

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5498657号  
(P5498657)

(45) 発行日 平成26年5月21日(2014.5.21)

(24) 登録日 平成26年3月14日(2014.3.14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 T
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543

請求項の数 5 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2007-524828 (P2007-524828)	(73) 特許権者	595117091
(86) (22) 出願日	平成17年7月19日 (2005.7.19)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
(65) 公表番号	特表2008-507992 (P2008-507992A)		BECTON, DICKINSON AND COMPANY
(43) 公表日	平成20年3月21日 (2008.3.21)		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 07417-1880 フランクリン・レイクス
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/025511		ベクトン・ドライブ 1
(87) 国際公開番号	W02006/020280		1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY 07417-1880, UNITED STATES OF AMERICA
(87) 国際公開日	平成18年2月23日 (2006.2.23)		
審査請求日	平成20年7月11日 (2008.7.11)	(74) 代理人	110001243
審査番号	不服2012-7113 (P2012-7113/J1)		特許業務法人 谷・阿部特許事務所
審査請求日	平成24年4月18日 (2012.4.18)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	10/902, 871		
(32) 優先日	平成16年8月2日 (2004.8.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 臨床サンプルからの無傷の生体全体の磁性粒子による捕捉

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

( i ) 少なくとも 1 種の無傷の小片全体または生体全体を含有するサンプルを容器内に提供するステップ、

( i i ) 前記サンプル、少なくとも 1 種の被覆されていない未処理の磁気反応性粒子、および残部を含む混合物を生成するステップ、

( i i i ) 前記混合物に約 7 . 0 未満の pH をもたらすステップであって、前記少なくとも 1 種の被覆されていない未処理の磁気反応性粒子の表面電荷特性の変化が生じ、それによって、前記少なくとも 1 種の無傷の小片全体または生体全体が前記少なくとも 1 種の被覆されていない未処理の磁気反応性粒子と非特異的に結合し、複合体を形成するステップであって、前記少なくとも 1 種の無傷の小片全体または生体全体の非特異的な結合が可逆的な結合であるステップ、

( i v ) 前記複合体に磁場を加えるステップ、

( v ) 前記複合体に磁場が加えられる間に、前記混合物の残部を前記容器から除去するステップ、

( v i ) 前記複合体を洗浄するステップ、

( v i i ) pH を約 8 . 3 ~ 8 . 4 に上昇させて、前記少なくとも 1 種の無傷の小片全体または生体全体を、前記少なくとも 1 種の被覆されていない未処理の磁気反応性粒子から溶離するステップ、ならびに

( v i i i ) 溶離した前記少なくとも 1 種の被覆されていない未処理の磁気反応性粒子

10

20

に再び磁場を加え、それによって、前記少なくとも1種の被覆されていない未処理の磁気反応性粒子を、前記少なくとも1種の無傷の小片全体または生体全体から分離するステップ、  
を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】

さらに、(ix)前記少なくとも1種の無傷の小片全体または生体全体を、前記容器から取り出すステップ、を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ステップ(iii)で、前記少なくとも1種の無傷の小片全体または生体全体は、沈殿せずに前記少なくとも1種の磁性粒子と結合することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項4】

前記粒子は、酸化鉄、水酸化第二鉄、または四酸化三鉄を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(iii)は、混合物に約4.5~5.5のpHをもたらすことを含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本願は、2004年8月出願の米国特許出願第10/902,871号明細書に対する優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、無傷の小片全体または生体全体をサンプルから抽出し、凝縮し、かつ/または単離するための組成物および方法を対象とする。より詳細には、本発明は、無傷の小片全体または生体全体を、磁気反応性粒子と可逆的に結合させることによってサンプルから抽出し、凝縮し、かつ/または単離するための組成物および方法を対象とする。

【背景技術】

【0003】

以下の議論において、背景提示および導入目的で、いくつかの物質および方法が記載される。本明細書に含有されるものは、従来技術の「認められたもの」として解されるものではない。該当する場合、出願人は、適用可能な法による規定のもとで、本明細書で言及する物質および方法が従来技術を構成するものでないことを表明する権利を明白に留保する。

