

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-503975

(P2012-503975A)

(43) 公表日 平成24年2月16日(2012.2.16)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	C 4 B 0 6 3

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2011-528176 (P2011-528176)
 (86) (22) 出願日 平成22年1月14日 (2010.1.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年3月28日 (2011.3.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2010/000064
 (87) 国際公開番号 W02010/111883
 (87) 国際公開日 平成22年10月7日 (2010.10.7)
 (31) 優先権主張番号 200910043007.0
 (32) 優先日 平成21年4月1日 (2009.4.1)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 511056725
 湖南省天騎医学新技▲術▼有限公司
 中国湖南省▲長▼沙市▲楓▼林二路366
 号裕▲園▼大厦3单元16楼1608室
 (74) 代理人 110000659
 特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
 (72) 発明者 ▲膨▼▲鈞▼
 中国湖南省▲長▼沙市▲楓▼林二路366
 号裕▲園▼大厦3单元16楼1608室
 Fターム(参考) 4B029 AA07 BB02 CC01 FA02
 4B063 QA06 QQ06 QR68 QR69 QR74
 QR82 QS11 QS40 QX01

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤感受性試験方法および薬剤感受性試験装置

(57) 【要約】

【解決手段】本発明は、薬剤感受性試験方法およびその装置に関し、その試験方法は、以下の各ステップを含む。濃縮された細菌または細胞の標本の中に、コロイド材料を含む培養液製の液状標本を添加し、凝固補助剤を添加して、前記標本を凝固させてゲル標本を形成する。その表面に薬剤のペーパーディスクを貼り、培養後に薬剤の阻止円を観察し、薬剤に対する感受性を確定する。前記薬剤感受性試験装置は、透明材料製の箱体を用い、かつそのキャビティの中に凝固補助剤を含む。

【選択図】 図 1

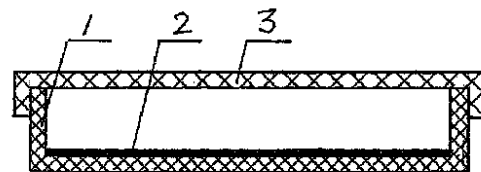


図 1 / Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (1) 検査する細菌標本または細胞標本を濃縮するステップと、
 (2) 検査する細菌標本または細胞標本の中に、栄養物質、コロイド材料を含む培養液を添加し、液状試験標本を作成するステップと、
 (3) 液状試験標本の中に、コロイド材料と反応してゲル状を形成することが可能な凝固補助剤を添加し、ゲル試験標本を作成するステップと、
 (4) ゲル試験標本の表面に薬剤のペーパーディスクを貼るステップと、
 (5) それをインキュベーターの中に入れて培養するステップと、
 (6) 薬剤の阻止円を観測し、薬剤に対する感受性を確定するステップと、
 を含んでなることを特徴とする、細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

10

【請求項 2】

前記培養液が細菌細胞増殖指示薬を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

【請求項 3】

液状試験標本をインキュベーターの中に入れて、2～4日間増殖培養することを特徴とする、請求項 1 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

【請求項 4】

液状試験標本をインキュベーターの中に入れて、2～4日間増殖培養することを特徴とする、請求項 2 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

20

【請求項 5】

前記培養液の中に静菌剤を含むことを特徴とする、請求項 1、2、3 又は 4 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

【請求項 6】

前記培養液の中の栄養物質と、コロイド材料との間の配合比が、栄養物質 100 ml につきコロイド材料 0.8 g～2 g を加え、栄養物質 100 ml につき凝固補助剤 0.1 g～0.2 g を配合することを特徴とする、請求項 1 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

【請求項 7】

前記培養液の中の栄養物質と、コロイド材料と、細菌細胞増殖指示薬との間の配合比が、栄養物質 100 ml につきコロイド材料 0.8 g～2 g を加え、細菌細胞増殖指示薬 2 mg～20 mg を加え、栄養物質 100 ml につき凝固補助剤 0.1 g～0.2 g を配合することを特徴とする、請求項 2、3 又は 4 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

30

【請求項 8】

前記培養液の中の栄養物質と、コロイド材料と、細菌細胞増殖指示薬と、静菌剤との間の配合比が、栄養物質 100 ml につきコロイド材料 0.8 g～2 g を加え、細菌細胞増殖指示薬 2 mg～20 mg を加え、静菌剤適量を加え、栄養物質 100 ml ごとに凝固補助剤 0.1 g～0.2 g を配合することを特徴とする、請求項 5 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

40

【請求項 9】

培養液を 1 回に使用する量に小分けし、密封して保存することを特徴とする、請求項 1、2、3、4 又は 6 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

【請求項 10】

培養液を 1 回に使用する量に小分けし、密封して保存することを特徴とする、請求項 5 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

