186] [実施例5] Diamminedichloropalladium (II)による、スタフィロコッカス・アウレウスの生細胞・死細胞の識別

本実施例5では、グラム陽性細菌であるスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) について、パラジウム錯体による生細胞と死細胞との識別が可能であるかどうかを検討した。

[0187] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) *Staphylococcus aureus* (スタフィロコッカス・アウレウス) ATCC 6538P株を用いて、実施例1と同様にして、滅菌水にて1 ml生細胞けん濁液 (2.1×10^7 CFU/ml) 及び死細胞けん濁液 (2.1×10^7 cells/ml) を調製した。

上記スタフィロコッカス・アウレウスの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液のそれぞれ $50\mu\text{l}$ を、下記試験に供した。

[0188] 1-2) Diamminedichloropalladium(II)溶液の調製及び試料の処理

diamminedichloropalladium(II) 1.70 mgを秤量し、 $804\mu\text{l}$ DMSO (Sigma) に溶解し10 mM溶液を調製した。その10 mM溶液を生理食塩水にて希釈し、 $1\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、及び $100\mu\text{M}$ の各溶液を調製した。

[0189] 各Diamminedichloropalladium (II)溶液 $50\mu\text{l}$ を、上記*S. aureus*生細胞け

ん濁液又は死細胞けん濁液50 μ lに添加し、恒温水槽にて37℃で10分間保持した。その後、冷却遠心処理（4℃、3,000×G、5分）し、上清を除去し、そのペレットを150 μ lの滅菌水にけん濁させ、よく攪拌した後、同様の冷却遠心処理を行い、上清を除去した。得られたペレット（5 μ l相当）をPCR増幅用試料とした。

[0190] 1－3）PCR増幅

前記実施例と同様にして、上記の各PCR増幅用試料のリアルタイムPCR増幅を2回実施した。

[0191] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表8に示す。

[0192] [表8]

表8 Diamminedichloropalladium (II) 処理・リアルタイムPCRによる *S. aureus* 生細胞・死細胞の Ct 値の変化

パラジウム錯体濃度 (μ M)	生細胞 (2.1×10^7 CFU/ml)	死細胞 (2.1×10^7 cells/ml)
0	21.5 $\pm$ 0.01 ^{a)}	20.0 $\pm$ 0.00
0.5	24.9 $\pm$ 0.70	30.8 $\pm$ 0.61
1	24.9 $\pm$ 0.04	ND ^{b)}
2.5	25.2 $\pm$ 1.40	ND
5	26.6 $\pm$ 0.59	ND
10	28.2 $\pm$ 2.36	ND
25	28.2 $\pm$ 1.47	ND
50	30.8 $\pm$ 1.24	ND

a) リアルタイムPCRの Ct 値（2回測定）

b) ND：ターゲット遺伝子増幅せず

[0193] 表8によれば、Diamminedichloropalladium (II) 1 μ Mで、生細胞のCt値は未処理のCt値と比較して3.4程度の上昇に留まったのに対し、死細胞ではターゲット遺伝子増幅は完全に抑制された。したがって、同パラジウム錯体により *S. aureus* の生細胞と死細胞の明瞭な識別ができた。

[0194] 3. 考察

上記のとおり、パラジウム錯体を用いることにより、*S. aureus* でも生細胞と死細胞の明瞭な識別が可能となることが明らかとなった。以上の実施例に

より、パラジウム錯体により、グラム陰性細菌、及び形態学的にグラム陰性細菌の外膜と同一組成をエンベロープとして含むインフルエンザウイルス等のウイルスのみならず、外膜を有さず形態学的にグラム陰性細菌やインフルエンザウイルスと異なるグラム陽性細菌においても、生細胞と死細胞の明瞭な識別も可能であることが判明した。したがって、パラジウム錯体は、微生物全般の生細胞と死細胞の識別が可能と考えられる。

[0195] 〔実施例6〕塩化パラジウム(II) ($\text{PdCl}_2(\text{II})$) をDMSOに溶解して得られる錯体による微生物の生細胞と死細胞の識別に関する検討

本実施例6では、共有結合による巨大分子として定義されている塩化パラジウム(II) ($\text{PdCl}_2(\text{II})$) をDMSOに溶解して得られるパラジウム錯体を用いて、クロノバクター・サカザキの生細胞と死細胞の識別に関する検討を行った。

[0196] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) クロノバクター・サカザキATCC29544を、BHIブロスを用いて、37°C、16時間培養を行った。

前記培養液1 mlを冷却遠心処理(4°C、3,000×G、10分間)し、上清除去後、ペレットに1 mlの滅菌水を添加し、更に滅菌水にて100倍希釈して、生細胞けん濁液(9.4×10^6 CFU/ml)を調製した。また、上記生細胞けん濁液1 mlを、1.5 mlのマイクロチューブ(Eppendorf, Hamburg, Germany)に分取し、沸騰水に3分間浸漬処理し、その後、急冷した。沸騰水に浸漬処理した各けん濁液は、標準寒天培地(Eiken, Tokyo, Japan)によりコロニーを形成しないことを確認し、損傷細胞/死細胞けん濁液(以下、損傷細胞と死細胞を包括して死細胞けん濁液と表記; 9.4×10^6 cells/ml)を得た。

