

(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
2017年1月19日(19.01.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/009999 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/070406
- (22) 国際出願日: 2015年7月16日(16.07.2015)
- (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: 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83号 森永乳業株式会社内 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三丁目4番10号 アクロポリス21ビル8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, 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: According to the present invention, living cells of microorganisms in a test sample are detected and distinguished from dead cells and/or damaged cells using the steps below. a) a step in which an indium complex is added to the test sample, b) a step in which DNA or RNA target regions of the microorganisms included in the test sample are amplified using a nucleic acid amplification method, and c) a step in which the amplification product is analyzed.

(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、死細胞及び／又は損傷細胞と識別して検出する。 a) 前記被検試料にイリ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 2017/009999 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／又は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及び／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、イリジウム錯体は、造影剤や発光材料、又はそれらの成分等として知られている。造影剤としては、例えば、非特許文献1には、ヒスチジンに結合して蛍光を発するイリジウム錯体が開示されている。また、発光材料としては、DNAと、主鎖又は側鎖にプロトン化可能なアミノ基を少なく

とも1つ有し、DNAと絡み合う導電性高分子と、DNAのアニオン部に結合するカチオン性官能基を有する脂質化合物と、DNAのアニオン部に結合する蛍光発光性のイリジウム等の金属錯体とを含む発光材料が知られている（特許文献5）。この発光材料中では、金属錯体は導電性高分子や脂質化合物が結合していないDNAのアニオン部に、静電相互作用により結合されている。

[0010] また、本発明者らは、EMA等と同様に、白金錯体（特許文献6）やパラジウム錯体（特許文献7）を用いることによって、核酸増幅法による生細胞と死細胞の識別が可能であることを開示している。

[0011] しかしながら、イリジウム錯体が微生物の生死判定に利用できることを示唆する従来技術は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：国際公開第2001/077379

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

特許文献5：特開2012-036228

特許文献6：国際公開第2014/021351

特許文献7：国際公開第2014/021352

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Chemical & Engineering News, 89(28):31-32, 2011

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、好ましい態様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、イリ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、好ましい態様では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、死細胞及び／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) 前記被検試料にイリ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、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、LAMP法、ICAN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、死細胞及び／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) イリジウム錯体、又は、

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

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、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態様と

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態様として
いる。

[0021] 本発明の方法及びキットは、前記イリジウム錯体が、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン
元素 (Cl、F、Br、I、At)、カルボキシレート ($-\text{CO}-\text{O}-$) 基、ピリジン基、 H_2O 、 CO_3^{2-} 、 OH^- 、 NO_3^- 、 ROH 、 N_2H_4 、 PO_4^{3-} 、 R_2O 、 RO^- 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ 、 NO_2^- 、 N_2 、 N_3^- 、 R_2S 、 R_2P^- 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、および R^- からなる群から選ばれる配位子を含む
ものであることを好ましい態様としている（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）。

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 (Cl、F、Br、I、At)、カルボキシレート ($-\text{CO}-\text{O}-$) 基、ピリジン基、 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_2P^- 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、および R^- からなる群から選ばれることを好ましい態様としている。

[0022] また、前記方法及びキットは、前記イリジウム錯体が、ジ- μ -クロロビス[
(η -シクロオクタ-1,5-ジエン)イリジウム(I)]、及び、2-ヒドロキシ-N-ピリ
ジン(ペンタメチルシクロペンタジエニル)イリジウム(III)ジクロリドから選
ばれることを好ましい態様としている。

発明を実施するための形態

[0023] 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（質量％）である。

[0024] <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、死細胞及び／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) 前記被検試料にイリ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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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；殺菌ミルク、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。

[0028] 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、又は水疱内容物等が例示される。

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。

[0029] 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。

[0030] 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、又は乳若しく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。

[0031] 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。

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。

[0032] 「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又はRNAに結合するイリ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。

[0033] グラム陽性菌としては、黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌などのブドウ球菌属；ミクロコッカス属；*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus pneumoniae*（肺炎球菌）等のストレプトコッカス属；*Enterococcus faecalis*などエン

テロコッカス属；エロコッカス属；*Bacillus cereus*（セレウス菌）、*Bacillus subtilis*（バチラス・ズブチリス）、*Bacillus licheniformis*（バチラス・リヘニフォルミス）等のバチラス属（栄養型細胞が望ましい）；ボツリヌス菌やウエルシュ菌などのクロストリジウム属；ヒト型結核菌やウシ型結核菌；マイコバクテリウム・イントラセルラー、マイコバクテリウム・アビウムなどのマイコバクテリウム属（抗酸菌及び非定型抗酸菌群）；ライ菌；アクチノミセス属；ノカルジア属；ノカルジオプシス属；アクチノマズラ属；ストレプトミセス属；デルマトフィルス属；ユーバクテリウム属；コリネバクテリウム属；プロピオニバクテリウム属等が挙げられる。

[0034] また、グラム陰性菌としては、レジオネラ属；サルモネラ属；0-157、0-26、0-11、0-145を始めとする腸管出血性大腸菌；カンピロバクター属；アルコバクター属；ヘリコバクター属；緑膿菌などのシュードモナス属；バークホルデリア属；アシネトバクター属；アルカリゲネス属；クリセオバクテリウム属；モラクセラ属；コクシエラ属；ブルセラ属；野兔病菌（*Francisella tularensis*）等のフランシセラ属；バルトネラ属；ボルデテラ属；インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）等のヘモフィルス属；パスツレラ属；クロモバクテリウム属；ストレプトバシラス属；赤痢菌等のシゲラ属、エルシニア属、エシェリヒア・コリなどエシェリヒア属、クレブシエラ属、シトロバクター属、エドワージエラ属、エンテロバクター属、ハフニア属、プレジモナス属、プロテウス属、プロビデンシア属、モルガネラ属、セラチア属等の腸内細菌科；ビブリオ属；エロモナス属；バクテロイデス属；プレボテラ属；ポルフィロオナス属；フソバクテリウム属；レプトトリキア属；ベイヨネラ属；ブラキスピラ属；レプトスピラ属；トレポネーマ属；ブタ赤痢スピロヘータ；ボレリア属；マイコプラズマ；リケッチア；クラミジア等が挙げられる。