【請求項 11】

培養液を 1 回に使用する量に小分けし、密封して保存することを特徴とする、請求項 7 に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

【請求項 12】

50

培養液を1回に使用する量に小分けし、密封して保存することを特徴とする、請求項8に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法。

【請求項13】

請求項1に記載の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法に用いられる薬剤感受性試験装置であって、周壁および底部が閉じられると共に上端が開いた構造を有する箱体(1)を備え、その箱体(1)のキャビティの中に凝固補助剤が置かれることを特徴とする、薬剤感受性試験装置。

【請求項14】

徐放体と、徐放体の中に付着した凝固補助剤とからなる凝固補助層(2)が、箱体(1)のキャビティの底部に設けられていることを特徴とする、請求項13に記載の薬剤感受性試験装置。

【請求項15】

接着剤と凝固補助剤とを混合した後に箱体(1)の底部に塗布する構造形式である凝固補助層(2)が、箱体(1)のキャビティの底部に設けられていることを特徴とする、請求項13に記載の薬剤感受性試験装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細菌または細胞の薬剤感受性試験方法および薬剤感受性試験装置に関する。

【背景技術】

【0002】

薬剤感受性試験は、細菌または細胞の薬剤耐性を検査する重要な試験である。従来の薬剤感受性試験方法で用いられている培地は、一般に、液体培地と固体培地の2種に分かれる。その試験方法は、一般にペーパーディスク試験法および濃度試験法がある。ペーパーディスク試験法で採用されるのは固体培地であり、濃度試験法で採用されるのは液体培地である。ペーパーディスク試験法は、固体培地表面に貼られたペーパーディスクによって形成される薬剤の阻止円を観察することによって、結核菌の薬剤に対する感受性を確定する。濃度試験法は、異なる薬剤および異なる薬剤濃度試験容器の中の細菌または細胞の成長状況を観察し検査することによって、細菌または細胞の薬剤に対する感受性を確定する。ペーパーディスク試験法であっても濃度試験法であっても、その薬剤感受性試験プロセス全体を、一般に、細菌または細胞の濃縮、増殖または分離培養および薬剤感受性試験の3段階に分けることができる。例えば、従来の技術を用いて結核菌に対して薬剤感受性試験を行う場合、一般に、ペーパーディスク試験法および濃度試験法があり、その試験プロセス全体を、一般に結核菌の濃縮、増殖または分離培養および薬剤感受性試験の3段階に分けることができる。従来のペーパーディスク試験法で、結核菌濃縮段階のステップは、以下のとおりである。(1)患者が提供した標本をピペットで吸い取り、試験容器の中に置く。(2)試験容器の中に消化液を添加し、標本粘液に対して消化を行い、標本中の粘液および不純物の中に包まれた細菌を十分に露出させる。(3)遠心分離し、上清液を捨て、結核菌標本を得る。結核菌標本が得られた後に、増殖または分離培養を行う。増殖または分離培養段階のステップは、以下のとおりである。(4)すでに濃縮した結核菌標本を少し取り、濃縮菌液を調製する。(5)濃縮菌液を、例えばレーベンシュタイン・イエンセン培地などの固体培地に接種して、増殖または分離培養を行う。一般に、37のインキュベーターの中で1ヵ月程度培養し、1つの細菌を培養して細菌コロニーをなす。細菌コロニーを得た後、薬剤感受性試験段階に入る。薬剤感受性試験段階のステップは、以下のとおりである。(6)少量の細菌コロニーを取り、一般に、1~3個の細菌コロニーを取り、溶解分散して濃縮菌液をなす。(7)濃縮菌液を、例えば寒天培地などの固体培地表面に接種する。(8)固体培地表面に薬剤のペーパーディスクを貼る。(9)37のインキュベーターの中に入れて1ヵ月程度培養し、薬剤の阻止円を観察し、結核菌の薬剤に対する感受性を確定する。従来のペーパーディスク試験法の長所は、操作が便利で、設備が簡単で、投資が小さいことであるが、以下の欠点が存在する。(欠点1)：試験全体に必要な時間が長ず

10

20

30

40

50

ざる。増殖または分離培養段階に1ヵ月程度かかり、薬剤感受性試験段階に約1ヵ月程度かかり、試験プロセス全体で約2ヵ月程度かかる。薬剤感受性試験で結果が得られた後になってから薬剤を使用して治療すると、治療のタイミングに深刻な影響を及ぼすことがある。臨床上、薬剤感受性試験がない状況で薬剤を使用して治療した場合、結核菌薬剤耐性の重篤な結果をもたらすことがよくある。(欠点2)：安全でない。試験全体で2回の人による接種が必要である。結核菌は伝染性を有するため、操作員に安全上の危惧をもたらし、環境を汚染する虞がある。

