

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5684569号  
(P5684569)

(45) 発行日 平成27年3月11日 (2015. 3. 11)

(24) 登録日 平成27年1月23日 (2015. 1. 23)

(51) Int. Cl.	F 1	
<b>C 1 2 Q</b> 1/24 (2006. 01)	C 1 2 Q	1/24
<b>C 1 2 M</b> 1/34 (2006. 01)	C 1 2 M	1/34
<b>C 1 2 N</b> 1/02 (2006. 01)	C 1 2 N	1/02

B

請求項の数 5 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2010-528127 (P2010-528127)	(73) 特許権者	505005049
(86) (22) 出願日	平成20年10月2日 (2008. 10. 2)		スリーエム イノベイティブ プロパティ
(65) 公表番号	特表2011-517278 (P2011-517278A)		ズ カンパニー
(43) 公表日	平成23年6月2日 (2011. 6. 2)		アメリカ合衆国, ミネソタ州 55133
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/078587		-3427, セント ポール, ポスト オ
(87) 国際公開番号	W02009/085357		フィス ボックス 33427, スリーエ
(87) 国際公開日	平成21年7月9日 (2009. 7. 9)		ム センター
審査請求日	平成23年9月28日 (2011. 9. 28)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	60/977, 180		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成19年10月3日 (2007. 10. 3)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100111903
			弁理士 永坂 友康

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物濃縮プロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 非晶質の長球化ケイ酸マグネシウムを含み、X線光電子分光法 (XPS) で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が0.5以下である表面組成物を有する濃縮剤を提供する工程と、(b) 少なくとも1種類の微生物株を含む試料を提供する工程と、(c) 前記濃縮剤と前記試料とを接触させることにより、少なくとも1種類の前記微生物株のうち少なくとも一部分が前記濃縮剤に結合又は捕捉されるようにする工程と、を含むプロセス。

【請求項 2】

前記プロセスが、少なくとも1種類の結合した微生物株の存在を検出する工程を更に含む、請求項1に記載のプロセス。

10

【請求項 3】

前記金属が、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、アルミニウム、鉄、チタン、及びこれらの組み合わせから選択され、前記濃縮剤が少なくとも部分的に融合した粒子形状である前記非晶質の長球化ケイ酸マグネシウムを含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項 4】

(a) 非晶質の長球化ケイ酸マグネシウムを含み、X線光電子分光法 (XPS) で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が0.5以下である表面組成物を有する濃縮剤を提供する工程と、(b) 細菌、酵母、ウイルス、細菌内生孢子、及びこれらの組み合わせから選択された少なくとも1種類の微生物株を含む試料を提供する工程と、(c) 前記濃縮

20

剤と前記試料とを接触させることにより、少なくとも1種類の前記微生物株のうち少なくとも一部分が前記濃縮剤により結合又は捕捉されるようにする工程と、を含むプロセス。

【請求項5】

(a) 非晶質の長球化ケイ酸マグネシウムを含み、X線光電子分光法(XPS)で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が0.5以下である表面組成物を有する濃縮剤と、(b) 試験容器と、(c) 請求項1に記載のプロセスの実施における前記濃縮剤の使用説明書と、を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

(関連出願の相互参照)

本出願は、米国特許仮出願第60/977,180号(2007年10月3日出願)の優先権を主張し、その内容は本明細書に参考として組み込まれる。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、検出又は検査の際に生存状態を保つような微生物の捕捉又は濃縮のためのプロセスに関するものである。他の態様において、本発明はそのような濃縮プロセスの実施に使用するための診断キットに関連するものである。

【背景技術】

【0003】

20

微生物汚染により生じる食品媒介疾患及び院内感染は、世界中の無数の場所で懸案となっている。よって、微生物の存在の同定及び/又は定量測定を行うために、様々な医療、食品、環境、又はその他の試料中における、細菌又は他の微生物の存在を検定することが、望ましいことが多く、あるいは必要である。

【0004】

例えば、たとえ他の細菌の存在下であっても、特定の細菌種の存在又は不在を検査するために、細菌DNA又は細菌RNAの検査を行うことができる。しかしながら、特定の細菌の存在を検出する能力は、少なくとも部分的に、分析される試料中の細菌の濃度に依存する。細菌試料は、検出に十分な濃度を確保するため、試料中の細菌の数を増加させるために培養(plated or cultured)されるが、この培養工程はしばしば時間がかかり、よって評価結果を顕著に遅らせることがある。

30

【0005】

試料中の細菌を濃縮することで、培養時間を短縮することができ、培養の工程の必要を排除することすら可能になる。よって、菌株に特異的な抗体を使用することによって、特定の細菌株を分離する(及びこれにより濃縮する)ための方法が(例えば、抗体をコーティングした磁石又は非磁石粒子の形態で)開発されている。しかしながらこのような方法は高価になり、少なくとも一部の診断用途に望まれる方法よりも依然としてやや遅い傾向がある。

【0006】

菌株特異的でない濃縮方法も使用されている(例えば、試料に存在する微生物のより総合的な評価を得るため)。混合した微生物群を濃縮した後、望ましい場合は、菌株特異的な精査を用いることによって特定の菌株の存在を判定することができる。

40

【0007】

微生物の非特異的な濃縮又は捕捉は、炭水化物とレクチンタンパク質との相互作用に基づいた方法によって達成されている。非特異的捕捉装置としてキトサンコーティングされた支持体を使用され、微生物の栄養素の役目を果たす物質(例えば、炭水化物、ビタミン、鉄キレート化合物、及びシデロホア)が、微生物の非特異的捕捉を提供するための配位子として有用であることも記述されている。

【0008】

様々な無機物質(例えばヒドロキシアパタイト及び金属水酸化物)が、細菌に非特異的

50

に結合しこれを濃縮するために使用されている。非特異的な捕捉のためには、無機結合剤を使用する及び／又は使用しない、物理的な濃縮方法（例えば濾過、クロマトグラフィー、遠心分離、及び重力沈殿）も利用されている。このような非特異的な濃縮方法は、速度、費用（少なくとも一部のものは高価な装置、材料、及び／又は訓練を受けた技術者が必要になる）、試料要件（例えば、試料の性質及び／又は量の制限）、空間的要件、使用の容易さ（少なくとも一部のものは複雑な複数の工程のプロセスを必要とする）、現場使用の適合性、及び／又は高価の点において様々に異なっている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

10

よって我々は、病原微生物を迅速に検出するためのプロセスに対する切迫したニーズがあると認識している。このようなプロセスは、好ましくは迅速だけでなく、コストが低く、簡単であり（複雑な機器又は手順の必要がない）、及び／又は様々な条件下で有効である（例えば、様々なタイプの試料マトリックスで使用でき、細菌の量が変わっても、及び試料の量が変わっても、使用できる）。

【課題を解決するための手段】

【0010】

簡単に言えば、1つの態様において、本発明は、試料中に存在する微生物株（例えば細菌、真菌類、酵母、原生動物、ウイルス（非エンベロープ型ウイルス及びエンベロープ型ウイルスの両方を含む）、及び細菌内生孢子の菌株）を非特異的に濃縮するプロセスを提供し、これにより1つ以上の株の検出又は検定を行えるよう微生物は生存性のままである。本プロセスには、（a）非晶質金属ケイ酸塩を含み、X線光電子分光法（XPS）で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が約0.5以下（例えば長球化タルクなど）である表面組成物を有する濃縮剤（好ましくは粒子濃縮剤）を提供する工程と、（b）少なくとも1種類の微生物株を含む試料（好ましくは液体の形態で）を提供する工程と、（c）その濃縮剤とその試料とを（好ましくは混合により）接触させることにより、少なくとも1種類の微生物株のうち少なくとも一部分が濃縮剤に結合又は捕捉されるようにする工程と、が含まれる。好ましくは、このプロセスは更に、少なくとも1つの結合した微生物株の存在を検出すること（例えば、培養による方法、顕微鏡／画像手法、遺伝子学的方法、生物発光による方法、又は免疫学的検出方法）、及び／又は得られた微生物結合濃縮剤を凝離すること（好ましくは重力沈殿により）を含む。このプロセスは所望により、得られた凝離濃縮剤を試料から分離することを更に含む。

20

30

【0011】

本発明のプロセスは、特定の微生物株を目標とするものではない。むしろ、或る比較的安価な無機物質が、様々な微生物の捕捉に驚くべきほど有効であり得ることが見出されている。このような物質は、試料中（例えば食品試料）に存在する微生物株を、株特異性ではない状態で濃縮するのに使用することができるため、1種類以上の微生物株（好ましくは1種類以上の細菌株）をより容易かつ迅速に検定することができる。

【0012】

本発明のプロセスは比較的簡単かつ低コストであり（複雑な装置又は高価な株特異性物質を必要としない）、比較的迅速であり得る（好ましい実施形態は、濃縮剤のない対応する対照試料に比べ、試料中に存在する微生物の少なくとも約70パーセント（より好ましくは少なくとも約80パーセント、最も好ましくは少なくとも約90パーセント）を約30分以内に捕捉する）。加えて、このプロセスは様々な微生物（グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方などの病原体を含む）及び様々な試料に（様々な試料マトリックスを含み、しかも少なくとも一部の従来技術とは違って、微生物含有量が少ない試料及び／又は大量の試料であっても）有効であり得る。よって、本発明のプロセスの少なくともいくつかの実施形態は、様々な状況下で病原微生物を迅速に検出するための低コストで簡単なプロセスに対する、上述のような緊迫したニーズに対応することができる。