[0035] ウイルスとしては、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、アデノウイルス科、パピローマウイルス科、ポリオーマウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、カリシウイルス科、アストロウイルス科、コロナ

ウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、オルトミクソウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、ボルナウイルス科、アレナウイルス科、ブニヤウイルス科、レオウイルス科、レトロウイルス科、肝炎ウイルスが挙げられるなどが挙げられる。

[0036] 後記実施例 1、3 に示されるように、イリジウム錯体による処理によりグラム陰性細菌であるエシェリヒア・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。また、実施例 2、4 に示されるように、イリジウム錯体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、イリジウム錯体は、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。

さらに、グラム陰性細菌の細胞壁外膜と同成分の最外殻エンベロープを有するウイルスについても、生細胞と死細胞の識別に使用できると考えられる。また、エンベロープを有しない所謂ヌクレオカプシド（タンパク質膜）のみ保有するウイルスは、外膜を有さず、直接ペプチドグリカン層が外界と接触するグラム陽性細菌に比較的類似しているため、イリジウム錯体による生細胞と死細胞の識別が可能であると考えられる。尚、後述するように、本発明においては、ウイルス粒子も、便宜的に「細胞」と呼ぶ。

[0037] エンベロープを有しない腸管系ウイルスの感染型（生細胞に相当）・非感染型（死細胞に相当）の識別に、PMA（プロピジウムモノアジド）という、物理的損傷のある非感染型にのみ透過して非感染型の核酸に共有結合し、核酸を鋳型として不活性化させる薬剤を用いて、腸管系ウイルスにて明瞭な感染型・非感染型の判定を可能した技術も存在する（S. Parshionikar et al., Appl. Environ. Microbiol. 76, 4318-4326, 2010）。

PMAは元来、細菌の生細胞と死細胞の明瞭な識別を可能とする薬剤であるが（A. Nocker et al., J. Microbiol. Methods. 67, 310-320, 2006）、ヌクレオカプシドしか有しない腸管系ウイルスでも明瞭な前記識別を可能としているので、イリジウム錯体も、PMAと同様に、ヌクレオカプシドしか有しない腸管系ウイルスにおいて（エンベロープを有するウイルスはグラム陰性細菌

に形態学的に酷似しているため勿論含まれる）、明瞭に感染型・非感染型を判定できる可能性が高い。

[0038] 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、細胞壁の損傷が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。

[0039] 「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。ウイルスに関する「死細胞」とは、哺乳動物細胞に感染できない状態をいう。

[0040] 「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。

[0041] 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、本発明は、生細胞の検出のみならず、生細胞と死細胞及び／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。

[0042] 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、好適な培養条件で培養したときのコロニー形成数 (cfu/ml又はCFU/ml (colony forming units / ml)) で近似させることができる。

[0043] 損傷細胞及び／又は死細胞の標準試料は、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、損傷細胞及び／又は死細胞の細胞数は、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、損傷細胞及び／又は死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。加熱時間を長くすると、損傷細胞よりも死細胞の割合が高くなる。

また、損傷細胞及び／又は死細胞の標準試料は、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、損傷細胞及び／又は死細胞の細胞数は、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培養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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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、死細胞及び／又は損傷細胞と識別して検出する」とは、生細胞を、

死細胞及び／又は損傷細胞に比べて選択的に検出することを意味する。尚、「生細胞と死細胞及び／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。

[0047] 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。

[0048] (1) 工程 a)

被検試料に、イリジウム錯体（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。

前記薬剤は、核酸（DNA又はRNA）に直接的に、又はタンパク質等を介して間接的に結合もしくは干渉して、ターゲット領域のPCR反応を阻害すると推定される。

[0049] 前記薬剤は、生細胞と、損傷細胞もしくは死細胞、又は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。

[0050] イリジウム錯体としては、生細胞と損傷細胞及び／又は死細胞との細胞壁に対する透過性が異なり、かつ、細胞内の核酸に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 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素（Cl、F、Br、I、At）、カルボキシレート（ $-\text{CO}-\text{O}-$ ）基、ピリジン基、 H_2O 、 CO_3^{2-} 、 OH^- 、 NO_3^- 、 ROH 、 N_2H_4 、 PO_4^{3-} 、 R_2O 、 RO^- 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ 、 NO_2^- 、 N_2 、 N_3^- 、 R_2S 、 R_2P^- 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、および R^- からなる群から選ばれる一つを含むイリジウム錯体が挙げられる（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）。イリジウム錯体は

、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。また、上記以外の配位子を含んでいてもよい。

[0051] 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、ペンチル基、シクロペンチル、ヘキシル基、シクロヘキシル基、オクチル基、シクロオクチ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、シクロオクテン基、ペンタメチルシクロペンタジエニル基、インデニル基等が挙げられる。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。

[0052] 上記配位子としては、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素（Cl、F、Br、I、At）、カルボキシレート（ $-\text{CO}-\text{O}-$ ）基、ピリジン基、 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_2P^- 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、および R^- からなる群から選ばれる一つ又はそれ以上が好ましい（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）。これらの中では、ハロゲン元素（Cl、F、Br、I、At）、ピリジン基、 OH^- 、 R^- が特に好ましい。

[0053] イリ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- μ -クロロビス[(η -シクロオクタ-1,5-ジエン)イリジウム(I)] (Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)]) $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{Ir}_2$

2-ヒドロキシ-N-ピリジン(ペンタメチルシクロペンタジエニル)イリジウム(II)ジクロリド (2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichloride) $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{IrNO}$

(アセチルアセトナト)ジカルボニルイリジウム(I) (Acetylacetonato)dicarbonyliridium(I)) $\text{C}_7\text{H}_7\text{IrO}_4$

(アセチルアセトナト)(1,5-シクロオクタジエン)イリジウム(I) $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{IrO}_2$

(アセチルアセトナト)(1,5-シクロオクタジエン)イリジウム(I) $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{IrO}_2$

クロロビス(シクロオクテン)イリジウム(I)ダイマー (Chlorobis(cyclooctene)iridium(I)dimer) $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{Cl}_2\text{Ir}_2$