【0003】

従来の濃度試験法には、2種の方法がある。1種の濃度試験法は、増殖培養段階で固体培地を採用する。その結核菌濃縮および増殖または分離培養の2つの段階のステップは、従来のペーパーディスク試験法と同じであるが、薬剤感受性試験段階のステップは、従来のペーパーディスク試験法と異なる。具体的には、以下のとおりである。増殖または分離培養して得た細菌コロニーを固体培地から取る。一般に、1つまたは数個の細菌コロニーを取る。溶解分散して菌懸濁液をなす異なる薬剤および異なる濃度で調製してなした複数個の試験容器の中に菌懸濁液を入れ、比較試験標本をつくる。試験容器の中の細菌の成長状況を観察し、検査し、結核菌の薬剤に対する感受性を確定する。この種の試験方法の長所は、設備が簡単で、投資が小さいことであるが、以下の欠点が存在する。(欠点1)：所要時間が長い。増殖または分離培養段階の方法およびステップは、従来のペーパーディスク試験法の方法およびステップと同じであるため、増殖または分離培養段階だけでも所要時間が1ヵ月程度かかる。(欠点2)：操作が面倒であり、安全でなく、かつ誤った試験結果をもたらしやすい。複数個の試験容器を調製する必要があるため、調製プロセスが面倒であり、安全でなく、操作員に安全上の危惧をもたらし、環境を汚染する虞がある。複数個の試験容器調製プロセスにおいて、その他の細菌に比較的汚染されやすく、誤った試験結果をもたらす可能性がある。もう1種の濃度試験法は、増殖または分離培養段階で液体培地を採用する。この種の試験方法は、例えば、BD社が販売しているバクテック9000MBおよびバクテックMGIT960全自動高速マイコバクテリウム培養薬剤感受性判定システムなど、一般に専用装置の試験を採用する。その長所は、操作が簡単で、試験プロセスの時間が短く、平均検出時間は14.4日であり、最も速くて10日程度である。しかしながら、存在する主な欠点は、装置設備の価格が高く、投資が大きいことである。使用コストの高さは、1つ目には装置設備の使用コストが高く、2つ目には複数個の比較試験標本が必要であり、試薬のコストが比較的高いことである。その費用は比較的大きく、一般の病院では負担が難しく、普及推進が難しくなっている。

【0004】

In-Vitro細胞に対して薬剤感受性試験を行う方法は比較的多く、よく用いられる方法としては、MTT比色法、放射性同位体取込法などがあるが、いずれも操作が面倒で、誤った試験結果がもたらされやすいなどの欠点が存在する。その理由は、異なる薬剤および異なる濃度の複数個の試験容器の調製が必要であり、かつ各試験容器の中に細胞懸濁液を加えなければならず、調製および細胞懸濁液を加えるプロセスが面倒なためである。複数個の試験容器を調製するプロセスにおいて、比較的汚染されやすく、誤った試験結果をもたらす可能性がある。

【0005】

上述した結核菌薬剤感受性試験を詳細に分析することによって、従来の細菌、細胞薬剤感受性試験方法、特に結核菌試験方法に以下の欠点が存在することが分かる。

- (1) 試験プロセス全体の所要時間が長い。
- (2) 操作が面倒である。
- (3) 安全でない。
- (4) 誤判定が出やすい。
- (5) 投資が大きく、普及推進が難しい。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】（ 特になし ）

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明の目的は、試験プロセスの時間が短い、細菌または細胞の薬剤感受性試験方法および薬剤感受性試験装置を提供することである。もう一つの目的は、投資を少なくし、使用コストを低くすることである。さらにもう一つの目的は、安全で便利に使用できるようにすることである。

【 課題を解決するための手段 】

10

【 0 0 0 8 】

前記目的を実現するために、本発明の細菌または細胞の薬剤感受性試験方法は、以下のステップを含む。

（ 1 ） 検査する細菌標本または細胞標本を濃縮する。

（ 2 ） 検査する細菌標本または細胞標本の中に、栄養物質、コロイド材料を含む培養液を添加し、液状試験標本を作成する。

（ 3 ） 液状試験標本の中に、コロイド材料と反応してゲル状を形成することが可能な凝固補助剤を添加し、ゲル試験標本を作成する。

（ 4 ） ゲル試験標本の表面に薬剤のペーパーディスクを貼る。

（ 5 ） それをインキュベーターの中に入れて培養する。

20

（ 6 ） 薬剤の阻止円を観測し、薬剤に対する感受性を確定する。

【 0 0 0 9 】

前記細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、前記培養液が細菌細胞増殖指示薬を含む。

【 0 0 1 0 】

前記細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、液状試験標本をインキュベーターの中に入れて、2～4日間増殖培養する。

