



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년11월08일  
 (11) 등록번호 10-1080897  
 (24) 등록일자 2011년11월01일

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/04* (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2005-7020146

(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년04월08일

심사청구일자 2008년12월22일

(85) 번역문제출일자 2005년10월24일

(65) 공개번호 10-2006-0003365

(43) 공개일자 2006년01월10일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/005085

(87) 국제공개번호 WO 2004/097037

국제공개일자 2004년11월11일

(30) 우선권주장

JP-P-2003-00121701 2003년04월25일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문현

US05741662 A1\*

US20030171556 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

히사미쓰 세이야꾸 가부시키가이샤

일본 사가켄 토스시 타시로 다이칸죠오 408반지

(72) 발명자

나시모토 코지

일본국 치바 인바군 인바무라 히라가가쿠엔다이  
2-23-9

이시다 가즈야

일본국 치바 나리타시 코즈노모리 1-7-11

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신용길

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 문동현

(54) 미생물 염색제 및 그의 이용

**(57) 요 약**

본 발명은 알칼리 물질과 디아조계 염료 또는 크산텐계 염료를 함유하는 것을 특징으로 하는 미생물 염색제 및 이것을 이용한 미생물 검출방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 종래의 직접 경검법에 있어서 전처리의 문제점을 해소하여, 보다 단시간에 미생물을 염색하는 염색제 및 이것을 이용한 미생물 검출방법을 제공할 수 있다.

(72) 발명자  
**이케다 야스오**  
일본국 치바 나라시노시 츠다누마 6-7-20-307

**하나오카 요시아키**  
일본국 치바 요즈카이도시 와라비 276-41

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

알칼리 물질과 시카고 스카이 블루 6B 또는 로다민 B를 함유하고, 알칼리 물질이 15~30질량%인 것을 특징으로 하는 미생물 염색제.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

제1항에 있어서, 다시 메탄올, 디메틸су폴시드, 메탄올 및 디메틸су폴시드의 어느 하나를 함유하는 것을 특징으로 하는 미생물 염색제.

### 청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 진균을 염색하는 것을 특징으로 하는 미생물 염색제.

### 청구항 6

제1항 또는 제4항에 있어서, 세균을 염색하는 것을 특징으로 하는 미생물 염색제.

### 청구항 7

청구항 제1항 또는 제4항에 기재된 미생물 염색제를 미생물을 함유하는 시료에 첨가하여 미생물을 염색하고, 이어서 염색된 미생물을 검출함을 특징으로 하는 미생물 검출방법.

### 청구항 8

청구항 제7항에 있어서, 미생물 염색제를 미생물을 함유하는 시료에 첨가한 후, 60~80℃에서 2~5분간 가온함을 특징으로 하는 미생물 검출방법.

## 명세서

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물 염색제에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 종래의 방법보다 단시간에 세균·진균 등의 미생물을 염색할 수 있는 염색제 및 이를 이용하는 미생물 검출방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 종래, 세균·진균 등의 미생물을 검출하기 위하여는 시료에 전처리한 후, 경검(鏡檢)을 실시하는 직접 경검법이나, 시료 중의 미생물을 배양한 후, 검사를 행하는 배양 검사법이 이용되고 있다. 특히, 의료 현장 등에서는 간편함 때문에 직접 경검법이 주로 이용되고 있다.

[0003] 이 직접 경검법의 전처리로서는 수산화칼륨법, 디메틸су폴시드(DMSO) 첨가 수산화칼륨법 및 파카 잉크-수산화칼륨법이 알려져 있다("Jpn. J. Med. Mycol.", 1995, Vol. 36, p. 61-86; 야마구치 히데요 등, 일본의진균학회 표준화위원회 보고).

[0004] 이 중에서, 수산화칼륨법 및 디메틸су폴시드 첨가 수산화칼륨법은 균을 염색하는 것은 아니기 때문에, 마라세티아균의 검출이 곤란하며, 검출할 때 현미경으로 측정하는 것에 숙련되어야만 한다는 문제점이 있다. 한편, 파

카 잉크-수산화칼륨법은 균을 염색할 수 있지만, 염색까지 수 시간 내지 하룻밤이 걸리는 문제점이 있다. 또한, 이 방법은 염색에 사용할 수 있는 잉크의 종류가 한정되어 있으며, 잉크 자체가 단일 성분이 아니기 때문에, 잉크의 처방 변경 등에 의해 균의 염색성에 변화를 일으키는 문제점도 있다.