クロロジヒドリド[ビス(2-ジイソプロピルホスフィノ)エチルアミン]イリジウム(III) (Chlorodihydrido[bis(2-diisopropylphosphino)ethylamine]iridium(III)) $C_{16}H_{39}ClIrNP_2$

クロロ(5-メトキシ-2-{1-[(4-メトキシフェニル)イミノ-N]エチル}フェニル-C)(1,2,3,4,5-ペンタメチルシクロペンタジエニル)イリジウム(III) (Chloro(5-methoxy-2-{1-[(4-methoxyphenyl)imino-N]ethyl}phenyl-C)(1,2,3,4,5-pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)) $C_{26}H_{31}ClIrNO_2$

ジクロロテトラキス(2-(2-ピリジニル)フェニル)ジイリジウム(III) (Dichlorotetrakis(2-(2-pyridinyl)phenyl)diiridium(III)) $C_{44}H_{32}Cl_2Ir_2N_4$

ジヨード(ペンタメチルシクロペンタジエニル)イリジウム(III)ダイマー (Diiodo(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III) dimer) $C_{20}H_{30}I_4Ir_2$

イリジウム(III)ブロミド水和物 (Iridium(III) bromide hydrate) $Br_3Ir \cdot xH_2O$

イリジウム(IV)クロリド水和物 (Iridium(IV) chloride hydrate) $Cl_4Ir \cdot xH_2O$

ペンタアンミンクロロイリジウム(III)クロリド (Pentaamminechloroiridium(III) chloride) $H_{15}Cl_3IrN_5$

テトライリジウムドデシルカルボニル (Tetrairidium dodecacarbonyl) $C_{12}Ir_4O_{12}$

イリジウム(III)アセチルアセトナート (Iridium(III)acetylacetonate) $C_{15}H_{21}IrO_6$

(1,5-シクロオクタジエン)- η^5 -インデニル)イリジウム(I) ((1,5-cyclooctadiene)- η^5 -indenyl)iridium(I)) $C_{17}H_{18}Ir$

(1,5-シクロオクタジエン)ビス(メチルジフェニルホスフィン)イリジウム(I)ヘキサフルオロホスファート ((1,5-cyclooctadiene)bis(methyldiphenylphosphine)iridium(I)hexafluorophosphate) $C_{34}H_{38}F_6IrP_3$

(1,5-シクロオクタジエン)(ピリジン)(トリシクロヘキシルホスフィン)-イリジウム(I)ヘキサフルオロホスファート ((1,5-cyclooctadiene)(pyridine)(t

ricyclohexylphosphine)-iridium(I)hexafluorophosphate) $C_{31}H_{50}F_6IrNP_2$

(1,5-シクロオクタジエン)(ヘキサフルオロアセチルアセトナト)イリジウム(

I) ((1,5-cyclooctadiene)(hexafluoroacetylacetonato)iridium) $C_{13}H_{13}F_6IrO$

2

(1,5-シクロオクタジエン)(メトキシ)イリジウム(I)ダイマー ((1,5-cyclooc

tadiene)(methoxy)iridium(I)dimer) $C_{18}H_{30}Ir_2O_2$

ビス(シクロオクタジエン)イリジウム(I)テトラキス(3,5-ビス(トリフルオロ

メチル)フェニル)ボラート (bis(cyclooctadiene)iridium(I)tetrakis (3,5-

bis(trifluoromethyl)phenyl)borate) $C_{48}H_{36}BF_{24}Ir$

ビス(1,5-シクロオクタジエン)イリジウム(I)テトラフルオロボラート (bis(

1,5-cyclooctadiene)iridium(I)tetrafluoroborate) $C_{16}H_{24}BF_4Ir$

ビス[1,2-ビス(ジフェニスホスフィノ)エタン]カルボニルクロロイリジウム(

I) (bis[1,2-bis(diphenylphosphino)ethane]carbonylchloroiridium(I)) C_5

$_3H_{48}ClIrOP_4$

ペンタメチルシクロペンタジエニルイリジウム(III)クロリドダイマー (pent

amethylcyclopentadienyliridium(III)chloride dimer) $C_{20}H_{30}Cl_4Ir_2$

クロロトリカルボニルイリジウム (Chlorotricarbonyliridium(I)) C_3ClIrO_3

カルボニルクロロビス(トリフェニルホスフィン)イリジウム(I) (Carbonylch

lorobis(triphenylphosphine)iridium(I)) $C_{37}H_{30}ClIrOP_2$

[0054] 好ましい錯体としては、下記の化合物が挙げられる。

Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)] (別名: ビス(1,5

-シクロオクタジエン)ジイリジウム(I)ジクロリド (bis(1,5-cyclooctadiene

)diiridium(I)dichloride)) (化1、分子量 (M.W.) 又は式量 (F.W.) : 67

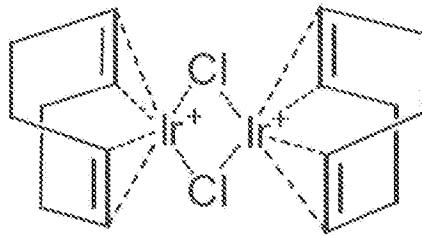
1.70)

2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichlo

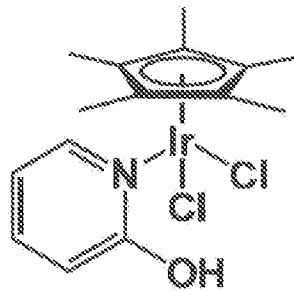
ride (化2、分子量 (M.W.) 又は式量 (F.W.) : 493.45)

[0055]

[化1]



[0056] [化2]



[0057] また、イリジウム錯体として、イリジウム化合物を、配位子としてイリジウムに結合し得る有機溶媒、又は配位子としてイリ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イリジウム錯体が挙げられる。このようなイリジウム化合物としては、例えば、イリ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イリ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^- 、 PO_4^{3-} 、 RO^- 、 CO_3^{2-} 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ 、 RS^- 、 CN^- 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 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) 等が挙げられる。