40

【0013】

50

別の態様において、本発明は更に、本発明のプロセス実施に使用するための診断キットを提供し、このキットには（a）金属ケイ酸塩を含み、X線光電子分光法（XPS）で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が約0.5以下である表面組成物を有する濃縮剤（好ましくは粒子濃縮剤）と、（b）試験容器（好ましくは滅菌済み試験容器）と、（c）本発明のプロセス実施における濃縮剤の使用説明書、とが含まれる。好ましくは、この診断キットは更に、微生物培地、溶解試薬、緩衝液、生物発光検出検定構成要素、遺伝子学的検出検定構成要素、及びこれらの組み合わせから選択された1種類以上の構成要素を含む。

【発明を実施するための形態】

【0014】

定義

本特許出願で使用される場合：

「試料」とは、非表面的な方法によって（すなわち、上記の濃縮剤を含む組成物をヒトの身体に適用及び／又はヒトの身体から除去することによって）、（例えば分析の目的で）採取された物質又は材料を意味する。

【0015】

「試料マトリックス」とは、試料の微生物以外の構成成分を意味する。

【0016】

「検出」とは、微生物の少なくとも構成要素の同定を意味し、これにより微生物が存在すると判定される。

【0017】

「遺伝子学的検出」とは、標的微生物に由来するDNA又はRNAなどの遺伝子学的物質の構成要素の同定を意味する。

【0018】

「免疫学的検出」とは、標的微生物に由来するタンパク質又はプロテオグリカンなどの抗原性物質の同定を意味する。

【0019】

「微生物」とは、分析又は検出に適する一般的物質を有する細胞を意味する（例えば、細菌、酵母、ウイルス、及び細菌内生孢子を含む）。

【0020】

「微生物株」とは、或る検出方法によって区別可能な特定のタイプの微生物を意味する（例えば、異なる属の、属内の異なる種の、又は種内の異なる分離株）。

【0021】

「標的微生物」とは、検出したい微生物を意味する。

【0022】

濃縮剤

本発明のプロセス実施に使用するために好適な濃縮剤は、金属ケイ酸塩を含み、X線光電子分光法（XPS）で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が約0.5以下（好ましくは約0.4以下、より好ましくは約0.3以下、最も好ましくは約0.2以下）である表面組成物を有する。好ましくは、この表面組成物は更に、X線光電子分光法（XPS）で測定して少なくとも平均約10原子パーセントの炭素を含む（より好ましくは少なくとも平均約12原子パーセントの炭素を含み、最も好ましくは少なくとも平均約14原子パーセントの炭素を含む）。XPSは、試料表面の、最も外側約3～10ナノメートル（nm）の元素組成を測定できる技法であり、周期表のうち水素及びヘリウムを除くすべての元素に対して感受性がある。XPSは、多くの元素について、0.1～1原子パーセントの濃度範囲の検出限界を伴った定量的測定技法である。XPSの好ましい表面組成評価条件には、受光立体角±10度で試料表面に対して測定される取り出し角90度が含まれる。

【0023】

上記の濃縮剤を使用した濃縮又は捕捉は一般的に特定の株、種、又は微生物のタイプに

10

20

30

40

50

対して特異的ではなく、よって、試料内の微生物の全体的な個体群の濃縮を提供する。次に、株特異的精査を伴う任意の既知の検出方法を用いて、捕捉された微生物群の中から、微生物の具体的な株を検出することができる。よって、この濃縮剤は、医療、食品、環境、又はその他の試料における微生物汚染又は病原体（特に細菌などの食品媒介病原体）の検出に使用することができる。

#### 【 0 0 2 4 】

金属ケイ酸塩などの無機材質は、水性系中に分散又は懸濁された状態で、材質及び水性系の pH に特有の表面電荷を呈する。表面 - 水界面上の電位は「ゼータ電位」と呼ばれ、これは電気泳動の可動性から（すなわち、水性系に置かれた帯電電極の間を材質粒子が移動する速度から）算出される。本発明のプロセス実施に使用される濃縮剤は、例えば、普通のタルクなどの一般的な金属ケイ酸塩よりもマイナスのゼータ電位を有する。更にこの濃縮剤は、細菌などの微生物濃縮においてタルクよりも驚くべきほど効果的であり、その表面は一般にマイナスに帯電する傾向にある。好ましくは、濃縮剤は pH が約 7 で負のゼータ電位を有する（より好ましくは、pH が約 7 でスモルコウスキー（Smoluchowski）ゼータ電位が約 - 9 ミリボルト ~ 約 - 25 ミリボルトの範囲、更に好ましくは、pH が約 7 でスモルコウスキーゼータ電位が約 - 10 ミリボルト ~ 約 - 20 ミリボルトの範囲、最も好ましくは、pH が約 7 でスモルコウスキーゼータ電位が約 - 11 ミリボルト ~ 約 - 15 ミリボルトの範囲である）。

#### 【 0 0 2 5 】

有用な金属ケイ酸塩には、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、アルミニウム、鉄、チタン、及び同様物（好ましくはマグネシウム、亜鉛、鉄、及びチタンであり、より好ましくはマグネシウム）、及びこれらの組み合わせの金属の非晶質ケイ酸塩が挙げられる。好ましいのは、少なくとも部分的に融合した粒子形状の非晶質金属ケイ酸塩である（より好ましくは非晶質の長球化金属ケイ酸塩であり、最も好ましくは非晶質の長球化ケイ酸マグネシウムである）。金属ケイ酸塩は既知であり、既知の方法によって化学的に合成するか、又は天然に生じる未加工鉱石の採鉱及び処理によって入手することができる。

#### 【 0 0 2 6 】

非晶質の、少なくとも部分的に融合した粒子形態の金属ケイ酸塩は、管理された条件下で、比較的小さな供給粒子（例えば、最大約 25 マイクロメートルの平均粒度）を溶融又は軟化させ、全体に長円形又は長球形の粒子（すなわち、真円又は実質的な円及び楕円形状、及びその他の丸みを帯びた又は曲線形状などのように、全体に丸く、鋭い角やエッジがない、拡大二次元画像を有する粒子）を形成する既知の任意の方法によって調整することができる。この方法には、アトマイゼーション、火炎研磨（fire polishing）、直接溶融、及び同様の方法が挙げられる。好ましい方法は炎融であり、この方法においては、固体の共有粒子を直接溶融又は火炎研磨することにより、少なくとも部分的に溶融した実質的にビー玉状の粒子が形成される（例えば、米国特許第 6,045,913 号（キャスル（Castle））に記述されている方法があり、この記述は参考として本明細書に組み込まれる）。より好ましくは、このような方法を利用して、不規則な形状の供給粒子のかなりの部分（例えば、約 15 ~ 約 99 体積パーセント、好ましくは約 50 ~ 約 99 体積パーセント、より好ましくは約 75 ~ 約 99 体積パーセント、最も好ましくは約 90 ~ 約 99 体積パーセント）を、全体に長円形又は長球形の粒子に転化させることにより、非晶質の長球化金属ケイ酸塩を生成することができる。

#### 【 0 0 2 7 】

一部の非晶質金属ケイ酸塩は、市販されている。例えば、非晶質の長球化されたケイ酸マグネシウムは、化粧品処方の使用のために市販されている（例えば、3M（商標）コスメティック・ミクロスフェアズ（Cosmetic Microspheres）CM-111（ミネソタ州セントポール市の 3M 社から販売））。

#### 【 0 0 2 8 】

濃縮剤が上述の表面組成物を有することを条件として、濃縮剤には、非晶質金属ケイ酸塩に加え、金属（例えば鉄又はチタン）の酸化物、結晶質金属ケイ酸塩、その他の結晶質

10

20

30

40

50

材質、及び同様物が更に含まれ得る。しかしながら濃縮剤は、好ましくは本質的に結晶質シリカは含まない。

#### 【0029】

本発明のプロセスの実施において、濃縮剤は、試料に接触し微生物を捕捉するような任意の形態で 사용할 ことができる（例えば粒子の形態で、又はディップスティック、フィルム、フィルタ、チューブ、ウェル、プレート、ビーズ、膜、若しくはマイクロ流体装置のチャンネル、その他同等物などの支持体に適用する）。好ましくは、この濃縮剤は特定の形態で使用され、より好ましくは粒子（好ましくは粒径が約1マイクロメートル（より好ましくは約2マイクロメートル）～約100マイクロメートル（より好ましくは約50マイクロメートル、更に好ましくは約25マイクロメートル、最も好ましくは約15マイクロメートルで、ここで任意の下限を範囲の任意の上限と組み合わせることができる）の範囲である。

10

#### 【0030】

##### 試料

本発明のプロセスは、医療、環境、食品、飼料、臨床、及び検査室の試料、及びこれらの組み合わせを含みこれらに限定されない、様々なタイプの試料に適用することができる。医療又は獣医試料には、例えば、臨床診断のために検査される生物源（例えばヒト又は動物）から得た細胞、組織、又は流体が含まれる。環境試料は、例えば、医療機関又は獣医機関、産業用設備、土壌、水源、食品調理領域（食品接触及び非接触領域）、検査室、又はバイオテロリズムの対象になり得る領域から得たものであり得る。食品の加工、取扱い、及び調理領域の試料は、細菌病原菌による食品供給汚染に関する特定の懸念があることが多いので、より好適である。