[0005] 따라서, 본 발명의 과제는 종래의 직접 경검법의 전처리의 문제점을 해소하여, 보다 단시간에 미생물을 염색하는 염색제 및 이를 이용한 미생물의 염색·검출방법을 제공하는 것이다.

### 발명의 상세한 설명

[0006] 본 발명자들은 이러한 사정에 감안하여 상기 과제를 해결하기 위하여 예의 연구한 결과, 미생물의 염색에 이용하는 염색제로서 알칼리 물질과 특정의 염료를 함유한 것을 이용함으로써 미생물을 단시간에 염색·검출할 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0007] 즉, 본 발명은 알칼리 물질과 디아조계 염료 또는 크산텐계 염료를 함유하는 것을 특징으로 하는 미생물 염색제를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 염색제를 미생물을 함유하는 시료에 첨가하여 미생물을 염색하고, 이어서 염색된 미생물을 검출하는 것을 특징으로 하는 미생물 검출방법을 제공하는 것이다.

### 산업상 이용 가능성

[0119] 본 발명의 염색제는 진균, 세균 등의 미생물을 단시간에 염색·검출할 수 있는 것이다. 또한, 본 발명의 염색제는 보존 안정성이나 열안정성이 높고, 장기 보존 및 염색시 가열에 의한 염색성 저하 문제가 없는 것이다.

[0120] 따라서, 본 발명의 염색제는 진균이나 세균 등의 미생물 염색제로서 매우 유효하다.

### 도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 실시예 1의 염색제에 의한 염색을 나타내는 현미경 사진( $\times 400$ )이다.

[0010] 도 2는 실시예 7의 염색제에 의한 염색을 나타내는 현미경 사진( $\times 400$ )이다.

[0011] [발명을 실시하기 위한 최선의 형태]

[0012] 본 발명의 미생물 염색제(이하, 「본 발명 염색제」라고 한다)는 알칼리 물질과 디아조계 염료 또는 크산텐계 염료를 함유하는 것이다.

[0013] 본 발명 염색제에 사용하는 알칼리 물질로서는 무기계 알칼리로서 수산화칼륨, 수산화나트륨, 수산화바륨, 탄산칼륨, 탄산나트륨, 탄산암모늄, 인산 삼칼륨, 인산수소 이칼륨, 인산 삼나트륨, 인산수소 이나트륨, 암모니아 등, 유기계 알칼리로서 메틸아민, 에틸아민, 이소프로필아민 등의 알킬아민류, 메탄올아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 이소프로판올아민, 디이소프로판올아민 등의 알칸올아민류를 들 수 있다. 이들 알칼리 물질 중, 바람직한 것으로는 수산화나트륨 및 수산화칼륨을 들 수 있으며, 특히 바람직한 것으로서는 수산화칼륨을 들 수 있다. 또한, 본 발명 염색제에 있어서, 알칼리 물질의 배합량은 10~40 질량%(이하, 단지 「%」라고 한다), 바람직하기로는 15~30%이다.

[0014] 한편, 본 발명 염색제에 사용하는 염료 중, 디아조계 염료로서는 시카고 스카이 블루 6B, 에반스 블루, 다이렉트 블루 15, 트립판 블루, 벤조플루풀린 4B, 콩고-레드 등이 바람직하고, 특히 시카고 스카이 블루 6B가 바람직하다. 본 발명 염색제에 있어서, 디아조계 염료의 배합량은 0.01~2%, 바람직하기로는 0.1~1%이다.

[0015] 또한, 본 발명 염색제에 사용하는 염료 중, 크산텐계 염료로서는 로다민 B, 로다민 B 베이스, 로다민 123 하이드레이트, 로다민 6G, 로다민 110, 로다민 575 등이 바람직하고, 특히 로다민 B가 바람직하다. 본 발명 염색제에 있어서, 크산텐계 염료의 배합량은 0.001~1%, 바람직하기로는 0.005~0.5%이다.

