

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3837006号
(P3837006)

(45) 発行日 平成18年10月25日(2006.10.25)

(24) 登録日 平成18年8月4日(2006.8.4)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/06 (2006.01)

C 1 2 Q 1/06

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04

G O 1 N 33/48 (2006.01)

G O 1 N 33/48

P

C 1 2 R 1/01 (2006.01)

C 1 2 Q 1/06

C 1 2 R 1:01

請求項の数 18 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-80998 (P2000-80998)
 (22) 出願日 平成12年3月22日 (2000.3.22)
 (65) 公開番号 特開2001-258590 (P2001-258590A)
 (43) 公開日 平成13年9月25日 (2001.9.25)
 審査請求日 平成15年3月25日 (2003.3.25)

(73) 特許権者 390014960
 シスメックス株式会社
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 (74) 代理人 100088867
 弁理士 西野 卓嗣
 (72) 発明者 井上 淳也
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 シスメックス株式会社内
 (72) 発明者 池内 喜郎
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 シスメックス株式会社内
 (72) 発明者 河島 康之
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 シスメックス株式会社内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌の染色方法及び検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

硫酸塩及び硝酸塩からなる群より選択される少なくとも1つの無機塩の存在下で、且つ
 pH 2 . 0 ~ 4 . 5 において、細菌を含む試料に、カチオン性界面活性剤を作用させて細菌の色素透過性を亢進させる工程、及び、
 色素を作用させて細菌を染色する工程、
 を含む細菌の染色方法。

【請求項2】

前記色素が、少なくとも細菌を構成する成分の一つと結合し、蛍光を発する蛍光色素である請求項1記載の細菌の染色方法。

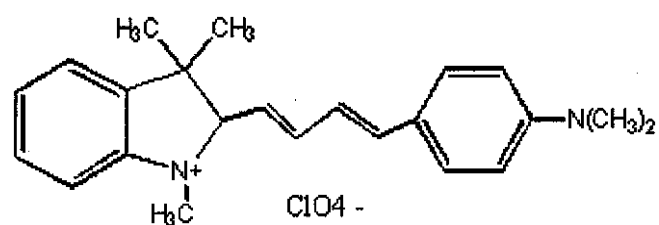
【請求項3】

前記蛍光色素が、以下の群から選択される少なくとも1つである請求項2記載の細菌の染色方法。；

(1) チアゾールオレンジ

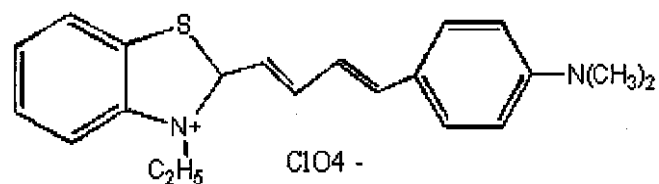
(2)

【化 1】



(3)

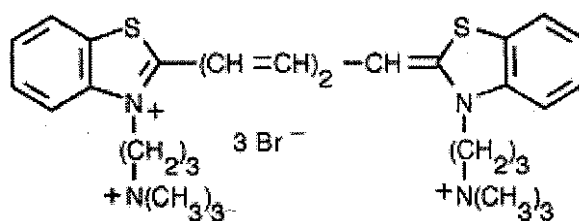
【化 2】



10

(4)

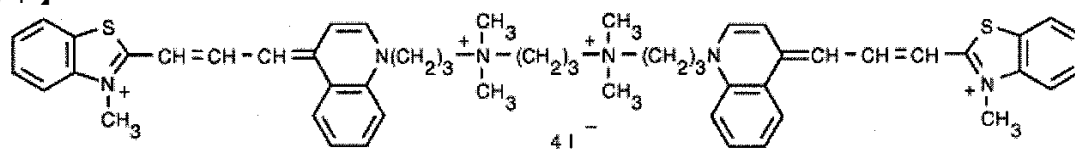
【化 3】



20

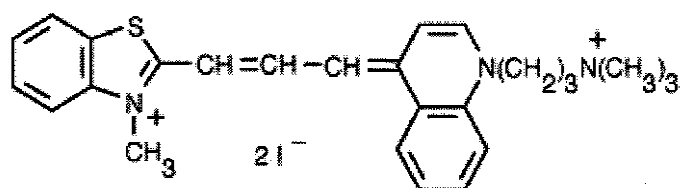
(5)

【化 4】



(6)