30

【0004】

サンプルからの生物学的成分の単離および/または分離は、多くの診断上および生化学上の手順において必須のタスクである。この目的を実現するための周知の技術には、生物学的材料を溶解して、それに含有される核酸を放出させ、その後、核酸の少なくとも一部を分離することが含まれる。核酸は、いくつかの異なる技術によって分離し、かつ/または取り出すことができる。このような技術の1つは、核酸を可逆的に磁性粒子に結合させることを含む。このような技術は、特許文献1および特許文献2に記載されており、それらの内容全体を参照により本明細書に組み込むものである。しかし、サンプルからの無傷の小片全体または生体全体を、凝縮し、単離し、または取り出すことが望まれる。

40

【0005】

【特許文献1】米国特許第5,973,138号明細書

【特許文献2】米国特許第6,433,160号明細書

【特許文献3】米国特許第6,672,458号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

50

本発明は、磁性粒子の表面電荷特性、および/または、小片もしくは生体それ自体の表面電荷特性を改変することによって、無傷の小片全体または生体全体を、磁性粒子に非特異的に結合させる組成物および技術を対象とする。したがって、無傷の小片全体または生体全体は、溶液からこれら小片または生体が沈殿することなく、磁性粒子と非特異的に結合する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

一態様によれば、本発明は、少なくとも1種の無傷の小片全体または生体全体を含有するサンプルを提供すること、そのサンプル、少なくとも1種の磁気反応性粒子、および残部を含む混合物を生成すること、ならびに混合物に約7.0未満のpHをもたらし、かつ、混合物に約7.0未満のpHをもたらし、かつ、少なくとも1種の磁気反応性粒子の表面電荷特性の変化が生じ、それによって少なくとも1種の無傷の小片全体または生体全体が少なくとも1種の磁気反応性粒子と非特異的に結合して、複合体を形成する。

10

【0008】

本発明の前述の特徴および他の特徴、態様、ならびに利点は、以下の説明、添付の請求項の範囲、および以下に簡潔に記載される図に示された例示的な実施形態から明らかとなる。別段の指定がない限り、同様の要素には同一の参照番号が付されることに留意されたい。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

ここで本発明の原理を、本発明のいくつかの例示的な実施形態を以下に議論し、前記の図を参照することによってさらに説明する。

【0010】

本明細書で使用する「無傷の小片全体または生体全体」は、溶解していないまたはその他の形で構成成分に分解されていない小片全体または生体全体の、天然に存在するまたは合成の任意の修飾物を意味する。無傷の小片全体または生体全体には、それらには限定されないが、細胞全体、細菌、ウイルス、寄生生物、および前記の組合せが含まれる。

【0011】

本明細書で使用する「サンプル」は、それらには限定されないが、血液、血漿、血清、尿、骨髓穿刺液、脳脊髄液、組織、細胞、食物、糞便、唾液、口内分泌物、鼻分泌物、気管支洗浄液、頸部液、およびリンパ液を含めた、任意の生物学的粒子または生体を含有する物質を意味する。場合によっては、サンプルは滅菌したものでよい。

30

【0012】

本明細書で使用する「磁気反応性粒子」は、それに付与される磁気モーメントを有することが可能であり、またはそうでなければ磁場の作用のもとで移動可能な粒子を意味する。

【0013】

本明細書で使用する「非特異的結合」は、特定の薬剤と選択的に結合するはずの受容体、捕捉剤、またはその他を介しては生ずることのない結合機構を意味する。

40

【0014】

本出願人は、磁気反応性粒子が酸性環境にあるとき、それが無傷の小片全体または生体全体と可逆的に結合することを見出した。特定の理論に拘泥するものではないが、本出願人は、酸性環境によって粒子の電気陽性の性質が高められ、それによってその粒子と電気陰性の無傷の小片全体または生体全体との結合が強まると考える。

【0015】

本発明の好ましい一実施形態によれば、磁気反応性粒子は、好ましくは被覆されず、またはそうでなければ処理されない。したがってこの粒子は、無傷の小片全体または生体全体と非特異的に結合する。本発明で有用な粒子には鉄粒子が含まれ、その鉄は、水性環境への溶解度が低い水酸化第二鉄および四酸化三鉄などの形態の酸化鉄でよい。硫化鉄およ