[0016] 본 발명 염색제에는 필요에 따라, 상기 성분에 추가적으로 메탄올 및/또는 디메틸су폴시드를 배합할 수 있다. 본 발명 염색제에 있어서, 메탄올의 바람직한 배합량은 0~30%이고, 특히 0~20%이다. 또한, 디메틸су폴시드의 바람직한 배합량은 0~20%이고, 특히 0~10%이다.

- [0017] 상기 메탄을 및/또는 디메틸су阜시드의 배합은 세포에 대한 염색성을 억제하지만, 미생물에 대한 염색성에는 변화를 주지 않기 때문에, 본 발명 염색제에 의한 미생물 염색을 확실히 하여, 미생물 검출을 보다 용이하게 한다. 또한, 디아조계 염료 또는 크산텐계 염료 중 예를 들면, 로다민 B와 같이 알칼리 용액에 대한 용해성이 낮은 것은 용해성을 높인다는 점에서도 이들을 배합하는 것이 바람직하다.
- [0018] 본 발명 염색제의 조제는 상기 알칼리 물질을 물에 용해하여 알칼리 용액을 조제하고, 이어서 이것에 디아조계 염료 또는 크산텐계 염료와 필요에 따라 메탄을 및/또는 디메틸су阜시드를 가하여 혼합함으로써 행해진다. 또한, 상기 염료 중 알칼리 용액에 대한 용해성이 낮은 것은 미리 메탄을 또는 디메틸су阜시드의 1종 이상에 용해시킨 후, 알칼리 용액과 혼합하는 것이 바람직하다.
- [0019] 이와 같이 하여 얻어진 본 발명 염색제는 예를 들면, 백선균 등의 피부 사상균, 칸디다균, 마라세티아균 등의 진균 또는 그램 음성균이나 그램 음성균인 세균을 염색할 수 있다.
- [0020] 이하, 본 발명 염색제를 이용하여 미생물을 검출하는 방법을 설명한다.
- [0021] 본 발명 염색제를 이용하여 미생물을 검출하기 위해서는 우선, 이들 미생물의 존재가 의심되는 부위에서 채취한 시료에 본 발명 염색제를 작용시키고, 그대로 20~30분 정도 방치하여 미생물을 염색한다. 사용하는 시료로서는 채취 부위에 따라 각종의 것을 이용할 수 있다. 예를 들면, 미생물로서 다리나 생모부(生毛部)의 백선균을 검출하는 경우에는 인설(鱗屑), 소수포(小水庖), 소수포 껍질(小水庖蓋), 구진(丘疹)의 각질 부분 등이 이용되며, 손톱, 발톱의 백선균을 검출하는 경우에는 조갑(爪甲) 하층이나 조갑 아래의 각질 등이, 또한, 모창(毛瘡)이나 독창(禿瘡)에서는 병소 중의 용이하게 빠지는 병모(病毛)가 이용된다. 또, 시료에 대한 본 발명 염색제의 첨가량은 수방울 정도로 하면 좋다.
- [0022] 또한, 본 발명 염색제는 열안정성이 높기 때문에, 보다 단시간에 미생물을 염색하기 위하여, 본 발명 염색제를 시료에 첨가한 후에, 정온 핫플레이트 등에 의해 60~80°C로 2~5분 정도 가온할 수도 있다.
- [0023] 다음으로, 본 발명 염색제를 작용시킨 시료는 예를 들면, 이것을 슬라이드글라스 상에 놓고, 이어서 커버글라스를 씌운 후, 이 커버글라스 위에서 유리봉 등으로 가볍게 눌러, 시료를 얇게 펼치고 나서 현미경 등에 의해 100~200배의 배율로 관찰하여, 염색의 유무를 검출한다.
- [0024] 그리고, 염색이 인정되었을 경우에는 다시 400배 정도의 배율로 경검함으로써, 시료 중의 피부 사상균, 칸디다균, 마라세티아균 등의 진균의 기생 형태를 관찰할 수 있고, 이것에 의해 그 존재를 검출할 수 있다. 한편, 시료 중의 미생물이 그램 양성균이나 그램 음성균인 세균의 경우에는 1000배 정도의 배율로 경검하여 그 존재를 검출할 수 있다.
- [0025] 본 발명 염색제에 있어서, 디아조계 염료를 이용하는 경우의 특히 바람직한 형태의 것으로서는, 알칼리 물질이 15~30%, 디아조계 염료가 0.1~1%, 메탄올이 0~20%, 디메틸су阜시드를 0~2% 함유하는 것을 들 수 있다. 또한, 크산텐계 염료를 이용하는 경우의 특히 바람직한 형태의 것으로서는, 알칼리 물질이 15~30%, 크산텐계 염료가 0.005~0.5%, 메탄올이 0%~30%, 디메틸су阜시드가 5%~20% 함유하는 것을 들 수 있다.
- [0026] 이상 설명한 본 발명 염색제를 사용함으로써, 종래의 미생물 염색 방법에 비해 단시간에, 보다 정확하게 미생물을 염색·검출하는 것이 가능해진다.
- [0027] 실시예
- [0028] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 실시예 1
- [0030] 염색제(1) :
- [0031] 20%의 수산화 칼륨 용액에 시카고 스카이 블루 6B(칸토가가쿠 가부시키가이샤제)를 0. 5% 농도가 되도록 가하고, 혼합, 용해하여 염색제를 조제하였다.
- [0032] 실시예 2
- [0033] 진균 감염 부위에서의 균의 염색·검출(1) :
- [0034] 표재성 진균증이 의심되는 부위에서 병소조직(인설)을 채취하여 검사 시료로 하였다. 이 시료를 슬라이드글라스 위에 놓고, 실시예 1의 염색제를 적하하고, 실온에서 20~30분간 방치하여 병소조직을 연화시켰다. 조직이 충분

