

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4266637号
(P4266637)

(45) 発行日 平成21年5月20日(2009.5.20)

(24) 登録日 平成21年2月27日(2009.2.27)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 33/48 (2006.01)

G O 1 N 33/48 A

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 B

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

G O 1 N 33/543 (2006.01)

G O 1 N 33/543 5 4 1 B

請求項の数 14 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-563278 (P2002-563278)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月5日(2002.2.5)
 (65) 公表番号 特表2004-526143 (P2004-526143A)
 (43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000498
 (87) 国際公開番号 W02002/062941
 (87) 国際公開日 平成14年8月15日(2002.8.15)
 審査請求日 平成16年10月4日(2004.10.4)
 (31) 優先権主張番号 0102790.3
 (32) 優先日 平成13年2月5日(2001.2.5)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0126674.1
 (32) 優先日 平成13年11月7日(2001.11.7)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 390019585
 ミリポア・コーポレーション
 MILLIPORE CORPORATI
 ON
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・O 1
 8 2 1、ビレリカ、コンコード・ロード・
 2 9 0
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

流体試料における微生物の存在を検出するための、下記の工程を含む方法：

i) 特異的結合対の第1メンバーが付着した複数の中空繊維フィルターメンブレンを含むフィルターデバイスの試料入口に試料を通し、該微生物は特異的結合対の第2メンバーを提示するものであり、該メンブレンは第1末端と第2末端、内腔を定める外面と内面を有し、各メンブレンの第1末端は開放して試料入口と連絡しており、各メンブレンの第2末端を通る流れは制限され、このためメンブレンの第1末端と細孔を通る流れのみが生じ、試料混合物はメンブレンの細孔を通して濾過されて濾過残渣がメンブレンの内腔に残り；

i i) 結合していない濾過残渣部分をメンブレン内腔から洗い去り；

i i i) メンブレンに付着した特異的結合対があればその存在を検出し；そして

i v) 検出工程(i i i)の結果と流体試料における該微生物の存在との相関性に基づき、流体試料における該微生物の存在を検出する；

ここで、メンブレンに特異的結合対の第1メンバーを付着させる前に、メンブレンは湿潤剤として使用されるアルコール類および非イオン性界面活性剤よりなる群のうちの少なくとも1つで処理される。

【請求項 2】

試料が少なくとも25、50、100、200、250、300、400、500、600、700、750、800、900または1000mlの容量を有する、請求項1に

記載の方法。

【請求項 3】

特異的結合対の第 1 メンバーが抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

メンブレンが、ポリプロピレン、ポリスルホン、酢酸セルロースおよびナイロンのメンブレンよりなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (i) の前にさらに下記の工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法

a) 気体試料を、ガスフィルターを含むガス濾過デバイスに通し；そして

b) ガス濾過デバイスのフィルターを試料用流体と接触させ、フィルターに捕獲された微生物があればそれを懸濁または溶解して、流体試料を調製する。

【請求項 6】

パッケージの内容物を特定の微生物の存在について検査するための、下記の工程を含む方法：

a) 試料用流体を収容した第 2 チャンバーと穿孔器具により連絡した第 1 チャンバーにパッケージを入れ；

b) パッケージと穿孔器具を接触させ、これによりパッケージ内の任意の固体物質はこの穿孔器具を通して第 2 チャンバーの試料用流体中へ入り、流体試料を得ることができ；そして

c) この流体試料について請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法を実施する。

【請求項 7】

さらに、第 1 チャンバー内の圧力が第 2 チャンバー内の圧力より高くなるように第 1 チャンバーと第 2 チャンバーの相対気圧を変更させる工程を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

パッケージがセルフシールパッドを備えており、このセルフシールパッドに穿孔器具を接触させる、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

固体試料における微生物の存在を検出するための、下記の工程を含む方法：

a) 微生物が流体相に装入されるように固体試料を試料用流体と接触させて流体試料にし；そして

b) この流体試料について請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法を実施する。

【請求項 10】

検出工程 (i i i) が、酵素イムノソルベントアッセイ、放射性標識の検出、蛍光の検出、A T P アッセイ、平板培養および P C R よりなる群から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

メンブレンを複数の特異的結合対の第 1 メンバーでコーティングする、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

メンブレンに特異的結合対の第 1 メンバーを付着させる前に、メンブレンをイソプロパノールで処理する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

メンブレンに特異的結合対の第 1 メンバーを付着させる前に、メンブレンをトゥイーン - 20 で処理する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

試料入口および複数の中空繊維フィルターメンブレンを含み、該メンブレンに特異的結合対の第 1 メンバーが付着しており、特定の微生物が特異的結合対の第 2 メンバーを提示し、該メンブレンは第 1 末端と第 2 末端、内腔を定める外面と内面を有し、各メンブレン

10

20

30

40

50

の第1末端は開放して試料入口と連絡しており、各メンブレンの第2末端を通る流れは制限され、このためメンブレンの第1末端と細孔を通る流れのみが生じ、したがって試料入口からデバイス内へ通した試料混合物はメンブレンの細孔を通して濾過されて濾過残渣がメンブレンの内腔に残るデバイスであって、メンブレンに特異的結合対の第1メンバーを付着させる前に、メンブレンは湿潤剤として使用されるアルコール類および非イオン性界面活性剤よりなる群のうちの少なくとも1つで処理される前記デバイス。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

本発明は、ビールなどコロイド混合物中の微生物、特に酵母および細菌を検出するための改良方法に関する。本発明はまた、液相懸濁物にするかまたは溶解することができる空気試料および固体試料（たとえば食品または細菌孢子）中の微生物の検出に関する。

【0002】

食品やビールなどの飲料の製造に際しては、最終製品の品質を保証するために特定の微生物の存在について検査を行う。醸造プロセスには、たとえば数時間毎に少なくとも25ml容量の試料、好ましくは約250ml容量の試料をインライン検査することが要求される。その際、微生物、すなわち酵母および細菌を含有する可能性のある粒状物質を試料から分離し、次いで特定の微生物の存否を判定しなければならない。これを行うために用いられるデバイスには、平均細孔直径0.45μmの平坦なフィルターを備えたBibby使い捨て真空フィルターユニット、および平均細孔直径0.45μmまたは0.2μmの平坦なフィルターを備えた受け器付きNalgeneフィルターホルダーが含まれる（たとえばMerck Laboratory Supplies Catalogue, 1998, p. 482参照）。そのようなデバイスは最大容量100mlの試料を濾過できるにすぎず、50cm²の平面表面積をもち、使用法が複雑であるため試料の検査に30分もかかることがある。それらは、その最大容量を濾過すると試料流体（たとえばラガー、エールその他のコロイド溶液）中に存在するタンパク質などの粒状物質で目詰まりし、その後の濾過を行うとすれば細胞溶解を起こすほどの高い圧力が要求され、その結果、微生物の検出が妨げられ、誤った結果が得られる。