上記クロノバクター・サカザキの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液のそれぞれ50 μl を、下記試験に供した。

[0197] 1-2) 塩化パラジウム(II) 溶液の調製及び試料の処理

塩化パラジウム(II) 4.9 mg (27.63 μmol)を、1104 μl DMSO (Sigma)に溶解し 25 mM溶液を調製した。その25 mMの各塩化パラジウム(II) 溶液を生理

食塩水にて100 μ M、1mM、及び10mMの各溶液を準備した。

上記塩化パラジウム (II) 溶液10 μ lをクロノバクター・サカザキ生細胞けん濁液又は死細胞けん濁液90 μ lに添加し、恒温水槽にて37℃で30分間保持した。その後、冷却遠心処理 (4℃、3,000×G、5分) し、上清を除去し、そのペレットを150 μ lの滅菌水にけん濁させ、よく攪拌した後、同様の冷却遠心処理を行い、上清を除去した。得られたペレット (5 μ l相当) をPCR増幅用試料とした。

[0198] 1-3) PCR増幅

前記の実施例と同様にして、各PCR増幅用試料のリアルタイムPCR増幅を実施した。

[0199] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表9に示す。

[0200] [表9]

表9 塩化パラジウム (II) DMSO 溶解物処理・リアルタイムPCRによる *C. sakazakii* 生細胞・死細胞の Ct 値の変化

パラジウム錯体濃度 (μ M)	生細胞 (4.4×10^6 CFU/ml)	死細胞 (4.4×10^6 cells/ml)
0	18.6 $\pm$ 0.70 ^{a)}	18.9 $\pm$ 1.40
1	18.9 $\pm$ 1.34	20.4 $\pm$ 0.23
10	19.9 $\pm$ 1.27	28.6 $\pm$ 0.25
20	25.8 $\pm$ 0.49	34.6 $\pm$ 0.29
30	28.8 $\pm$ 0.35	ND ^{b)}

a) リアルタイムPCRの Ct 値 (n=2)

b) ND : ターゲット遺伝子増幅せず

[0201] 3. 考察

表9に示されるように、塩化パラジウム (II) 20 μ M にてクロノバクター・サカザキの生細胞のリアルタイムPCRのCt値は未処理に比較して7.2上昇した程度に留まったのに対して、死細胞処理群では未処理と比較して15.7程度上昇し、更に30 μ Mで、クロノバクター・サカザキの生細胞のリアルタイムPCRのCt値は未処理に比較して10.2上昇した程度に留まったのに対し、死細胞ではターゲット遺伝子の増幅が完全に抑制され、生細胞と死細胞の生死

判定の可能性が示唆された。

従って、生細胞と死細胞を明瞭に識別するパラジウム錯体には、本実施例 6 にて開示されたような、他の元素もしくは基との共有結合により巨大分子として定義されているパラジウム化合物を有機溶媒に溶解して得られるパラジウム錯体も含まれると考えられる。

[0202] 〔実施例 7〕 bis(triphenylphosphine)palladium(II)diacetate、又は palladium(II)acetate による大腸菌 (*Escherichia coli*) の生細胞・死細胞の識別

本実施例 7 では、ハードなルイス塩基であるカルボキシレート基を配位子とするパラジウム錯体 bis(triphenylphosphine)palladium(II)diacetate、及び、palladium(II)acetate を DMSO に溶解して生成させたパラジウム錯体を用いて、生細胞・死細胞の識別を行った。

[0203] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) 滅菌水を用いて *E. coli* JCM1649 株を用いて、滅菌水にて生細胞けん濁液 (2.2×10^7 CFU/ml) 及び死細胞けん濁液 (2.2×10^7 cells/ml; 沸騰水 2 分浸漬) を調製し、それぞれ 90 μ l を下記試験に供した。JCM1649 株は、独立行政法人 理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1) から入手することができる。

[0204] 1-2) パラジウム錯体溶液の調製及び試料の処理

bis(triphenylphosphine)palladium(II)diacetate (II) (Sigma) 3.11 mg (14.15 μ mol) を正確に秤量し、415.2 μ l のジメチルスルフォキシド (DMSO, Sigma) に溶解して 10 mM 溶液を調製した。この溶液を生理食塩水で希釈して 100 μ M、500 μ M、1000 μ M 溶液を準備した。

同様に、palladium(II)acetate (Palladium(II)Acetate Recrystallized, Aldrich) 4.02 mg (17.9 μ mol) を正確に秤量し、1790.0 μ l の DMSO に溶解して 10 mM 溶液を調製した。この溶液を生理食塩水で希釈して 10 μ M、20 μ M、250 μ M、及び 500 μ M 溶液を準備した。