[0058] 前記イリジウム化合物として具体的には、塩化イリジウム、臭化イリジウム、フッ化イリジウム、ヨウ化イリジウム、水酸化イリジウム、硝酸イリジウム、炭酸イリジウム、酢酸イリジウム、ジメトキシイリジウム、メトキシリン酸イリジウム、リン酸イリジウム、塩化イリジウム酸、ジスルフメチルイリジウム、ジシアノイリジウム、ジチオシアネートイリジウム、二水素化イリジウム、メチルイリジウム、酸化イリジウム、五塩化イリジウム (IV) ジアンモニウム (ヘキサクロロイリジウム (IV) 酸二アンモニウム) 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イリジウム、臭化イリジウム、フッ化イリジウム、及びヨウ化イリジウムが挙げられ、特に好ましい化合物として塩化イリジウムが挙げられる。塩化イリジウムとしては、塩化イリジウム (III)、塩化イリジウム (IV) が挙げられる。

[0059] 有機溶媒としては、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ベンゾニトリル (benzonitrile) 等が挙げられる。塩化イリジウムを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) イリジウム (III) が挙げられる。

[0060] また、配位子としてイリジウムに結合し得る物質を含む溶液としては、ハルマリン (harmaline) 溶液、例えばハルマ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。前記のようなイリジウムを含む巨大分子をこれらの溶液に溶解すると、イリジウムはハルマ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、イリ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イリジウム錯体も、本発明に使用することができる。

イリジウム錯体は、二量体 (1 錯体に 2 個のイリジウム元素を有するダイマー) 等の多量体であってもよい。二量体としては、例えば、 $\text{Di-}\mu\text{-chlorobis}[(\eta\text{-cycloocta-1,5-diene})\text{iridium(I)}]$ が挙げられる。

[0061] イリジウム錯体、及び、イリ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イリジウム化合物は、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、Weiss R.B., Christian M.C. (1993) *Drugs* 46:360; Gordon M., Hollander S. (1993) 24: 209; Khokhar A.R., Lopez-Berestein G., Perez-Soler P., US Patent 5 117 022, 1992; Brown D.B., Kohkhar A.R., Hacker M.P., McCommack J.J., European Patent EP 0130 482 b1, 1988; Yanai J., Japanese Patent JP 09 132 583 A2, 1997; Lippert B., *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of Leading Anti-cancer Drugs*, 1st Ed., John Wiley and sons, Ltd., 19

99に記載の方法に準拠して合成することもできる。

[0062] 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。

[0063] 薬剤による処理の条件は、適宜設定することが可能である。例えば、検出対象の微生物の生細胞と死細胞及び／又は損傷細胞とのけん濁液に、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、生細胞と死細胞及び／又は損傷細胞と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。

[0064] このような条件として、具体的には、Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)]では終濃度20～3000 μ M、好ましくは25～3000 μ M、4～43℃、5分～2時間が例示される。2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichlorideでは終濃度20～3000 μ M、好ましくは50～300 μ M、4～43℃、5分～2時間が例示される。

他のイリジウム錯体についても、これらのイリジウム錯体に準じて条件を設定することができる。また、細胞数が既知の試料を用いて、細胞を種々の条件でイリジウム錯体で処理して、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し、増幅産物を解析することによって、好適な条件を選択することができる。

[0065] 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。

[0066] 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350nm～700nm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。

[0067] 本発明の薬剤は、生細胞の細胞壁よりも、死細胞及び／又は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、染色体DNA又はRNAに、直接的、又は間接的に結合もしくは干渉し、その結果、薬剤が結合したDNA又はRNAは、核酸増幅反応の鋳型とはなくなると推定される。

[0068] 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又はRNAに、薬剤が直接的、又は間接的に結合もしくは干渉し、核酸増幅反応が阻害される。そのために、生細胞は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。

[0069] 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。

[0070] 先の薬剤処理と、それ以降の薬剤処理との間で、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。

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。

[0071] (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。

[0072] 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）。

[0073] 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。増幅反応液に、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場合は、これらのうち、いずれか一種を、又は任意の二種以上を組合わせて使用することができ、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よりも高い濃度、例えば 2 倍～10 倍の濃度で添加してもよい。

[0074] 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。

[0075] 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、 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、リゾチームから、ホスホリラーゼ、及び乳酸脱水素酵素から選択される1種又は複数種を例示することができる。

[0076] 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。

[0077] 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反応液に加えることによる、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）。

[0078] 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）。

[0079] 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着するこ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）。

[0080] 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。

[0081] 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%、好ましくは0.01～1%、より好ましくは0.2～0.6%である。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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（シエル社の登録商標）、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系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レート）、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。

[0086] 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。例えば、陰イオン系界面活性剤が用いられる場合は0.0005～0.01%の範囲が好ましく、陽イオン系界面活性剤が用いられる場合は0.0005～0.01%の範囲が好ましい。

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。

[0087] 他の界面活性剤の場合、例えば、非イオン系界面活性剤が用いられる場合は0.001～1.5%の範囲が好ましい。

具体的には、Nonidet P-40の場合は、通常、0.001～1.5%の範囲であれば良く、好ましくは0.002～1.2%、より好ましくは0.9～1.1%である。

Tween 20、Tween 40、Tween 60、又はTween 80の場合は、通常、0.001～1.5%の範囲であれば良く、好ましくは0.002～1.2%、より好ましくは0.9～1.1%である。

Brij56又はBrij58の場合は、通常0.1～1.5%の範囲であれば良く、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。

[0088] 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。

[0089] 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、ピロリン酸塩等が挙げられる。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0.1～20 mM、好ましくは1～10 mM、より好ましくは1～5 mMである（特許第4127847号、W02007/094077参照）。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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る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。核酸増幅の鋳型には、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、鋳型調製のための核酸の抽出は行わないことが好ましい。

[0093] 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を鋳型として、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。