【0003】

先行技術のデバイスは、試料から微生物を分離および検出するのに本発明のデバイスおよび方法を用いるより実質的に長い時間がかかる。WO01/11006には先行技術に対する改良が開示されており、より迅速に微生物を分離および検出でき、かつその後の微生物の回収、したがって検査が比較的単純で容易である。本発明のデバイスおよび方法はWO01/11006のものと異なる。特に（後に詳述するように）本発明方法は単なる再懸濁工程ではなく洗浄工程を伴う。

【0004】

本発明のデバイスおよび方法は、試料から微生物を分離および検出するためのよりいっそう迅速かつ単純な方法を提供することにより、WO01/11006その他の先行技術をさらに改良したものである。

【0005】

特に、本発明のデバイスはたとえば1～3個程度の少数の細菌を含有する100ml容量の被験溶液中のすべての細菌を迅速に検出できることが認められた。より大容量のもの、たとえば1～3個の細菌を含有する1000mlのラガーについても、同様な結果を達成できる。

【0006】

本発明によれば、流体試料における微生物の存在を検出するための、下記の工程を含む方法が提供される：

i) 特異的結合対の第1メンバーが付着した複数の中空繊維フィルターメンブレンを含むフィルターデバイスの試料入口に試料を通し、該微生物は特異的結合対の第2メンバーを提示するものであり、該メンブレンは第1末端と第2末端、内腔を定める外面と内面を

10

20

30

40

50

有し、各メンブレンの第1末端は開放して試料入口と連絡しており、各メンブレンの第2末端を通る流れは制限され、このためメンブレンの第1末端と細孔を通る流れのみが生じ、試料混合物はメンブレンの細孔を通して濾過されて濾過残渣 (f i l t r a n d) がメンブレンの内腔に残り；

i i) 結合していない濾過残渣部分をメンブレン内腔から洗い去り；

i i i) メンブレンに付着した特異的結合対があればその存在を検出し；そして

i v) 工程 (i i i) の検出結果と流体試料における該微生物の存在との相関性を判定する。

【 0 0 0 7 】

試料は、たとえば少なくとも25、50、100、200、250、300、400、500、600、700、750、800、900または1000mlの容量をもつ。

” 特異的結合対のメンバー ” は、他方の分子に特異的に結合する領域を表面上またはキャビティ内にもち、このため特定の空間組織化および極性組織化について他方の分子に対し相補的であると定義される、2つの異なる分子の一方である。特異的結合対のメンバーは一般に、リガンドと受容体 (抗リガンド) 、 s b p (特異的結合対) メンバーと s b p パートナー、 s b p メンバー類などと呼ばれる。これらは通常は抗原 - 抗体など免疫対のメンバーであるが、この用語は実際には他の特異的結合対を含めた、より広い意味をもつ。

【 0 0 0 8 】

種々の形の文中における ” 抗体 ” という用語は、本明細書において免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫活性部分、すなわち抗体結合部位またはパラトープを含む分子を表わす。そのような分子は、免疫グロブリン分子の ” 抗原結合フラグメント ” とも呼ばれる。

【 0 0 0 9 】

” 付着した ” とは、特異的結合対の第1メンバーがメンブレンに物理的に拘束され、そこからの分離が阻止または妨害されていることを意味する。これは、メンブレンへの共有結合、たとえばメンブレンへの抗体の共有結合によるものであってもよく、他の手段、たとえばファンデルワールス力によるものであってもよい。したがって、特異的結合対の第1メンバー、たとえば抗体がメンブレンの繊維に単に捕捉されていてもよく、メンブレンに共有結合している必要はない。

【 0 0 1 0 】

特に、抗体そのほか特異的結合対の第1メンバーが、グルタルアルデヒドによる架橋によりポリプロピレンメンブレンに共有結合してもよい。架橋方法は当業者に自明であり、たとえばポリプロピレン基を酸化またはハロゲン化して反応性モノマーにすることにより達成できる。

【 0 0 1 1 】

液相でない被験試料、たとえば空気試料、または粒状物質その他の固体、たとえば食品を検査するためには、それらをまず懸濁流体の状態にしなければならない。これを実施するには2つの基本的状況がある：空気その他の気体試料を微生物の存在について検査する場合、ならびに固体、たとえば粉末および食品を微生物の存在について検査する場合。

【 0 0 1 2 】

1 . 気体試料の検査：

空気などの気体試料を特定の微生物の存在について検査するためには、選択した微生物を捕獲するのに十分な細孔をもつ空気 (すなわち気体) 濾過デバイスを用いる。たとえば、1 μ mの直径をもつ炭疽菌 (B a c i l l u s a n t h r a c i s) の場合、たとえば0 . 2 μ mの孔径を使用できる。空気濾過デバイスはフィルターへの空気の流通を促進するためにファンを備えていてもよく、大量の空気を比較的短期間でフィルターに通すことができ、細孔直径より大きなサイズの粒状物質がすべて保持される。次いで微生物を懸濁または溶解できる試料用流体 (たとえば特定の微生物を懸濁または溶解できる緩衝液、流体または混合物) とフィルターを接触させて、捕捉された微生物があればそれを適宜、

10

20

30

40

50

懸濁状態にし、または溶解する（すなわち流体相）。微生物を捕獲し、そしてそれらを懸濁状態にし／溶解するこの初期段階が完了すると、次いで本発明方法の残り（すなわち前記の工程（i）～（iv））を実施できる。

【0013】

試料用流体、たとえば特定の微生物を溶解または懸濁できる緩衝液その他の溶液、流体または混合物の厳密な性質は、微生物自体および前記工程（i）で用いる特異的結合対の第1メンバーの性質に依存する。試料用流体の機能は、特定の微生物を特異的結合対の第1メンバーと相互作用させ、これにより特異的結合対を適宜形成してその微生物を検出できるようにすることである。たとえば、特異的結合対の第1メンバーはその微生物または特定の微生物と特異的結合対を形成することができ、したがってその検出を行い、特異的対の形成と特定の微生物の存在との相関性を判定することができる。