【 0 0 1 1 】

前記細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、前記培養液の中に静菌剤を含む。

【 0 0 1 2 】

前記細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、前記培養液の中の栄養物質と、コロイド材料との間の配合比が、栄養物質 100 ml につきコロイド材料 0.8 g ~ 2 g を加え、栄養物質 100 ml につき凝固補助剤 0.1 g ~ 0.2 g を配合する。

30

【 0 0 1 3 】

前記細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、前記培養液の中の栄養物質と、コロイド材料と、細菌細胞増殖指示薬との間の配合比が、栄養物質 100 ml につきコロイド材料 0.8 g ~ 2 g を加え、細菌細胞増殖指示薬 2 mg ~ 20 mg を加え、栄養物質 100 ml につき凝固補助剤 0.1 g ~ 0.2 g を配合する。

【 0 0 1 4 】

前記細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、前記培養液の中の栄養物質と、コロイド材料と、細菌細胞増殖指示薬と、静菌剤との間の配合比が、栄養物質 100 ml につきコロイド材料 0.8 g ~ 2 g を加え、細菌細胞増殖指示薬 2 mg ~ 20 mg を加え、静菌剤適量を加え、栄養物質 100 ml ごとに凝固補助剤 0.1 g ~ 0.2 g を配合する。

40

【 0 0 1 5 】

前記細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、培養液の 1 回に使用する量に小分けし、密封して保存する。

【 0 0 1 6 】

前記細菌、細胞の薬剤感受性試験方法の薬剤感受性試験装置は、周壁および底部が閉じられ、上端が開いた構造形式を有する箱体を含み、箱体のキャビティの中に凝固補助剤が置かれる。

【 0 0 1 7 】

50

前記薬剤感受性試験装置は、徐放体と、徐放体の中に付着した凝固補助剤とからなる凝固補助層が、箱体のキャビティの底部に設けられる。

【0018】

前記薬剤感受性試験装置は、接着剤によって凝固補助剤と混合した後に箱体の底部に塗布する構造形式である凝固補助層が、箱体のキャビティの底部に設けられている。

【0019】

前記薬剤感受性試験装置は、箱体の底部に目盛が設けられている。

【0020】

前記薬剤感受性試験装置は、箱体の開いた端にそれと合わせた蓋が設けられる。

【0021】

本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、その培養液の中の栄養物質が、栄養成分と、緩衝剤とを含む。その作用は、細菌または細胞の成長のために、栄養を提供し、培養液のPHを制御することである。異なる細菌または細胞に対して、異なる栄養物質の組成を選定することができる。例えば、結核菌は7H9培地を選定することができ、普通細菌または真菌は普通ブイヨン配合を選定することができ、腫瘍細胞は細胞培地配合を選定することができる。培養液の中のコロイド材料の作用は、培養液の中に凝固補助剤を添加する前に、コロイド材料がその中に溶解して、培養液が液状を呈するようにし、培養液の中に凝固補助剤を添加した後、コロイド材料が凝固補助剤と反応して、安定したゲルを培養液が一定時間内に形成するようにすることである。0.5~1.5%アルギン酸ナトリウムまたは0.5~2.0%ペクチン、0.5~1.5%カラギーナンなどを選定することができる。培養液の中の細菌細胞増殖指示薬の作用は、細菌または細胞の増殖繁殖プロセスにおいてMTTを分解して青色の点状の色団を形成することによって、短時間内に各細菌または細胞が肉眼で見える青色の粒子状の点を形成し、肉眼または低倍率の顕微鏡で点の性質および数量を正確に観察して細胞または細菌の成長状況を確定することができるようにすることである。3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(その商品名はMTT,英語名:3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)を選定することができる。

【0022】

培養液の中に静菌剤を加えるのは、主に結核マイコバクテリウム薬剤感受性試験に用いられ、その作用は、抗酸菌以外のその他の雑菌の成長を抑制することである。

【0023】

本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法で用いる凝固補助剤の作用は、凝固補助剤が培養液の中のコロイド材料と反応して、安定したゲルを培養液が一定時間内に形成するようにすることである。カルシウムイオンまたはマグネシウムイオン、ホウ砂、クエン酸カリウムなどを選定することができる。

【0024】

本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、その薬剤感受性試験装置が、周壁および底部が閉じられ、上端が開いた構造形式を有する箱体を含み、箱体の中に凝固補助剤が置かれ、培養液の中にコロイド材料が添加され、液状試験標本は培養液を用いてなるため、液状試験標本の中にコロイド材料を有し、液状試験標本を薬剤感受性試験装置内に入れる以前は液状を呈しており、薬剤感受性試験装置に入れた後、試験標本の中のコロイド材料が薬剤感受性試験装置の中の凝固補助剤と反応して、安定したゲル状を常温で急速に形成し、ゲル試験標本を形成することができる。こうすることによって、薬剤のペーパーディスクをゲル試験標本の表面に貼ることができるため、薬剤のペーパーディスクを用いて、細菌または細胞の薬剤に対する感受性を試験することができる。