[0094] 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。

[0095] 核酸増幅法としては、PCR法（Polymerase chain reaction: 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）、ICAN法（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic aci

ds： 嶋田雅光ら、ベッドサイドICAN 法によるクラミジア／リン菌遺伝子検出試薬の開発、2002年、第51回日本医学検査学会抄録集、121、向井博之、ICAN 法の開発と応用、2002年、第14回北海道輸血シンポジウム、20)、S D A 法 (Strand Displacement Amplification: Edward L. Chan, et al., Arch. Pat hol. Lab. Med., 124:1649-1652, 2000)、L C R 法 (Ligase Chain Reaction: Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.88, p.189-193, 1991)、T M A 法 (Transcription-Mediated-Amplification: Sarrazin C. et al., J. Clin. Microbiol., vol.39: p.2850-2855 (2001))、T R C 法 (Transcription-Reverse Transcription-Concerted method: Nakaguchi Y. et al., J. Clin. Microbiol., vol.42: p.4284-4292 (2004))、H C 法 (Hybrid Capture: Nazarenko I., Kobayashi L. et al., J. Virol. Methods, vol.154: p.76-81, 2008)、S M A 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。

[0096] なお、本発明においては、P C R 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。P C R 法には、定量P C R 法 (Quantitative PCR 又は Real-Time PCR: VanGuilder HD, et al., Biotechniques, 2008, Apr;44(5), 619-26、Spackman E., et al., Methods Mol Biol., 2008, Vol.436, p.19-26)、R T - P C R 法 (Reverse Transcription PCR: Freeman WM, et al., Biotechniques, 1999, Jan;26(1), 112-22, 124-5)、リアルタイムP C R 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) 等の改変法が含まれるが、それらに制限されない。

[0097] 本発明において「ターゲット領域」とは、染色体D N A、又はR N A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。

[0098] 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。

本発明の方法の好ましい態様では、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／又は損傷細胞との識別が可能である。

[0099] 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。

[0100] 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・サカザキ菌に特異的な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。

[0101] 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-protein A (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。

[0102] 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。

[0103] 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。

[0104] 核酸増幅反応の条件は、各核酸増幅法 (PCR法、LAMP法、ICAN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。

[0105] (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) と同時に行われる。例えば、リアルタイムPCRの場合は、工程c

)は工程b)と同時に行為れ得る。

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。

[0106] 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。

[0107] また、増幅産物の有無は、増幅産物の融解温度(TM)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。

[0108] 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。

[0109] <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、死細胞及び／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、イリジウム錯体を含む。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 酵素、イリジウム錯体、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。

[0114] 前記核酸増幅反応は、PCR法（定量PCR法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法を含む）、LAMP法、ICAN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が好ましい。なお、上記キットにおいて、架橋剤等の薬剤は、本発明の方

法で説明したものと同様である。

[0115] 本発明のキットに含まれるイリ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。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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、ピロリン酸塩等が挙げられる。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。

[0119] 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。

[0120] 本発明のキットは、さらに、希釈液、イリ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

[0121] 以下に、実施例を用いて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。

[0122] 〔実施例1〕 $\text{Di-}\mu\text{-chlorobis}[(\eta\text{-cycloocta-1,5-diene})\text{iridium(I)}]$ による大腸菌 (*Escherichia coli*) の生細胞・死細胞の識別

本実施例では、イリジウム錯体を用いた *E. coli* の生細胞及び死細胞の識別を行った。イリジウム錯体としては、イリジウム錯体二量体（1錯体に2個のイリジウム元素を有するダイマー）である $\text{Di-}\mu\text{-chlorobis}[(\eta\text{-cycloocta-1,5-diene})\text{iridium(I)}]$ を用いた。

[0123] 1. 試験材料及び方法

1-1) 滅菌水を用いて *E. coli* JCM1649株の生細胞けん濁液 ($1.2 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$) を調製した。この生細胞けん濁液の一部を沸騰水中に3分浸漬し、損傷細胞／死細胞けん濁液 ($1.2 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ 。以下、損傷細胞と死細胞を包括して死細胞と表記する) を調製した。これらの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液のそれぞれ90 μl を下記試験に供した。JCM1649株は、JCM（国立研究開発法人 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））から入手できる。

[0124] 1-2) イリジウム錯体溶液の調製

$\text{Di-}\mu\text{-chlorobis}[(\eta\text{-cycloocta-1,5-diene})\text{iridium(I)}]$ (Wako) 3.92 mg (5.84 μmol) を秤量し、116.7 μl のジメチルスルフォキシド (DMSO、D8418-50ML, Sigma) に溶解して50 mM溶液を調製した。この溶液を生理食塩水で希釈して100 μM 、250 μM 、1000 μM のイリジウム錯体溶液を準備した。

[0125] 1-3) イリジウム錯体による被検試料の処理

前記の各イリジウム錯体溶液10 μl を、上記生細胞けん濁液90 μl 又は死細胞けん濁液90 μl 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℃、15,000×G、5分）し、上清を除去した。沈殿物（ペレット

）を1ml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 μ lに相当）をPCR増幅用試料とした。

[0126] 1－4）PCR増幅

細胞からの核酸の抽出を行わずにPCRを効率よく行うために必要な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（この溶液を、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。

例えば、PCR 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 $\times$ DBC）を調製することができる。尚、後述するTaq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer（New England Biolabs Japan Inc.; M0273S）を用いて、メーカーマニュアルに従ってリアルタイムPCRマスターミックス（qPCR）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。

[0127] Brij 58、 $MgCl_2$ 、及びTSCは滅菌水にて溶解後、オートクレーブ（121 $^{\circ}C$ 、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、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。

[0128]

[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 μ g/ml	10 μ g/ml

[0129] 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。）を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。具体的には、前記Taq DNA Polymerase with Standard Taq BufferをqPCRバッファーとして用い、これにTaqポリメラーゼを通常使用の4倍量を加え、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（DqPCR）マスターミックスを調製した。

先に調製したPCR増幅用試料にダイレクト・リアルタイムPCR用マスターミックスを添加して、リアルタイムPCR増幅(40 cycles)を2回実施した。尚、以下、New England Biolabs製品はNEBと記載する。

[0130] [表2]

表2 ダイレクト・リアルタイムPCR (DqPCR) マスターミックス組成

各試薬	添加量 (μ l)	組成 (終濃度)
NEB Taq polymerase (5 U/ μ l)	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 μ M each)	0.75	0.3 μ M each
ENT-16S TaqMan probe (10 μ M)	1.5	0.6 μ M
cDBC (10 × DBC)	2.5	1 ×
Sterile water (SW)	10.25	(—)
Template	5.0	(—)
Total volume	25.0	