[0205] 前記の各薬剤溶液 10 μ l を、上記生細胞けん濁液 90 μ l 又は死細胞けん濁液 90 μ l に添加し、恒温水槽にて 37°C で 30 分間保持した。その後、冷却遠心

処理（4℃、15,000 × G、5分）し、上清を除去しそのペレットを1 mlの滅菌水にて洗浄した。洗浄後のペレット（細胞けん濁液5 μlに相当）をPCR増幅用試料とした。

[0206] 1-3) PCR増幅

下記表10に示す組成にてダイレクト・リアルタイムPCR用マスターミックスを調製した。具体的には、Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (New England Biolabs Japan Inc.; M0273S)をリアルタイムPCRバッファーとして用い、Taqポリメラーゼを通常使用の4倍量加え、同バッファーにcDBC (10 × DBC) を所定量添加した。ダイレクト・リアルタイムPCR増幅(40 cycles)を2回実施した。以下、New England Biolabs製品はNEBと記載する。

[0207] [表10]

表10 ダイレクト・リアルタイムPCRマスターミックス組成		
各試薬	添加量 (μl)	組成 (終濃度)
NEB Taq polymerase (5 U/μl)	0.5	4 ×
NEB 10 × buffer	2.5	1 ×
TaKaRa dNTP mixture (2 mM)	2.0	0.16 mM
ENT-16S forward, reverse primer mix (10 μM each)	0.75	0.3 μM each
ENT-16S TaqMan probe (10 μM)	1.5	0.6 μM
cDBC (10 × DBC)	2.5	1 ×
Sterile water (SW)	10.25	(-)
Template	5.0	(-)
Total volume	25.0	

[0208] PCR増幅には、Primer ENT-16S forward: 腸内細菌科菌群 (Enterobacteriaceae) 特異的16S rRNA遺伝子検出用フォワードプライマー (5'- GTTGTAAGCACTTTCAGTGGTGAGGAAGG -3' : 配列番号4)、Primer ENT-16S reverse: 腸内細菌科菌群 (Enterobacteriaceae) 特異的16S rRNA遺伝子検出用リバースプライマー (5'- GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG-3' : 配列番号5) をPCRプライマーとして使用した (両プライマーはニッポンジーンに製造委託した)。増幅されるrRNA遺伝子の断片長は424 bpである。腸内細菌科菌群 (Enterobac

teriacae) ENT-16S TaqMan probeとしては、5' - /56-FAM/AACTGCATC/ZEN/TGATACTGGCAGGCT/31ABkFQ/ -3' (配列番号6) の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。このプローブは、オリゴヌクレオチドの5' 末端に蛍光物質56-FAM、中央部にZEN、3' 末端に31ABkFQという消光色素 (クエンチャー) を配置した仕様で、Integrated DNA Technologies社にて委託製造した。

尚、配列番号4及び5のプライマーに関する塩基配列情報は、Nakano, S. et al., J. Food Prot. 66:1798-1804, 2003から入手し、配列番号6のENA-16S TaqMan probeの塩基配列は、各腸内細菌科菌群の16S rRNA遺伝子情報はthe GenBank database (<http://www.ebi.ac.uk/genbank/>) より腸内細菌科菌群内で相補的領域を選択した。

[0209] リアルタイムPCR装置を用いて、下記のPCRサーマルサイクル条件により、リアルタイムPCRを実施した。

- 1) 95℃, 20秒 (1サイクル)
- 2) 95℃, 5秒; 60℃, 1分 (40サイクル)

尚、陰性コントロール (Negative Control) として、滅菌水5μlを鋳型として使用した。リアルタイムPCRは2回実施した。

[0210] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表11に示す。

[0211] [表11]

表11 各種パラジウム錯体処理・ダイレクト・リアルタイムPCRによる大腸菌*E. coli*の生細胞・死細胞 (滅菌水けん濁液) の識別結果 (Ct値の変化)

パラジウム錯体	パラジウム錯体濃度 (μM)	生細胞 (2.1×10 ⁷ CFU/ml)	死細胞 (2.1×10 ⁷ cells/ml)
(No Agent)	0	19.1 ± 0.23	21.1 ± 0.18
bis(triphenylphosphine)palladium(II)diacetate	10	19.5 ± 0.27	21.1 ± 0.13
	50	24.5 ± 0.19	ND
	100	27.7 ± 0.25	ND
palladium(II)acetate	1	20.3 ± 0.06	ND
	2	21.7 ± 0.14	ND
	25	ND	ND
	50	ND	ND

[0212] 3. 考察

表11によれば、bis(triphenylphosphine)palladium(II)diacetateを*E. c*

oliの生細胞及び死細胞に作用させた時、死細胞のターゲット遺伝子増幅は50 μ M以上で完全に抑制されていた。生細胞の場合、本薬剤の濃度依存的にCt値が上昇する傾向が観測されたが、50 μ Mの濃度にて明瞭な生細胞と死細胞の識別が可能であった。

