

(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
2016年6月30日(30.06.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/103433 A1

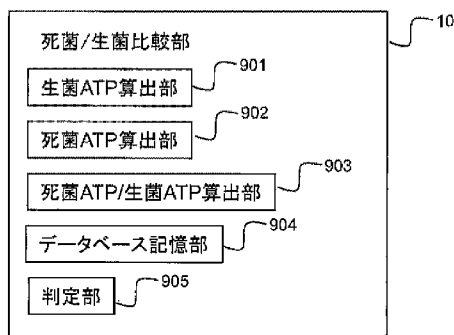
- (51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/084455
- (22) 国際出願日: 2014年12月26日(26.12.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社日立製作所 (HITACHI, LTD.) [JP/JP]; 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 多田 博子(TADA Hiroko); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 野田 英之(NODA Hideyuki); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 仁井見 英樹(NIIMI Hideki); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630番地 国立大学法人富山大学富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP). 北島 勲(KITAJIMA Isao); 〒9300194 富山県富山市杉谷2630番地 国立大学法人富山大学富山大学杉谷キャンパス内 Toyama (JP).
- (74) 代理人: 井上 学, 外 (INOUE Manabu et al.); 〒1008220 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号 株式会社日立製作所内 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) Title: METHOD, DEVICE AND SYSTEM FOR TESTING DRUG SENSITIVITY

(54) 発明の名称: 薬剤感受性試験方法、装置及びシステム

図9



- 10 Dead cells/living cells comparison unit
- 901 ATP in living cells-calculation section
- 902 ATP in dead cells-calculation section
- 903 ATP in dead cells/ATP in living cells -calculation section
- 904 Database memory
- 905 Determination section

(57) Abstract: In a conventional method for determining growth of a bacterium using the ATP test wherein the growth of the bacterium is determined on the basis of an increase or decrease in ATP in living cells with the lapse of culture time, the ATP in the living cells should be measured twice or more in the course of the culture and drug sensitivity test. Thus a trouble some procedure for preparing a sample is required in each measurement and speedy acquisition of drug sensitivity test results is difficult. According to the present invention, therefore, the presence or absence of drug sensitivity of a bacterium is determined on the basis of luminescence quantity of ATP originating in dead cells in a liquid culture medium.

(57) 要約: ATP法を利用した従来の菌の増殖判定では、培養時間の経過に伴う生菌ATPの増減により菌の増殖を判定するため、薬剤感受性培養実施中に生菌ATPの測定を複数回実施する必要があり、測定毎に試料調製の手間がかかるとともに、薬剤感受性結果を迅速に入手することが困難であった。そこで、本発明では、培養液中の死菌由来のATP発光量に基づいて、菌の薬剤への感受性の有無を判定する。



WO 2016/103433 A1

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

発明の名称：薬剤感受性試験方法、装置及びシステム

技術分野

[0001] 本発明は、菌の増殖評価に関する。特に、細菌の薬剤感受性試験を実施する方法、装置及びシステムに関するものである。

背景技術

[0002] 感染症による死亡者数の増加や、薬剤耐性菌の出現に伴い、感染症起因菌の薬剤感受性試験の迅速化が注目されている。従来は、薬剤感受性試験は培養法に基づき実施されてきた。感染症患者から血液、咽頭ぬぐい液、喀痰などの検体を採取後、常在菌が混在する検体から感染症起因菌を単独コロニーで得るため分離培養を一昼夜行なう。さらに、単独コロニーを形成した菌を一定濃度に調製後、各種各濃度の薬剤・抗生物質が配置された容器に分配し、薬剤感受性培養を一昼夜行なう。そして、培養後、菌の増殖の有無を基に感染症起因菌の薬剤感受性試験の結果が得られ、その結果を受けて患者に対し適切な投薬が行われる。そのため感染症患者に対し適切な投薬が行われるのは、検体採取後3日目以降である。

[0003] これに対して、薬剤感受性試験を迅速に行なう方法として、菌内にエネルギー源として存在するATP（Adenosine Triphosphate：アデノシン三リン酸）の変化量を菌の増殖の指標とするATP生物発光法が注目されている。ATP法は、菌内にエネルギー源として存在するATPを、ホタル由来の酵素ルシフェラーゼを利用して検出する方法である。ルシフェラーゼが、菌内のATPとMg²⁺存在下において基質であるルシフェリンを酸化し、その際に生じる発光量がATP量に比例するため、発光量の変化から菌の増殖を評価可能である。ATP法を利用した菌数の判定方法として、例えば、特許文献1において、ATP測定により生菌を計数し、DNA法により総菌を計数し、この総菌から生菌を減算して生菌数と死菌数を得る技術が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平08-304402

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] ATP法を利用した従来の菌の増殖判定では、検体中の遊離ATPを消去し、生きている菌体内のATP(生菌ATP)のみを評価する。この方法では、培養時間の経過に伴う生菌ATPの増減により菌の増殖を判定するため、薬剤感受性培養実施中に生菌ATPの測定を複数回実施する必要があり、測定毎に試料調製の手間がかかるとともに、薬剤感受性結果を迅速に入手することが困難であった。

課題を解決するための手段

[0006] 上述した課題の少なくとも一の課題を解決するための本発明の一態様として、薬剤感受性試験装置に、薬剤及び菌を含む培養液のATP発光計測を行う計測部と、計測部が計測した培養液中の死菌由来のATP発光量に基づいて、菌の薬剤への感受性の有無を判定する判定部と、を設ける。

発明の効果

[0007] 本発明により、ATP薬剤感受性試験を迅速及び簡便に実施することで、感染症患者に対し抗生物質の早急な適正投与が可能となる。上記した以外の、課題、構成及び効果は、以下の実施例の説明により明らかにされる。

図面の簡単な説明

- [0008] [図1]薬剤感受性試験の対象とする菌培養液の構成例を示す図。
[図2]生菌ATP及び死菌ATPを測定するための試料調製方法を模式的に示す図。
[図3]各方法で測定可能なATPを示す表。
[図4a]抗生物質非存在下での生菌ATP発光量及び死菌ATP発光量の経時変化の一例を示すグラフ。
[図4b]抗生物質存在下での生菌ATP発光量及び死菌ATP発光量の経時変

化の一例を示すグラフ。

[図5]薬剤感受性試験システムによる処理工程の一例を示すフロー図。

[図6]薬剤感受性試験システムによる死菌ATP発光量の測定工程の一例を示すフロー図。

[図7]本実施例における薬剤感受性試験システムの構成例を示す図。

[図8]計測装置の内部構成を示す図。

[図9]死菌/生菌比較部の内部構成を示すブロック図。

[図10]薬剤感受性試験の判定基準とするデータベースの例を示す表である。

[図11]E. coliの培養時間の経過に伴うATP量比の例を示すグラフである。

[図12]S. aureusの培養時間の経過に伴うATP量比の例を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本発明の好適な実施形態について、図面を用いつつ実施例を示して説明する。但し、この実施例に記載されているシステム、装置、デバイス、部材等の寸法、材質、形状、その他の相対的な配置等は特に特定の記載がない限りは、この発明の範囲をそれに限定する趣旨ではなく、あくまで説明例に過ぎない。