【0025】

本発明が、従来細菌、細胞の薬剤感受性試験方法に比べ、試験プロセス全体の時間が短い理由は、以下のとおりである。(1):患者から提供された標本の中の検査する細菌または細胞を十分に利用する。患者から提供された標本の中の細菌または細胞の大部分が濃縮

10

20

30

40

50

されて試験標本の作成に用いられ、また試験標本はすべてが薬剤感受性試験に用いられるため、患者から提供された標本の中の検査する細菌または細胞が十分に利用される。(2): 増殖もしくは分離培養段階を省略するか、または増殖もしくは分離培養時間を短くすることができる。一般の細菌または細胞に対して薬剤感受性試験を行う場合、同時に6個の薬剤のペーパーディスク試験を行えば要求を満たすことができるため、薬剤感受性試験装置のキャピティの面積は、同時に6個の薬剤のペーパーディスクの薬剤感受性試験を行うように設計することができる。薬剤感受性試験は、細菌または細胞の薬剤耐性を検査するため、薬剤感受性試験を行う前に、すべての患者に対して確定診断が行われている。すでに確定診断が行われた一般の患者にとって、本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法は、提供された標本の中の細菌または細胞を十分に利用するため、薬剤感受性試験を行うときに、薬剤感受性試験装置のキャピティの中の単位面積あたりの細菌または細胞の数が比較的大きく、薬剤感受性試験の細菌または細胞に対する数の要求を十分に満たし、増殖培養によって細菌または細胞の数をさらに増やす必要がない。確定診断時に、患者から提供された標本に含まれる検査する細菌の量が比較的少ないことが確認された場合には、作成された液状試験標本をインキュベーターの中に置いて増殖培養を行ってから、液状試験標本を薬剤感受性試験装置の中に入れ、薬剤感受性試験を行うべきである。本発明の増殖培養は、液状培地の中で行われるため、相対的に、細菌の液状培地中での増殖速度は、固体培地上での増殖速度に比べて速い。さらに、患者によって提供された標本の中の検査する細菌または細胞を充分利用し、増殖培養前の初期数量を比較的大きくする。そのため、増殖培養の時間が短くなる。例えば、結核菌に対して、中国疾病予防センターが編著し、中国協和医科大学出版社が2004年7月1日に出版した『中国結核病予防治療計画 喀痰塗抹標本顕微鏡検査品質保証マニュアル』における規定により、チール・ネルゼン染色法を採用し、顕微鏡検査の結果、抗酸菌陽性(4+) : 1視野あたり10本以上であった場合、増殖培養を行わずに、薬剤感受性試験段階に直接入ることができる。このようにして、本発明は、増殖培養段階を省略するため、試験全体の時間が節約される。顕微鏡検査の結果、抗酸菌陽性(3+) : 1視野あたり1~9本以下であった場合、増殖培養を行うべきである。液状培地の中での増殖速度は速く、また初期菌量は大きく、従来の増殖培養の所要時間に比べ、所要時間が短いため、試験全体の時間が節約される。(3): 薬剤感受性試験段階の時間が短い。初期数量が大きいため、薬剤の阻止円の形成が比較的容易である。従来のペーパーディスク試験法に比べて所要時間が短いため、試験全体の時間が節約される。さらに、細菌細胞増殖指示薬の呈色作用によって、細菌または細胞の繁殖成長状況および薬剤の阻止円をさらに良好に示すことができ、観察、検査にさらに便利であり、試験時間をさらに短くすることができる。発明者が繰り返し試験を行った結果、本発明の細菌、細胞薬剤感受性試験方法を用いて結核菌薬剤感受性試験を行うことによって、増殖培養段階を省略することができ、増殖培養が必要である場合でも、2~4日しか必要でなく、薬剤感受性試験段階は5~7日しか必要でなく、試験プロセス全体で14日もかからないことが証明された。上述した内容を総合すると、本発明は試験プロセスの時間を短くする目的を実現(達成)している。

【0026】

本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法が、投資が少なく、使用コストが低い理由は以下のとおりである。本発明を実施するために必要な設備は、従来のペーパーディスク試験法と基本的に同じであり、遠心装置、薬剤感受性試験装置などと組み合わせるだけでよい。前記遠心装置、薬剤感受性試験装置などは、製造が簡単で生産コストが低いため、設備全体の投資が少ない。本発明を実施するには、ディスポーザルの試験容器および栄養物質、緩衝剤、コロイド材料、指示薬などの試薬を組み合わせる必要があり、これらのディスポーザルの試験容器および試薬のコストが低く、かつ使用数量が少ない。また、本発明の装置設備の投資が少なく、使用コストが低く、本発明の使用コストをさらに減少させる。そのため、本発明は、投資が少なく、使用コストが低いという目的を有効に実現(達成)する。