20

#### 【0031】

液体の形態で得られる試料、又は液体中の固体の分散液又は懸濁液の形態で得られる試料は、直接使用することができ、あるいは濃縮して（例えば遠心分離により）又は希釈して（例えば緩衝（pH調整済み）溶液の追加により）使用することができる。固体又は半固体の試料は、直接使用するか、あるいは例えば、望ましいなら、流動体媒質（例えば緩衝液）で洗浄若しくはすすぎ、又は流動体媒質中に懸濁若しくは分散させることにより抽出することができる。試料は表面から（例えばスワブ拭き取り又はすすぎにより）採取することができる。好ましくは、試料は流体の形態で使用される（例えば、液体、気体、又は液体中若しくは気体中の固体若しくは液体の分散物若しくは懸濁物）。

30

#### 【0032】

本発明のプロセスを実施するのに使用できる試料の例としては、食品（例えば、生鮮農産物又はそのまま食べる昼食若しくは「調理済み」食肉）、飲料（例えばジュース又は炭酸飲料）、飲料水、並びに生物学的流動体（例えば全血、又は血漿、血小板の豊富な血液分画、血小板濃縮物、圧縮した赤血球などの血液構成成分；細胞調製物（例えば細胞分散液、骨髓吸引物、又は脊椎骨髓）；細胞懸濁液；尿、唾液、及びその他の体液；骨髓；肺水；脳液；外傷滲出物；外傷生検試料；眼内液；脊髄液；その他同様物）が挙げられ、また溶解緩衝液の使用などの手順を使用して形成することができる細胞可溶化物などの溶解調製物、並びに同様物が挙げられる。好ましい試料としては、食品、飲料、飲料水、生物学的流動体、及びこれらの組み合わせが挙げられる（食品、飲料、飲料水、及びこれらの組み合わせが更に好ましい）。

40

#### 【0033】

試料の量は、個々の用途に応じて異なり得る。例えば、本発明のプロセスが診断又は研究用途に仕様される場合、試料の量は通常、マイクロリットルの範囲であり得る（例えば10 $\mu$ L以上）。プロセスが食品病原体試験検査又は飲料水安全性試験のために使用される場合、試料の量は通常、ミリリットル～リットルの範囲であり得る（例えば100ミリリットル～3リットル）。例えばバイオプロセス又は製剤処方などの産業用途においては、この量は何万リットルであることがある。

#### 【0034】

50

本発明のプロセスは、濃縮状態の試料から微生物を分離し、更に、使用される検出手順を阻害し得る試料マトリックス構成成分から微生物を分離することも可能にする。これらすべての場合において、本発明のプロセスは、他の微生物濃縮方法に追加して、又はその代わりに、使用することができる。よって、所望により、追加の濃縮が望ましい場合には、本発明のプロセスを実施の前又は後に試料からの培養を行うことができる。

#### 【0035】

##### 接触

本発明のプロセスは、2つの物質の間に接触をもたらす、様々な既知の方法又は今後開発される方法によって実施することができる。例えば、濃縮剤を試料に加えることができ、又は試料を濃縮剤に加えることができる。濃縮剤でコーティングしたディップスティックを試料溶液に浸すことができ、濃縮剤を含有するフィルムの上に試料溶液を注ぐことができ、濃縮剤を含む試験管又はウェルに試料溶液を注ぐことができ、又は、濃縮剤でコーティングされたフィルタ（例えば織布又は不織布のフィルタ）に試料溶液を通すことができる。

#### 【0036】

しかしながら好ましくは、濃縮剤及び試料は、様々な任意の容器内に合わせて入れられる（任意の追加順序を用いて）（所望により、しかしながら好ましくは、キャップ付き、閉鎖、又は密閉された容器であり、より好ましくは、キャップ付きの試験管、瓶、又は広口瓶である）。本発明のプロセスを実施する際の使用に好適な容器は、個々の試料によって決定され、量及び性質により大きく異なり得る。例えば、容器は10マイクロリットル容器（例えば試験管）などの小さいものであり得、又は100ミリリットルから3リットル容器（例えば三角フラスコ又はポリプロピレン製広口瓶）などの大きいものであり得る。容器、濃縮剤、及び試料に直接接触するその他の器具又は添加剤は、使用前に滅菌することができ（例えば、制御された熱、エチレンオキシドガス、又は放射線によって）、これにより検出エラーを起こし得る試料の汚染を低減又は防ぐことができる。特定の試料の微生物を捕捉又は濃縮するための、検出を成功させるのに十分な濃縮剤の量は、場合によって異なり（例えば、濃縮剤の性質及び形態並びに試料の量に依存する）、当業者によって容易に決定できる。例えば、一部の用途については、試料ミリリットル当たり、10ミリグラムの濃縮剤が有用であり得る。

#### 【0037】

望ましい場合は、試料の中に少なくとも1回、粒子濃縮剤を通過させることによって（例えば、約10分間にわたって重力沈殿に依存することによって）、接触を効果的にすることができる。接触は、混合によって（例えば攪拌、振盪、又は揺動ブラットフォームによって）強化することができ、これにより濃縮剤の粒子が試料の大部分を通過して繰り返し通過又は沈殿することができる。少量のマイクロリットルの容積（典型的には0.5ミリリットル未満）の場合、混合は、例えば米国特許第5,238,812号（コールター（Coulter）ら）（この記述は参考として本明細書に組み込まれる）に記述されているように、渦動又は「転動（nutation）」などの急速なものであり得る。約0.5ミリリットル以上の、より大量（典型的には0.5ミリリットル～3リットル）の場合、混合は、例えば米国特許第5,576,185号（コールター（Coulter）ら）（この記述は参考として本明細書に組み込まれる）に記述されているように、粒子濃縮剤及び試料を「上下転倒」させる方法で穏やかに混転することにより達成できる。このような混転は、例えば、試験管又は他のタイプの反応容器を支えるよう構成された装置を用い、試験管又は容器を「上下転倒」させる方法でゆっくりと回転させて達成することができる。接触は、望むだけの時間、実施することができる（例えば、試料量が約100ミリリットル以下の場合、最高約60分間の接触が有用であり得、好ましくは、約15秒～約10分又はそれ以上、より好ましくは、約15秒～約5分の接触が有用であり得る）。

#### 【0038】

よって、本発明のプロセスの実施において、混合（例えば攪拌、揺動、又はかき混ぜ）及び/又は培養（例えば周囲温度で）は随意ではあるが、濃縮剤との接触で微生物を増加

10

20

30

40

50

させるために好ましい。好ましい接触方法には、生物含有試料（好ましくは流動体）を粒子濃縮剤と混合すること（例えば、約 15 秒～約 5 分）と、培養すること（例えば約 3 分～約 30 分）との両方が含まれる。望ましい場合は、1 種類以上の添加剤（例えば溶解試薬、生物発光検定試薬、核酸捕捉試薬（例えば磁石ビーズ）、微生物用培地、緩衝液（例えば固体試料を湿らせる）、微生物染色試薬、洗浄用緩衝液（例えば、結合していない物質を洗い流すため）、溶出試薬（例えば血清アルブミン）、界面活性剤（例えば、テキサス州ヒューストンのユニオン・カーバイド・ケミカルズ・アンド・プラスティックス（Union Carbide Chemicals and Plastics）社から販売されているトリトン（Triton）（商標）X-100 非イオン系界面活性剤）、機械的磨耗ノ溶出試薬（例えばガラスビーズ）、及び同様物）が、濃縮剤及び試薬の組み合わせの中に含まれ得る。

10

#### 【0039】

望ましい場合は、濃縮剤（単独で、又は例えば抗菌剤と組み合わせて、及び／又は液体形態（例えば水又は油）、固体形態（例えば布、ポリマー、紙、又は無機固体）、ゲル形態、クリーム形態、フォーム形態、又はペースト形態の担体物質と組み合わせて）は、非多孔質又は多孔質、固体、微生物に汚染されているか又は微生物に汚染可能な材質又は表面に対して、塗布又はすりつけることができる（例えば「クリーニング」剤として使用する）。結合剤、安定剤、界面活性剤、又はその他の特性変性剤も望ましい場合は利用することができる。

#### 【0040】

このような使用のために、濃縮剤は織布又は不織布に塗布することができ、更に紙、ティッシュペーパー、綿棒などの使い捨て可能な表面、及び様々な吸収性及び非吸収性材質に塗布することができる。例えば、濃縮剤は布又は紙の担体物質に組み込み、「クリーニング」ワイプとして使用することができる。濃縮剤は、例えば住居、保育所、工場、病院などにおいて、玩具、装置、医療機器、作業台表面などを洗浄するために、固体表面に（例えば、担体物質を含むワイプ又はペーストの形状で）適用することができる。洗浄又はその他の目的に使用する場合、試料は同時に採取することができ、望ましい場合は単一の工程で濃縮剤に接触し得る。