[0010] 図1を用いて本実施例の薬剤感受性試験の対象とする菌培養液1について説明する。菌培養液1中には、生菌2、細胞膜の損傷がない死菌3、細胞膜が損傷した死菌4など、菌が多様な状態で存在する。菌培養液1のうち、生菌2及び細胞膜の損傷がない死菌3はATPを細胞膜内に内包する。一方、細胞膜が損傷した死菌4においては、細胞膜の損傷が進むに従いATPが細胞膜の損傷部から漏れ出すため、細胞膜が損傷した死菌4由来のATPは培養液中に遊離ATP5として存在する。

[0011] 次に、図2を用いて生菌及び死菌由来のATPを測定するための方法について説明する。方法(1)の生菌ATP法は、菌体外のATP5を消去し、生菌2の細胞膜に内包されたATP2000と、細胞膜の損傷がない死菌3の細胞膜に内包されたATP3000と、を測定する方法である。方法(2)の

液中ATP法は、生菌2及び死菌3、4の菌体を含んだまま培養液1中の細胞膜が損傷した死菌4と遊離ATP5を測定する方法である。死菌4は、後述する生物発光分子である酵素ルシフェラーゼ反応の基質と酵素が損傷部位から進入するため、測定の対象となる。方法(3)のろ液ATP法は、後述するフィルタリング容器12を用いた遠心分離により培養液1をろ過することにより菌体2、3、4を除去し、ろ液1000中に含まれる遊離ATP5を測定する方法である。方法(4)の全ATP法は、生菌2の細胞膜に内包されたATP2000と、細胞膜の損傷がない死菌3の細胞膜に内包されたATP3000と、細胞膜が損傷した死菌4の細胞膜内に残存するATP4000と、を抽出し、遊離ATP5を合わせて測定する方法である。

[0012] 以上の方法(1)~(4)で測定可能な培養液1中のATPを図3に整理して示す。方法(1)では、生菌(細胞膜あり)の細胞膜に内包されたATPと死菌(細胞膜あり)の細胞膜に内包されたATPを測定可能である。方法(2)では、死菌(細胞膜損傷)の細胞膜に内包されたATPと死菌(細胞膜損傷)由来の遊離ATPを測定可能である。方法(3)では、死菌(細胞膜損傷)由来の遊離ATPを測定可能である。方法(4)では、生菌(細胞膜あり)の細胞膜に内包されたATPと死菌(細胞膜あり)の細胞膜に内包されたATPと死菌(細胞膜損傷)の細胞膜に内包されたATPと死菌(細胞膜損傷)由来の遊離ATPを測定可能である。

[0013] このように、遊離ATP5として培養液1中に存在する死菌由来のATPは、方法(2)~(4)に含まれるため、方法(2)~(4)により遊離ATP5の量に基づいて死菌ATPを測定可能である。

[0014] 次に、図4a及び図4bを用いて、大腸菌を例として方法(1)~(4)により処理しATP量を測定した結果の一例を示す。ATP法は、菌内にエネルギー源として存在するATPを、ホタル由来の酵素ルシフェラーゼを利用した生物発光検出である。ルシフェラーゼが、菌内のATPと Mg^{2+} 存在下において基質であるルシフェリンを酸化し、その際に生じる発光量がATP量に比例するため、発光量の変化から菌の増殖を評価する。

[0015] 本実施例では、発光量を60secのフォトンカウント値の積算で表わし、単位

を発光量 (Amount of luminescence (a. u.)) とする。先に述べたように、発光量と ATP 量は比例関係にあり、発光量が増加している場合は ATP 量が増加していると判定する。

[0016] 図 4 aは、大腸菌を抗生物質非存在下で培養した結果、図 4 bは大腸菌を抗生物質であるアンピシリン (以下ABPCとする) $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下で培養した結果を示す。図 4 aと 図 4 bの結果を比較すると、図 4 aでは培養時間の経過に伴って方法(1)の生菌 ATP 法は培養時間 4 時間まで発光量が培養時間とともに増加し、その後の培養時間 5 時間、6 時間では、飽和する傾向を示すのに対して、方法(2)の液中 ATP 法～(4)全 ATP 法も同様の傾向を示す。一方、図 4 bでは培養時間の経過 (3 hrs以降)に伴い方法(1)の生菌 ATP の発光量が減少するのに対し、方法(2)液中 ATP 法～(4)全 ATP 法では発光量が増加もしくは大きく変化しないといった傾向を示す。

[0017] これは、培養時間 4 時間で、抗生物質であるアンピシリンが大腸菌に作用し、生菌の増殖を停止させ、時間が経つにつれて菌を死に至らせている反応を示している。死菌由来の ATP は細胞膜の損傷が進むに従い細胞膜の損傷部から漏出するため、菌培養液中の ATP は増加する。方法(2)の液中、(3)のろ液中、(4)の全 ATP の培養時間 4 時間以降で発光量が一定になっている理由は、いずれも死菌由来の ATP が増加していることを示す結果である。

[0018] 次に、図 5 を用いて生菌 ATP または死菌 ATP を求める際に本実施例における薬剤感受性試験システムによる処理工程の一例を示す。なお、当該試験の測定対象となる菌は、菌体内に ATP を含有するものであれば特に限定されない。

[0019] 感染症患者から血液、咽頭ぬぐい液、喀痰等の検体を採取し (S 5 0 1)、常在菌が混在する検体から感染症起因菌を単独コロニーで得るため分離培養を一昼夜約 24h 行なう (S 5 0 2)。分離培養後、単独コロニーを形成した菌を一定濃度に調製後 (S 5 0 3)、各種各濃度の薬剤・抗生物質が配置された容器に分配し (S 5 0 4)、薬剤感受性培養を実施する (S 5 0 5)。

- [0020] ここで、S505で使用する分配容器の材質及び形状は特に限定されないが、平面上に複数の穴（ウェル）を有するプレート状のものが望ましく8ウェル×12ウェルで合計96ウェルが一体となった96穴マイクロプレート、または、16ウェル×24ウェルで合計384ウェルが一体となった384穴マイクロプレート、32ウェル×48ウェルで合計1532ウェルが一体となった1532穴マイクロプレート、等を用いる。
- [0021] また、薬剤感受性培養に使用する薬剤・抗生物質は特に限定されないが、ペニシリン系、セフェム系、アミノグリコシド系、ニューキノロン系、ホスホマイシン系等の殺菌作用を有する抗生物質が望ましい。
- [0022] 薬剤感受性培養を数時間実施後、培養液中に含まれる生菌由来の生菌ATPを生菌ATP測定フローで測定する。また、培養液中の死菌由来の死菌ATPを、死菌ATP測定フローで測定する。これらの測定フローの測定結果に基づいて菌の薬剤感受性を判定する。
- [0023] 生菌ATP測定フローATPは、ATP消去工程S506と、ATP抽出工程S507と、発光測定S508から構成される。ATP消去工程S506においては、菌体外の遊離ATPの除去を実施する。遊離ATPを除去する方法は特に限定されず、アピラーゼ等のATP分解酵素を用いる方法や、フィルタろ過により除去する方法が挙げられる。ATP抽出工程S507においては、菌体の膜を破碎しATPを膜外へ抽出する。菌体の膜を破碎する方法は特に限定されず、界面活性剤等を添加し破碎する方法や、超音波照射法、フレンチプレスやホモジナイザなどによる破碎法などが挙げられる。その後、発光測定S508を行う。
- [0024] 死菌ATP測定フローは、フィルタろ過工程S509と、ろ液回収工程S510と、発光測定S511から構成される。フィルタろ過工程S509において、フィルタ孔径よりサイズの大きい菌体を除去し、ろ液回収工程S510においてろ液を回収し、発光計測を行い（S511）、死菌ATP量の判定を行う。
- [0025] このように、図5に例示する死菌ATP測定フローでは、方法(3)のろ液