50

び塩化鉄などの他の鉄粒子も、本明細書に記載の条件を用いて、核酸を結合し抽出するのに適したものであってもよい。

【0016】

磁気反応性粒子の形状は、本発明にとって重要ではない。磁気反応性粒子は、例えば、球体、立方体、長円体、カプセル型、錠剤型、特徴のない任意の形状等を含めた様々な形状のものでよく、均一形状でも不均一形状でもよい。粒子の形状を問わず、その最大点での径は、一般に約0.1 μmから約20 μmの範囲である。一実施形態によれば、磁気反応性粒子は直径約1.0 μmである。

【0017】

磁気反応性粒子が、無傷の小片または生体全体と効果的かつ可逆的に結合する酸性環境は、様々な手段によって提供することができる。例えば、磁気反応性粒子を酸性溶液に添加することができ、または酸性溶液をその粒子に添加してもよい。あるいは、塩酸、硫酸、酢酸、またはクエン酸などの酸性化剤を添加することによって磁気反応性粒子が存在する溶液または環境を酸性化することもできる。ただし、磁気反応性粒子が存在する環境がpH約7.0未満のものならば、その粒子は無傷の小片全体または生体全体と可逆的に結合する。好ましい一実施形態によれば、結合を促進するために、約4.5~5.5のpHが定められる。

10

【0018】

場合によっては、1種または複数の洗浄ステップをこの段階で実施して、望ましくない物質をさらになくすことができる。適切な洗浄剤ならばいずれも使用することができる。例えば、非イオン性洗浄剤または非イオン性洗浄剤/低濃度の酸性溶液を使用することができる。

20

【0019】

結合した無傷の小片全体または生体全体は、さらなる操作のために、適切な緩衝液に溶離させることができる。結合した無傷の小片全体または生体全体を有する粒子の環境を加熱し、かつ/またはこのような環境のpHを上げることによって、このような溶離を実現することができる。無傷の小片全体または生体全体の磁性反応からの溶離の助けとするために使用できる薬剤には、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、あるいは電気陰性の無傷の小片全体または生体全体が磁気反応性粒子から移動するのに十分な程度までその環境のpHを増大する任意の化合物などの塩基性溶液が含まれる。好ましい一実施形態によれば、結合した小片または生体の放出を促進するために、約8.3~8.4のpHが定められる。

30

【0020】

次いで、無傷の小片全体または生体全体を抽出し、凝縮し、かつ/または単離することができる。その結果、無傷の小片全体または生体全体を、以下の、培養、ポリメラーゼ連鎖増幅、連鎖置換増幅、逆転写酵素連鎖置換増幅、およびリガーゼ連鎖増幅の1種または複数などのさらなるプロセスにかけることができる。

【0021】

ここで、本発明の原理に従って実施される例示的プロセスを、図1を参照することによって説明する。

40

【0022】

ステップAでは、サンプル10を容器15に配置する。サンプル10は、無傷の小片全体または生体全体20を含有する。

【0023】

次いでステップBで、サンプル10、無傷の小片全体または生体全体20、および磁気反応性粒子30を含む混合物25を形成する。この混合物のpHは、適切なレベル、好ましくは約7.0未満、より好ましくは約4.5~5.5にされる。この混合物は、任意の適切な手段によって形成することができる。例えば、磁気反応性粒子30を酸性溶液に添加することができ、または酸性溶液を粒子30に添加してもよい。あるいは、塩酸、硫酸、酢酸、またはクエン酸などの酸性化剤を添加することによって、磁気反応性粒子30が

50

存在する溶液または環境を酸性化することもできる。

【0024】

前述のように、pHの変化は、少なくとも磁気反応性粒子30の表面電荷特性の改変を引き起こして、無傷の小片全体または生体全体20が磁気反応性粒子30と結合し、それによって複合体を形成する。次いで、磁場が加えられる。ステップCに示すように、このことは、互いに逆の永久磁石40または電磁石(図示せず)を、容器15の外側に接近させることによって実現することができる。磁場の影響下で、結合した無傷の小片全体または生体全体と磁気反応性粒子の複合体は、磁石に向かって引き付けられる。次いで、混合物25の上清または残部を、容器15から除去することができる(ステップD)。