また、palladium(II)acetateのDMSO溶液は、1 μ Mの濃度にて死細胞由来のターゲット遺伝子増幅が完全に抑制され、生細胞に関しては、2 μ Mまでの濃度であれば無処理と比較してもCt値が若干上昇する程度で抑制されており、明瞭な生細胞と死細胞の識別が可能であった。

[0213] 本実施例7により、パラジウム金属にソフトなR₃P基 (triphenylphosphine 基) を配位結合させたパラジウム錯体を用いても、生細胞と死細胞の識別が可能であることが示された。また、palladium(II)acetateをDMSOに溶解させることにより生成するパラジウム錯体を用いた場合も、明瞭な生細胞と死細胞の判定が可能であった。

以上により、途中経過を問わず最終的に生成したパラジウム錯体は、配位子がハードなルイス塩基、中間のルイス塩基、ソフトなルイス塩基何れであっても、良好な生細胞と損傷細胞・死細胞の識別が可能である。

[0214] [実施例8]

Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)を用いた牛乳中のE. coliの生細胞・死細胞の識別

[0215] 食品サンプルや臨床検体には、パラジウム錯体の配位子になり得る成分が混在している。例えば、殺菌した牛乳では、ウシ体細胞やウシ乳腺上皮細胞が含まれている。これらの細胞は死細胞であっても、DNA結合性タンパク質 (例えばHUヒストン様タンパク質)、RNA結合性タンパク質 (例えばSynaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein「SYNCRIP」分子量66 kDa (特願2000-299812)、核内RNA-タンパク質複合体・パラスペックル (paraspeckle) (Sasaki Y.T.et.al.(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106:2525-2530) を形成するタンパク質、及び、リボゾームタンパク質のようなタンパク質を保持している可能性が高い。また、これらのタンパク質がウ

シ体細胞やウシ乳腺上皮細胞から殺菌した牛乳中に流出している可能性も可能性も高く、これらのタンパク質はパラジウム錯体の配位子になり得る（実施例1～7参照）。

また、パラジウム錯体はタンパク質（又は、システイン残基など硫黄を含むアミノ酸、もしくは、他のアミノ酸）を配位子とすることも既に示唆されているので、乳中の各種カゼイン、ホエイタンパク質にも、パラジウム錯体は一部配位する可能性もある（Lippardら（生物無機化学 Lippard, S.J. and Berg, J.M. 著；松本和子監修 21-23頁 “生物無機化学の研究における配位化学の原理”））。

そこで、殺菌した牛乳に含まれる生細胞と死細胞が、パラジウム錯体を用いて識別可能かどうかを試験した。

[0216] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) 生理食塩水を用いてE. coli JCM1649株の生細胞けん濁液 (8.2×10^8 CFU/ml) 及び死細胞けん濁液 (8.2×10^8 cells/ml)（生細胞けん濁液を沸騰水にて3分ボイル後急冷）を調製し、更にそれらを生理食塩水にて10倍希釈し、生細胞けん濁液及び死細胞けん濁液を調製した。

[0217] 1-2) パラジウム錯体溶液の調製及び試料の処理

Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II) (Sigma) 3.01 mg ($10.54 \mu\text{mol}$)、及び、Diamminedichloropalladium (II) (Wako) 2.48 mg ($11.73 \mu\text{mol}$) を正確に秤量し、前者は211 μl 、後者は1173 μl のDMSOに溶解して、各々50 mM溶液を調製した。この溶液を生理食塩水で希釈して、さらに100 μM 、500 μM 、1 mM、5 mM、10 mM溶液を準備した。

[0218] 市販の牛乳（殺菌済み：以下、「殺菌ミルク」と記載する。）12 mlを採取し、前記10倍希釈生細胞けん濁液20 μl を接種し、 1.6×10^6 CFU/12 ml殺菌ミルクを調製した。また、同様に、殺菌ミルク12 mlに前記10倍希釈死細胞けん濁液20 μl を接種し、 1.6×10^6 cells/12 ml殺菌ミルクの死細胞接種殺菌ミルクを調製した。

尚、試験に用いた市販の牛乳（殺菌ミルク）は、E. coli生細胞は検出限界

以下 (<1 CFU/2.22 ml) であることを培養法により確認した。

また、この殺菌ミルクに既知濃度のE. coli死細胞を接種し、薬剤処理をせずに後述のミルクから細菌を回収する工程のみを行い、その後、前述の実施例7と同様のダイレクト・リアルタイムPCRを行うことにより、検出されるE. coli死細胞が最大でも 10^3 cells/mlであることを予備検討にて確認したものを試験材料として使用した。