中のATP、すなわち、細胞膜の損傷により漏出した遊離ATPを死菌ATPとして判定する。ただし、死菌ATPの測定方法はこれに限定されず、図2の方法(2)における培養液をそのまま用いて培養液中に菌体から漏出した遊離ATPを測定する方法や、菌培養液の全ATP(図2(4))を測定対象としてもよい。全ATPを死菌ATP測定の対象とする場合は、発光測定S511と発光測定S508の差分を死菌ATPとする。方法(4)を用いる場合、培養液に界面活性剤等を添加しATPを抽出する方法や、超音波照射法、フレンチプレスやホモジナイザなどにより菌体からATPを抽出する方法などが挙げられる。

[0026] 次に、図7を用いて本実施例における薬剤感受性試験システムの構成例を示す。本システムは、培養器6、分注機7、遠心機8、計測装置9、死菌/生菌比較部10から構成される。培養器6では、薬剤感受性試験の対象となる菌体の培養を実施する。分注機7は、菌体の培養後に、薬剤感受性試験用のプレート11の各容器へ菌体液を分注する。分注機7は、数マイクロリットルから数100マイクロリットルまで分注可能な分注機構を搭載しており、10マイクロリットルから200マイクロリットルの範囲で任意に変更可能であるが、100マイクロリットルが好適である。

[0027] 次に、薬剤感受性試験が終了した薬剤感受性試験プレート11中の各容器内の試料を、底部にフィルタを有する容器12、第2の発光測定容器14へ分注する。分注機7は、数マイクロリットルから数100マイクロリットルまで分注可能な分注機構を搭載し、底部にフィルタを有する容器12、第2の発光測定容器14へ所定の試料量を分注する。そして分注機7による工程が終了した第2の発光測定容器14を計測装置9に導入する。遠心機8では、死菌ATPの調製工程において、菌培養液1から菌体を除去するためのフィルタろ過を実施する。底部にフィルタを有するフィルタリング容器12は、第1の発光測定容器13の上部に設置し、遠心機8により遠心されることで、底部にフィルタを有する容器12中の溶液がろ過され、ろ液が第1の発光測定容器13中に得られる。そして第1の発光測定容器13を計測装置9に導

入する。

[0028] 計測装置9では、ATPの調整工程S506、S507等の実施、及び死菌ATPの発光計測S508、S511を実施する。死菌/生菌比較部10では、計測装置9により計測されたATP発光量から、生菌ATP発光量と死菌ATP発光量の算出と、死菌ATP発光量/生菌ATP発光量の比率の判定を行なう。なお、前記分注機7は、単独コロニーを形成した菌を一定濃度に調製後(S503)、各種各濃度の薬剤・抗生物質が配置された容器に分配する工程(S504)にも利用できる。

[0029] 図9に、死菌/生菌比較部10の機能ブロック構成図を示す。死菌/生菌比較部10は、生菌ATP算出部901、死菌ATP算出部902、及びこれら901、902における処理を最終的な結果として纏めて結果表示する死菌ATP/生菌ATP算出部903、データベース記憶部904、判定部905で構成される。

[0030] 具体的には、図5の発光測定(S508)の結果が生菌ATP算出部901に、発光測定(S511)の結果が死菌ATP算出部902に記憶され、死菌ATP/生菌ATP算出部903にて、死菌ATP発光量をx、生菌ATP発光量をyとすると、死菌ATP発光量/生菌ATP発光量が x/y という値として記憶され、死菌ATP量/生菌ATP量の量比の最終結果として表示される。もちろん、分割して表示することも可能であり、S508、S511の結果だけを表示されることも可能である。

[0031] また、データベース記憶部904では過去の死菌ATP/生菌ATP算出部903での発光量比(x/y)の算出結果をもとに菌種ごとにデータベース化された判定基準が記憶されている。判定部905は、この判定基準に基づいて薬剤感受性の有無を判定する。例えば、菌種が同定されていれば、判定部905において、データベース記憶部904から菌種を選び、判定基準となる生菌ATP発光量(S508)/死菌ATP発光量(S511)の比率(x/y)の閾値を読み出し、死菌ATP/生菌ATP算出部903での算出結果と閾値を比較することで薬剤感受性の有無判定を行う。これにより、過去の試験結

果に基づく正確な判定が可能となる。ただし、データベース記憶部 904 に記憶される判定基準は過去の死菌 ATP/生菌 ATP 算出部 903 での算出結果に基づくものであることが必須ではなく、予め所定の閾値が設定されている構成でもよい。

[0032] 図 10 にデータベース記憶部 904 に記憶される判定基準の 1 例を示す。菌種毎に、死菌発光量(x)と、生菌発光量(y)と、死菌 ATP と生菌 ATP の量比を示す死菌 ATP 発光量 /生菌 ATP 発光量 (x/y) が記憶される。菌 A を例とした場合、一定時間培養後に測定した菌液の、死菌発光量(x)と生菌発光量(y)を元に算出された死菌 ATP 量/生菌 ATP 量 (x/y) が、A よりも大きい場合、判定部 905 はその薬剤に対し菌 A は感受性であると判定する。逆に死菌 ATP 量/生菌 ATP 量 (x/y) が A 以下である場合、判定部 905 はその薬剤に対し菌 A は感受性がない、つまり耐性と判定する。

[0033] 図 8 に計測装置 9 の内部構成の一例を示す。計測装置 9 は試薬分注機構部 15、試料調製機構部 16、発光検出機構部 17 から構成される。

[0034] 試薬分注機構部 15 は、第 1 の電動アクチュエータ 18 と、第 2 の電動アクチュエータ 19 による位置調整機構 20、分注ノズル 21、チューブ配管 22、シリンジ 23、さらに、シリンジ 23 を動かす第 3 の電動アクチュエータ 24 で構成され、分注ノズル 21 とチューブ配管 22 は、固定部 25 を用いて連結される。

[0035] 試薬の出し入れは、シリンジ 23 の押し引きに使用される第 3 の電動アクチュエータ 24 の上下移動に連動して、シリンジ 23 のピストンが上下することで行われ、試薬フォルダ 26 内の試薬の分取や、発光測定容器 28 への分注が可能である。また位置調整機構 20 により、試薬フォルダ 26 及び発光測定容器 28 上の適切な位置へ分注ノズル 21 を移動させることが可能である。

[0036] 試料調製機構部 16 は、試薬フォルダ 26 と発光測定容器 28 を設置するステージ 29、ステージ 29 を任意の位置に移動可能な第 1 の電動スライダ 30、第 2 の電動スライダ 31 で構成される。試薬フォルダ 26 は、生菌 A

TPの調製工程S506、S507で使用する消去試薬、抽出試薬、及びATPの発光計測工程S508、S511で使用する発光試薬を包含する。試薬フォルダ26上には、これらの試薬以外にも適宜必要な試薬等を搭載可能であり、例えば、クロスコンタミネーションを防ぐためのノズル洗浄用の第1の洗浄液、分注機構部20の試薬と接する分注ノズル21、チューブ配管22、シリンジ23内全てを洗浄するための第2の洗浄液、さらに、洗浄後の第1の洗浄液、第2の洗浄液を貯留するための空容器等、も搭載可能である。