【0025】

場合によっては、1種または複数の洗浄ステップ(図示せず)をこの段階で実施して、望ましくない物質をさらになくすることができる。適切な洗浄剤ならばいずれも使用することができる。例えば、非イオン性洗浄剤または非イオン性洗浄剤/低濃度の酸性溶液を使用することができる。

【0026】

ステップEは、複合体を溶離して、無傷の小片全体または生体全体20を、磁気反応性粒子30から開放することを示すものである。この溶離は、化学薬品、熱エネルギー、またはその2つの組合せなどによる任意の適切な手段によって達成することができる。例えば、pHを適切なレベルに上昇させるために、緩衝液45を添加することができる。一実施形態によれば、pHは約8.3~8.4に上げられる。緩衝液は、KOHを含んでよい。

【0027】

次いでステップFでは、磁石40を再び容器15の近くに接近させ、今度は磁気反応性粒子30だけを容器15の側壁に引き付ける。次いで、無傷の小片全体または生体全体20を、容器15から取り出す(ステップG)。

【0028】

ステップGに続いて、無傷の小片全体または生体全体20を、以下の、培養、ポリメラーゼ連鎖増幅、連鎖置換増幅、逆転写酵素連鎖置換増幅、およびリガーゼ連鎖増幅の1種または複数などのさらなるプロセスにかけることができる。

【0029】

例示的プロセスの上記ステップは、手作業で、自動方式で、または手作業および自動ステップの組合せによって実施することができる。自動ステップは、場合によっては自動化されたピペット機能、混合機能、および磁石配置機能を含む自動ロボット装置で実施することができる。自動ロボット装置は、コンピュータ制御することができる。

【0030】

本発明は、いくつかの異なる状況で使用することができる。例えば、本発明は、その内容全体が参照により本明細書に取り込まれる特許文献3に記載のシステムおよび方法と共に使用することができる。

【0031】

ここで、本発明の原理を、以下の例示的な非限定的な実施例に則して説明する。

【実施例1】

【0032】

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)および大腸菌(*E. coli*)を、酸性緩衝液の環境から抽出できたかどうかを判定するために、ある実験を実施した。微生物の緩衝液からの回収は、以下に記載のように調製された培地を検査することによって評価した。

【0033】

pHが4.8の0.1M酢酸ナトリウム緩衝液1.0ml量を、2.0mlのマイクロ遠心チューブ内にピペットで入れ、各チューブに、平均粒径が約1.4ミクロンの四酸化三鉄50mgを入れた。1×10<sup>6</sup>CFU/mlの黄色ブドウ球菌(*S. aureus*) ATCC 25923懸濁液0.01ml量を、第1のチューブに添加し、1×10<sup>6</sup>C

10

20

30

40

50

F U / m l の大腸菌 ( E . c o l i ) A T C C 1 1 7 7 5 懸濁液 0 . 0 1 m l 量を、第 2 のチューブに添加した。

【 0 0 3 4 】

上記混合物を入れた各チューブを、N u t a t o r ミキサーで、室温で 3 時間回転させて、酸化鉄と黄色ブドウ球菌 ( S . a u r e u s ) および大腸菌 ( E . c o l i ) 各微生物との結合を促進した。次いで、ネオジム磁石をチューブの側面に 3 0 秒間配置した。

【 0 0 3 5 】

次いで、上清をピペットでチューブから取り出した。取り出した上清の一部を使用して 1 0 倍希釈液を作成した。非希釈上清および希釈上清の両方を、以下にさらに詳細に説明するように、増殖用プレートに塗布した。

10

【 0 0 3 6 】

次いで、マイクロチューブ内の酸化鉄 / 微生物の複合体を、上記の酢酸ナトリウム緩衝液で 2 回洗浄した。次いで、その複合体を、酢酸ナトリウム緩衝液 1 m l で再懸濁した。次いで、懸濁液の一部分を使用して、1 0 倍希釈液を調製した。非希釈懸濁液および希釈懸濁液の両方を、以下にさらに詳細に説明するように、増殖用プレートに塗布した。