20

#### 【0041】

##### 凝離及び／又は分離

所望により、しかしながら好ましくは、本発明のプロセスは、得られた微生物結合の濃縮剤の凝離を更に含む。好ましくはこのような凝離は、少なくとも部分的に、重力沈殿（重力沈降、例えば、約 5 分間～約 30 分間にわたって）に依存することによって達成することができる。しかしながらいくつかの場合において、凝離を促進すること（例えば遠心分子又は濾過によって）又は任意の凝離方法の組み合わせを使用することが望ましいことがある。

30

#### 【0042】

本発明のプロセスは、所望により、得られた微生物結合の濃縮剤と試料の分離を更に含む。液体試料の場合は、凝離の結果生じた上澄みの除去又は分離が伴い得る。上澄みの分離は、当該技術分野において周知の数多くの方法によって実施することができる（例えば、上澄みを注ぎ出し又は吸い上げることによって、プロセスを実施するのに使用した容器又は管の底に、微生物結合の濃縮剤を残すことができる）。

40

#### 【0043】

本発明のプロセスは、手動により（例えばバッチ単位による方法で）実施することができ、又は（例えば、連続的又は準連続的処理を実現して）自動化することができる。

#### 【0044】

##### 検出

さまざまな微生物を濃縮することができ、所望により、しかしながら好ましくは、本発明のプロセスを用いて検出することができ、これには例えば、細菌、真菌類、酵母、原生動物、ウイルス（非エンベロープ型ウイルス及びエンベロープ型ウイルスの両方を含む）、細菌内生孢子（例えばバチルス（炭疽菌、セレウス菌、及び枯草菌を含む）及びクロス

50



トリジウム（ボツリヌス菌、クロストリジウム・ディフィシル、及びウェルシュ菌）、並びに同様物、並びにこれらの組み合わせが挙げられる（好ましくは、細菌、酵母、真菌類、ウイルス、細菌内生孢子、及びこれらの組み合わせであり、更に好ましくは、細菌、酵母、ウイルス、細菌内生孢子、及びこれらの組み合わせであり、最も好ましくは、グラム陰性菌、グラム陽性菌、非エンベロープ型ウイルス（例えばノロウイルス、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、ライノウイルス、及びこれらの組み合わせ）、細菌内生孢子、及びこれらの組み合わせである。このプロセスは、病原体の検出における有用性を有し、これは食品安全性又は医療、環境、若しくはテロ対策の理由から非常に重要であり得る。このプロセスは、病原菌（例えばグラム陰性菌とグラム陽性菌の両方）、並びに様々な酵母、カビ、及びマイコプラズマ（及びこれらの任意の組み合わせ）の検出に特に有用であり得る。

10

#### 【0045】

検出される標的微生物の属には、リステリア属、大腸菌属、サルモネラ属、カンピロバクター属、クロストリジウム属、ヘリコバクター属、マイコバクテリウム属、シゲラ属、ブドウ球菌属、腸球菌属、バチルス属、ナイセリア属、シゲラ属、連鎖球菌属、ビブリオ属、エルシニア属、ボルデテラ属、ボレリア属、シュードモナス属、サッカロミセス属、カンジダ属、及び同様物、並びにこれらの組み合わせが挙げられる。試料には複数の微生物株が含まれることがあり、任意の株を、他の株とは独立に検出することができる。検出の標的となり得る具体的な微生物には、大腸菌、腸炎エルシニア菌、エルシニア仮性結核菌、コレラ菌、腸炎ビブリオ菌、ビブリオ・バルニフィカス菌、リステリア・モノサイトゲネス、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、サッカロマイセス・セレヴィシエ、カンジダ・アルピカンス、ブドウ球菌エンテロトキシン亜種、セレウス菌、炭疽菌、バチルス・アトロファエウス、枯草菌、ウェルシュ菌、ボツリヌス菌、クロストリジウム・ディフィシル、エンテロバクター・サカザキ、緑膿菌、及び同様物、並びにこれらの組み合わせ（好ましくは、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、サッカロマイセス・セレヴィシエ、バチルス・アトロファエウス、枯草菌、大腸菌、大腸菌バクテリオファージがサロゲートであるヒト感染性非エンベロープ型腸内ウイルス、及びこれらの組み合わせ）が挙げられる。

20

#### 【0046】

濃縮剤によって捕捉又は結合した（例えば吸着によって）微生物は、現在知られている、又は今後開発される任意の望ましい方法によって本質的に検出することができる。このような方法には、例えば、培養による方法（時間が許す場合は好ましいことがある）、顕微鏡（例えば透過光型顕微鏡又は落射蛍光顕微鏡（蛍光染料で標識した微生物を可視化するのに使用できる））、及びその他の画像手法、免疫学的検出方法、及び遺伝子学的検出方法が挙げられる。微生物捕捉後の検出のプロセスは、所望により、試料マトリックス構成成分を除去するための洗浄が含まれる。

30

#### 【0047】

免疫学的検出は、標的生物に由来する抗原物質の検出であり、これは一般的に、細菌又はウイルス粒子の表面にあるマーカーとして作用する生物学的分子（例えばタンパク質又はプロテオグリカン）である。抗原物質の検出は通常、抗体、例えばファージディスプレイなどのプロセスによって選択されたポリペプチド、又はスクリーニングプロセスから得られたアプタマーによって行うことができる。

40

#### 【0048】

免疫学的検出方法は周知であり、例えば免疫沈降及び酵素結合免疫吸着検定（ELISA）が挙げられる。抗体結合は、様々な方法で検出することができる（例えば、一次抗体又は二次抗体のいずれかを、蛍光染料で、量子ドットで、又は化学発光若しくは着色基質を生成できる酵素で標識し、プレートリーダー又はラテラルフロー装置のいずれかをを用いる）。

#### 【0049】

検出はまた、遺伝子学的検定法（例えば核酸のハイブリダイゼーション又はプライマーを用いた増幅）によって実行することができ、これが好ましい方法であることが多い。捕

50

捉又は結合された微生物は溶解され、検定に利用できる遺伝子学的物質を供給する。溶解方法は周知であり、これには例えば、音波処理、浸透性ショック、高温処理（例えば約50～約100）、及びリゾチーム、グルコラーゼ、チモラーゼ（zymolase）、リチカーゼ、プロテイナーゼK、プロテイナーゼE、及びウイルスエンドリシン類（enolysins）などの酵素、と共にインキュベーションすることが挙げられる。

#### 【0050】

一般的に使用されている遺伝子学的検出検定法の多くは、DNA及び/又はRNAを含む、具体的な微生物の核酸を検出する。遺伝子学的検出方法に使用される条件の厳密性は、検出される核酸配列の変異レベルに相関する。塩濃度及び温度の条件が非常に厳しい場合、標的の正確な核酸配列の検出が制限され得る。よって、標的核酸配列に小さな変異を有する微生物株は、非常に厳しい遺伝子学的検定法を使用して区別することができる。遺伝子学的検出は、核酸ハイブリダイゼーションに基づいて行われ、ここにおいて一本鎖核酸プローブが微生物の変性核酸にハイブリッド化して、プローブ鎖を含む二本鎖核酸が生成される。当業者は、ゲル電気泳動、細管式電気泳動、又はその他の分離方法の後でハイブリッドを検出するための、放射性、蛍光、及び化学発光標識などのプローブ標識について熟知するであろう。

10

#### 【0051】

特に有用な遺伝子学的検出方法は、プライマーを用いた増幅に基づくものである。プライマーを用いた核酸増幅方法には、例えば、熱サイクル方法（例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、及びリガーゼ連鎖反応（LCR）、並びに等温方法及び鎖置換増幅（SDA）（及びこれらの組み合わせ、好ましくはPCR又はRT-PCR）が挙げられる。増幅された生成物を検出する方法は、例えばゲル電気泳動分離及び臭化エチジウム染色、並びに生成物中に組み込んだ蛍光標識又は放射性標識の検出が含まれ、これらに限定されない。増幅生成物の検出前に分離工程を必要としない方法（例えば、リアルタイムPCR又はホモジニアス検出法）も使用することができる。

20

#### 【0052】

生物発光検出法は周知であり、例えば、米国特許第7,422,868号（ファン（Fan）ら）（この記述は参考として本明細書に組み込まれる）に記述されているものを含むアデノシン（adenosine）三リン酸（ATP）検出方法が挙げられる。

30

#### 【0053】

本発明のプロセスは株特異性ではないため、同じ試料内で、複数の微生物株を検定のための標的にすることができる、一般的な捕捉システムを提供する。例えば、食品試料の汚染について検定を行う場合、同じ試料内でリステリア・モノサイトゲネス、大腸菌、及びサルモネラの全部について試験を行うことが望ましいことがあり得る。捕捉工程を1回行い、次に例えば、これら微生物株それぞれの、異なる核酸配列を増幅するための固有プライマーを使用して、PCR又はRT-PCR検定を行うことができる。よって、各株について別々の試料取扱い及び調製手順を行う必要を回避することができる。