히 연화된 후, 커버글라스를 씌우고, 커버글라스 위에서 유리봉 등으로 가볍게 눌러, 얇게 펼치고 나서 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0035] 경검 결과, 100 내지 200배의 배율에서 미생물의 염색(청색)을 확인할 수 있었다. 다시 배율을 400배 정도로 함으로써, 피부 사상균이나, 칸디다균, 마라세티아균의 기생 형태도 관찰할 수 있어, 그 존재를 확인할 수 있었다. 배율 400배에서의 현미경 사진을 도 1에 나타낸다.

[0036] 실시예 3

[0037] 진균 감염 부위에서의 균의 염색·검출(2) :

[0038] 실온에서의 방치에 대신하여 정온 핫플레이트상, 60~80°C로 2~5분 가온하는 이외에는 실시예 2와 같이 염색, 경검하였다.

[0039] 경검 결과, 100~200배의 배율에서 염색(청색)을 확인할 수 있었다. 다시 배율을 400배 정도로 함으로써, 피부 사상균이나, 칸디다균, 마라세티아균의 기생 형태도 관찰할 수 있어, 그 존재를 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 염색제는 가온함으로써, 보다 단시간에 염색할 수 있음을 알았다.

[0040] 실시예 4

[0041] 미생물 검출에서의 메탄올 및 디메틸су폴시드의 영향(1) :

[0042] 시카고 스카이 블루 6B의 농도는 0.5%로, KOH 농도는 20%로 고정한 다음, 메탄올(MeOH) 농도 및 디메틸су폴시드(DMSO) 농도를 여러 가지로 변화시킨 하기 염색제를 조제하여, 검체 세포의 염색 정도 및 미생물의 염색 정도를 하기 기준에 의해 평가하였다. 또한, 염색제 특성을 종합적으로 평가하였다. 이 결과를 표 1에 나타낸다.