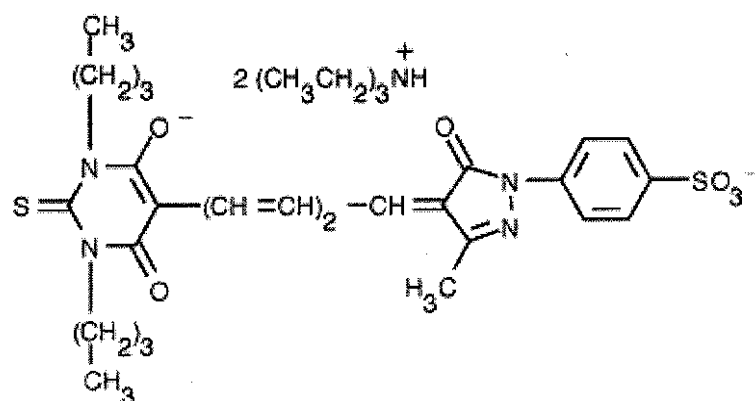
【化 5】



30

(7)

【化 6】

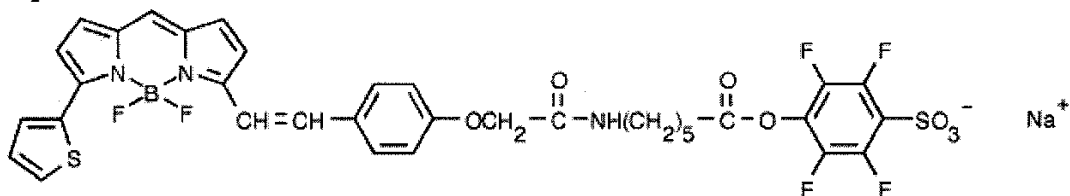


40

(8)

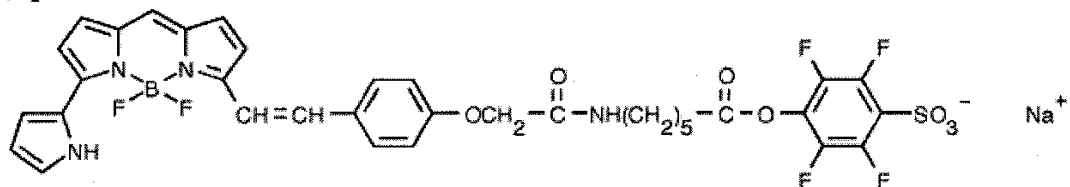
50

【化 7】



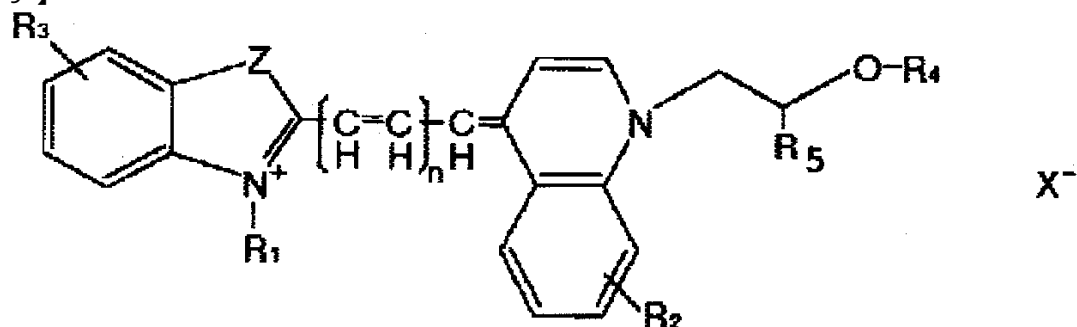
(9)