[0037] 先に述べたクロスコンタミネーションを防ぐために、分注ノズル21を測定毎に交換する場合も考慮し、本発明の薬剤感受性システムの計測装置9のステージ29には、ディスポチップを設置するチップ群設置部27が設けられている。分注ノズル21は、位置調整機構20によりチップ群設置部27へアクセス可能で、自動でチップの取り外しと取り付けを行う。

[0038] 発光測定容器28の設置場所のステージ29の底部は透明または、部材が切り抜かれており、発光検出機構部17において発光検出が可能となっている。ステージ29の第1の電動スライダ30、第2の電動スライダ31と、試薬分注機構部15の位置調整機構20が連動して位置制御を行い、分注ノズル21から発光測定容器28上の任意の目的容器（ウェル）へ試薬を分注する。

[0039] 発光検出機構部17における発光の検出方法は特に限定されないが、本実施例では、光電子増倍管（Photomultiplier Tube、以下PMTとする）を用いた1例を図8に示した。発光検出機構部17は、光ファイバケーブル32とPMT33で構成される。ファイバケーブルで光ファイバケーブル32とPMT33を接続し、光ファイバ先端に入射した光をPMT33の受光部まで伝送する。発光測定容器28の本形態では、光ファイバケーブル32の先端直径が発光測定容器28の各容器と同程度か小さいものを使用することで、発光測定容器28上の特定位置での発光検出が可能となる。また、第1の電動スライダ30と第2の電動スライダ31により、発光測定容器28上の任意の目的容器（ウ

エル)における発光測定が可能である。感度の面でPMTが好適であるが、検出器としてPMT 33だけでなく、CCDカメラやフォトダイオードでも代替可能である。

[0040] これまで図7、図8、図9等を用いて薬剤感受性試験システムの構成例について説明してきた。ここで、図7では、培養器6、分注機7、遠心機8、計測装置9、死菌/生菌比較部10を、各々機能ごとに分割した装置であるが、もちろん、これら全てを一体化した全自動システムであっても良い。その場合は、培養器6、分注機7、遠心機8、計測装置9へ、適切なタイミングで、薬剤感受性試験プレート11、底部にフィルタを有する容器12、第1の発光測定容器13、第2の発光測定容器14を移動させ、ローディング可能なロボットアームを用意し、連続的に処理できる形態に構成されたシステムとなる。

[0041] また、図9で説明した各機能ブロックは、ソフトウェアモジュールとして実装しても良いしハードウェアで実現してもよい。つまり、各機能ブロックは、死菌/生菌比較部10内において、それぞれの機能を実現するメモリに格納されたプログラムをプロセッサが解釈して実行することによりソフトウェアで実現することができる。また、各機能ブロックは、それらの一部又は全部を、例えば集積回路で設計する等によりハードウェアで実現してもよい。各機能を実現するプログラム、ファイル、データベース、関数データ、変数データ、等の情報は、例えば、メモリや、ハードディスク、SSD (Solid State Drive)等の記録装置、または、ICカード、SDカード、DVD等の記録媒体に置くこともできる。

[0042] さらに、判定部905による薬剤感受性の判定基準としては、図5に示した生菌ATP発光量と死菌ATP発光量の両方の測定結果を用いる方法の他に、図6に示す死菌ATP発光量の測定結果のみを用いることも可能である。この場合の発光量測定は、図5に示す死菌ATP量を測定する方法に準ずる。具体的には図6のS601~S605は、図5のS501~S505と同様の操作を実施する。図6のS606~S608は、図5のS509~S

5 1 1 と同様の操作を実施する。

[0043] 以下では、本実施例による薬剤感受性の判定例について実験内容を交えてより詳細に説明する。

[0044] 本実験例では、*Escherichia coli* (ATCC25922株、以下E.coliとする) と *Staphylococcus aureus* (ATCC25923、以下S.aureusとする) を菌体として使用し、ATP法による薬剤感受性試験を実施した。抗生物質としては、アンピシリン、レボフロキサシン (以下LVFXとする) を用いた。

[0045] まず、菌体をLB寒天培地上で一晩培養し、翌日コロニーをMueller-Hinton (以下MHとする) 培地中に懸濁し0.5マクファーランドに調製した菌懸濁液を作製した。次に、予め終濃度の2倍濃度の抗生物質入りMH培地を50 μ Lずつ分注したプレートに、MH培地で500倍に希釈した菌懸濁液を50 μ Lずつ分配し、37 $^{\circ}$ Cで一定時間静置培養を行い、菌懸濁液を調製した。抗生物質の終濃度は、E.coliを測定対象とした場合にはABPCは4 μ g/mL、LVFXは0.125 μ g/mL、S.aureusを測定対象とした場合には、ABPCは0.25 μ g/mL、LVFXは0.125 μ g/mLとした。なお、抗生物質を含まないMH培地中で培養したものを比較対照とした。

[0046] ATP生菌ATPは、前述の菌培養液18 μ LにATP消去液2 μ Lを混合し、室温で30分間静置した。その後ATP抽出試薬20 μ Lを混合し、室温で1分間静置することで調製した。死菌ATPは、菌培養液をフィルタ (膜孔径0.22 μ m) 上に添加し、遠心によりフィルタろ過したろ液を死菌ATPとした。調製した生菌ATPまたは死菌ATPに発光試薬を添加し、1分間のフォトンカウンティングを行い、得られた発光量 (Amount of luminescence (a.u.)) をATP量の指標として用いた。

[0047] 上記により、死菌ATP発光量及び生菌ATP発光量の発光量比を求め、それを生菌ATPと死菌ATPの量比として算出した結果を図11及び図12に示す。

[0048] 図11は、E.coliの生菌ATPと死菌ATPの量比を示す。抗生物質を含まない培地では、死菌ATP発光量/生菌ATP発光量、つまり死菌ATP量

/生菌 ATP 量は、大凡0.1以下で推移した。一方、ABPCまたはLVFX存在下では、培養時間の経過に伴い、死菌 ATP 量/生菌 ATP 量が増加した。抗生物質の効果判定する基準を死菌 ATP 量/生菌 ATP 量=1とすると、ABPC及びLVFXのE. coliに対する効果は、薬剤感受性培養を開始後およそ3時間で判定可能であることが示された。

[0049] 次にS. aureusの生菌と死菌の量比を図12に示す。抗生物質を含まない培地では、死菌 ATP 量/生菌 ATP 量は、大凡0.5以下で推移した。ABPCまたはLVFX存在下では、E. coliの場合と同様に培養時間の経過に伴い、死菌 ATP 量/生菌 ATP 量が増加した。抗生物質の効果判定する基準を死菌 ATP 量/生菌 ATP 量=1とすると、ABPCのS. aureusに対する効果は薬剤感受性培養を開始後およそ2.5時間、LVFXのS. aureusに対する効果は、およそ4時間で判定可能であることが示された。

[0050] 以上の実験から、ATP法による薬剤感受性試験の判定基準として、薬剤を含む反応系において生菌 ATP 量と死菌 ATP 量を ATP 発光量により求め、生菌と死菌の ATP 量比を用いることで、異なる菌種で同一の判定基準で薬剤感受性を判定でき、従来技術より短時間且つ正確に薬剤の効果判定することが可能であることが明らかになった。