#### 【0054】

##### 診断キット

40

本発明のプロセスを実施する際に使用するための診断キットは、（a）上述の濃縮剤（好ましくは粒子）、（b）試験容器（好ましくは滅菌試験容器）、（c）本発明のプロセス実施における濃縮剤使用のための説明書を含む。好ましくは、この診断キットは更に、微生物培養媒体又は培地、溶解試薬、緩衝液、生物発光検出検定構成要素（例えば照度計、溶解試薬、ルシフェラーゼ酵素、酵素基質、反応緩衝液、その他同様の物）、遺伝子学的検出検定構成要素、及びこれらの組み合わせから選択された1つ以上の構成要素を含む。好ましい溶解試薬は、緩衝液中に供給された溶解酵素であり、好ましい遺伝子学的検出検定構成要素には、標的微生物に固有の1つ以上のプライマーが含まれる。

#### 【0055】

例えば、本発明の診断キットの好ましい実施形態には、粒子濃縮剤（例えば、ガラス製

50

又はポリプロピレン製バイアルなどの滅菌使い捨て可能な容器入り)に、本発明のプロセスの実施における前記薬剤使用のための説明書(例えば、濃縮剤と、分析する流動体試薬とを混合し、この濃縮剤を重力によって沈殿させ、得られた上澄みを除去し、濃縮剤に結合した少なくとも1種類の標的微生物株の存在を検出すること)を組み合わせたものが含まれる。濃縮剤は所望により、防腐剤を含んだ少量の緩衝液で水和させ、これにより保管及び輸送中の安定性を高めることができ、並びに/又は破って開けるタイプの密閉パウチに入れ/分包し、汚染を防ぐことができる。濃縮剤は液体中の分散液又は懸濁液の形態であり得、又は粉末形態であり得る。好ましくは、診断キットには、粒子濃縮剤をあらかじめ計量した分包(例えば、試料量に応じて)が含まれる(例えば1つ以上の破って開けるタイプの密閉パウチ)。

10

#### 【実施例】

#### 【0056】

本発明の目的及び利点は、下記の実施例によって更に例示されるが、これらの実施例において列挙された特定の材料及び量は、他の諸条件及び詳細と同様に本発明を過度に制限するものと解釈すべきではない。

#### 【0057】

##### 材料

結晶質ケイ酸マグネシウム濃縮剤(以降、「タルク」)をマリנקロット・ベーカー社(Mallinckrodt Baker, Inc.)(ニュージャージー州フィリップスバーグ)から購入した。微生物培養物は、ザ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(The American Type Culture Collection)(ATCC、バージニア州マナサス)から購入された。

20

#### 【0058】

非晶質の長球化ケイ酸マグネシウム濃縮剤(以降「ASタルク」を、3M(商標)コスメティック・ミクロスフェアズ(Cosmetic Microspheres)CM-111(固形球形として成型済み、粒子密度2.3g/立方センチメートル、表面積3.3m<sup>2</sup>/g、粒径:90パーセントが約1.1マイクロメートル未満、50パーセントが約5マイクロメートル未満、10パーセントが約2マイクロメートル未満、ミネソタ州セントポール市の3M社から販売)として入手した。

#### 【0059】

##### ゼータ電位測定

タルク及びASタルクの濃縮剤の水性分散液(マサチューセッツ州ベッドフォード市のミリポア社(Millipore Corporation)からのMilli-Q(商標)Elx 10(商標)シンセシス(Synthesis)A10脱イオンシステムを用いて得られた18メガオームの脱イオン水中に、それぞれタルク5.75重量パーセント、ASタルク5.8重量パーセント)のゼータ電位を、TM200自動滴定モジュール、pH電極、及びインライン伝導度セルを備えた、コロイダル・ダイナミクス・アコーストサイザーII(Colloidal Dynamics Acoustosizer II)(商標)多周波数電気音響スペクトルアナライザー(コロイダル・ダイナミクス社(Colloidal Dynamics)、ロードアイランド州ウォリック市)を用いて、加えた塩酸(pH)の関数として測定された。測定は、極性校正と、次の一般的なパラメータの極性試料設定を用いて行われた:

30

40

#### 【0060】

## 【表 1】

開始体積： 分散液 170 mL  
 滴定体積： 終了点で 5～10 mL、各滴定で 20 ステップ  
 滴定剤： 1. 0 N 塩酸水溶液  
 (J. T. ベーカー (J. T. Baker) 社、ニュージャージー州フィリップス  
 バーク)  
 攪拌速度： 毎分 300 回転 (rpm)  
 ポンプ速度： 毎分 400 mL  
 混合遅延： 酸を加えた後 120 秒攪拌してから測定

10

## 【0061】

pH が約 7 の時点で、AS タルクはスモルコウスキー (Smoluchowski) ゼータ電位が約 -12 mV であり、タルクはスモルコウスキー (Smoluchowski) ゼータ電位約 -8 mV を示した。

## 【0062】

表面組成分析

タルク及び AS タルクの濃縮剤試料の表面組成を、X 線光電子分光法 (XPS、別名 ESCA) によって分析した。粉末試料を、アルミホイル上で、感圧性接着剤両面テープに押し付けた。余分な粉末は、圧縮窒素ガスで吹き飛ばすことにより各試料表面から除去された。

20

## 【0063】

単色 Al-K X 線励起源 (1478 eV) と、一定パルスエネルギーモードで動作する半球形電子エネルギーアナライザーを有する、クレイトス AXIS ULTRA (Kratos AXIS Ultra) (商標) DLD スペクトロメーター (クレイトス・アナリティカル社 (Kratos Analytical)、英国マンチェスター市) を用いてスペクトルデータを取得した。放出光電子は、±10 度の許容角度の立体角と試料表面に対して測定された 90 度の取り出し角で検出された。表面帯電を最小限に抑えるため、低エネルギーの電子フラッドガンを使用した。陽極に 140 ワットの電力をかけ、チャンバ圧力  $2.7 \times 10^{-8}$  Torr) を用いて測定が行われた。

30

## 【0064】

各濃縮剤試料の表面積約 300 マイクロメートル×約 700 マイクロメートルが、各データポイントについて、分析された。各試料の 3 つの領域について分析され、平均をとって、報告される平均原子パーセント値を得た。データ処理は標準のビジョン 2 (Vision2) (商標) ソフトウェア (クレイトス・アナリティカル社 (Kratos Analytical)、英国マンチェスター市) を使用して実施された。結果 (濃縮剤表面の、XPS によって検出され得る濃度で存在する元素) を下の表 A に示す。

## 【0065】

【表 2】

濃縮剤	マグネシウム (平均原子パーセント)	ケイ素 (平均原子パーセント)	ケイ素に対する マグネシウムの比	炭素 (平均原子パーセント)	酸素 (平均原子パーセント)
タルク	17	26	0.65	6.9	50
ASTアルク	6.5	32	0.20	14	47

表A.

## 【0066】

## 微生物濃縮試験方法

単離した微生物コロニーを、5 mLのBBL（商標）トリプチケース（Trypticase）（商標）ソイブロス（Soy Broth）（ベクトン・ディッキンソン社（Becton Dickinson）、メリーランド州スパークス）に接種し、37℃で18～20時間インキュベートした。この1 mL当たり約 $10^9$ コロニー形成単位の一晩培養物を、pH 7.2の吸着緩衝液（5

10

20

30

40

50

mM KCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1 mM MgCl<sub>2</sub>、及び 1 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を含む)で希釈し、希釈液 1 mL 当たり 10<sup>3</sup> の微生物を得た。体積 1.1 mL の微生物希釈液を、10 mg の濃縮剤が入った、分離、ラベル付け、滅菌済みの 5 mL のポリプロピレン試験管 (BD フアルコン (Falcon) (商標)、ベクトン・ディッキンソン社 (Becton Dickinson)、ニュージャージー州フランクリンレークス) に加え、それぞれにキャップをして、サーモライン・マキシミックス・プラス (Thermolyne Maximix Plus) (商標) 渦流ミキサー (バーンステッド・インターナショナル社 (Barnstead International)、アイオワ州) 上で混合した。キャップをした各試験管を、サーモライン・ヴァリ・ミックス (Thermolyne Vari Mix) (商標) 振盪器プラットフォーム (バーンステッド・インターナショナル社 (Barnstead International)、アイオワ州) 上で、室温 (25 )  
10  
にて 15 分間インキュベートした。インキュベーション後、各試験管を 10 分間実験台の上に静置し、濃縮剤を沈殿させた。濃縮剤を含まない 1.1 mL の微生物希釈液が入った対照試料試験管を、同じように処理した。得られた沈殿した濃縮剤及び / 又は上澄み液 (及び対照試料) を次に分析に使用した。

#### 【0067】

沈殿した濃縮剤を、メーカーの指示に従い、1 mL の滅菌バターフィールド (Butterfield's) 緩衝液 (pH 7.2 ± 0.2、リン酸一カリウム緩衝液、VWR カタログ番号 83008-093、VWR 社、ペンシルバニア州ウェストチェスター) に再び懸濁させ、3 M (商標) ペトリフィルム (Petrifilm) (商標) エアロビック・カウント・プレート (Aerobic Count Plates) 培地 (ドライ、脱水可能、3 M 社、ミネソタ州セントポール)  
20  
上で培養した。3 M (商標) ペトリフィルム (Petrifilm) (商標) プレートリーダー (Plate Reader) (3 M 社、ミネソタ州セントポール) を使用して、好気性菌計数が定量された。結果は次の式を用いて計算された：