[0131] PCR増幅には、Primer ENT-16S forward: 腸内細菌科菌群 (Enterobacteria

ceae) 特異的16S rRNA遺伝子検出用フォワードプライマー (5'-GTTGTAAAGCAC TTTCA GTGGTGAGGAAGG -3' : 配列番号1)、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プライマー (5'-GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG-3' : 配列番号2) 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 (Enterobacteriaceae) ENT-16S TaqMan probeとしては、配列番号3 (5'-/56-FAM/AAGTGCATC/ZEN/TGATACTGGCAGGCT/31ABkFQ/-3') 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。

[0132] 尚、配列番号1及び2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3のENT-16S TaqMan probeに関する塩基配列情報はGenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) より腸内細菌科菌群内の16S rRNA遺伝子の相補的領域を選択することにより得た。

[0133] 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2回実施した。

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

尚、陰性コントロールとして、滅菌水5μlを鋳型として使用した。

[0134] 2. 結果及び考察

リアルタイムPCRの結果を表3に示す。表3中、「No Agent」は陰性コントロールを示す。

[0135]

[表3]

表3 Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)]処理・DqPCRによる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）

薬剤	薬剤濃度 (μ M)	生細胞 (1.2×10^7 cfu/ml)	死細胞 (1.2×10^7 cells/ml)
No Agent	0	19.4 $\pm$ 0.12	22.7 $\pm$ 0.15
Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)]	10	21.4 $\pm$ 0.32	23.2 $\pm$ 0.17
	25	22.5 $\pm$ 0.24	33.0 $\pm$ 0.29
	100	23.0 $\pm$ 0.32	ND $\times$ 2 ^a

a) 2回の結果が未増幅（陰性）を示す。

[0136] 表3によれば、Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)]をE. coliの生細胞及び死細胞に作用させたとき、死細胞のCt値は薬剤濃度依存的に大きくなり、当該イリジウム錯体100 μ Mの濃度にて死細胞由来のPCR増幅が完全に抑制された。一方、生細胞に関しては、濃度が高くなるにつれ若干薬剤の透過現象が観察されるが、前記死細胞由来のPCRを完全に抑制した薬剤濃度では、未処理生細胞のCt値と比較して3.6程度の上昇（増幅の遅れ）に留まり、当該イリジウム錯体100 μ Mにて明瞭な生細胞と死細胞の識別が可能であった。

[0137] [実施例2] Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)]によるスタフィロコッカス・アウレウス (S. aureus) の生細胞・死細胞の識別

実施例1では、イリジウム錯体二量体を用いて、グラム陰性細菌の代表的菌種であるE. coliの生細胞及び死細胞の明瞭な識別が可能であることが示された。本実施例では、同じイリジウム錯体二量体により、グラム陽性細菌であるS. aureusの生細胞と死細胞とを明瞭に識別できるかを検討した。

[0138] 1. 試験材料及び方法

1-1) 滅菌水を用いてS. aureus ATCC 6538P株の生細胞けん濁液 (4.5×10^7 cfu/ml) を調製した。この生細胞けん濁液の一部を沸騰水中に3分浸漬し、死細胞懸濁液 (4.5×10^7 cells/ml) を調製した。これらの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液のそれぞれ90 μ lを下記試験に供した。

[0139] 1-2) イリジウム錯体溶液の調製

Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)] 4.45 mg (6.63

μmol) を秤量し、132.5 μl のジメチルスルフォキシドに溶解して50 mM溶液を調製した。この溶液を生理食塩水で希釈して100 μM 、250 μM 、1000 μM のイリジウム錯体溶液を準備した。

[0140] 1-3) イリジウム錯体による被検試料の処理

前記の各イリジウム錯体溶液10 μl を、上記生細胞けん濁液90 μl 又は死細胞けん濁液90 μl に添加し、恒温水槽にて37°Cで15分間保持した。その後、冷却遠心処理 (4°C、15,000 $\times$ G、5分) し、上清を除去した。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。

[0141] 1-4) PCR増幅

下記表4に示される組成にて、ダイレクト・リアルタイムPCR (DqPCR) マスターミックスを調製した。具体的には、SYBRPremix Ex Taq™ PCR Master Mix (2 $\times$) (Takara-Bio Co., Ltd, Otsu, Japan) をリアルタイムPCR用バッファーとして用い、PCR増幅用forward primer及びreverse primerとしてBacteria Screening PCR Kit (Takara-Bio)添付Primer Mix BS (5 μM each)を使用した。尚、本プライマーミックスはスタフィロコッカス属及びバチラス属を共に検出可能とするプライマーであり、増幅遺伝子長は約380 bpである。リアルタイムPCRは2回実施した。

[0142] [表4]

表4 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)
2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq	12.5	1 $\times$
Primer Mix BS (5 μM each)	1.25	0.25 μM each
dH ₂ O (10 $\times$ DBC)	2.5	1 $\times$
Sterile water (SW)	3.75	(-)
Template	5.0	(-)
Total volume	25.0	

[0143] 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°C, 1分 (1サイクル)

2) 95℃, 10秒; 59℃, 30秒; 72℃, 30秒 (40サイクル)

尚、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。

[0144] 2. 結果及び考察

リアルタイムPCRの結果を表5に示す。

[0145] [表5]

表5 Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)]処理・BqPCRによる*S. aureus*の生細胞・死細胞(滅菌水けん濁液)の識別結果(Ct値の変化)

薬剤	薬剤濃度 (μ M)	生細胞 (4.5×10^7 cfu/ml)	死細胞 (4.5×10^7 cells/ml)
No Agent	0	17.2 $\pm$ 0.24	16.8 $\pm$ 0.32
Di- μ -chlorobis[(η -cycloocta-1,5-diene)iridium(I)]	10	19.8 $\pm$ 0.31	18.9 $\pm$ 0.28
	25	21.1 $\pm$ 0.27	29.9 $\pm$ 0.55
	100	22.0 $\pm$ 0.65	ND $\times$ 2 ^a

a) 2回の結果が未増幅(陰性)を示す。

[0146] 表5によれば、グラム陽性細菌である*S. aureus*についても、イリジウム錯体(二量体)処理により生細胞と死細胞との識別が可能であることが示された。すなわち、イリジウム錯体によりグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に関して、生細胞と死細胞との明瞭な識別が可能であることが示された。