【0027】

10

20

30

40

50

本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法の使用が安全で便利な理由は、以下のとおりである。本発明は、検査する標本を濃縮し、結果の判定をディスポーザルの密閉容器内で行うことができ、その他器材を汚染することがなく、操作の完了後にまとめて消毒処理する。また、試験プロセス全体の手作業の手順が少なく、簡単であるため、細菌の作業員および環境に対する影響を最大限に減少させ、試験の生物学的安全性を大幅に向上させることができる。本発明は、ディスポーザルの培養液を密封瓶の中に注入し、使用時に、密封瓶を開け、培養液と濃縮した細菌または細胞とを均一に混ぜた後、薬剤感受性試験装置の中に入れるだけでよい。操作が簡単で便利であるため、本発明は、安全で便利に使用するという目的を有効に実現（達成）することができる。

【0028】

次に、図面および実施例と合わせ、本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法および薬剤感受性試験装置について詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】本発明における薬剤感受性試験装置の正面断面の概略図である。

【図2】図1に示す下面の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0030】

図に示すように、箱体（1）は、周壁および底部が閉じられ、上端が開いた構造形式である。徐放体と、徐放体の中に付着した凝固補助剤とからなる凝固補助層（2）が、箱体（1）内に設けられている。箱体（1）の底部に目盛（4）が設けられ、箱体（1）の開いた端に合わせて蓋（3）を有する。

【0031】

本発明の薬剤感受性試験装置の凝固補助層（2）における徐放体は、徐放膜とすることができる。培養液を箱体（1）の中に入れた後、この徐放膜が培養液の中に溶解することができ、凝固補助剤が徐放体の中に付着する。糖と凝固補助剤との混合を採用し、吹付塗布の方法を用いて箱体（1）の中に凝固補助層を形成することもできる。

【0032】

次に、本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法および薬剤感受性試験装置を「結核菌薬剤感受性試験に用いた実施例」を示す。

【0033】

チール・ネルゼン染色法を採用して確定診断を行い、顕微鏡検査の結果、抗酸菌陽性（4+）：1視野あたり10本以上であったものに対して、以下の薬剤感受性試験を行った。

1. 患者の朝の喀痰標本を5ml取り、4%水酸化ナトリウムで消化（溶解）した。
2. 遠心機の中に置き、4500回転で10分間遠心分離し、標本の中の結核菌を十分に沈殿させた。
3. 上清液を捨てた。
4. 培養液20mlを用いて沈殿物を溶離し、液体菌懸濁液形式の液状試験標本を作成した。
5. 液状試験標本を均一に薬剤感受性試験装置の箱体の中に入れ、培養液の中のコロイド材料と箱体の中の凝固補助剤とを反応させ、3時間以内に凝固させて安定したゲルをなし、ゲル試験標本を形成した。
6. ゲル試験標本の表面の所定の位置に測定する薬剤のペーパーディスクを貼った。
7. 蓋をして、37℃のインキュベーターの中に置き、5～7日間培養した。結核菌は増殖繁殖プロセスにおいてMTTを分解して青色の点状の色団を形成するが、薬剤が結核菌に対して阻止作用を有している場合、薬剤のペーパーディスクが貼られたゲル試験標本の周囲に青い色団を形成することができないため、阻止円が形成された。
8. 阻止円の大きさに基づき、薬剤の細菌に対する作用の効果を判断した。

【0034】

10

20

30

40

50

本実施例における培養液 20 ml で採用した配合は、栄養物質が 7 H 9 配合 20 ml、細菌細胞増殖指示薬が 3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウムプロミド 0 . 4 mg、コロイド材料が 0 . 5 ~ 1 . 5 % アルギン酸ナトリウム 0 . 17 g、阻害剤が 0 . 4 mg マラカイトグリーンであった。本実施例における凝固補助剤は、カルシウムイオン 0 . 02 g であった。

【 0 0 3 5 】

本実施例における培養液 20 ml に採用する配合は、さらに、栄養物質が 7 H 9 配合 20 ml、細菌細胞増殖指示薬が 3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウムプロミド 0 . 5 mg、コロイド材料が 0 . 5 ~ 1 . 5 % アルギン酸ナトリウム 0 . 3 g、阻害剤が 0 . 4 mg マラカイトグリーン 0 . 8 ml とし、本実施例における凝固補助剤を、カルシウムイオン 0 . 03 g とすることも可能である。