再懸濁された濃縮剤中の CFU / mL パーセンテージ =

( 培養された再懸濁濃縮剤からのコロニー数 ) / ( 培養された未処理対照試料からのコロニー数 ) × 100

( 式中、CFU = コロニー形成単位であり、これは生きている又は生存性微生物の単位である )。

#### 【0068】

次に、下の式を用いて、濃縮剤による微生物捕捉のパーセンテージについて結果が報告  
30  
された：

捕捉効率又は捕捉パーセンテージ = 再懸濁濃縮剤中の CFU / mL パーセンテージ  
濃縮剤

比較のため、少なくともいくつかの場合において、1 mL の上澄みを除去し、未希釈、又は 1 : 10 の割合でバターフィールド (Butterfield's) 緩衝液で希釈し、3 M (商標) ペトリフィルム (Petrifilm) (商標) エアロビック・カウント・プレート (Aerobic Count Plates) 培地上で培養した。3 M (商標) ペトリフィルム (Petrifilm) (商標) プレートリーダー (Plate Reader) (3 M 社、ミネソタ州セントポール) を使用して、好気性菌計数が定量された。結果は次の式を用いて計算された：

上澄み中の CFU / mL パーセンテージ =

( 培養された上澄みからのコロニー数 ) / ( 培養された未処理対照試料からのコロニー数 ) × 100

( 式中、CFU = コロニー形成単位であり、これは生きている又は生存性微生物の単位である )。

#### 【0069】

微生物コロニー及び濃縮剤の色が似ている場合 (プレートリーダーでのコントラストが少なくなる)、結果は上澄みに基づいて得られ、下の式を使用して濃縮剤による微生物の捕捉パーセンテージに関して報告を行った：

捕捉効率又は捕捉パーセンテージ = 100 - 上澄み中の CFU / mL パーセンテージ

実施例 1 及び 2 並びに比較例 1 及び 2

10

20

30

40

50

上述の微生物濃縮試験方法を使用して、非晶質長球化ケイ酸マグネシウム（上述の通り調製；以下「ＡＳタルク」）及び結晶質（長球化されていない）ケイ酸マグネシウム（以下「タルク」）１０ｍｇを、標的微生物であるグラム陰性菌サルモネラ菌亜種ネズミチフス菌（*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Typhimurium）（ＡＴＣＣ ３５９８７）及びグラム陽性菌黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）（ＡＴＣＣ ６５３８）の細菌濃縮について、別々に試験を行った。結果を下の表１に示す（全試料の標準偏差は１０パーセント未満）。

【００７０】

【表３】

10

表１．

実施例番号	微生物	濃縮剤	捕捉パーセント
C-1	ブドウ球菌	タルク	58
1	ブドウ球菌	ＡＳタルク	99
C-2	サルモネラ	タルク	69
2	サルモネラ	ＡＳタルク	92

【００７１】

実施例３～５及び比較例３～５

20

上述の微生物濃縮試験方法を使用して、標的微生物としてグラム陰性菌であるネズミチフス菌（*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Typhimurium）（ＡＴＣＣ ３５９８７）に対する細菌濃縮について、単位体積当たりのさまざまな重量のＡＳタルク及びタルクの試験が個別に行われた。結果を下の表２に示す（全試料の標準偏差は１０パーセント未満）。

【００７２】

【表４】

表２．

実施例番号	微生物	濃縮剤	濃縮剤の量（ｍｇ／ｍＬ）	捕捉パーセント
C-3	サルモネラ	タルク	1	63
3	サルモネラ	ＡＳタルク	1	82
C-4	サルモネラ	タルク	5	64
4	サルモネラ	ＡＳタルク	5	90
C-5	サルモネラ	タルク	10	69
5	サルモネラ	ＡＳタルク	10	95

30

【００７３】

実施例６～８及び比較例６～８

40

上述の微生物濃縮試験方法を使用して、標的微生物としてグラム陰性菌であるネズミチフス菌（*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Typhimurium）（ＡＴＣＣ ３５９８７）のさまざまな細菌濃度に対して、ＡＳタルク及びタルク１０ｍｇの試験が個別に行われた。結果を以下の表３に示す。

【００７４】

【表 5】

表 3.

実施例番号	微生物	濃縮剤	微生物濃縮 (CFU/mL)	捕捉パーセント±標準偏差
C-6	サルモネラ	タルク	10	68±9
6	サルモネラ	ASタルク	10	92±11
C-7	サルモネラ	タルク	100	74±3
7	サルモネラ	ASタルク	100	98±3
C-8	サルモネラ	タルク	1000	69±1
8	サルモネラ	ASタルク	1000	92±1

10

## 【0075】

実施例 9 ~ 11 及び比較例 9 ~ 11

上述の微生物濃縮試験方法を使用して、標的微生物としてネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium) (ATCC 35987) に対するインキュベーション 5 分間、10 分間、及び 15 分間の場合の細菌濃縮について、10 mg の AS タルク及びタルクの試験が個別に行われた。結果を下の表 4 に示す (全試料の標準偏差は 10 パーセント未満)。

20

## 【0076】

【表 6】

表 4.

実施例番号	微生物	濃縮剤	培養時間 (分)	捕捉パーセント
C-9	サルモネラ	タルク	5	74
9	サルモネラ	ASタルク	5	97
C-10	サルモネラ	タルク	10	77
10	サルモネラ	ASタルク	10	96
C-11	サルモネラ	タルク	15	75
11	サルモネラ	ASタルク	15	92

30

## 【0077】

実施例 12 及び比較実施例 12

上述の微生物濃縮試験方法を使用して、ただし吸着緩衝液の代わりにバターフィールド緩衝液を使用し、標的微生物のサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) ( $10^2$  CFU/mL、ATCC 201390) の酵母濃縮について、AS タルク及びタルク 10 mg の試験が個別に行われた。得られた物質を 3 M (商標) ペトリフィルム (Petrifilm) (商標) 酵母・カビ計数プレート (Yeast and Mold Count Plate) 培地 (ドライ、脱水可能、3 M 社、ミネソタ州セントポール) 上で培養し、メーカーの指示に従い 5 日間インキュベートした。単離された酵母コロニーを手動で数え、捕捉したパーセンテージを上述のように計算した。捕捉パーセントは AS タルクでは 97 パーセント、タルクでは 82 パーセントであった (全試料について標準偏差は 10 パーセント未満)。

40

## 【0078】

実施例 13 ~ 15

食品試料を地元の食料品店 (セントポールのカブ・フーズ (Cub Foods)) から購入した。七面鳥肉スライス及びアップルジュース (11 g) を滅菌済みガラス皿内で計量し、滅菌済みストマッカー (Stomacher) (商標) ポリエチレンフィルタ袋 (スーアード社 (S

50



eward Corp)、英国ノーフォーク)に加えた。食品試料は、サルモネラ菌亜種ネズミチフス菌(ATCC 35987)の18~20時間の一晩培養物(ストック)を用いて、濃度 $10^2$  CFU/mLで菌を添加した。この後に、99 mLのバターフィールド(Butterfield's)緩衝液を、菌を添加した試料に加えた。得られた試料をストマッカー(Stomacher)(商標)400サーキュレーター(Circulator)実験用ブレンダー(スーアード社(Seward Corp)、英国ノーフォーク)で2分間サイクルで混合した。混合した試料を滅菌済み50 mL遠心管(BDファルコン(Falcon)(商標)、ベクトン・ディッキンソン社(Becton Dickinson)、ニュージャージー州フランクリンレークス)に加え、毎分2000回転(rpm)で5分間遠心分離にかけ、大きな破片を除去した。得られた上澄み液を、試料として更なる試験に使用した。アップルジュースから得られた上澄みのpHは、1 N水酸化ナトリウム(VWR、ペンシルバニア州ウエストチェスター)を加えることにより、試験する前に、7.2に調整された。水飲み場の飲料水(100 mL)は、滅菌済み250 mLガラス瓶(VWR、ペンシルバニア州ウエストチェスター)に採取し、標的微生物のサルモネラ菌亜種ネズミチフス菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium)(ATCC 35987)を $10^2$  CFU/mLで接種し、手で5回転倒混和し、室温(25)で15分間インキュベートした。この飲料水試料を更なる試験に使用した。

#### 【0079】

上述の細菌濃縮試験方法を用い、上記のように調製された1 mL試験試料それぞれを、ASタルク10 mgを含んだ試験管に別々に加え、標的微生物であるサルモネラ菌亜種ネズミチフス菌(ATCC 35987)の細菌濃縮について試験が行われた。結果を下の表5に示す(全試料の標準偏差は10パーセント未満)。

#### 【0080】

#### 【表7】

表5.