[0147] [実施例3] 2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichlorideによる*E. coli*の生細胞・死細胞の識別

実施例1及び2にて、イリジウム錯体二量体を用いて、*E. coli*及び*S. aureus*というグラム陰性細菌、グラム陽性細菌の生細胞と死細胞との明瞭な識別ができることが示された。本実施例では、イリジウム錯体単量体を用いて*E. coli*の生細胞と死細胞とが識別できるかを検討した。

[0148] 1. 試験材料及び方法

1-1) 滅菌水を用いて*E. coli* JCM1649株の生細胞けん濁液(2.1×10^7 cfu/ml)を調製した。この生細胞懸濁液の一部を沸騰水中に3分浸漬し、死細胞懸濁液(2.1×10^7 cells/ml)を調製した。これらの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液のそれぞれ90 μ lを下記試験に供した。

[0149] 1-2) イリジウム錯体溶液の調製

2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichlo

ride (関東化学 (株)、東京) 4.22 mg (8.55 μmol) を秤量し、855.3 μl のジメチルスルフォキシド (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250 μM 、500 μM 、2000 μM のイリジウム錯体溶液を準備した。

[0150] 1-3) イリジウム錯体による被検試料の処理

前記の各イリジウム錯体溶液10 μl を、上記生細胞けん濁液90 μl 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、冷却遠心処理 (4°C、15,000 $\times$ G、5分) し、上清を除去した。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。

[0151] 1-4) PCR増幅

実施例1と全く同じ条件 (すなわち、表2に示すダイレクト・リアルタイムPCRマスターミックス使用) にて、ダイレクト・リアルタイムPCR (DqPCR) を実施した。

[0152] 2. 結果及び考察

リアルタイムPCRの結果を表6に示す。

[0153] [表6]

表6 2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichloride処理・DqPCRによる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)

薬剤	薬剤濃度 (μM)	生細胞 (2.1×10^7 cfu/ml)	死細胞 (2.1×10^7 cells/ml)
No Agent	0	18.8 $\pm$ 0.22	20.9 $\pm$ 0.24
2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium (III)dichloride	25	20.7 $\pm$ 0.25	21.3 $\pm$ 0.19
	50	21.6 $\pm$ 0.31	28.1 $\pm$ 0.43
	200	23.1 $\pm$ 0.32	ND $\times$ 2 ^a

a) 2回の結果が未増幅 (陰性) を示す。

[0154] 表6によれば、2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichlorideをE. coliの生細胞及び死細胞に作用させたとき、死細胞のCt値は薬剤濃度依存的に大きくなり、当該イリジウム錯体200 μM の濃度にて死細胞由来のPCR増幅が完全に抑制された。一方、生細胞に関しては、濃度が高くなるにつれ若干薬剤の透過現象が観察されるが、前記死細胞由来のPCR

を完全に抑制した薬剤濃度では、未処理生細胞のCt値と比較して4.3程度の上昇（増幅の遅れ）に留まり、当該イリジウム錯体200 μM にて生細胞と死細胞との明瞭な識別が可能であった。

すなわち、イリジウム錯体は二量体のみならず単量体においてもE. coliの生細胞と死細胞との明瞭な識別が可能であることが示された。

[0155] 〔実施例4〕 2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichlorideによるS. aureusの生細胞・死細胞の識別

実施例3においては、イリジウム錯体単量体によりE. coliの生細胞と死細胞との明瞭な識別が可能であることが示された。本実施例では、同じイリジウム錯体単量体によりS. aureusの生細胞と死細胞とを明瞭に識別できるかを検討した。

[0156] 1. 試験材料及び方法

1-1) 滅菌水を用いてS. aureus ATCC 6538P株の生細胞けん濁液 (6.6×10^7 cfu/ml) を調製した。この生細胞けん濁液の一部を沸騰水中に3分浸漬し、死細胞懸濁液を調製したこれらの生細胞けん濁液、又は死細胞けん濁液のそれぞれ90 μl を下記試験に供した。

[0157] 1-2) イリジウム錯体溶液の調製

2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichloride(関東化学(株)、東京) 3.89 mg (7.88 μmol)を秤量し、788.1 μl のジメチルスルフォキシド (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250 μM 、500 μM 、2000 μM のイリジウム錯体溶液を準備した。

[0158] 1-3) イリジウム錯体による被検試料の処理

前記の各イリジウム錯体溶液10 μl を、上記生細胞けん濁液90 μl 又は死細胞けん濁液90 μl に添加し、恒温水槽にて37℃で15分間保持した。その後、冷却遠心処理 (4℃、15,000 $\times$ G、5分) し、上清を除去した。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。

[0159] 1－4) PCR増幅

実施例2と同様にして、リアルタイムPCRを2回実施した。

[0160] 2. 結果及び考察

リアルタイムPCRの結果を表7に示す。

[0161] [表7]

表7 2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichloride処理・DqPCRによる*S. aureus*の生細胞・死細胞(滅菌水けん濁液)の識別結果(Ct値の変化)

薬剤	薬剤濃度 (μM)	生細胞 (6.6×10^7 cfu/ml)	死細胞 (6.6×10^7 cells/ml)
No Agent	0	16.3 $\pm$ 0.28	16.1 $\pm$ 0.33
2-Hydroxy-N-pyridine(pentamethylcyclopentadienyl)iridium(III)dichloride	25	19.1 $\pm$ 0.42	18.2 $\pm$ 0.31
	50	20.2 $\pm$ 0.53	28.4 $\pm$ 0.62
	250	22.0 $\pm$ 0.79	ND $\times$ 2 ^a

a) 2回の結果が未増幅(陰性)を示す。

[0162] 表7によれば、グラム陽性細菌である*S. aureus*についても、当該イリジウム錯体(単量体)処理により、生細胞と死細胞との識別が可能であることが示された。すなわち、二量体や単量体に関わらず、イリジウム錯体により、広くグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に関して、生細胞と死細胞との明瞭な識別が可能であることが示された。