10

【0014】

2. 固体の検査：

食品（たとえばケーキまたはパン）などの固体を特定の微生物の存在について検査するためには、微生物を懸濁または溶解できる試料用流体と固体を接触させて、捕捉された微生物があればそれを適宜、懸濁状態にし、または溶解する。前記のように、微生物を捕獲し、そしてそれらを懸濁状態にし／溶解するこの初期段階が完了すると、次いで本発明方法の残り（すなわち前記の工程（i）～（iv））を実施できる。

【0015】

したがって本発明によれば、固体試料における微生物の存在を検出するための、下記の工程を含む方法も提供される：

20

a) 微生物が流体相に装入されるように固体試料を試料用流体と接触させて流体試料にし；そして

b) この流体試料について工程（i）～（iv）の方法を実施する。

【0016】

固体を検査する他の例は、手紙などパッケージの内容物の検査である。前記方法を実施する；すなわち固体と試料用流体を接触させ、次いで工程（i）～（iv）の方法を実施して、特定の微生物の存在を判定する。ただし、まずパッケージ内容物を取り出さなければならぬ。それを達成するために本発明は、パッケージを装入できる第1チャンバー、試料用流体を収容した第2チャンバー、第1チャンバーと第2チャンバーの相対圧を変更する手段（たとえばポンプまたは注射器）を備え、内腔を通る流れを起こすことができる穿孔器具により第2チャンバーが第1チャンバーと連絡している装置を提供する。

30

【0017】

本発明は、パッケージの内容物を特定の微生物の存在について検査するための、下記を含む方法をも提供する：パッケージを第1チャンバーに入れ、第1チャンバーと第2チャンバーの相対気圧を変更し、パッケージと穿孔器具を接触させ、これによりパッケージが穿孔されてパッケージ内の固体物質、特に粒状物質がパッケージから試料用流体中へ入り、試料用流体に懸濁または溶解して流体試料が得られる。次いでこの流体試料について工程（i）～（iv）の方法を実施し、それに含まれる微生物があれば検出される。

【0018】

40

したがって本発明によれば、パッケージの内容物を特定の微生物の存在について検査するための、下記の工程を含む方法が提供される：

a) 試料用流体を収容した第2チャンバーと穿孔器具により連絡した第1チャンバーにパッケージを入れ；

b) パッケージと穿孔器具を接触させ、これによりパッケージ内の固体物質はいずれもこの穿孔器具を通して第2チャンバーの試料用流体中へ入り、流体試料を得ることができ；そして

c) この流体試料について工程（i）～（iv）の方法を実施する。

【0019】

この方法はさらに、第1チャンバー内の圧力が第2チャンバー内の圧力より高くなるよ

50

うに第1チャンバーと第2チャンバーの相対気圧変更を行う工程を含む。これにより、第1チャンバー内のパッケージから第2チャンバーへの固体物質、たとえば粒状物質の移動を、促進または遂行できる。

【0020】

パッケージをこの装置から安全に取り出すことができるようにパッケージはセルフシールパッドを備えていてもよく、これを穿孔器具と接触させる - パッケージを穿孔器具から抜き取ると、パッドはセルフシールされ、固体がパッケージからそれ以上出るのが阻止され、装置からのパッケージ取出しが安全になる。

【0021】

穿孔器具は、パッケージを穿孔した際にシールが破れるようにシールされていてもよい - この方法で第1チャンバーと第2チャンバーの間の圧力差を維持することができ、第2チャンバー内の圧力は第1チャンバー内の圧力と対比して低い。あるいは、穿孔した後にチャンバー内の圧力を変更することができる。穿孔器具はセルフシールであってもよい。したがって本発明によれば、パッケージの内容物を特定の微生物の存在について検査するための方法であって、パッケージを第1チャンバーに入れ、パッケージが穿孔されてパッケージ内の固体物質、特に粒状物質がパッケージから試料緩衝液（または特定の微生物を懸濁または溶解できる他の溶液、流体または混合物）へ通過できるように、パッケージと穿孔器具を接触させ、そして第1チャンバー内の気圧と対比して第2チャンバー内の気圧を低下させ、これにより固体物質がパッケージから試料緩衝液中へ通過して試料緩衝液（または特定の微生物を懸濁または溶解できる他の溶液、流体または混合物）に懸濁または溶解する方法が提供される。

【0022】

あるいは、第1チャンバーと第2チャンバーの間に圧力差を設けず、二者間の固体物質の移行をたとえば重力により行うのももちろん可能である。

気体および固体を特定の微生物の存在について検査するこれらすべての場合、本発明は迅速に正確な結果を与えるという明らかな利点をもつ。試料のアッセイに要する時間は、相当する他のアッセイ法、たとえばELISAおよびPCRより何倍も短い。本発明を用いた場合の一般的なアッセイ時間は15分である。空気をサンプリングする場合、きわめて大容量の空気をフィルターに通すことができ（たとえば10、25、50、100、250、500、750、1000、2500、5000、7500または10000リットルの空気）、保持された粒状物質をきわめて短期間で検査することができる - この場合もアッセイ時間は15分が一般的である。したがってこれらの微生物検査方法によれば、これまで示唆されていない方法で検査することができ、かつきわめて迅速に結果を得ることができる。これはこれまで達成できなかったものである。

【0023】

流体試料を微生物の存在について検査する本発明は、たとえば炭疽菌抗体を特異的結合対の第1メンバーとして用いて、流体試料を炭疽菌の存在について検査するのにもちろん利用できる。

【0024】

炭疽菌の検査のほか、本発明は、生物戦争に用いられる可能性のある他のいかなる微生物の検査にも利用できる。

特異的結合対の第1メンバーと第2メンバーが結合できる条件下で、試料をフィルターメンブレンに通す。特異的結合対の第2メンバー以外の部分が特異的結合対の第1メンバーに結合する可能性を少なくすることが望ましいかまたは必要な場合、よりストリンジェントな結合（"ストリンジェントハイブリダイゼーション"とも呼ばれる）条件を採用できる。たとえば温度またはpHを変更して、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件を得ることができる。適切なハイブリダイゼーション条件は特異的結合対のメンバーに依存し、当業者に自明であろう。