【化 8】



(10) 以下の一般式で表される化合物：

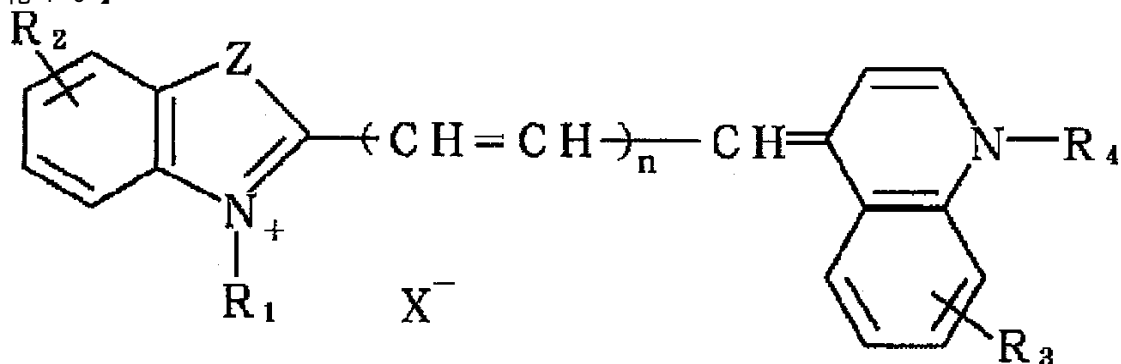
【化 9】



(式中、R 1 は水素原子又は炭素数 1 ～ 3 のアルキル基；R 2 及び R 3 は水素原子、炭素数 1 ～ 3 のアルキル基又は炭素数 1 ～ 3 のアルコキシ基；R 4 は水素原子、アシル基又は炭素数 1 ～ 3 のアルキル基；R 5 は水素原子、置換されていてもよい炭素数 1 ～ 3 のアルキル基；Z は硫黄原子、酸素原子又は炭素数 1 ～ 3 のアルキル基で置換された炭素原子；n は 1 又は 2；X - はアニオンである)

(11) 以下の一般式で表される化合物：

【化 10】



(式中、R 1 は水素原子又は炭素数 1 ～ 18 のアルキル基；R 2 及び R 3 は水素原子、炭素数 1 ～ 3 のアルキル基又は炭素数 1 ～ 3 のアルコキシ基；R 4 は水素原子、アシル基、又は炭素数 1 ～ 18 のアルキル基；Z は硫黄、酸素、あるいは炭素数 1 ～ 3 のアルキル基を有する炭素であり；n は 0，1 又は 2 であり；X - はアニオンである)。

【請求項 4】

前記 pH を維持するために p K a 1 ～ 5 の緩衝剤を使用する請求項 1 記載の細菌の染色方法。

【請求項 5】

10

20

30

40

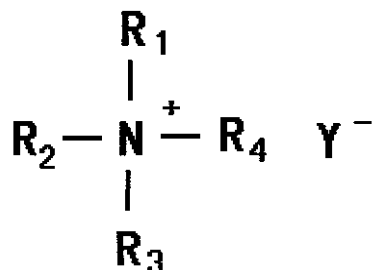
50

該緩衝剤が、クエン酸塩、リン酸塩、フタル酸塩、グリシン、コハク酸、乳酸、 β -アラニン、 ϵ -アミノカプロン酸及びフマル酸からなる群より選択される少なくとも1つである請求項4記載の細菌の染色方法。

【請求項6】

カチオン性界面活性剤が、以下の式で示される四級アンモニウム塩；

【化11】



10

(式中、 R_1 は炭素数8～18のアルキル基； R_2 、 R_3 及び R_4 は同一又は異なって、炭素数1～3のアルキル基またはベンジル基； Y^- はハロゲンイオンである)
である請求項1記載の細菌の染色方法。

【請求項7】

四級アンモニウム塩が、デシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩及びオクタデシルトリメチルアンモニウム塩からなる群より選択される少なくとも1つである請求項6記載の細菌の染色方法。

20

【請求項8】

以下の工程を含む細菌検出法：

(1)細菌を含む試料と、カチオン系界面活性剤と、硫酸塩及び硝酸塩からなる群より選択される少なくとも1つの無機塩とを含むpH2.0～4.5の水溶液とを混合して測定用試料を調製する工程；

(2)前記測定用試料を、蛍光色素を用いて一定時間染色反応させる工程；

(3)前記工程で処理された測定用試料をフローサイトメータの検出部に導入し、染色された細菌に光を照射し、前記測定用試料中の細菌から発せられる散乱光及び蛍光を測定する工程；及び

30

(4)測定した散乱光及び蛍光の信号強度又はパルス幅に基づいて細菌と他の成分とを分離・計数する工程。

【請求項9】

前記分離・計数工程において、
前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅、
前方散乱光強度と蛍光強度、及び
前方散乱光パルス幅と蛍光強度
のうち何れか1つに基づいて細菌と他の成分とを分離・計数する、請求項8記載の細菌検出法。

40

【請求項10】

前記無機塩の水溶液中の濃度が、10～500mMである、請求項8又は9記載の細菌検出法。

【請求項11】

(1)カチオン性界面活性剤と、硫酸塩及び硝酸塩からなる群より選択される少なくとも1つの無機塩とを含むpH2.0～4.5の水溶液、及び(2)色素を含む溶液、を含む細菌の染色用試薬。