10

【 0 0 3 6 】

本実施例における培養液 30 ml に採用する配合は、さらに、栄養物質が 7 H 9 配合 20 ml、細菌細胞増殖指示薬が 3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウムプロミド 4 mg、コロイド材料 0 . 4 g、阻害剤が 0 . 4 mg マラカイトグリーンとし、本実施例における凝固補助剤を、カルシウムイオン 0 . 04 g とすることも可能である。

【 0 0 3 7 】

チール・ネルゼン染色法を採用して確定診断を行い、顕微鏡検査の結果、抗酸菌陽性 (3 +) : 1 視野あたり 1 ~ 9 本以下であったものに対して、以下の薬剤感受性試験を行った。

20

- 1 . 患者の朝の喀痰標本を 5 ml 取り、4 % 水酸化ナトリウムで消化 (溶解) した。
- 2 . 遠心機の中に置き、4500 回転で 10 分間遠心分離し、標本の中の結核菌を十分に沈殿させた。
- 3 . 上清液を捨てた。
- 4 . 培養液 20 ml を用いて沈殿物を溶離し、液体菌懸濁液形式の液状試験標本を作成した。
- 5 . 液状試験標本を 37 °C のインキュベーターの中に置き、2 ~ 4 日間増菌培養し、液状試験標本が淡青色を呈する変化が観察された。
- 6 . 増菌後の液状試験標本を均一に薬剤感受性試験装置の箱体の中に入れ、培養液の中のコロイド材料と箱体の中の凝固補助剤とを反応させ、3 時間以内に凝固させて安定したゲルをなし、ゲル試験標本を形成した。
- 7 . ゲル試験標本の表面の所定の位置に測定する薬剤のペーパーディスクを貼った。
- 8 . 蓋をして、37 °C のインキュベーターの中に置き、5 ~ 7 日間培養した。結核菌は増殖繁殖プロセスにおいて MTT を分解して青色の点状の色団を形成するが、薬剤が結核マイコバクテリウムに対して阻止作用を有している場合、結核マイコバクテリウムが正常に繁殖することができず、薬剤のペーパーディスクが貼られたゲル試験標本の周囲に青い色団を形成することができないため、阻止円が形成された。
- 9 . 阻止円の大きさに基づき、薬剤の細菌に対する作用の効果を判断した。

30

【 0 0 3 8 】

本実施例における培養液 20 ml で採用する配合は、さらに、栄養物質が 7 H 9 配合 20 ml、細菌細胞増殖指示薬が 3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウムプロミド 0 . 5 mg、コロイド材料が 0 . 5 ~ 1 . 5 % アルギン酸ナトリウム 0 . 3 g、阻害剤が 0 . 4 mg マラカイトグリーンとすることも可能である。本実施例における凝固補助剤は、カルシウムイオン 0 . 03 g であった。

40

【 0 0 3 9 】

次に、本発明の細菌、細胞の薬剤感受性試験方法および薬剤感受性試験装置を「普通細菌または真菌薬剤感受性試験に用いた実施例」を示す。

【 0 0 4 0 】

- 1 . 分離培養後の標的コロニーを、培養液 20 ml を用いて、液体菌懸濁液形式の的液

50

状試験標本を作成した。

2. 液状試験標本を均一に薬剤感受性試験装置の箱体の中に入れ、培養液の中のコロイド材料と箱体の中の凝固補助剤とを反応させ、3時間以内に凝固させて安定したゲルをなし、ゲル試験標本を形成した。

3. ゲル試験標本の表面の所定の位置に測定する薬剤のペーパーディスクを貼った。

4. 蓋をして、37のインキュベーターの中に置き、12～24時間培養した。普通細菌または真菌は増殖繁殖プロセスにおいてMTTを分解して青色の点状の色団を形成するが、薬剤が細菌に対して阻止作用を有している場合、細菌が正常に繁殖することができず、薬剤のペーパーディスクが貼られたゲル試験標本の周囲に色団を形成することができないため、阻止円が形成された。

5. 阻止円の大きさに基づき、薬剤の細菌に対する作用の効果を判断した。

【0041】

本実施例における培養液20mlで採用した配合は、栄養物質が普通ブイヨン配合20ml、細菌細胞増殖指示薬が3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド4mg、コロイド材料が0.5～1.5%アルギン酸ナトリウム0.4gであった。本実施例における凝固補助剤は、カルシウムイオン0.04gであった。