従って、E. coli死細胞を 1.6×10^6 CFU/12 ml殺菌ミルクとなる濃度にて接種した死細胞接種殺菌ミルクは、元来含まれているE. coli死細胞は無視できるレベルである。

尚、殺菌ミルクにおいて、比較的高濃度にて混在することが想定されるE. coliを始めとする大腸菌群（サルモネラを含めると腸内細菌科菌群）死細胞は、 1.6×10^6 CFU/12 ml殺菌ミルクのレベルが充分想定されるので、本方法において、その死細胞由来のPCRは完全に抑制される必要がある。

[0219] 前記各生細胞接種殺菌ミルク、および死細胞接種殺菌ミルクを、それぞれ冷却遠心分離（4℃、 $3,000 \times G$ 、5分）し、デカンテーションにより上清を除去して生細胞乳ペレット(a)、死細胞乳ペレット(a)を回収した。

回収した各乳ペレット(a)にPBS10 mlを加えよく攪拌し、冷却遠心分離（4℃、 $3,000 \times G$ 、5分）後、デカンテーションにより上清を除去して各ペレット(b)を回収した。回収した各ペレット(b)に990 μ l滅菌水を添加してけん濁した。この各ペレット(b)けん濁液に、前記100 μ M、500 μ M、1 mM、5 mM、10 mM、又は50 mM Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)溶液を10 μ l添加し、37℃の恒温槽にて30分間攪拌（恒温水槽PERSONAL-11; TA Itec恒温槽 60 rpm）しながら保持した。

また、これとは別に、Diamminedichloropalladium (II)溶液を用いて、Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)と同様の希釈系列にて試験を実施した。

その後、各々の試料に10 ml PBSを加え、よく攪拌後、冷却遠心分離（4℃、 $3,000 \times G$ 、5分）し、デカンテーションにより上清を除去して、各ペレッ

ト(c)を得た。さらに同様の工程を再び実施した。各ペレット(c) に100 μ l の滅菌水を添加してけん濁させ、ABI製100 μ l容 PCRチューブに移し、冷却遠心分離(4℃、3,000 $\times$ G、5分)し、ピペットにより上清を除去して各ペレット(d)を回収した。回収した各ペレット(d) (5 μ l相当)をPCR増幅用試料とした。

[0220] 1-3) PCR増幅

前述の実施例7の表10と同様のダイレクト・リアルタイムPCR用マスターミックスを用いて、ダイレクト・リアルタイムPCR増幅(40 cycles)を2回実施した。

[0221] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表12に示す。

[0222] [表12]

表12 Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)処理もしくはDiamminedichloropalladium (II)処理・ダイレクト・リアルタイムPCRによる殺菌ミルク中における大腸菌 *E. coli* の生細胞・死細胞の識別結果 (Ct 値の変化)

パラジウム錯体	パラジウム錯体濃度 (μ M)	生細胞 (1.3×10^5 CFU/ml) ^{a)}	死細胞 (1.3×10^5 cells/ml) ^{a)}
(No Agent)	0	24.7 $\pm$ 0.43 ^{b)}	30.9 $\pm$ 0.28
Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)	1	24.5 $\pm$ 0.57	28.2 $\pm$ 0.43
	5	23.1 $\pm$ 0.37	31.2 $\pm$ 0.61
	10	23.9 $\pm$ 1.64	ND ^{c)}
	50	23.7 $\pm$ 0.89	ND
	100	26.4 $\pm$ 1.76	ND
	500	ND	ND
Diamminedichloropalladium (II)	1	25.7 $\pm$ 0.23	28.8 $\pm$ 0.52
	5	24.7 $\pm$ 0.66	29.0 $\pm$ 0.48
	10	25.9 $\pm$ 0.97	30.1 $\pm$ 1.26
	50	27.1 $\pm$ 1.03	ND
	100	ND	ND
	500	ND	ND

a) 殺菌ミルク中の接種 *E. coli* 生菌又は死菌濃度

b) 試験は2回測定

c) 陰性

[0223] 3. 考察

表12によれば、死細胞接種殺菌ミルクでは、薬剤処理を施さない場合(パラジウム錯体未添加)のCt値が30.9であったのに対し、Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)で処理した場合は10~500 μ Mにて、Diamminedichloropalladium (II)で処理した場合は50~500 μ Mにて、PCR増幅は見

られなかった。

一方、生細胞接種殺菌ミルクの場合は、Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)では0~100 μ Mにて、またDiamminedichloropalladium (II)では0~50 μ Mにて、PCR増幅が観測され、パラジウム錯体未添加の場合のCt値と比較しても殆ど差がなかった。

すなわち、2種類のパラジウム錯体を用いて、殺菌ミルク中における生細胞と死細胞の識別が可能であることが示された。

[0224] [実施例9] Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)を用いた牛乳中のE. coli生細胞の特異的識別の検出限界