[0051] つまり、本実施例の薬剤感受性試験システムによって、ATP法を利用した細菌の薬剤感受性試験における薬剤感受性培養に要する時間を短縮し、且つ少ない測定回数で薬剤の効果判定ができることが分かった。これにより、薬剤感受性試験を迅速及び簡便に実施することで、重篤な感染症患者に対し抗生物質の早急かつ適正な投与が可能となる。

[0052] さらに、本実施例の薬剤感受性試験システムでは、生菌の ATP 量は菌の膜内に包含する ATP 量から求め、死菌の ATP 量は反応系に含まれる遊離 ATP 量から求めることにより、従来の生菌数/死菌数の判定技術と相違し、生菌と死菌の両方を ATP 法により計数可能であり、手法の違いによる計数誤差が生じないことから、高精度に生菌数と死菌数の計数が可能となる。また、計数方法が ATP 法で統一されるので、簡略な装置構成を実現できる。

符号の説明

[0053] A T P 6…培養器、7…分注機、8…遠心機、9…計測装置、10…死菌/生菌比較部、11…薬剤感受性試験プレート、12…フィルタリング容器、13…第1の発光測定容器、14…第2の発光測定容器、15…試薬分注機構部、16…試料調製機構部、17…発光検出機構部、18…第1の電動アクチュエータ、19…第2の電動アクチュエータ、20…位置調整機構、21…分注ノズル、22…チューブ配管、23…シリンジ、24…第3の電動アクチュエータ、25…固定部、26…試薬フォルダ、27…チップ群設置部、28…発光測定容器、29…ステージ、30…第1の電動スライダ、31…第2の電動スライダ、32…光ファイバ、33…PMT

請求の範囲

- [請求項1] 薬剤及び菌を含む培養液の A T P 発光計測を行う計測部と、
前記計測部が計測した前記培養液中の死菌由来の A T P 発光量に基づいて、前記菌の前記薬剤への感受性の有無を判定する判定部と、を備える薬剤感受性試験装置。
- [請求項2] 請求項 1 に記載の薬剤感受性試験装置であって、
前記計測部は、前記培養液中の生菌由来の A T P 発光量と、前記培養液中の死菌由来の A T P 発光量と、を計測し、
前記判定部は、前記生菌由来の A T P 発光量と、前記死菌由来の A T P 発光量と、の間の発光量比に基づいて、前記菌の前記薬剤への感受性の有無を判定する、ことを特徴とする薬剤感受性試験装置。
- [請求項3] 請求項 1 に記載の薬剤感受性試験装置であって、
前記判定部は、前記培養液をろ過したろ液に含まれる遊離 A T P の発光量を前記死菌由来の A T P 発光量として前記判定を行う、ことを特徴とする薬剤感受性試験装置。
- [請求項4] 請求項 2 に記載の薬剤感受性試験装置であって、
更に、前記判定の閾値を記憶する記憶部を備え、
前記判定部は、前記閾値を参照し、前記発光量比と前記閾値との比較結果に基づいて、前記菌の前記薬剤への感受性の有無を判定する、ことを特徴とする薬剤感受性試験装置。
- [請求項5] 請求項 4 に記載の薬剤感受性試験装置であって、
前記判定部は、前記閾値を参照し、前記発光量比が前記閾値よりも大きい場合に前記菌の前記薬剤への感受性が有ると判定する、ことを特徴とする薬剤感受性試験装置。
- [請求項6] 請求項 4 に記載の薬剤感受性試験装置であって、
前記記憶部は、過去に前記判定を行った前記発光量比に基づく前記閾値を記憶する、ことを特徴とする薬剤感受性試験装置。
- [請求項7] 培養液中で菌体の培養を行う培養装置と、

前記菌体を含む培養液に薬剤を注入する分注装置と、
前記培養液の A T P 発光計測を行い、前記培養液中の死菌由来の A T P 発光量に基づいて、前記菌の前記薬剤への感受性の有無を判定する試験装置と、を備える薬剤感受性試験システム。

[請求項8]

請求項7に記載の薬剤感受性試験システムであって、
前記試験装置は、前記培養液中の生菌由来の A T P 発光量と、前記培養液中の死菌由来の A T P 発光量と、を計測し、前記生菌由来の A T P 発光量と、前記死菌由来の A T P 発光量と、の間の発光量比に基づいて、前記菌の前記薬剤への感受性の有無を判定する、ことを特徴とする薬剤感受性試験システム。

[請求項9]

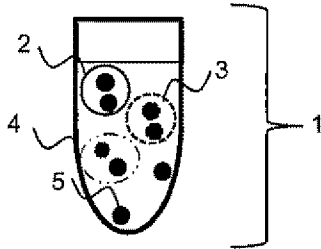
請求項7に記載の薬剤感受性試験システムであって、
更に、前記培養液をろ過するろ過装置を備え、
前記試験装置は、前記ろ過後のろ液に含まれる遊離 A T P の発光量を前記死菌由来の A T P 発光量として前記判定を行う、ことを特徴とする薬剤感受性試験システム。

[請求項10]

薬剤及び菌を含む培養液の A T P 発光計測を行い、
前記計測した前記培養液中の死菌由来の A T P 発光量に基づいて、前記菌の前記薬剤への感受性の有無を判定する、
ことを特徴とする薬剤感受性試験方法

[図1]

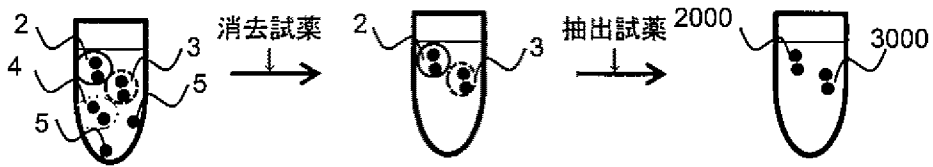
図1



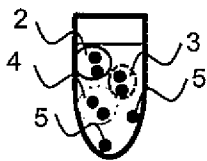
[図2]

図2

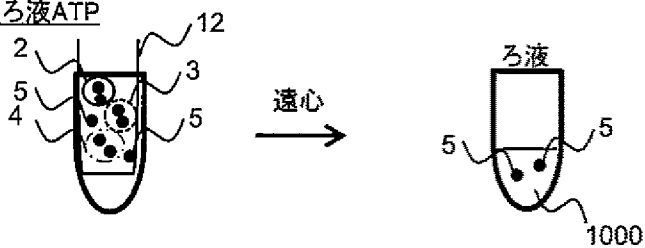
(1) 生菌ATP



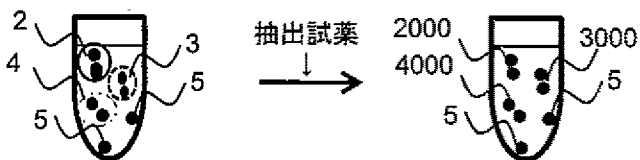
(2) 液中ATP



(3) ろ液ATP



(4) 全ATP



[図3]