[0043] (염색제의 MeOH 및 DMSO 농도)

[0044] 염색제 A : MeOH 0% / DMSO 0%

[0045] 염색제 B : MeOH 10% / DMSO 0%

[0046] 염색제 C : MeOH 20% / DMSO 0%

[0047] 염색제 D : MeOH 30% / DMSO 0%

[0048] 염색제 E : MeOH 40% / DMSO 0%

[0049] 염색제 F : MeOH 0% / DMSO 1%

[0050] 염색제 G : MeOH 10% / DMSO 1%

[0051] 염색제 H : MeOH 20% / DMSO 1%

[0052] 염색제 I : MeOH 0% / DMSO 2.5%

[0053] 염색제 J : MeOH 10% / DMSO 2.5%

[0054] 염색제 K : MeOH 20% / DMSO 2.5%

[0055] (평가 기준)

[0056] 검체 세포의 염색 정도

[0057] 평점 : 내용

[0058] + + + : 매우 진하게 염색되어 있다.

[0059] + + : 진하게 염색되어 있다.

[0060] + : 약간 염색되어 있다.

[0061] ± : 연하게 염색되어 있다.

[0062] - : 염색되지 않았다.

[0063] 미생물의 염색 정도

[0064] 평점 : 내용

+++ : 매우 진하게 염색되어 있다.

[0066] ++ : 진하게 염색되어 있다.

[0067] + : 약간 염색되어 있다.

[0068] ± : 연하게 염색되어 있다.

[0069] - : 염색되지 않았다.

[0070] 종합 평가

[0071] 평점 : 내용

◎ : 염색제로서 실용성이 높다.

[0073] ○ : 염색제로서 사용할 수 있다.

[0074] △ : 염색제로서 사용하기에는 문제가 있다.

[0075] ✗ : 염색제로서 사용할 수 없다.

[0076] (결과)

[0077] 표 1

염색제	염색 정도		종합평가
	검체 세포	미생물	
염색제 A	± ~ ++	+ ~ +++	◎
염색제 B	- ~ +	++ ~ +++	◎
염색제 C	- ~ +	+++	◎
염색제 D	± ~ ++	++ ~ +++	○
염색제 E	± ~ ++	+ ~ ++	△
염색제 F	-	+ ~ ++	○
염색제 G	±	++	◎
염색제 H	- ~ ±	++ ~ +++	◎
염색제 I	-	+ ~ ++	○ ~ △
염색제 J	±	+ ~ ++	○
염색제 K	-	++	○

[0079] 실시예 5

[0080] 염색제(2) :

[0081] 20%의 수산화나트륨 용액에 시카고 스카이 블루 6B를 0.5% 및 메탄올을 20%가 되도록 가하고, 혼합, 용해하여, 염색제를 조제하였다.

[0082] 실시예 6

[0083] 염색제(3) :

[0084] 5mg의 로다민 B(알드릿치사제)와 1ml의 디메틸솔포시드를 혼합, 용해한 후, 4ml의 물을 가하였다. 이것과 40%의 수산화칼륨 용액을 1:1의 비율로 혼합, 용해하여 염색제를 조제하였다.

[0085] 실시예 7

[0086] 진균 감염 부위의 미생물의 염색 · 검출(3)

[0087] 염색제로서 실시예 6의 염색제를 이용하는 이외에는 실시예 2와 같이 염색, 경검을 하였다. 배율 400배에서의 현미경 사진을 도 2에 나타낸다

[0088] 경검 결과, 100~200배의 배율에서 염색(홍색)을 확인할 수 있고, 이것에 의해 균의 존재를 검출할 수 있었다. 다시 배율을 400배 정도로 함으로써, 피부 사상균, 칸디다균, 마라세티아균의 기생 형태도 관찰할 수 있었다.

배율 400배에서의 현미경 사진을 도 2에 나타낸다.

[0089] 실시예 8

[0090] 미생물 검출에서 메탄올 및 디메틸су폭시드의 영향(2) :

[0091] 로다민 B의 농도는 0.05%로, KOH 농도는 20%로 고정한 다음, MeOH 농도 및 DMSO 농도를 여러 가지로 변화시킨 하기의 염색제를 조제하여, 검체 세포의 염색 정도 및 미생물의 염색 정도를 실시예 4와 동일한 기준에 의해 평가하였다. 또한, 염색제의 특성도 이와 같이 종합적으로 평가하였다. 이 결과를 표 2에 나타낸다.