本実施例9では、殺菌ミルク中のE. coli生菌の特異的識別の検出限界を調べた。

[0225] 1. 試験材料及び培養方法

1-1) 生理食塩水を用いてE. coli JCM1649株の生細胞けん濁液 (1.5×10^9 CFU/ml) を調製し、更に生理食塩水にて10、100、1000、及び 10^4 倍希釈し、生細胞けん濁液を調製した。

[0226] 1-2) パラジウム錯体溶液の調製及び試料の処理

Dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II) (Sigma)3.01 mg (10.54 μ mol) を正確に秤量し、211 μ lのDMSOに溶解して50 mM溶液を調製した。これを生理食塩水にて希釈し、5 mM溶液を調製した。

[0227] 市販の牛乳（殺菌済み：以下、「殺菌ミルク」と記載する。）12 mlを採取し、前記10、100、1000、及び 10^4 倍希釈生細胞けん濁液10 μ lを接種し、 $1.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^3$ CFU/12 mlミルクの試料を調製した。

尚、試験に用いた市販の牛乳（殺菌ミルク）は、E. coli生細胞は検出限界以下 (<1 CFU/2.22 ml) であることを培養法により確認した。

また、この殺菌ミルクに既知濃度のE. coli死細胞を接種し、薬剤処理をせずに後述のミルクから細菌を回収する工程のみを行い、その後、前述の実施例7と同様のダイレクト・リアルタイムPCRを行うことにより、検出されるE. coli死細胞が最大でも 10^3 cells/mlであることを予備検討にて確認した。

ものを試験材料として使用した。

[0228] 前記各生細胞接種殺菌ミルクを冷却遠心分離（4℃、3,000 × G、5分）し、デカンテーションにより上清を除去して乳ペレット(a)を回収した。回収した乳ペレット(a)にPBSを10 ml加えてよく攪拌し、再び冷却遠心分離（4℃、3,000 × G、5分）した後、デカンテーションにより上清を除去してペレット(b)を回収した。回収したペレット(b)を990 μlの滅菌水にけん濁し、前記5 mM Dichloro(η-cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)溶液を10 μl添加し、37℃の恒温槽にて30分間攪拌（恒温水槽PERSONAL-11; TAITEC恒温槽 60 rpm）しながら保持した。

その後、PBSを10 ml加えて、よく攪拌した後、冷却遠心分離（4℃、3,000 × G、5分）し、デカンテーションにより上清を除去してペレット(c)を得た。さらに同様の工程を再び実施した。ペレット(c)を100 μlの滅菌水にけん濁させ、ABI製100 μl容 PCRチューブに移し、冷却遠心分離（4℃、3,000 × G、5分）し、ピペットにより上清を除去してペレット(d)を回収した。回収したペレット(d)（5 μl相当）をPCR増幅用試料とした。

[0229] 1-3) PCR増幅

前述の実施例7の表10と同様のダイレクト・リアルタイムPCR用マスターミックスを用いて、PCR増幅(40 cycles)を2回実施した。

[0230] 2. 結果

リアルタイムPCRの結果を表13に示す。

[0231] [表13]

表13 Dichloro(η-cycloocta-1,5,-diene)palladium (II)処理・ダイレクト・リアルタイムPCRによる殺菌ミルク中における大腸菌 E. coli の生細胞検出結果

パラジウム錯体	生細胞濃度 (CFU/ml) ^{a)}	Ct 値
Dichloro(η-cycloocta-1,5,-diene)palladium (II) (50 μM)	1.3 × 10 ⁴ ^{b)}	28.5 ± 0.32
	1.3 × 10 ³	33.7 ± 0.43
	1.3 × 10 ²	ND ^{c)}
	0	ND

a) 殺菌ミルク中の接種 E. coli 生菌濃度

b) 試験は2回測定

c) 陰性

[0232] 3. 考察

表13によれば、dichloro(η -cycloocta-1,5,-diene)palladium (II) 50 μ Mにて、殺菌ミルク中のE. coli生細胞 (1.5×10^4 CFU/12 mlミルク = 1.3×10^3 CFU/ml) からのターゲット遺伝子増幅を確認した。

[0233] 本実施例で用いたダイレクト・リアルタイムPCR用のプライマーは、腸内細菌科菌群 (Enterobacteriaceae) を網羅的に検出可能とする16S rRNA遺伝子をターゲットとするプライマーであるため、E. coliの生細胞・死細胞の識別に留まらず、殺菌ミルク中のEnterobacteriaceaeの生細胞・死細胞判定試験に利用可能である。

[0234] 本実施例では、殺菌ミルク中にE. coliが 10^3 CFU/mlの濃度で存在する場合、又はそれより低濃度で当初E. coli生細胞が汚染していたとしても、 10^3 CFU/ml濃度になるまで短時間培養することにより、生細胞のみ検出できることが示された。従って、ミルクと類似組成を有する血液などの臨床検体でも明瞭なターゲット細胞の生細胞・死細胞の識別が容易に類推される。