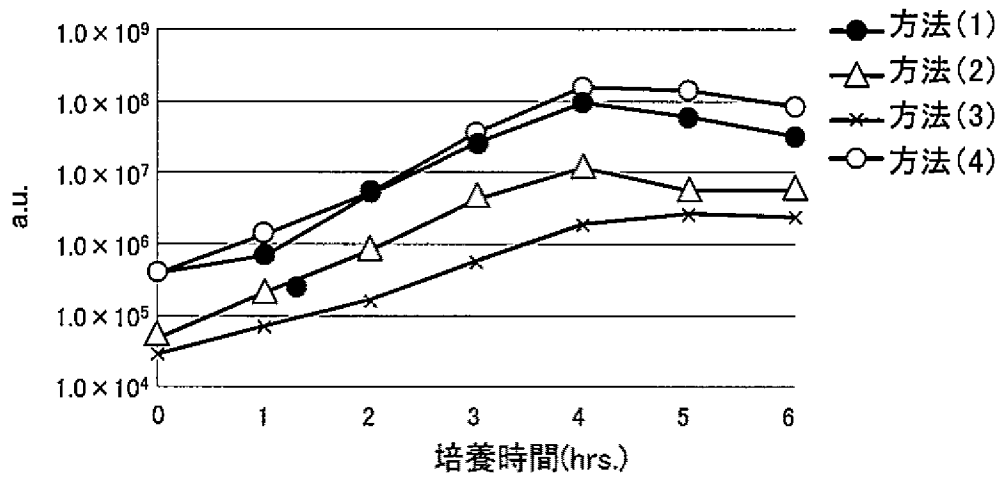
図3

	方法(1) 生菌ATP	方法(2) 液中ATP	方法(3) ろ液ATP	方法(4) 全ATP
生菌(細胞膜あり)の細胞膜に内包されたATP	○	×	×	○
死菌(細胞膜あり)の細胞膜に内包されたATP	○	×	×	○
死菌(細胞膜損傷)の細胞膜に内包されたATP	×	○	×	○
死菌(細胞膜損傷)由来の遊離ATP	×	○	○	○

○:測定可能 ×:測定不可

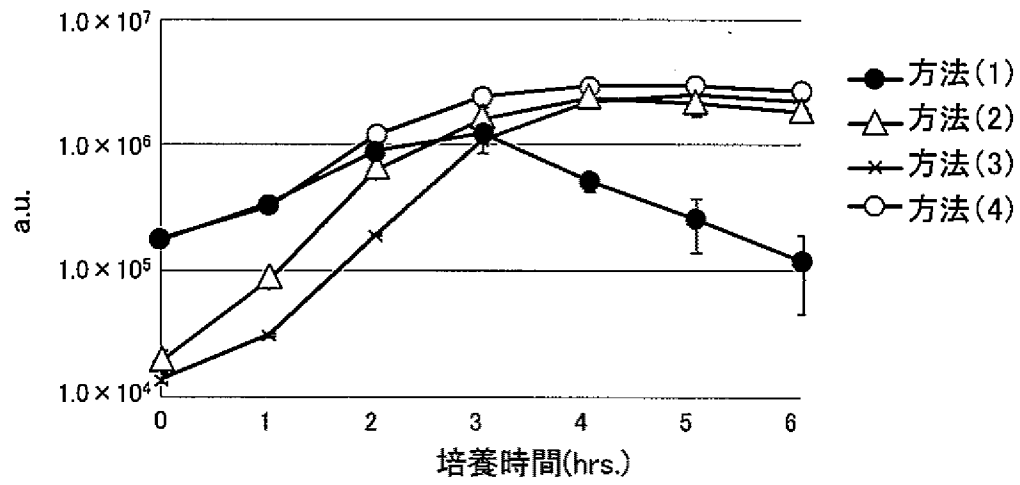
[図4a]

図4a

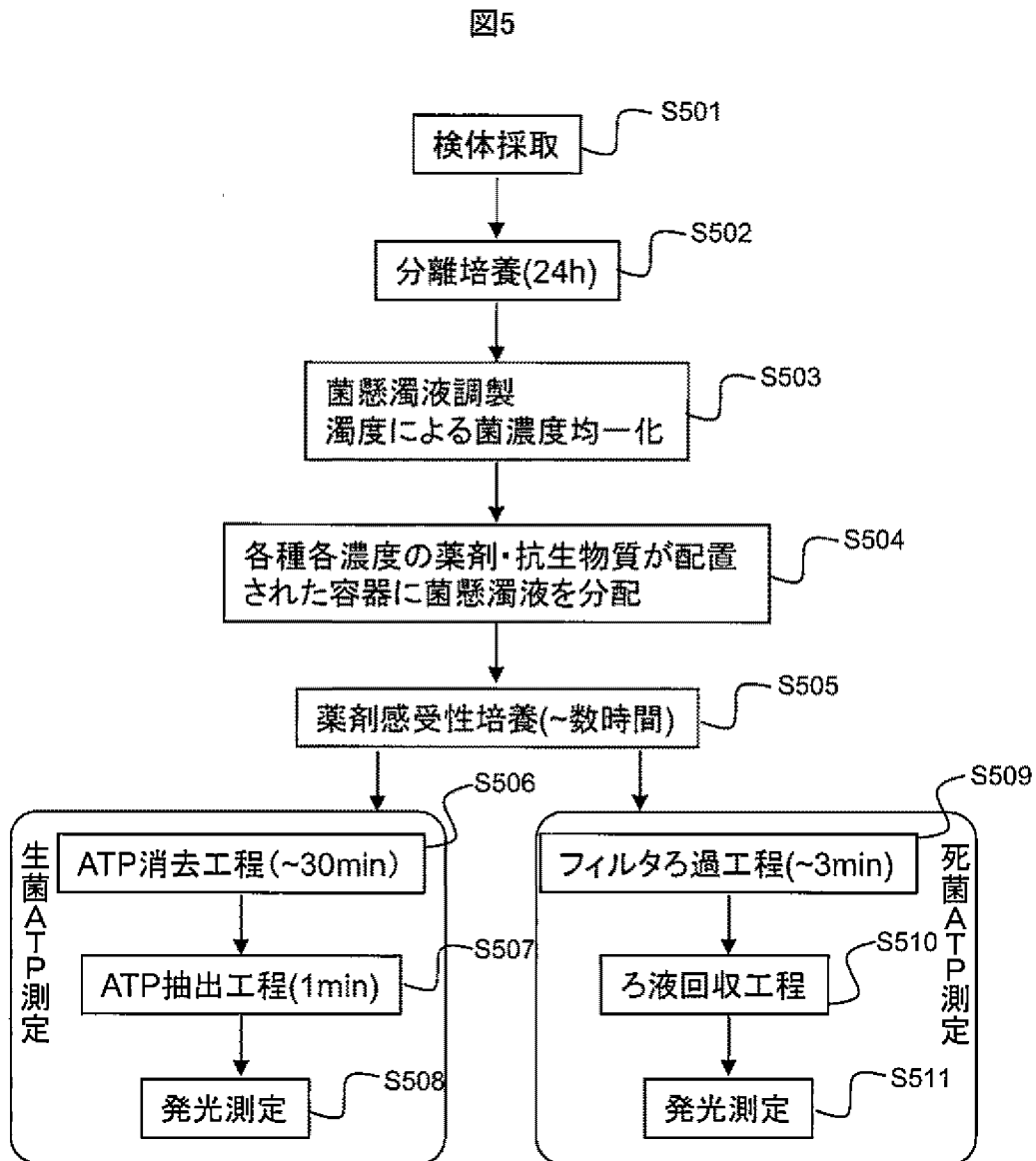


[図4b]