【0025】

洗浄工程（ii）では、結合した特異的結合対がメンブレン内腔から洗い去られないこ

10

20

30

40

50

とが必須なのは明らかである。したがって洗浄工程では、メンブレンに付着した特異的結合対の第1メンバーに結合した特異的結合対の第2メンバー以外の濾過残渣を除去する。もちろん、場合により特異的結合対がメンブレンから脱着して非結合濾過残渣と一緒にメンブレン内腔から洗い去られる可能性もある。これが起きる場合もありうるが、特異的結合対の第2メンバーに結合した特異的結合対の第1メンバーは実質的にすべて（すなわち本質的にすべて）メンブレンに付着したままである。

【0026】

検出工程（i i i）は多様な形態のいずれかをとることができる。たとえば、結合対または微生物に、標識プローブ、たとえば酵素を含む検出抗体を結合させることにより、特異的結合対を検出できる（古典的な酵素イムノアッセイ、EIA）。あるいはプローブが放射性標識抗体または蛍光標識抗体であってもよい。他のプローブは当業者に自明である。

10

【0027】

あるいは、微生物を特異的結合対の第1メンバーから溶離（すなわち分離）し、別個の検出工程を用いてもよい。たとえば、溶離した微生物を細胞溶解させ、放出されたATPがあればそれをルシフェラーゼアッセイにより検出できる。あるいは微生物特異的抗体を用いてもよく、または溶出物を一般的（または微生物特異的）栄養培地に接種し、微生物コロニーの増殖を検出することができる。その微生物に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを一般的PCR試験に用いて溶出物を検査することもできる。

【0028】

20

本発明に利用できる広範な検出工程は、メンブレンに複数の特異的結合対の第1メンバーが付着していてもよいことをも意味する。異なる第1メンバーを互いに混和してメンブレン全体に付着させてもよく、または特定の特異的結合対の第1メンバーをメンブレンの特定位置に付着させてもよい。用いる検出工程は複数の特異的結合対を全般的に検出および/または定量できるものであってもよく、選択した1以上の特異的結合対を検出および/または定量できるものであってもよい。たとえば第1の特異的結合対の存在を第1の発蛍光団により検出し、第2の特異的結合対の存在を放射性標識により、あるいは第1の発蛍光団のものと識別できる励起および/または発光スペクトルをもつ第2の発蛍光団により検出することができる。

【0029】

30

先行技術のデバイスは一般に、濾過した粒状物質を硬い”ビスケット（比較的強く圧縮された高密度の粒状物質塊）”としてメンブレン表面に生成し、微生物その他の粒状物質はメンブレンの気孔を閉塞し、気孔内に捕捉される。このビスケットは取り除きにくく、微生物の存在を検査できるようにそれを処理するのは困難である。

【0030】

本発明デバイスの構造によれば、その後洗い去ることができる再懸濁可能な”ケーキ”が形成され、より低い圧力を濾過に際して使用できるため、緻密なビスケットの形成および高圧使用の必要性が避けられる。高圧で操作すると細菌の溶解が起きる可能性があり、このため不正確な結果が得られる。高圧により細菌が変形してメンブレンを通過し、不正確な結果が得られる可能性もある。

40

【0031】

先行技術の濾過デバイスおよび方法には、GE 2135902、EP302949、WO94/00222、WO84/00015、US5863501、US5814179、US4501793、特開平4-135478（WPI Abstract 1992-205001）、特開昭63-104615（WPI Abstract 1988-165566）、特開昭63-088007（WPI Abstract 1988-145060）および特開昭61-133105（WPI Abstract 1986-200908）がある。しかしこれらのいずれにも、本発明により達成できる結果を得るのに必要なそれぞれの工程を含む本発明方法は開示または示唆されていない。特に、先行技術にはより硬い”ビスケット”ではなく再懸濁可能な”ケーキ”の形の濾過残渣を生

50

成することは示唆されておらず、後続処理工程の一部として濾過残渣をメンブレンから洗い去ることも先行技術には示唆されていない。

【0032】

たとえば特開昭63-104615には、たとえばウイルスを流体から分離するためのデバイスが開示され、これは複数の中空セルロース繊維を含み、それらの一端は充填材に埋め込まれて大気へ開放されており、他端はシールされている。しかしそれには具体的な本発明方法もその利点も示唆されていない。他の濾過デバイスも知られている：たとえば“Culture Guard 中空繊維フィルター”、Cole Parmer (www.coleparmer.com)、製品コードEW-29510-50。

【0033】

有利には、ポリプロピレン繊維メンブレンを使用できることが見いだされた（前記Cole Parmer 製品はセルロース中空繊維メンブレンを使用）。

特に、メンブレンを湿潤剤、たとえばイソプロパノール、および/または界面活性剤、たとえばトゥイーン-20 (Tween-20) で処理してそれらをより親水性にし、特異的結合対の第1メンバーを付着しやすくすることができる。メンブレンに抗体を付着させる前にメンブレンをイソプロパノールで処理することにわり達成される予想外に良好な結果を後記に示す。たとえばメンブレンをトゥイーン-20（一般に0.1%）および抗体で処理する前にイソプロパノールに浸漬し、次いで自然乾燥させることができる。

【0034】

メンブレンを湿潤剤、たとえばアルコール類で前処理することにより、試料混合物がメンブレンを通り抜ける速度が著しく高まることが見いだされた。これは特に、乾燥した処理メンブレンと乾燥した未処理メンブレンを比較した場合に分かる。この流速上昇により、微生物を溶解させずに、またはメンブレンを通過させずに、確実に採集できる。

【0035】

有用な界面活性剤には、非イオン界面活性剤、特にトゥイーン-20、より具体的には5%トゥイーン-20溶液が含まれる。

複数の中空繊維フィルターメンブレンを用いると、濾過を行える表面積も、単一の平坦なメンブレンをもつ同様な全寸法（すなわちサイズ）の単一デバイスと比較して相対的に大きくなる（一般に少なくとも3倍の大きさ）。これにより、比較的大容量の試料を細孔の目詰まりが起きることなく濾過することも可能となる。これは、大量の粒状物質を含有するため平坦なフィルターメンブレンを直ちに目詰まりさせる可能性のある混濁試料（たとえばスタウト (stout)）に特に有用である。