【0042】

次に、本細菌、細胞の薬剤感受性試験方法および薬剤感受性試験装置を「腫瘍細胞薬剤感受性試験に用いた実施例」を示す。

【0043】

1. すでに確定診断した腫瘍患者の手術切除物細胞を分離して培養し、一定の数量になった後に、専用容器の中に置いて保存し、使用に備えた。

2. 腫瘍細胞を含む前記溶液1mlを取り、本発明を含有する培養液20mlの中に添加し、均一に混ぜ、細胞懸濁液形式の液状試験標本を作成した。

3. 液状試験標本を均一に薬剤感受性試験装置の箱体の中に入れ、培養液の中のコロイド材料と箱体の中に置かれた凝固補助剤とを結合させ、3時間以内に凝固させて安定したゲルをなし、ゲル試験標本を形成した。

4. ゲル試験標本の表面の所定の位置に測定する薬剤のペーパーディスクを貼った。

5. 蓋をして、37のインキュベーターの中に置き、2～7日間培養した。腫瘍細胞は増殖繁殖プロセスにおいてMTTを分解して青色の点状の色団を形成するが、薬剤が腫瘍細胞に対して阻止作用を有している場合、細胞が正常に繁殖することができず、薬剤のペーパーディスクが貼られたゲル試験標本の周囲に色団を形成することができないため、阻止円が形成された。

6. 阻止円の大きさに基づき、薬剤の腫瘍細胞に対する作用の効果を判断した。

【0044】

本実施例における培養液20mlで採用した配合は、栄養物質が細胞培地配合20ml、細菌細胞増殖指示薬が3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド5mg、コロイド材料が0.5～1.5%アルギン酸ナトリウム0.4mgであった。本実施例における凝固補助剤は、カルシウムイオン0.04

【符号の説明】

【0045】

- 1 箱体
- 2 凝固補助層
- 3 蓋
- 4 目盛

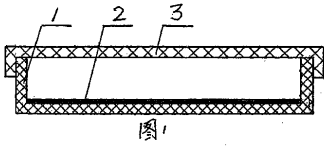
10

20

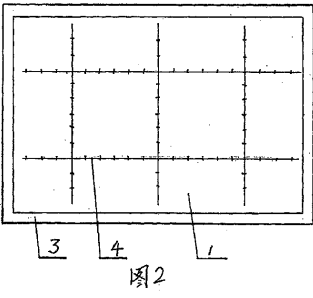
30

40

【图 1】



【图 2】



【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2010/000064
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
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)		
IPC: C12M, C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI EPODOC CPRS CNKI BIOSIS MEDLINE sodium alginate, carrageenan, pectin, drug susceptibility, drug sensitivity, drug sensitive, coagulant		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN101134954A (Jiangsu Fresh WATER AQUATIC PROD INS) 05 Mar. 2008 (05.03.2008), see whole document	1-15
A	CN1556217A (Yang XQ, et al.) 22 Dec. 2004 (22.12.2004), see whole document	1-15
A	JP2008220350A (Cellseed Inc) 25 Sep. 2008 (25.09.2008), see whole document	1-15
A	Ni YX, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing -- Good Laboratory Practices. Shanghai Scientific & Technical Publishers, Oct 2002, pages 15-34	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 10 Apr. 2010 (10.04.2010)		Date of mailing of the international search report 22 Apr. 2010 (22.04.2010)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer SU, Lin Telephone No. (86-10)62411030

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/000064

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101134954A	05.03.2008	NONE	
CN1556217A	22.12.2004	CN100480395C	22.04.2009
JP2008220350A	25.09.2008	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/000064

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

C12Q1/04 (2006.01) i

C12M1/16 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2010/000064
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12M, C12Q		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI EPODOC CPRS CNKI BIOSIS MEDLINE		
药敏, 凝固剂, 胶体, 凝胶, 助凝剂, 海藻酸钠, 果胶, 卡拉胶, sodium alginate, carrageenan, pectin, drug susceptibility, drug sensitivity, drug sensitive, coagulant		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN101134954A (江苏省淡水水产研究所) 05.3 月 2008 (05.03.2008), 见全文	1-15
A	CN1556217A (杨小强, 等) 22.12 月 2004 (22.12.2004), 见全文	1-15
A	JP2008220350A (Cellseed Inc) 25.9 月 2008 (25.09.2008), 见全文	1-15
A	倪语星, 等. 抗微生物药物敏感性试验规范. 上海科学技术出版社, 2002 年 10 月, 第 15-34 页	1-15
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 10.4 月 2010 (10.04.2010)		国际检索报告邮寄日期 22.4 月 2010 (22.04.2010)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 苏林 电话号码: (86-10) 62411030

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/000064

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101134954A	05.03.2008	无	
CN1556217A	22.12.2004	CN100480395C	22.04.2009
JP2008220350A	25.09.2008	无	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2010/000064

主题的分类:

C12Q1/04 (2006.01) i

C12M1/16 (2006.01) i

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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