実施例番号	微生物	濃縮剤	試料	捕捉パーセント
13	サルモネラ	ASタルク	アップルジュース	86
14	サルモネラ	ASタルク	七面鳥肉	78
15	サルモネラ	ASタルク	飲料水	98

#### 【0081】

#### 実施例16及び17

大量の試料(30 mL試料体積当たりASタルク300 mg)からの標的微生物サルモネラ菌亜種ネズミチフス菌(ATCC 35987)の濃縮について、ASタルクが試験された。水飲み場の飲料水(100 mL)は、滅菌済み250 mLガラス瓶(VWR、ペンシルバニア州ウエストチェスター)に採取し、標的微生物のサルモネラ菌亜種ネズミチフス菌(ATCC 35987)を $10^2$  CFU/mLで接種した。結果として得られた接種済みの水を、手で5回転倒混和し、室温(25)で15分間インキュベートした。インキュベートした飲料水試料30 mLを、ASタルク300 mgが入った滅菌済み50 mL円錐形ポリプロピレン製遠心管(BDファルコン(Falcon)(商標)、ベクトン・ディッキンソン社(Becton Dickinson)、ニュージャージー州フランクリンレークス)に加え、上記の微生物濃縮試験方法を使用して試験を行った。結果として得られた沈殿したASタルクを、30 mL滅菌済みバターフィールド緩衝液中に再懸濁させ、その結果として得られた懸濁液1 mLを、3 M(商標)ペトリフィルム(Petrifilm)(商標)エアロビック・カウント・プレート(Aerobic Count Plates)培地上で培養した。捕捉パーセントは98パーセントであった(標準偏差は10パーセント未満)。

#### 【0082】

地元の食料品店(セントポールのカブ・フーズ(Cub Foods))から購入した、丸のま

まのグレートマト（11g）を滅菌済みペトリ皿に入れ、標的微生物のサルモネラ菌亜種ネズミチフス菌（ATCC 35987）を $10^2$  CFU/mLで接種し、手で5回渦流で混合し、室温（25℃）で5分間インキュベートした。このトマトを、バターフィールド緩衝液99mLが入った滅菌済みのストマッカー（Stomacher）（商標）ポリエチレンフィルターバッグ（スーアード社（Seward Corp）、英国ノーフォーク）に加えた。バッグの内容物を1分間渦流で混合した。試料30mLを、ASタルク300mgが入った滅菌済み50mL円錐形ポリプロピレン製遠心管（BDファルコン（Falcon）（商標）、ベクトン・ディッキンソン社（Becton Dickinson）、ニュージャージー州フランクリンパークス）に加え、上述の微生物濃縮試験方法を使用して細菌濃縮の試験を行った。ASタルク粒子は、2000 rpmで5分間遠心分離にかけることにより沈殿させた（エッペンドルフ社（Eppendorf）、ニューヨーク州ウェストベリー）。沈殿した粒子を、30mL滅菌済みバターフィールド緩衝液中に再懸濁させ、得られた懸濁液1mLを、3M（商標）ペトリフィルム（Petrifilm）（商標）エアロビック・カウント・プレート（Aerobic Count Plates）培地上で培養した。捕捉パーセントは99パーセントであった（標準偏差は10パーセント未満）。

10

## 【0083】

## 実施例18及び19

標的細菌内生孢子バチルス・アトロファエウス（*Bacillus atrophaeus*）（ATCC 9372）及び枯草菌（*Bacillus subtilis*）（ATCC 19659）に対する濃縮について、10mgのASタルクの試験が行われた。上述の微生物濃縮試験方法を利用し、次の変更を加えた：一晚培養物が、 $2 \times 10^2$  CFU/mLのバチルス・アトロファエウス及び $7 \times 10^2$  CFU/mLの枯草菌をそれぞれ有し、得られた上澄みを未希釈で培養し、結合したバチルス・アトロファエウスを伴い沈殿した濃縮剤を1mLの滅菌バターフィールド（Butterfield's）緩衝液に再懸濁させ、培養した。結合した枯草菌を伴い沈殿した濃縮剤を5mLの滅菌バターフィールド（Butterfield's）緩衝液に再懸濁させ、培養した（各1mL）。捕捉効率は、培養した上澄み液からの計数に基づいて計算され、その結果を下の表6に示す（全試料の標準偏差は10パーセント未満）。

20

## 【0084】

## 【表8】

30

表6.

実施例番号	微生物	濃縮剤	捕捉パーセント
18	バチルス・アトロファエウス	ASタルク	97
19	枯草菌	ASタルク	95

## 【0085】

## 実施例20及び21

標的の非エンベロープ型細菌感染ウイルスである大腸菌バクテリオファージMS2（ATCC 15597-B1；しばしばさまざまなヒト感染性非エンベロープ腸内ウイルスのサロゲートとして使用される）の濃度に対して、10mgのASタルクの試験が行われた。二層寒天法（下記に記述）を使用し、大腸菌細菌（ATCC 15597）を宿主として使用し、大腸菌バクテリオファージMS2（ATCC 15597-B1）の捕捉の検定を行った。

40

## 【0086】

大腸菌バクテリオファージMS2ストックをpH7.2の滅菌1X吸着緩衝液（5mM KCl、1mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1mM  $\text{MgCl}_2$ 、及び1mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ を含む）中で10倍段階希釈し、1ミリリットル当たり $10^3$ 及び $10^2$ プラーク形成単位（PFU/mL）の2つの希釈を得た。得られた体積1.0mLのバクテリオファージ希釈液を、10mgの濃縮剤が入った、ラベル付け、滅菌済みの5mLのポリプロピレン試

50

験管（ＢＤファルコン（Falcon）（商標）、ベクトン・ディッキンソン社（Becton Dickinson）、ニュージャージー州フランクリンレークス）に加え、サーモライン・マキシミックス・プラス（Thermolyne Maximix Plus）（商標）渦流ミキサー（バーンステッド・インターナショナル社（Barnstead International）、アイオワ州）上で混合した。キャップをした試験管を、サーモライン・ヴァリ・ミックス（Thermolyne Vari Mix）（商標）振盪器プラットフォーム（バーンステッド・インターナショナル社（Barnstead International）、アイオワ州）上で、室温（２５℃）にて１５分間インキュベートした。インキュベーション後、試験管を１０分間実験台の上に静置し、濃縮剤を沈殿させた。濃縮剤を含まない１．０ｍＬのバクテリオファージ希釈液が入った対照試料試験管を、同じように処理した。得られた沈殿した濃縮剤及び上澄み液（及び対照試料）を次に分析に使用した。

10

#### 【００８７】

１００マイクロリットルの上澄み液を取り出し、下記の二層寒天法を使用してバクテリオファージの検定を行った。更に上澄みを８００マイクロリットル取り出して廃棄した。１００マイクロリットルの沈殿した濃縮剤も、バクテリオファージの検定を行った。

#### 【００８８】

二層寒天法：

大腸菌細菌（ＡＴＣＣ １５５９７）の単一コロニーを２５ｍＬの滅菌済み３重量パーセントのトリプシン大豆ブロス（Ｂａｃｔｏ（商標）トリプシン・ソイ・ブロス（Tryptic Soy Broth）（ベクトン・ディッキンソン社（Becton Dickinson and Company）、メリーランド州スパークス、メーカーの指示に従って調製）に接種し、振盪インキュベーター（Ｉｎｎｏｖａ（商標）４４、ニュー・ブランズウィック・サイエンティフィック社（New Brunswick Scientific Co., Inc.）、ニュージャージー州エディソン）を毎分２５０回転動（ｒｐｍ）に設定して一晩、３７℃でインキュベートした。この一晩おいた７５０ミリリットルの培養物が、７５ｍＬの滅菌済み３重量パーセントのトリプシン大豆ブロスにインキュベートするために使用された。得られた培養物３７℃を２５０ｒｐｍに設定した振盪インキュベーターで３７℃でインキュベートし、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ⅲ分光光度計（モレキュラー・デバイズ社（Molecular Devices）、カリフォルニア州サニーヴェール）を使用して５５０ｎｍの吸光度（吸光度値０．３～０．６）で測定された対数期における大腸菌細胞を得た。細胞は、検定に使用するまでの間、氷上でインキュベートされた。

20

30

#### 【００８９】

１００マイクロリットルの上述バクテリオファージ試験試料を、氷上でインキュベートした大腸菌（宿主細菌）細胞７５マイクロリットルと混合し、室温（２５℃）で５分間インキュベートした。得られた試料を、５ｍＬの滅菌済みの、上部が溶融した寒天（３重量パーセントのトリプシン大豆ブロス、１．５重量パーセントのＮａＣｌ、０．６重量パーセントの寒天で、当日に調製し、４８℃水浴中に保管したもの）と混合した。混合物を次に、ペトリ皿内の下側寒天（３重量パーセントのトリプシン大豆ブロス、１．５重量パーセントのＮａＣｌ、１．２重量パーセントの寒天）の上に注いだ。混合物の溶融寒天を５分間固まらせてから、ペトリ皿又はプレートを目視で点検し、これらの沈殿濃縮剤を含むプレートが（対照プレートと共に）、バクテリオファージプラークの存在を示した。捕捉効率は、培養した上澄みの計数に基づいて計算し、 $10^2$  PFU/mL希釈について７２パーセントと判定された（標準偏差は１０パーセント未満）。

40

#### 【００９０】

実施例２２

アップルジュースを地元の食料品店（セントポールのカブ・フーズ（Cub Foods））から購入した。アップルジュース（１１ｇ）を滅菌したガラス皿内で計量し、９９ｍＬの滅菌バターフィールド（Butterfield's）緩衝液を加えた。加えた液を１分間渦流で混合し、２つの細菌培養物をこれに添加した。培養物は、ネズミチフス菌（Salmonella enteric

50

a subsp. enterica serovar Typhimurium) (ATCC 35987) 及び大腸菌 (Escherichia coli) (ATCC 51813) をそれぞれ 1 CFU/mL の濃度で、18 ~ 20 時間の一晚培養物 (細菌ストック) を用いた。細菌ストックを、上述のように 1 X 吸着緩衝液中で段階希釈した。