【0036】

フィルターメンブレン材料の性質そのものも重要であることが見いだされた - イソプロパノールで前処理した平均細孔直径0.2 μm をもつ市販のポリプロピレン中空繊維メンブレンは、たとえば同様に前処理した場合ですら、平均細孔直径0.2 μm をもつポリスルホンメンブレンよりはるかに高い流速を達成できることが見いだされた。したがって、本発明の好ましい態様においては、中空繊維メンブレンはポリプロピレンメンブレンである。もちろん他のメンブレン、特に類似の物理的特性、たとえば類似の平均細孔直径およびメンブレン単位表面積当たりの細孔面積をもつものも使用できる。これらには、同様なポリスルホン、酢酸セルロースおよびナイロンのメンブレンが含まれる。

【0037】

本発明に用いる中空繊維メンブレンは、0.2 μm の平均細孔直径をもつことができる。

本発明によれば、試料入口および複数の中空繊維フィルターメンブレンを含み、該メンブレンに特異的結合対の第1メンバーが付着しており、特定の微生物が特異的結合対の第2メンバーを提示し、該メンブレンは第1末端と第2末端、内腔を定める外面と内面を有し、各メンブレンの第1末端は開放して試料入口と連絡しており、各メンブレンの第2末端を通る流れは制限され、このためメンブレンの第1末端と細孔を通る流れのみが生じ、したがって試料入口からデバイス内へ通した試料混合物はメンブレンの細孔を通して濾過

10

20

30

40

50

されて濾過残渣がメンブレンの内腔に残るデバイスも提供される。

【0038】

本発明の方法およびデバイスによる微生物検査の容易さのほか、さらに濾過速度が加わる - 実施例の結果から分かるように、本発明によれば他のデバイスが必要とする時間のごく一部で、しばしば少なくとも10倍の迅速さで、ある容量の試料流体中の特定の微生物を検出できる。

【0039】

本発明は、著しく混濁した混合物を濾過する場合ですら、その試料について一定の結果を与えるという重要な利点も備えている - 異なる一組の結果間で少なくとも99%の一致を容易に達成できる。これは、比較的不一致の可能性がある平坦なメンブレンを用いて得た結果より優れている。

10

【0040】

本発明の種々の態様において、中空繊維メンブレンはポリプロピレンからなる。これはタンパク質吸着能が低いため、多くの生物医学的用途に用いられている。ポリプロピレンメンブレンに抗体のほか特異的結合対のメンバーを付着させることは、これまで示唆されていない。本発明は特に、前記のようにポリプロピレンメンブレンをイソプロパノールで処理することにより、SDSおよびトウイン-20などの界面活性剤で洗浄した場合ですら、特異的結合対のメンバーがメンブレンに結合した状態を維持することを証明する。これはこれまで示唆されていない。

20

【0041】

本発明は、添付の図面の幾つかの図を参照した以下の記載からさらに明らかになるであろう。図面は例示のためにフィルターデバイスの1つを示すにすぎない。

別途記載しない限り、操作はすべて、標準プロトコルを用い、適宜、製造業者の指示に従って実施された。PCR、分子クローニング、マニピュレーションと配列決定、抗体生成、エピトープのマッピングとミモトープ(mimotope)の設計、細胞培養とファージディスプレイなど種々の手法のための標準プロトコルが、下記の文献に記載されている: McPherson, M. J., et al. (1991, PCR: A practical approach, オックスフォード大学出版社, オックスフォード)、Sambrook, J., et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク)、Huynh and Davies (1985, "DNA Cloning Vol. I - A Practical Approach", IRL Press, オックスフォード, 編者D. M. Glover)、Sanger, F., et al. (1977, PNAS USA, 74(12): 5463-5467)、Harlow, E. and Lane, D. ("Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク, 1998)、Jung, G. and Beck-Sickinger, A. G. (1992, Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 31: 367-486)、Harris, M. A. and Rae, I. F. ("General Techniques of Cell Culture", 1997, ケンブリッジ大学出版社, ISBN 0521 573645)、"Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual" (編者Kay, B. K., Winter, J., and McCafferty, J., Academic Press社, 1996, ISBN 0-12-402380-0)。

30

40

【0042】

特に本明細書に詳述する方法に有用な試薬および装置は、下記などから入手できる: Amersham (www.amersham.co.uk)、Boehringer Mannheim (www.boehringer-ingelheim.com)、Clontech (www.clontech.com)、Genosys (www.genosys.com)、Millipore (www.millipore.com)、Novagen

50

(www.novagen.com)、Perkin Elmer (www.perkinelmer.com)、Pharmacia (www.pharmacia.com)、Promega (www.promega.com)、Quiagen (www.quiagen.com)、Sigma (www.sigma-aldrich.com) および Stratagene (www.stratagene.com)。

【0043】

”PMID:” 参照番号が刊行物に付記されている場合、これらは米国国立医学図書館がそれらにあてがったPubMed識別番号である。同図書館から各刊行物の完全な書籍情報と抄録をwww.ncbi.nlm.nih.govで入手できる。特にたとえばPNAS、JBCおよびMBC刊行物の場合、これによって完全な刊行物の電子コピーに直接アクセスすることもできる。

10

【0044】

ラクトバシラス・ブレビス (Lactobacillus brevis) に特異的な抗原は当技術分野で周知である：たとえば Yasui T. and Yoda K. (Appl. Environ. Microbiol., 1997年11月; 63(11): 4258-33; PMID: 9361439)、Yasui T., Yoda K. (FEMS Microbiol. Lett., 1997年6月15日; 151(2): 169-76; PMID: 9228750) および Shimohashi H., Kodaira S., and Suegara N. (Jpn. J. Microbiol., 1976年10月; 20(5): 405-13; PMID: 62862); 抗ラクトバシラス・ブレビス抗体も同様に周知である (たとえば Youichi Tsuchiya, Yasukazu Nakakita, Junji Watari, and Ken Shinotsuka, 1999 American Society of Brewing Chemists (ASBC) アリゾナ州フェニックス年会, 6月19~23日, 抄録 O-17 参照)。

20

【0045】

抗体の調製

高濃度溶液のラクトバシラス・ブレビス微生物を、室温で8%ホルムアルデヒド溶液2~3時間の添加により殺した。12000rpmで10分間の遠心により細胞ペレットを得た。液体を除去し、細胞ペレットを洗浄し、無菌脱イオン水に再懸濁した。ホルムアルデヒドの痕跡がすべて除かれるまで、この遠心と洗浄の操作を繰り返した。最終細胞ペレット(免疫原)を0.5mlのPBSに再懸濁し、必要になるまで凍結保存した。この免疫原を注射する前に、0.125mlの免疫原を等部数のフロイント完全アジュバント (Sigma-Aldrich社、カタログ番号F5881) で希釈した。これにより初回注射を行った。その後、免疫原を等部数のフロイント不完全アジュバント (Sigma-Aldrich社、カタログ番号F5506) で希釈したもので3回のブースター注射を行った。再懸濁した抗原調製物の試料を同様に平板培養および計数により検査し、生存可能な細胞が残存しないことを確認した。