[0092] (염색제의 MeOH 및 DMSO 농도)

[0093] 염색제 L : MeOH 10% / DMSO 0%

[0094] 염색제 M : MeOH 25% / DMSO 0%

[0095] 염색제 N : MeOH 0% / DMSO 10%

[0096] 염색제 O : MeOH 10% / DMSO 10%

[0097] 염색제 P : MeOH 20% / DMSO 10%

[0098] 염색제 Q : MeOH 30% / DMSO 10%

[0099] 염색제 R : MeOH 40% / DMSO 10%

[0100] 염색제 S : MeOH 0% / DMSO 25%

[0101] (결과)

[0102] 표 2

염색제	염색 정도		종합평가
	검체 세포	미생물	
염색제 L	++	++	✗ ~ △
염색제 M	+++	+	✗
염색제 N	± ~ +	+++	◎
염색제 O	± ~ +	+++	◎
염색제 P	+ ~ ++	++ ~ +++	○
염색제 Q	±	++	○
염색제 R	-	+	△
염색제 S	-	+	△

[0104] 실시예 9

[0105] 염색제(4) :

[0106] 5mg의 로다민 B와 1ml의 디메틸су폭시드를 혼합, 용해한 후, 4ml의 물을 가하였다. 이것과 40%의 수산화나트륨 용액을 1:1의 비율로 혼합, 용해하여 염색제를 조제하였다.

[0107] 비교예 1

[0108] 비교 염색제(1) :

[0109] 20% 수산화칼륨 용액에 아닐린 블루(와코준야쿠고교 가부시키가이샤제)를 1% 가하고, 혼합, 용해하여 비교 염색제를 조제하였다. 이 염색제로 실시예 2와 같이 염색, 경검을 하였지만, 염색은 확인할 수 없었고, 미생물을 검출할 수 없었다.

[0110] 비교예 2

[0111] 비교 염색제(2) :

[0112] 20%의 수산화칼륨 용액에 브릴리언트 블루 R(시그마사제)를 0.5% 농도, 디메틸су폭시드를 10%가 되도록 가하고, 혼합, 용해하여 비교 염색제를 조제하였다. 이 염색제로 실시예 2와 같이 염색, 경검을 하였지만, 염색은 확인할 수 없었고, 미생물을 검출할 수 없었다.

[0113] 비교 예 3

[0114] 비교 염색제(3) :

[0115] 플라티나 스페어잉크 블루블랙 카트리지(플라티나 만넨히쓰 가부시키가이샤제)와 40%의 수산화나트륨 용액을 1 : 1의 비율로 혼합, 용해하여 비교 염색제를 조제하였다. 이 염색제로 실시예 2와 같이 염색, 경검을 하였지만, 염색은 확인할 수 없었고, 미생물을 검출할 수 없었다.

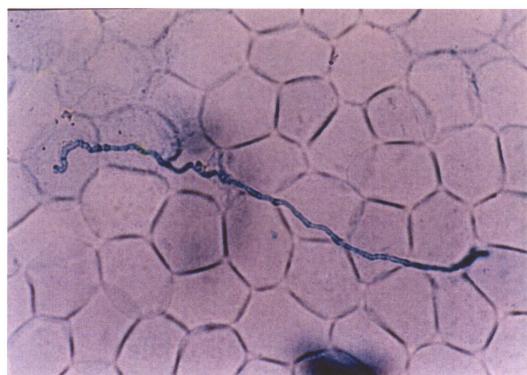
[0116] 비교 예 4

[0117] 비교 염색제(4) :

[0118] 유니볼 시그노(Uni-Ball Shigno)용 교체 심 UMR-85N 블루블랙(미츠비시 엔피쓰 가부시키가이샤제)과 40%의 수산화나트륨 용액을 1 : 1의 비율로 혼합, 용해하여, 비교 염색제를 조제하였다. 이 염색제로 실시예 2와 같이 염색, 경검을 하였지만, 염색은 확인할 수 없었고, 미생물을 검출할 수 없었다.

## 도면

### 도면1



### 도면2