【 0 0 3 7 】

以下の各サンプルそれぞれ 0 . 1 m l 量を、3 つの異なる B B L T M 血液寒天プレート ( 羊血 5 % の T S A I I ) のそれぞれの上にピペットで置き広げた。

- ( i ) 黄色ブドウ球菌 ( S . a u r e u s ) 非希釈上清 ;
- ( i i ) 黄色ブドウ球菌 ( S . a u r e u s ) 希釈上清 ;
- ( i i i ) 黄色ブドウ球菌 ( S . a u r e u s ) 酸化鉄非希釈懸濁液 ;
- ( i v ) 黄色ブドウ球菌 ( S . a u r e u s ) 酸化鉄希釈懸濁液 ;
- ( v ) 大腸菌 ( E . c o l i ) 非希釈上清 ;
- ( v i ) 大腸菌 ( E . c o l i ) 希釈上清 ;
- ( v i i ) 大腸菌 ( E . c o l i ) 酸化鉄非希釈懸濁液 ; および
- ( v i i i ) 大腸菌 ( E . c o l i ) 酸化鉄希釈懸濁液。

20

【 0 0 3 8 】

各プレートを、3 6 ° C 、周囲空気下で 2 4 時間インキュベートした。全回収物を測定するために、各プレート上のコロニー数を計数し、非希釈サンプルについては 1 0 を乗じ、希釈サンプルについては 1 0 0 を乗じた。算出したコロニー数を、以下の表 I および I I に記録する。

30

【 0 0 3 9 】

【 表 1 】

表 I - 黄色ブドウ球菌 ( S . a u r e u s ) 回収物

サンプル	プレート 1	プレート 2	プレート 3	平均
( i )	0	0	0	0
( i i )	0	0	0	0
( i i i )	TNTC*	TNTC	TNTC	TNTC
( i v )	23400	16800	19900	20033

\* = 多数にて計数できず ( T N T C )

40

【 0 0 4 0 】

## 【表 2】

表 I I - 大腸菌 (E. coli) 回収物

サンプル	プレート 1	プレート 2	プレート 3	平均
(v)	40	60	80	60
(vi)	0	0	100	33
(vii)	1980	2730	710	1807
(viii)	2000	600	400	1000

## 【0041】

上記の記録されたデータから、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) および大腸菌 (E. coli) の両方が、pH 4.8 の酢酸ナトリウム緩衝液中、酸化鉄との結合により捕捉されたことが明らかとなる。一方、上清には、ごく少数の微生物しか存在していないと思われる (すなわち、酸化鉄と未結合)。

## 【実施例 2】

## 【0042】

黄色ブドウ球菌 (S. aureus) を、蓄尿サンプルから抽出できたかどうかを判定するために、ある実験を実施した。尿からの微生物の回収物を、以下に記載のように調製された培地を調査することによって評価した。

## 【0043】

健康な男性および女性ドナーの蓄尿の pH を、pH 4.8 の 0.1 M 酢酸緩衝液を用いて、pH 4.8 に調節した。pH 調節された尿 1.0 ml 量を、約 1.4 ミクロンの平均粒径の四酸化三鉄 50 mg を入れた 2.0 ml マイクロ遠心チューブ内にピペットで入れた。1 × 10<sup>6</sup> CFU/ml の黄色ブドウ球菌 (S. aureus) ATCC 25923 懸濁液 0.01 ml 量を、チューブに添加した。

## 【0044】

上記混合物を入れた各チューブを、Nutator ミキサーで、室温で 2 時間回転させて、酸化鉄と微生物黄色ブドウ球菌 (S. aureus) との結合を促進した。次いで、ネオジム磁石をチューブの側面に 30 秒間配置した。

## 【0045】

次いで、上清をピペットでチューブから取り出した。非希釈上清を、以下にさらに詳細に説明するように、増殖用プレートに塗布した。

## 【0046】

次いで、マイクロチューブ内の酸化鉄 / 微生物の複合体を、上記の酢酸ナトリウム緩衝液で 2 回洗浄した。次いで、その複合体を、0.154 M 塩酸ナトリウム溶液 1 ml で再懸濁した。非希釈懸濁液を、以下にさらに詳細に説明するように、増殖用プレートに塗布した。