産業上の利用可能性

[0163] 本発明の方法によれば、簡便な工程で、微生物の生細胞を、死細胞及び／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。

[0164] また、本発明に用いるイリジウム錯体のうち、例えば、前述する化2に示される化合物は有機化学や有機合成化学の分野において金属触媒として使用されており、EMA等の薬剤に比べて危険性が低いと考えられる。さらに、好ましいイリジウム錯体は、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、死細胞及び／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) 前記被検試料にイリ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] 前記イリジウム錯体が、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素、カルボキシレート基、ピリジン基、 H_2O 、 CO_3^{2-} 、 OH^- 、 NO_3^- 、 ROH 、 N_2H_4 、 PO_4^{3-} 、 R_2O 、 RO^- 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ 、 NO_2^- 、 N_2 、 N_3^- 、 R_2S 、 R_2P^- 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、および 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）からなる群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、ピリジン基、 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_2P^- 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、および R^- 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] 前記イリジウム錯体が、ジ- μ -クロロビス[(η -シクロオクタ-1,5-ジエン)イリジウム(I)]、及び、2-ヒドロキシ-N-ピリジン(ペンタメチルシクロペンタジエニル)イリジウム(III)ジクロリドから選ばれる、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記イリジウム錯体が、イリジウム化合物を、配位子としてイリジウムに結合し得る有機溶媒、又は配位子としてイリ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イリジウム錯体である、請求項1に記載の方法。
- [請求項6] 前記有機溶媒がジメチルスルホキシドである、請求項5に記載の方

法。

- [請求項7] 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1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 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7に記載の方法。
- [請求項9] 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7又は8に記載の方法。
- [請求項10] 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特徴とする、請求項7～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 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1～10のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項12] 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11に記載の方法。
- [請求項13] 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1～12のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項14] 前記微生物が、細菌又はウイルスである、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項15] 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14に記載の方法。
- [請求項16] 前記核酸増幅法が、PCR法、LAMP法、ICAN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1～15のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項17] 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 16 に記載の方法。

[請求項18] 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 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] 核酸増幅法により、被検試料中の微生物の生細胞を、死細胞及び／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) イリジウム錯体、又は、

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

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20] 前記イリジウム錯体が、 NH_3 、 RNH_2 、ハロゲン元素、カルボキシレート基、ピリジン基、 H_2O 、 CO_3^{2-} 、 OH^- 、 NO_3^- 、 ROH 、 N_2H_4 、 PO_4^{3-} 、 R_2O 、 RO^- 、 ROPO_3^{2-} 、 $(\text{RO})_2\text{PO}_2^-$ 、 NO_2^- 、 N_2 、 N_3^- 、 R_2S 、 R_2P^- 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、および 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）から選ばれる配位子を含む、請求項 19 に記載のキット。

[請求項21] 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、ピリジン基、 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_2P^- 、 R_3P 、 RS^- 、 CN^- 、 RSH 、 RNC 、 $(\text{RS})_2\text{PO}_2^-$ 、 $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{S}^-$ 、 SCN^- 、 CO 、 H^- 、および R^- からなる群から選ばれる、請求項 20 に記載のキット。

[請求項22] 前記イリジウム錯体が、ジ- μ -クロロビス[(η -シクロオクタ-1,5-ジエン)イリジウム(I)]、及び、2-ヒドロキシ-N-ピリジン(ペンタメ

チルシクロペンタジエニル)イリジウム(III)ジクロリドから選ばれる、請求項 19 に記載のキット。

[請求項23] さらに、配位子としてイリジウムに結合し得る有機溶媒を含む、請求項 19 に記載のキット。

[請求項24] 前記有機溶媒がジメチルスルホキシドである、請求項 23 に記載のキット。

[請求項25] 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 19 ～ 24 のいずれか一項に記載のキット。

[請求項26] さらに界面活性剤を含む、請求項 19 ～ 25 のいずれか一項に記載のキット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)

C12Q1/02, 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 1996-2015
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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/021351 A1 (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 06 February 2014 (06.02.2014), claims & JP 5433821 B	1-26
A	WO 2014/021352 A1 (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 06 February 2014 (06.02.2014), claims & JP 5433820 B	1-26
A	Takashi SOEJIMA et al., "Rapid methods to distinguish live from dead microorganism", Bulletin of Japan Dairy Technical Association, 2013, vol.62, pages 1 to 25	1-26



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

14 September 2015 (14.09.15)

Date of mailing of the international search report

29 September 2015 (29.09.15)

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/JP2015/070406

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HISAMATSU, Y. et al., Design and Synthesis of Amphiphilic and Luminescent Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Containing Cationic Peptides as Inducers and Detectors of Cell Death via a Calcium-Dependent Pathway, Bioconjugate Chem., 2015.05, Vol.26, pp.857-879	1-26
T	JP 2015-136340 A (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 30 July 2015 (30.07.2015), entire text (Family: none)	1-26
T	JP 2015-139434 A (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 03 August 2015 (03.08.2015), entire text (Family: none)	1-26

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n			
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. C12Q1/02, 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 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 5 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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	WO 2014/021351 A1（森永乳業株式会社）2014.02.06, 請求の範囲 & JP 5433821 B	1-26	
A	WO 2014/021352 A1（森永乳業株式会社）2014.02.06, 請求の範囲 & JP 5433820 B	1-26	
A	副島隆志 他, 生菌と死菌の見分け方, 乳業技術, 2013, Vol.62, pp. 1-25	1-26	
☒ 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 1 4 . 0 9 . 2 0 1 5		国際調査報告の発送日 2 9 . 0 9 . 2 0 1 5	
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 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 藤井 美穂 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8	4 N 4 4 3 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	HISAMATSU, Y. et al., Design and Synthesis of Amphiphilic and Luminescent Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Containing Cationic Peptides as Inducers and Detectors of Cell Death via a Calcium-Dependent Pathway, Bioconjugate Chem., 2015.05, Vol.26, pp.857-879	1-26
T	JP 2015-136340 A (森永乳業株式会社) 2015.07.30, 全文 (ファミリーなし)	1-26
T	JP 2015-139434 A (森永乳業株式会社) 2015.08.03, 全文 (ファミリーなし)	1-26