【請求項12】

前記色素が、少なくとも細菌を構成する成分の一つと結合し、蛍光を発する蛍光色素である請求項11記載の細菌の染色用試薬。

50

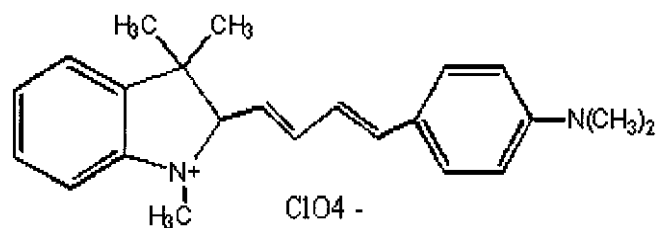
【請求項 13】

前記蛍光色素が、以下の群から選択される少なくとも1つである請求項12記載の細菌の染色用試薬。；

(1) チアゾールオレンジ

(2)

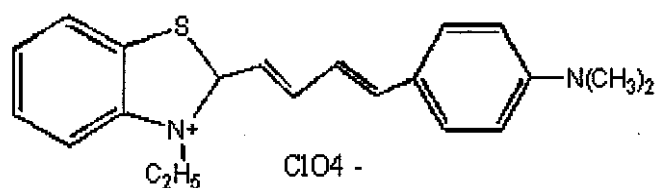
【化26】



10

(3)

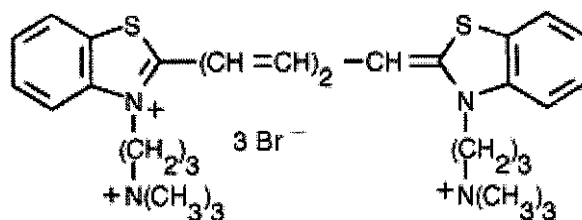
【化27】



20

(4)

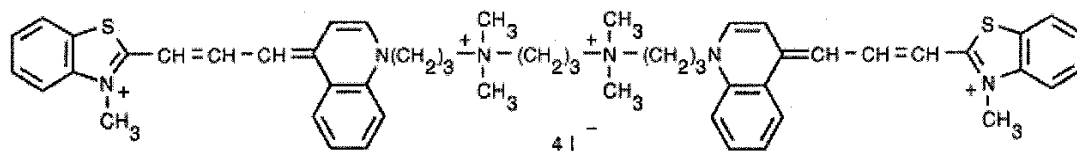
【化28】



30

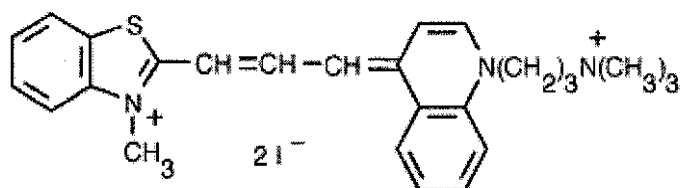
(5)

【化29】



(6)

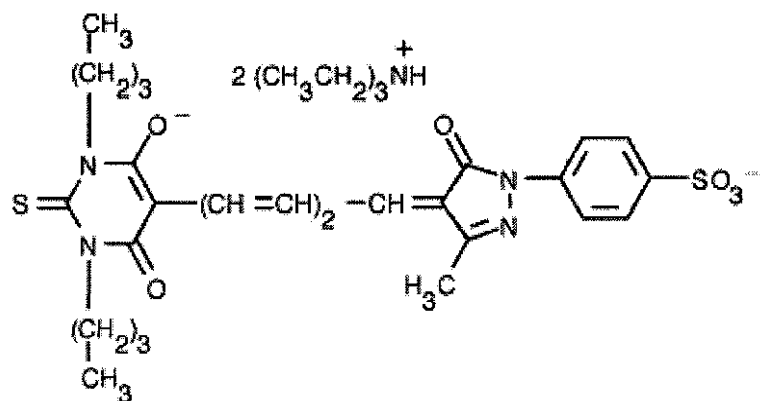
【化30】



40

(7)

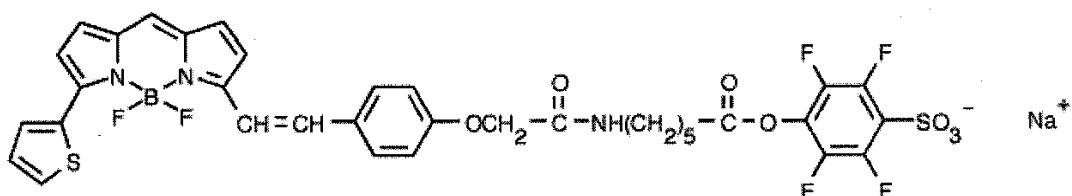
【化 3 1】



10

(8)