[0235] 以上の各実施例で示されるように、パラジウム錯体を用いることにより、食品、環境サンプル、及び臨床検体中のターゲット細胞の生細胞と死細胞（損傷細胞も含む）の明瞭な識別が可能と結論される。

産業上の利用可能性

[0236] 本発明の方法によれば、簡便な工程で、微生物の生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出することができる。本発明により、核酸増幅法による簡易かつ迅速な食品及び生体試料、拭き取り試料、工業用水、環境用水、排水等の環境中の微生物の生細胞・損傷細胞・死細胞の簡便な判別が可能となる。

[0237] また、本発明に用いるパラジウム錯体のうち、例えばジアンミンジクロロパラジウム (II) (diamminedichloro-palladium (II)) は、臨床的には実績がないが、抗ウイルス効果・抗腫瘍効果について基礎検討されており、EMA等の薬剤に比べて危険性が低いと考えられる。さらに、好ましいパラジウム錯体は、EMA等の薬剤に比べて安価であり、産業上有利である。

請求の範囲

- [請求項1] 被検試料中の微生物の生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出する方法であって、以下の工程を含む方法：
- a) 前記被検試料にパラジウム錯体を添加する工程、
 - b) 被検試料に含まれる微生物のDNA又はRNAのターゲット領域を核酸増幅法により増幅する工程、及び
 - c) 増幅産物を解析する工程。
- [請求項2] 前記パラジウム錯体が、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素、カルボキシレート基、 H_2O 、 CO_3^{2-} 、 OH^- 、 NO_3^- 、 ROH 、 N_2H_4 、 PO_4^{3-} 、 R_2O 、 RO^- 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ 、 R_2S 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、 R^- （ただし、「R」はいずれも飽和又は不飽和有機基を表す）、 NO_2^- 、 Ar-NH_2 、 Ar-CN （Arは不飽和有機基）、 N_2 、 SO_3^{2-} 、イミダゾール環、不飽和環状有機基、及び N_3^- から選ばれる配位子を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記配位子が、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素、カルボキシレート基、 R_3P 、及び Ar-CN からなる群から選ばれる、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記パラジウム錯体が、ジクロロ（ η -シクロオクタ-1,5-ジエン）パラジウム（II）、ビス（ベンゾニトリル）ジクロロパラジウム（II）、ジアンミンジクロロパラジウム（II）、ジクロロ（エチレンジアミン）パラジウム（II）、及び、ビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（II）ジアセテートからなる群から選ばれる、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記パラジウム錯体が、パラジウム化合物を、配位子としてパラジウムに結合し得る有機溶媒、又は配位子としてパラジウムに結合し得る物質を含む溶液に溶解することにより生成するパラジウム錯体である、請求項1に記載の方法。
- [請求項6] 前記パラジウム化合物が、塩化パラジウム、フッ化パラジウム、臭化パラジウム、ヨウ化パラジウム、水酸化パラジウム、二硝酸パラジ

ウム(II)、四硝酸パラジウム(IV)、酢酸パラジウム、リン酸パラジウム、ジメトキシパラジウム、メトキシリン酸パラジウム、亜硫酸パラジウム、ジニトロパラジウム、及びパラジウムジアジドからなる群から選ばれる、請求項5に記載の方法。

[請求項7] 前記パラジウム化合物が、塩化パラジウム又は酢酸パラジウムであって、塩化パラジウムが塩化パラジウム(II)であり、酢酸パラジウムが酢酸パラジウム(II)である、請求項6に記載の方法。

[請求項8] 前記有機溶媒がジメチルスルホキシドである、請求項5～7のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 前記ターゲット領域の増幅が、細胞からの核酸の抽出を行わずに行われることを特徴とする、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

[請求項10] 前記ターゲット領域の増幅が、微生物細胞内で行われることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

[請求項11] 前記ターゲット領域の増幅が、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、マグネシウム塩、及び有機酸塩又はリン酸塩を前記被検試料に添加して行われることを特徴とする、請求項9又は10に記載の方法。

[請求項12] 前記ターゲット領域の増幅が、界面活性剤の存在下で行うことを特徴とする、請求項9～11のいずれか一項に記載の方法。

[請求項13] 前記ターゲット領域が、50～5000塩基のターゲット領域である、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

[請求項14] 前記ターゲット領域が、被検試料のDNAの5S rRNA遺伝子、16S rRNA遺伝子、23S rRNA遺伝子、及びtRNA遺伝子から選択される遺伝子に対応するターゲット領域である、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 前記被検試料が、食品、生体試料、飲料水、工業用水、環境用水、排水、土壌、又は拭き取り試料のいずれかである、請求項1～14の

いずれか一項に記載の方法。

[請求項16] 前記微生物が、細菌、又はウイルスである、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