#### 【0091】

上述の細菌濃縮試験方法を使用して、菌を添加したアップルジュース試料 10 mL を、100 mg の AS タルクが入った滅菌済み 50 mL 円錐形ポリプロピレン製遠心管 (BD フアルコン (Falcon) (商標)、ベクトン・ディッキンソン社 (Becton Dickinson)、ニュージャージー州フランクリンレークス) に加え、15 分間インキュベートして、標的微生物であるサルモネラ (Salmonella) の (競合微生物である大腸菌の存在下における) 細菌捕捉 / 濃縮について試験を行った。得られた上澄み液を除去し、沈殿した濃縮剤を、滅菌 3 重量パーセントのトリプシン大豆ブロス (バクト (Bacto) (商標) トリプシン大豆ブロス (Tryptic Soy Broth)、ベクトン・ディッキンソン社 (Becton Dickinson and Company)、メリーランド州スパークスをメーカーの指示に従い調製) 2 mL が入った別の 50 mL 遠心管に移した。この管にゆるくキャップをし、内容物を混合して、37 でインキュベートした。一晚インキュベーションした後、得られたブロス混合物を、SDI (デラウェア州ニューアークのストラテジック・ダイアグノスティックス社 (Strategic Diagnostics, Inc.)) から販売されているラピッドチェック (RapidChek) (商標) サルモネラ・ラテラルフロー・イムノアッセイ試験ストリップを用いて、サルモネラの存在について試験した。試験ストリップを目視検査し、サルモネラ陽性が示された。

#### 【0092】

この微生物を含むブロス混合物について、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による核酸検出も実施された。上述の一晚インキュベートした濃縮剤含有ブロス 1 mL を、試験試料として、アプライド・バイオシステムズ社 (Applied Biosystems) (カリフォルニア州フォスターシティ) から販売されているタックマン (TaqMan) (商標) ABI サルモネラ検出キット (Salmonella enterica Detection Kit) を用いて、サルモネラの存在を検定した。対照試料として、ネズミチフス菌 (Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium) (ATCC 35987) の 18 ~ 20 時間一晚培養物 (ストック) 1 mL も検定が行われた。PCR 試験が実施された。ストラタジーン (Stratagene) Mx3005P (商標) QPCR (定量 PCR) システム (ストラタジーン社 (Stratagene Corporation)、カリフォルニア州ラホーヤ) で、1 サイクル当たり次のサイクル条件を用いて、45 サイクルを実施した: 25 で 30 秒間、95 で 10 分間、95 で 15 秒間、及び 60 で 1 分間。対照試料について、平均 ( $n = 2$ ) サイクル閾値 (CT 値) 17.71 が得られた。濃縮剤を含む試験試料について、平均 ( $n = 2$ ) CT 値 19.88 が得られ、PCR 反応陽性が示され、サルモネラの存在が確認された。

#### 【0093】

本出願では、以下の態様が提供される。

1. (a) 非晶質金属ケイ酸塩を含み、X 線光電子分光法 (XPS) で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が 0.5 以下である表面組成物を有する濃縮剤を提供する工程と、(b) 少なくとも 1 種類の微生物株を含む試料を提供する工程と、(c) 前記濃縮剤と前記試料とを接触させることにより、少なくとも 1 種類の前記微生物株のうち少なくとも一部分が前記濃縮剤に結合又は捕捉されるようにする工程と、を含むプロセス。
2. 前記プロセスが、少なくとも 1 種類の結合した微生物株の存在を検出する工程を更に含む、態様 1 に記載のプロセス。
3. 前記濃縮剤が粒子濃縮剤である、態様 1 に記載のプロセス。
4. 前記表面組成物のケイ素原子に対する金属原子の比が 0.4 以下である、態様 1 に記載のプロセス。
5. 前記表面組成物が少なくとも平均 10 原子パーセントの炭素を有する、態様 1 に記載のプロセス。
6. 前記濃縮剤が、pH 7 においてマイナスのゼータ電位を有する、態様 1 に記載のプロ

ロセス。

7. 前記金属が、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、アルミニウム、鉄、チタン、及びこれらの組み合わせから選択される、態様1に記載のプロセス。

8. 前記金属がマグネシウムである、態様7に記載のプロセス。

9. 前記濃縮剤が、少なくとも部分的に融合した粒子形状である非晶質金属ケイ酸塩を含む、態様1に記載のプロセス。

10. 前記非晶質金属ケイ酸塩が長球化されている、態様9に記載のプロセス。

11. 前記濃縮剤が非晶質の長球化ケイ酸マグネシウムである、態様10に記載のプロセス。

12. 前記試料が液体の形態である、態様1に記載のプロセス。

10

13. 前記微生物株が、細菌、真菌類、酵母、原生動物、ウイルス、細菌内生孢子、及びこれらの組み合わせから選択される、態様1に記載のプロセス。

14. 前記微生物株が、細菌、酵母、ウイルス、細菌内生孢子、及びこれらの組み合わせから選択される、態様13に記載のプロセス。

15. 前記接触が、前記濃縮剤と前記試料との混合により実施される、態様1に記載のプロセス。

16. 前記検出が、培養による方法、顕微鏡及びその他の画像手法、遺伝子学的検出方法、免疫学的検出方法、生物発光による検出方法、及びこれらの組み合わせから選択される方法によって実施される、態様2に記載のプロセス。

17. 前記プロセスが、結果として得られる微生物結合濃縮剤を凝離する工程を更に含む、態様1に記載のプロセス。

20

18. 前記凝離が、重力沈殿、遠心分離、濾過、及びこれらの組み合わせから選択される方法によって達成される、態様17に記載のプロセス。

19. 前記凝離が、少なくとも部分的に重力沈殿によって達成される、態様18に記載のプロセス。

20. 前記プロセスが、結果として得られる凝離濃縮剤を前記試料から分離する工程を更に含む、態様17に記載のプロセス。

21. (a) 非晶質の長球化ケイ酸マグネシウムを含み、X線光電子分光法(XPS)で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が0.5以下である表面組成物を有する濃縮剤を提供する工程と、(b) 細菌、酵母、ウイルス、細菌内生孢子、及びこれらの組み合わせから選択された少なくとも1種類の微生物株を含む試料を提供する工程と、(c) 前記濃縮剤と前記試料とを接触させることにより、少なくとも1種類の前記微生物株のうち少なくとも一部分が前記濃縮剤により結合又は捕捉されるようにする工程と、を含むプロセス。

30

22. 前記プロセスが、少なくとも1種類の結合した微生物株の存在を検出する工程を更に含む、態様21に記載のプロセス。

23. 前記濃縮剤が微小粒子を含み、前記試料が液体の形態であり、かつ前記の接触が前記濃縮剤と前記試料との混合により実施される、態様21に記載のプロセス。

24. 前記プロセスが、結果として得られる微生物結合濃縮剤を、少なくとも部分的に重力沈殿により凝離する工程を更に含む、態様23に記載のプロセス。

40

25. (a) 非晶質金属ケイ酸塩を含み、X線光電子分光法(XPS)で測定したケイ素原子に対する金属原子の比が0.5以下である表面組成物を有する濃縮剤と、(b) 試験容器と、(c) 態様1に記載のプロセス実施における前記濃縮剤の使用説明書と、を含む、キット。

26. 前記キットが、微生物培地、溶解試薬、緩衝液、遺伝子学的検出検定の構成要素、生物発光検出検定の構成要素、及びこれらの組み合わせから選択される、少なくとも1つの構成要素を更に含む、態様25に記載のキット。

27. 前記濃縮剤が粒子の形態であり、前記試験容器が滅菌済みかつ使い捨てであり、前記試験容器内に前記濃縮剤が入っている、態様25に記載のキット。

28. 前記キットが、1つ以上の破って開けるタイプの密閉パウチに、粒子形態の前記

50

濃縮剤を予め計量した、少なくとも1つの分包を含む、態様25に記載のキット。

29. 前記濃縮剤が非晶質の長球化ケイ酸マグネシウムを含む、態様25に記載のキット。

本明細書で引用した特許、特許文献、及び公報に含有される参照された記述内容は、その全体が、それぞれ個別に組み込まれているかのように、参照として組み込まれる。本発明に対する様々な予見できない修正及び変更が、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく当業者に明らかとなるであろう。本発明は、本明細書に記載した例示的な実施形態及び実施例によって過度に限定されるものではなく、またかかる実施例及び実施形態は、一例として表されているだけであり、ただし、本発明の範囲は、以下のように本明細書に記載した請求項によってのみ限定されることを意図するものと理解されるべきである。

## フロントページの続き

(74)代理人 100102990

弁理士 小林 良博

(74)代理人 100098486

弁理士 加藤 憲一

(72)発明者 クシルサガール, マンジリ ティー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427, スリーエム センター

(72)発明者 クシルサガール, トゥシャール エー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427, スリーエム センター

(72)発明者 ウッド, トーマス イー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427, スリーエム センター

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特公平06-081595(JP, B2)

米国特許第04560660(US, A)

特開平02-225314(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-1/70

C12M 1/00-3/10

C12N 1/00-15/90

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)

PubMed