図4b

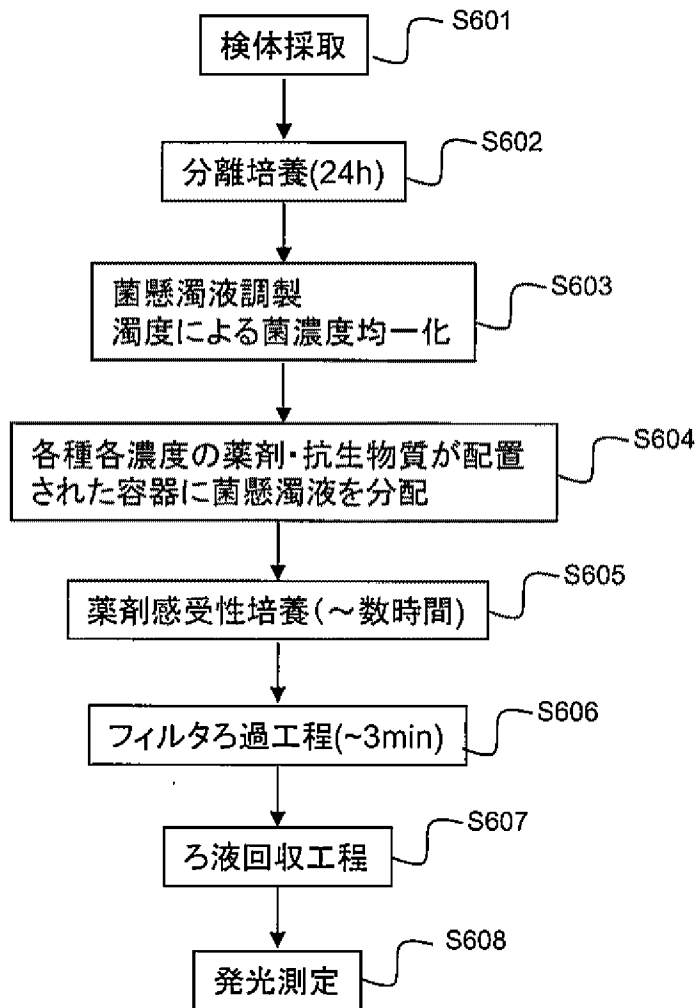


[図5]



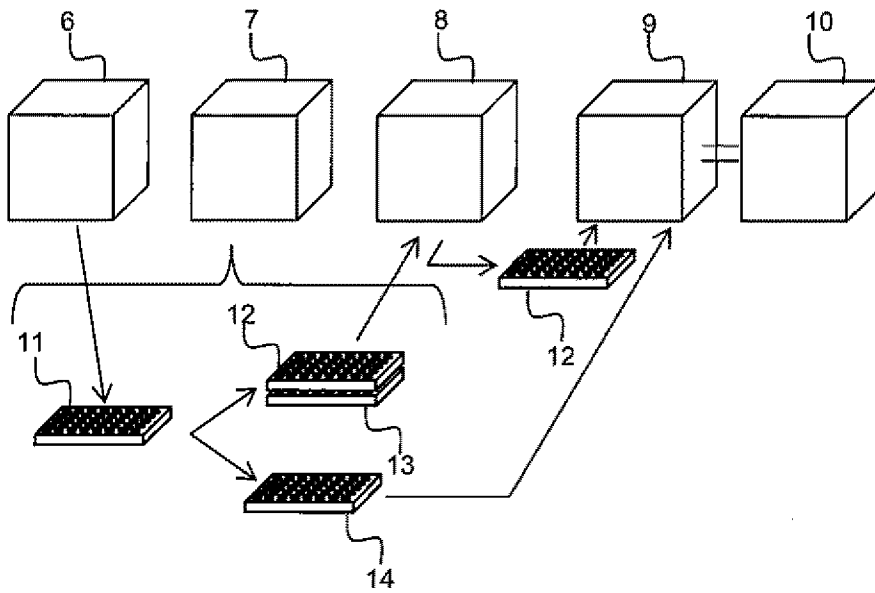
[図6]

図6



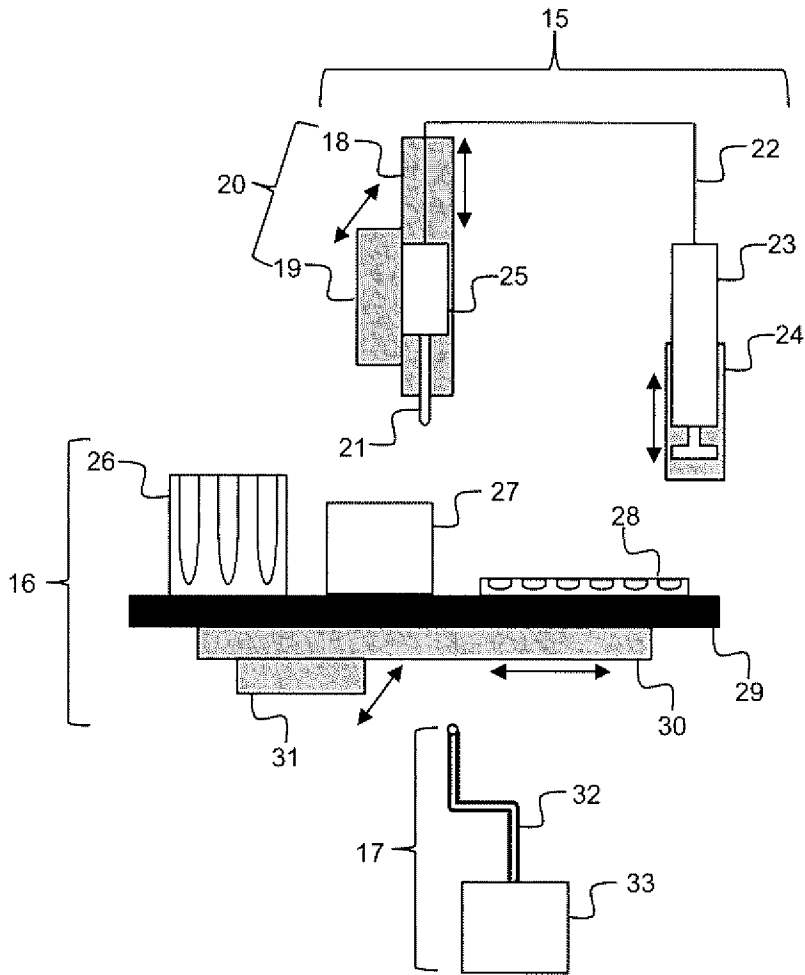
[図7]

図7



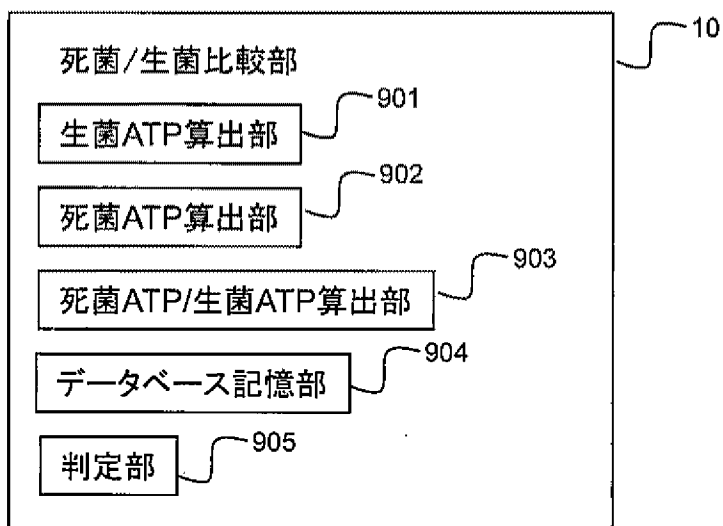
[図8]