30

【0046】

プロテインAアフィニティークロマトグラフィー (Sigma-Aldrich社が供給、カタログ番号PURE-1A) により、血清から免疫グロブリンを精製する。

40

中空繊維メンブレンの前処理

公称孔径0.2ミクロン、長さ55cmの中空繊維ポリプロピレンメンブレン (Membrana, ドイツ国ウッペルタール; カタログ番号PP-Q3/2) をイソプロパノールに一夜浸漬した。次いでメンブレンを乾燥させ、続いてトウイーン-20(5%)に20分間浸漬し、次いで乾燥させた。

【0047】

中空繊維メンブレンの調製

前処理した一定長さの中空繊維メンブレン(前記)35本の一端を束ね合わせた。紫外線硬化性接着剤をメンブレンのごく一部に付与し、付与した後、5mmのカラーを接着領域上に滑り込ませた。次いで接着剤が硬化するまで(45秒)紫外線を照射した。すべて

50

のメンブレンを検査して、メンブレン内腔が完全に開放していることを確認した。次いで注射器フィッティング付きキャップをカラーに取り付け、紫外線硬化性接着剤で固定した。

【 0 0 4 8 】

抗ラクトバシラス・ブレビス抗体の 1 : 1 0 , 0 0 0 希釈液 5 m l (0 . 1 M 炭酸 / 炭酸水素塩緩衝液 (S i g m a 、カタログ番号 C 3 0 4 1) 中に希釈) を注射器に入れ、メンブレンのキャップに取り付けた。メンブレン内腔が溶液で濡れるように、メンブレンの他端を鉗子で閉じて溶液を装入した。メンブレンの外面に溶液が見えた時点で装入を停止した。これはメンブレンの全面が溶液で覆われたことを示す。次いでメンブレンをハイブリダイゼーションチューブ内にシールし、室温で 1 5 分間インキュベートした。

10

【 0 0 4 9 】

次いで、メンブレン内腔に空気を通し、続いて 0 . 1 % トウイーン - 2 0 を含有するリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) (1 回当たり約 5 0 m l) を数回装入して内腔を洗浄することにより、結合していない抗体を除去した。次いで、被覆したメンブレンを完全に自然乾燥させた。

【 0 0 5 0 】

中空繊維メンブレンの検査

イソプロパノールによる前処理がポリプロピレン中空繊維メンブレンへの抗体付着に及ぼす効果を証明するために、2 種類のチューブを作成した (図 3 参照) 。一方 (チューブ A 、 3 0 0) は、炭酸 / 炭酸水素塩緩衝液に一夜浸漬した後、H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ、D a k o) に結合したブタ抗体に 6 0 分間浸漬したポリプロピレン中空繊維メンブレン 3 0 1 を収容していた。他方のチューブ (チューブ B 、 3 1 0) は、イソプロパノールに一夜浸漬した後、H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ、D a k o) に結合したブタ抗体に 6 0 分間浸漬したポリプロピレン中空繊維メンブレン 3 1 1 を収容していた。次いで、0 . 1 % トウイーン - 2 0 を含有する緩衝液中に両メンブレン 3 0 1 、 3 1 1 を保持し、十分に洗浄した。

20

【 0 0 5 1 】

抗体付着度を測定するために、1 . 5 m l の H R P 基質を入れた 2 個のガラスバイアル (図示されていない) それぞれに 2 滴の T M B (テトラメチルベンザジン) 色原体試薬を装入し、各メンブレン 3 0 1 、 3 1 1 をバイアルの 1 つに浸漬し、抗体の存在を示す色の変化を発現させる。

30

【 0 0 5 2 】

結果を図 3 に示す。メンブレン 3 1 0 、 3 1 1 の濃いパッチは H R P により起きた色の变化、すなわちメンブレンへの抗体付着を示す。メンブレン 3 1 1 の方がメンブレン 3 1 0 より実質的に色が濃い。これは、より多量の抗体がそれに付着していることを示す。

【 0 0 5 3 】

結合の定量

中空繊維メンブレンに付着した抗体への微生物の結合を定量するために、既知濃度のラクトバシラス・ブレビスを含有する試料 1 0 0 m l をフィルターデバイスに通し、0 . 1 % トウイーン - 2 0 中の P B S (前記) で洗浄して結合していない微生物を除去し、結合した微生物を緩衝液 (一般に 0 . 1 M クエン酸、p H 3 . 0) で溶離する。次いで溶出微生物を微生物用平板培地に接種して、捕獲レベルを測定する。

40

【 0 0 5 4 】

結合の特異性

メンブレンの特異性を証明するために、既知濃度の混合微生物を含有する溶液 1 0 0 m l をフィルターに装入し、前記操作を実施する。ターゲット微生物、すなわちラクトバシラス・ブレビスのみが、微生物用平板培地上に検出される。溶離前に、他の微生物はすべてメンブレンから洗い去られていた。

【 0 0 5 5 】

フィルターデバイス

50

フィルターデバイス100は、ルアーロック(Luer lock)フィッティング21を備えた試料入口20を含む。この入口は、35本の平均細孔直径0.2 μ mをもつ中空ポリプロピレン繊維メンブレン30と連絡している。試料入口20において、メンブレン30の第1末端は紫外線硬化性接着剤に埋め込まれ、これによりメンブレンは適所に保持され、かつ試料入口20と連絡している。出口110において、メンブレン30の第2末端は紫外線硬化性接着剤に埋め込まれ、これによりメンブレンは適所に保持され、かつ試料出口110と連絡している。出口はプラグ120で閉じられ、これによりメンブレン30の第2末端を通る流れは制限される。メンブレン30は前記“中空繊維メンブレンの調製”のセクションの記載に従って調製された。