## 【0047】

上記の上清および懸濁液のそれぞれ 0.1 ml 量を、3 つの異なる BBLTM 血液寒天プレート (羊血 5% の TSA II) のそれぞれの上にピペットで置き、広げた。各プレートを、36、周囲空気下で 24 時間インキュベートした。全回収物を測定するために、各プレート上のコロニー数を計数し、10 を乗じた。算出したコロニー数を、以下の表 III に記録する。

## 【0048】

10

20

30

40

## 【表 3】

表 I I I - 黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 回収物

サンプル	プレート 1	プレート 2	プレート 3	平均
上清	3440	4290	3630	3786
懸濁液	> 10,000*	> 10,000	> 10,000	> 10,000

\* = 多数にてプレート全体を計数できず、1つのプレートの1/4を計数したものに4を乗じ、次いで10を乗じて全プレートについての概算に達する。

## 【0049】

10

上記の記録されたデータから、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) が、pH 4.8の酢酸ナトリウム緩衝液中、酸化鉄との結合により捕捉されたことが明らかとなる。一方、上清には、懸濁液よりも有意に少ない数の微生物が存在していると思われる(すなわち、酸化鉄と未結合)。

## 【0050】

本発明の好ましい実施形態と共に詳細に記載するように、本発明は多くの異なる形態の実施形態によって満たされるが、本開示は本発明の例示的な原理としてみなされるべきであり、本発明を、本明細書に示し説明する特定の実施形態に制限するものではないことが理解されよう。多数の変形形態は、当分野の技術者によって、本発明の精神から逸脱することなく行われ得る。本発明の範囲は、添付の請求項の範囲およびそれらの均等物によって推測されることになる。

20

## 【0051】

当分野の技術者なら誰でも本発明を行いまたは使用することができるように、先に記載の実施形態が提示される。これらの実施形態に対する様々な変更形態も可能であり、本明細書に示される一般的な原理は、他の実施形態に同様に適用することができる。要約は、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。というのはその目的は、適切な当局ならびに一般社会が、本発明の一般的性質を迅速に決定することを可能にするためのものだからである。

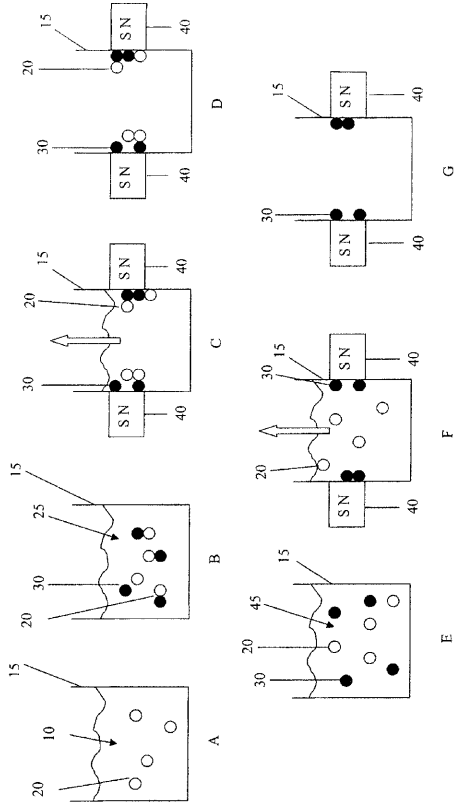
## 【図面の簡単な説明】

## 【0052】

30

【図 1】本発明の原理に従って実施されるプロセスの一実施形態を示す略図である。

【 1】



---

フロントページの続き

(74)復代理人 100133721

弁理士 主代 静義

(72)発明者 レイ エー・マクミラン

アメリカ合衆国 21093 メリーランド州 ティモニウム・ライスター ドライブ 714

合議体

審判長 郡山 順

審判官 齊藤 真由美

審判官 小川 慶子

(56)参考文献 特開2003-210158(JP,A)

特表2002-543835(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-5/28, G01N 33/50-33/98