[請求項17] 前記細菌が、グラム陰性細菌、又はグラム陽性細菌である、請求項16に記載の方法。

[請求項18] 前記核酸増幅法が、PCR法、RT-PCR法、LAMP法、SDA法、LCR法、TMA法、TRC法、HC法、SMAP法、又はマイクロアレイ法である、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] 前記PCR法がリアルタイムPCR法により行われ、PCRと増幅産物の解析が同時に行われることを特徴とする、請求項18に記載の方法。

[請求項20] 前記増幅産物の解析が、微生物の標準試料を用いて作成された微生物量及び増幅産物との関連を示す標準曲線を用いて行われることを特徴とする、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

[請求項21] 核酸増幅法により、被検試料中の微生物の生細胞を、死細胞又は損傷細胞と識別して検出するためのキットであって、下記の要素を含むキット：

1) パラジウム錯体、又は、

配位子としてパラジウムに結合し得る有機溶媒、もしくは配位子としてパラジウムに結合し得る物質を含む溶液に溶解したときにパラジウム錯体を生成するパラジウム化合物、

2) 検出対象の微生物のDNA又はRNAのターゲット領域を核酸増幅法により増幅するためのプライマー。

[請求項22] 前記パラジウム錯体が、 NH_3 、 NH_2 、ハロゲン元素 (Cl、F、Br、I、At)、カルボキシレート基、 H_2O 、 CO_3^{2-} 、 OH^- 、 NO_3^- 、 ROH 、 N_2H_4 、 PO_4^{3-} 、 R_2O 、 RO^- 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ 、 R_2S 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、 R^- (ただし、「R」はいずれも飽和又は

不飽和有機基を表す)、 NO_2^- 、 Ar-NH_2 (Arは不飽和有機基)、 N_2 、 SO_3^{2-} 、イミダゾール環、不飽和環状有機基、及び N_3^- から選ばれる配位子を含む、請求項21に記載のキット。

[請求項23] 前記配位子が、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素、カルボキシレート基、 R_3P 、及び Ar-CN からなる群から選ばれる、請求項22に記載の方法。

[請求項24] 前記パラジウム錯体が、ジクロロ (η -シクロオクタ-1,5-ジエン)パラジウム (II)、ビス (ベンゾニトリル) ジクロロパラジウム (II)、ジアンミンジクロロパラジウム (II)、ジクロロ (エチレンジアミン) パラジウム (II)、及び、ビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) ジアセテートからなる群から選ばれる、請求項21に記載のキット。

[請求項25] 前記パラジウム化合物が、塩化パラジウム、フッ化パラジウム、臭化パラジウム、ヨウ化パラジウム、水酸化パラジウム、二硝酸パラジウム (II)、四硝酸パラジウム (IV)、酢酸パラジウム、リン酸パラジウム、ジメトキシパラジウム、メトキシリン酸パラジウム、亜硫酸パラジウム、ジニトロパラジウム、及びパラジウムジアジドからなる群から選ばれる、請求項21に記載のキット。

[請求項26] 前記パラジウム化合物が、塩化パラジウム又は酢酸パラジウムであって、塩化パラジウムが塩化パラジウム (II) であり、酢酸パラジウムが酢酸パラジウム (II) である、請求項25に記載のキット。

[請求項27] さらに、配位子としてパラジウムに結合し得る有機溶媒を含む、請求項21、25又は26に記載のキット。

[請求項28] 前記有機溶媒がジメチルスルホキシドである、請求項27に記載のキット。

[請求項29] さらに、核酸増幅阻害物質の働きを抑制する薬剤、マグネシウム塩、及び有機酸塩又はリン酸塩を含む、請求項21～28のいずれか一項に記載のキット。

[請求項30] さらに界面活性剤を含む、請求項21～29のいずれか一項に記載

のキット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/070663

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i

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)

C12Q1/68, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), G-Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shin'ichi YOSHIDA et al., "Tokushu: Kenchiku Kankyo to Setsubi ni Kakawaru Suishitsu Kensa no Katsuyo to Doko Seikin Dake o Kenshutsu suru PCR-ho", Kenchiku Setsubi to Haikan Koji, 2011, vol.49, no.5, pages 34 to 36	1-30
A	WO 2007/094077 A1 (Kyushu University), 23 August 2007 (23.08.2007), & US 2009/0305240 A1 & EP 1992690 A1	1-30

☐ 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
13 August, 2013 (13.08.13)

Date of mailing of the international search report
27 August, 2013 (27.08.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

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	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

国際調査で使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）

CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), G-Search

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
A	吉田 眞一 他, 特集：建築環境と設備に関わる水質検査の活用と動向 生菌だけを検出する P C R 法, 建築設備と配管工事, 2011, Vol. 49, No. 5, p. 34-36	1-30
A	WO 2007/094077 A1（国立大学法人九州大学）2007.08.23 & US 2009/0305240 A1 & EP 1992690 A1	1-30

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矛盾するものではなく、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

13.08.2013

国際調査報告の発送日

27.08.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

三原 健治

4B

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3448