【0056】

10

使用する際には、工程Iにおいて100ml容量のラガー60を蠕動ポンプ130によりチューブ140を通して100ml/分の速度でデバイス100に送入する(メンブレンの表面積を調整するだけで、デバイス100により濾過するラガーなどの試料の容量を、たとえば1000ml以上にまで増加させることができる)。デバイス100がラガー60で満たされるのに伴って、出口110を閉鎖しているプラグ120のため、デバイス100からの唯一の出口はメンブレン30の細孔となる。したがってラガー60はメンブレン30を通して濾過され、濾液は廃液採集容器150に採集され、廃棄される。

【0057】

工程IIにおいて、プラグ120を取り除き、チューブ140を通して50mlの洗浄緩衝液160(0.01%トゥイーン-20を含有するリン酸緩衝化生理食塩水からなる)を送入し、メンブレン30の内腔に沿って通過させ(すなわちメンブレン30の細孔を通してではなく)、廃液容器150に採集し、廃棄する。洗浄緩衝液160がデバイス100を通過し終わると、空気をチューブ140およびメンブレン30に送入してメンブレン30から余分な流体を排除するために、さらに10秒間、ポンプ130を作動させておく。次いでポンプ140を停止し、デバイス100をチューブ140およびポンプ130から分離する。

20

【0058】

工程IIIにおいて、次いで0.5mlの溶離緩衝液161(0.2M NaOHを含む細胞溶解緩衝液)を入れた1mlの無菌注射器を試料入口20に取り付け、注射器50のプランジャー55を完全に押し込んで、溶離緩衝液161をメンブレン30に吹き込む。次いでプランジャー55を引き戻し、メンブレン30の内腔から溶離緩衝液161を抜き出す。これをさらに2回繰り返して、結合した微生物をすべて確実に溶解させる。次いでプランジャー55を完全に押し込んで、溶離緩衝液161を1.5mlの無菌試験管170内へ排出する。

30

【0059】

工程IVにおいて、等容量の中和緩衝液(0.2Mリン酸トリス)を試験管170に添加し、試験管170に蓋をし、試験管170を2~3回反転させることにより内容物を混合する。

【0060】

最後に工程Vにおいて、Biotracer UniliteルミノメーターおよびSigma Bioluminescence試薬を用いて試料のATPアッセイを実施する。

40

【0061】

PCRおよび平板培養など広範な微生物検出方法を採用でき、したがって工程III~Vを適宜変更できることは、明らかである。たとえば溶離工程IIIは、0.1Mクエン酸(pH3.0)を用いて実施し、全微生物を溶解せずに試験管170内へ溶離することができる。

【0062】

ATPアッセイ

微生物汚染を検出するための最も一般的かつ迅速な方法は、細胞性ATPの測定である

50

。これには、細胞内に存在する A T P を放出させるために細胞膜 / 壁を破壊する (細胞溶解) 必要がある。次いで、放出された A T P は基質 (ルシフェリン) と A T P を多数の生成物 (光を含む) に変換する酵素反応により測定することができる。次いで標準的ルミノメーターにより光の量を測定できる。多数の A T P アッセイ系が市販されている。ただし、完全に細胞溶解し、したがってすべての細胞性 A T P を放出する能力は、微生物株に依存する。

【 0 0 6 3 】

第 2 濾過デバイス (図 2) に示す濾過デバイスの構築 :

装置 :

- 1 . 平均細孔直径 0 . 2 μ m のポリプロピレン中空繊維メンブレン (5 % トウイーン - 2 0 で前処理) ; 10
- 2 . ハンドヘルドアプリーケーターおよびフットスイッチを含む L o c t i t e (R T M) 2 1 半自動制御器 ; 圧力を 0 . 2 バールに、デジタル出力を 3 5 . 0 に設定 ;
- 3 . B o n d m a t i c 8 5 0 紫外線源 ; タイマーを 4 0 秒に設定 ;
- 4 . 内径 7 . 0 m m 、外径 1 2 . 4 m m のカラー (図 2 、 2 0 0) (ポリカーボネートロッド) ;
- 5 . 2 m m のポリマーポリプロピレンで作成した Y 形末端キャップ (図 2 、 2 1 0) ; カラーを受けるための広い末端 (内径 1 2 . 4 m m) と、ルアー注射器ノズルに接続するための狭い末端 (内径 4 . 1 m m) をもつ ;

下記に従って濾過デバイスを作成した :

- 1 . すべての作業面を I P A (イソプロピルアルコール) で清浄にする ;
- 2 . 適宜な本数の長いポリプロピレン中空繊維メンブレンからなる束をとり、束の周りに複数のカラーを配置する ;
- 3 . 中空繊維メンブレンの束の末端から約 3 0 m m の位置で、接着剤がメンブレンの束に浸透するようにメンブレンの束の中心に接着剤アプリーケーターのノズルを配置して接着剤を付与し、接着剤がその領域のメンブレンすべてに付与されるようにノズルを操作する。その位置の束の外側にさらに接着剤を付与する。次いでカラーが接着剤に接触するように、カラーをその位置においてメンブレン上で滑り回転させる ;
- 4 . 束の接着剤被覆部分を紫外線源下に置いて、接着剤を硬化させる ;
- 5 . 先のカラーから束に沿って約 3 0 m m の位置に、工程 3 (前記) に詳述したように接着剤を付与する。第 1 カラー、次いで第 2 カラーを互いに接触するように接着剤上で滑り回転させ、次いでそれらを 1 ~ 2 m m 離し、工程 4 を繰り返す ;
- 6 . メンブレンの長さ全体にカラーが適所に配置されるまで工程 5 を繰り返す ;
- 7 . 1 対のカラーの間の 1 ~ 2 m m の隙間で繊維を切断すると、繊維の各末端が開放内腔をもち、各末端の外側がカラーでシールされた、複数の中空繊維デバイスが得られる ;
- 8 . これらのデバイスの 1 つおよび 1 対の末端キャップをとり、L o c t i t e 下塗剤 7 7 0 を末端キャップの内側リムおよびデバイスカラーの外側に付与する。約 1 分間放置し、次いで L o c t i t e 速硬性接着剤 4 0 3 を各カラーの外側に付与し、末端キャップをカラー上に接着するまで強く押し付ける。 40