図8



[図9]

図9



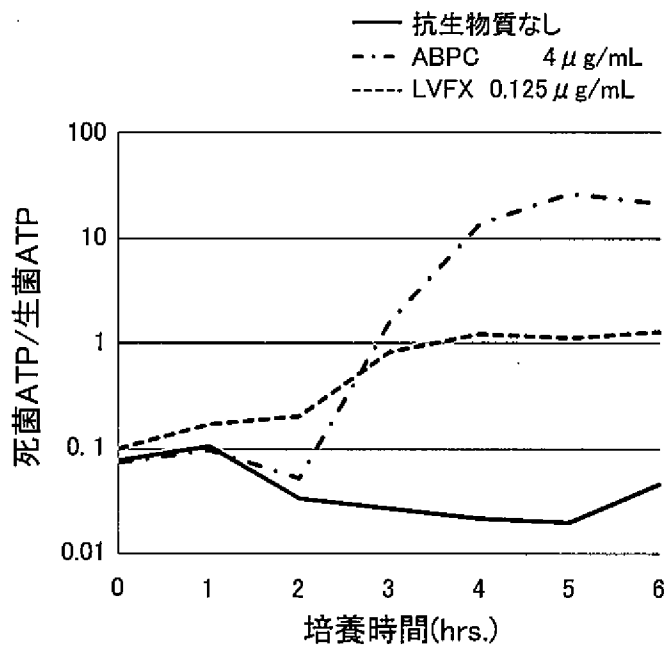
[図10]

図10

菌種/発光量	x	y	x/y
菌A	x1	y1	A
菌B	x2	y2	B

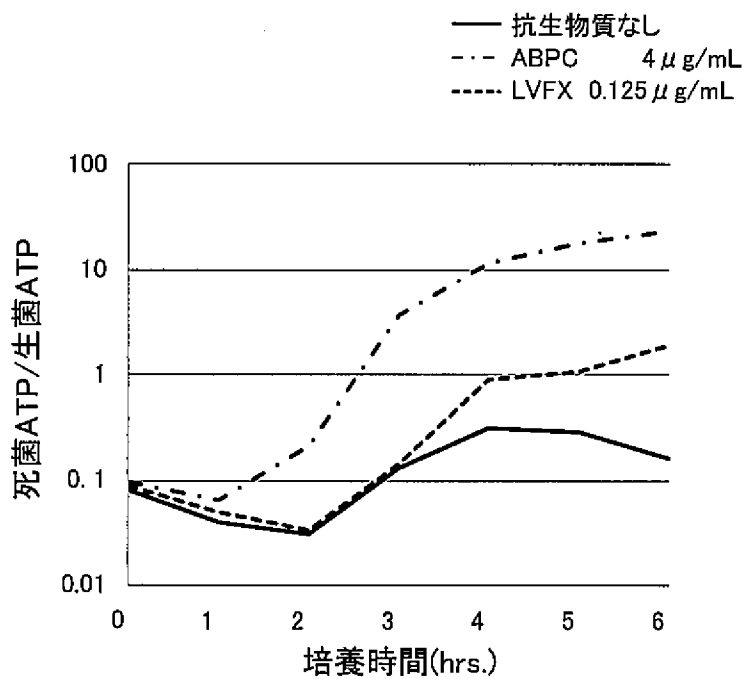
[図11]

図11



[図12]

図12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/084455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M1/34(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)
C12M1/34

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN), Thomson Innovation,
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 5798263 A (PROMEGA CORP.), 25 August 1998 (25.08.1998), column 9, line 61 to column 10, line 5; column 14, lines 3 to 16; column 15, lines 34 to 46; fig. 5; abstract (Family: none)	1-6 1-10
X Y	US 4390274 A (BERTHOLD F. et al.), 28 June 1983 (28.06.1983), column 3, lines 19 to 32; column 4, lines 57 to 63; column 8, lines 12 to 14; column 9, line 60 to column 10, line 32; fig. 6 & GB 2045929 A & DE 2901919 A1 & FR 2447028 A5	1-3 1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 05 February 2015 (05.02.15)	Date of mailing of the international search report 17 February 2015 (17.02.15)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/084455

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	THORE A. et al., Effects of Ampicillin on Intracellular Levels of Adenosine Triphosphate in Bacterial Cultures Related to Antibiotic Susceptibility, Acta Path. Microbiol. Scand. B, 1977, Vol.85, pp.161-166, particularly, page 162, left column, paragraphs of 'Microorganisms', 'Sensitivity Testing', 'Ampicillin Treatment of Bacterial Cultures', page 162, right column, paragraphs of 'Luciferase Assay of ATP', 'Detection of Intracellular ATP', page 163, left column, paragraph of 'Detection of Extracellular ATP', page 166, left column, lines 6 to 9, fig. 2, 3	7-10 1-10
X Y	NILSSON L., New Rapid Bioassay of Gentamicin Based on Luciferase Assay of Extracellular ATP in Bacterial Cultures, Antimicrob. Agents Chemother., 1978, Vol.14, No.6, pp.812-816, particularly, page 812, right column, paragraphs of 'Test strain', 'Bacterial cultures', 'Antibiotic standards', page 813, left column, paragraphs of 'Determination of intracellular ATP', 'Determination of extracellular ATP', page 815, left column, line 13 to right column, line 7, page 815, right column, lines 11 to 13, fig. 1	7-10 1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/34(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 (IPC)) Int.Cl. C12M1/34		
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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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/MEDLINE/BIOSIS(STN), Thomson Innovation, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	US 5798263 A (PROMEGA CORPORATION) 1998.08.25 第9欄第61行-第10欄第5行、第14欄第3-16行、第15欄第34-46 行、図5、要約 (ファミリーなし)	1-6 1-10
X Y	US 4390274 A (BERTHOLD F. et al.) 1983.06.28 第3欄第19-32行、第4欄第57-63行、第8欄第12-14行、第9欄 第60行-第10欄第32行、図6 & GB 2045929 A & DE 2901919 A1 & FR 2447028 A5	1-3 1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 05.02.2015	国際調査報告の発送日 17.02.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/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) 小金井 悟 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 5804

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	THORE A. et al., Effects of Ampicillin on Intracellular Levels of Adenosine Triphosphate in Bacterial Cultures Related to Antibiotic Susceptibility, Acta Path. Microbiol. Scand. B, 1977, Vol. 85, pp. 161-166 特に、第 162 頁左欄「Microorganisms」、「Sensitivity Testing」、「Ampicillin Treatment of Bacterial Cultures」の段落、第 162 頁右欄「Luciferase Assay of ATP」、「Detection of Intracellular ATP」の段落、第 163 頁左欄「Detection of Extracellular ATP」の段落、第 166 頁左欄第 6-9 行、図 2、図 3	7-10 1-10
X Y	NILSSON L., New Rapid Bioassay of Gentamicin Based on Luciferase Assay of Extracellular ATP in Bacterial Cultures, Antimicrob. Agents Chemother., 1978, Vol. 14, No. 6, pp. 812-816 特に、第 812 頁右欄「Test strain」、「Bacterial cultures」、「Antibiotic standards」の段落、第 813 頁左欄「Determination of intracellular ATP」、「Determination of extracellular ATP」の段落、第 815 頁左欄第 13 行-右欄第 7 行、第 815 頁右欄第 11-13 行、図 1	7-10 1-10