【 0 0 6 4 】

前記のように、本発明のデバイスおよび方法を用いて得られる結果は、大容量の試料液から少数の微生物を簡単、迅速かつ精確に検出できることを示す。

図 4 に示すように、フィルターデバイス 5 0 0 は、フィルター本体 5 2 0 に收容された長さ 4 0 m m の中空繊維ポリプロピレンメンブレン 5 1 0 を 2 0 本含む。メンブレン 5 1 0 はそれぞれ本体 5 2 0 の溝内に隔離され、各末端が接着剤 5 3 0 で適所に保持されている。接着剤はメンブレン 5 1 0 の外側に配置され、メンブレン 5 1 0 の内腔または末端に進入することはない。スナップ嵌め末端キャップ 5 4 0 は、チューブ 5 4 1 に対するコネクターを備え、したがって試料タンクからデバイス 5 0 0 へ試料を直接供給することができる。スナップ嵌め末端キャップ 5 5 0 は、チューブ (図示されていない) に対するコネ 50

クターを備えたホイルシールキャップからなる。これは、ホイルシールが無傷の場合、流体がデバイス 500 から流出する唯一の経路はメンブレン 510 を通した濾過であることを意味する。たとえば注射器 551 でホイルシールを穿刺すると、濾過以外の流れを起こすことができる。これは、メンブレン 510 に付着した抗体に結合していない微生物の洗浄除去が可能であることを意味する。

【0065】

デバイス 500 の外側本体 520 にも口 560 が含まれる。これに真空装置を接続して、メンブレン 510 による濾過をさらに促進できる。

中空繊維メンブレンに接着剤を付与する前記工程を簡略化するために、紫外線硬化性接着剤とアプリケーション（たとえば注射器）（これはメンブレンと接触させる必要があり、汚染を生じる可能性がある）を用いるのではなく、代わりにグルー（たとえばエポキシ樹脂）と遠心機の組合わせを用いる。すなわち、中空繊維メンブレンの束をエポキシ樹脂と共にポットに入れ、遠心することにより（たとえば 750 rpm で）、中空繊維メンブレン束の一端の周囲のみにエポキシ樹脂のシールを形成することができる。樹脂が硬化するまで遠心を続ける。

【0066】

次いでメンブレンの束を逆転させてこの操作を繰り返すことにより、メンブレンの他端をシールする。たとえばベーキングにより接着剤を追加硬化させることができる。接着剤およびメンブレンがたとえば遠心機に粘着するのを防ぐために、部品を剥離剤、たとえば Promol K502 で拭うことにより前処理できる。

【0067】

次いで、シールしたメンブレン末端をエポキシ樹脂プラグを通して切断することにより、各末端がエポキシ樹脂プラグ中にあって閉鎖していない中空繊維メンブレンの束が得られる。次いでこれを紫外線硬化性接着剤を用いて作成した束と同様に使用できる。

【0068】

有用なエポキシ樹脂の例は、Pur System 接着剤 725 A および Pur System 接着剤 725 B F である。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図 1】本発明による第 1 デバイス、および微生物の検出におけるその使用を示す。

【図 2】図 1 のデバイスの末端キャップの断面図およびカラーの上面図を示す。

【図 3】抗体が付着したポリプロピレンメンブレンの写真を示す。一方のメンブレン（チューブ A、左）は炭酸 / 炭酸水素塩緩衝液に一夜浸漬することにより前処理したもの、他方（チューブ B、右）はイソプロパノールに一夜浸漬することにより前処理したもの。

【図 4】本発明に用いる他の態様のフィルターデバイスを示す。

10

20

30

【図 1】

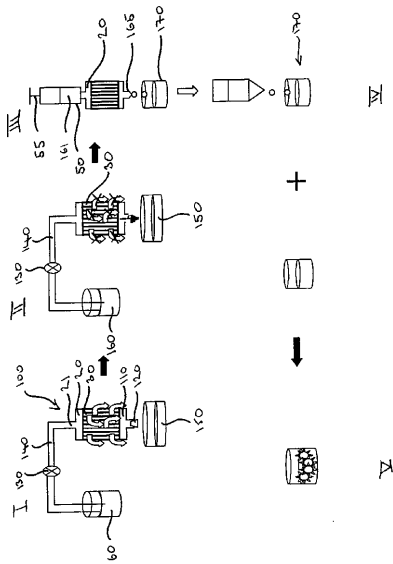
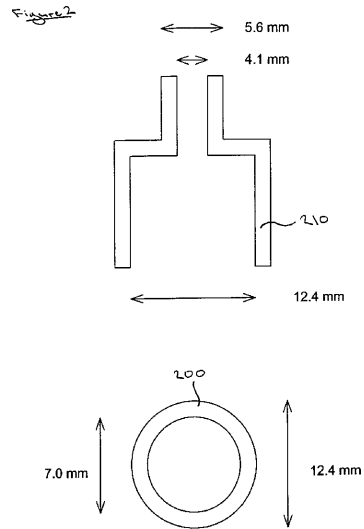


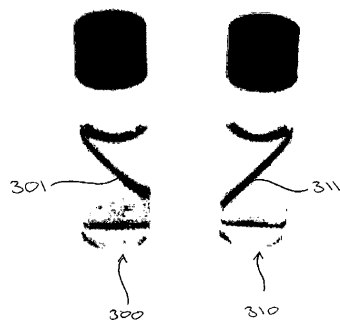
Figure 1

【図 2】



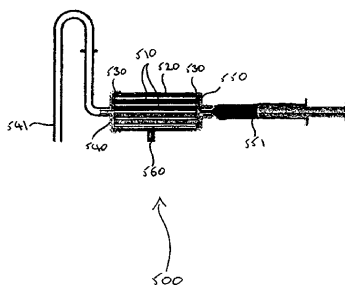
【図 3】

Figure 3



【図 4】

Figure 4



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

G 0 1 N 33/569 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/543 5 4 5 Z

G 0 1 N 33/543 5 7 5

G 0 1 N 33/569 A

G 0 1 N 33/569 B

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100122644

弁理士 寺地 拓己

(72)発明者 キーナン, エリザベス・アン

イギリス国ランカシャー ビーエル6 5 エスジェイ, ボルトン, ホーウィッチ, グリーンストーン
・アベニュー 3 4

(72)発明者 プレナンド, マイケル・スティール

イギリス国ランカシャー エフワイ8 4 エイディー, リザムサントアンズ, アイレー・ロード,
クランブルック

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第00/023792(WO, A1)

国際公開第00/076562(WO, A1)

国際公開第99/051765(WO, A1)

特表2000-517171(JP, A)

特開平05-010954(JP, A)

特表平10-503847(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

C12Q 1/04

C12Q 1/06

JSTPlus(JDream2)