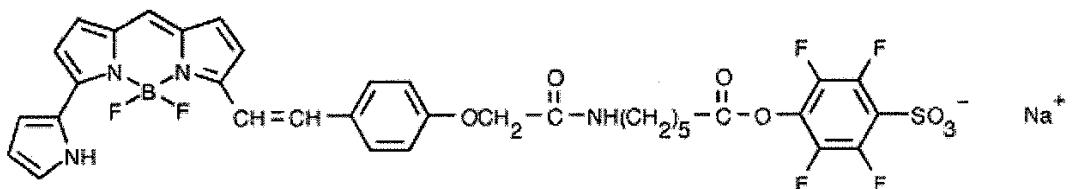
【化 3 2】



20

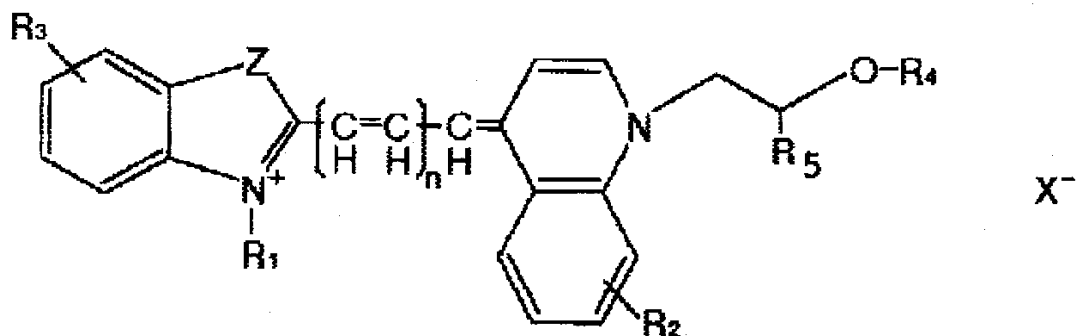
(9)

【化 3 3】



(1 0) 以下の一般式で表される化合物：

【化 3 4】



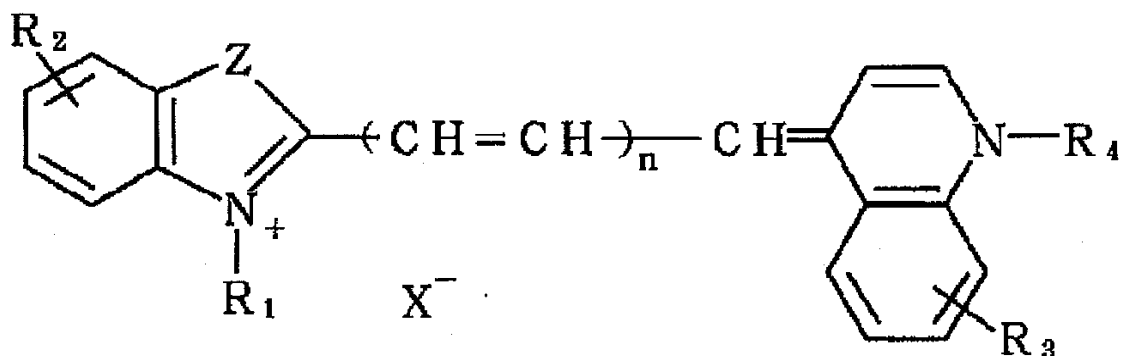
30

(式 中 、 R 1 は水素原子又は炭素数 1 ～ 3 のアルキル基 ； R 2 及び R 3 は水素原子、炭素数 1 ～ 3 のアルキル基又は炭素数 1 ～ 3 のアルコキシ基 ； R 4 は水素原子、アシル基又は炭素数 1 ～ 3 のアルキル基 ； R 5 は水素原子、置換されていてもよい炭素数 1 ～ 3 のアルキル基 ； Z は硫黄原子、酸素原子又は炭素数 1 ～ 3 のアルキル基で置換された炭素原子 ； n は 1 又は 2 ； X - はアニオンである)

40

(1 1) 以下の一般式で表される化合物：

【化 3 5】



10

(式中、R₁は水素原子又は炭素数1～18のアルキル基；R₂及びR₃は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基；R₄は水素原子、アシル基、又は炭素数1～18のアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは炭素数1～3のアルキル基を有する炭素であり；nは0，1又は2であり；X⁻はアニオンである)。

【請求項 1 4】

前記pHを維持するためにpK_a 1～5の緩衝剤を使用する請求項1記載の細菌の染色用試薬。

【請求項 1 5】

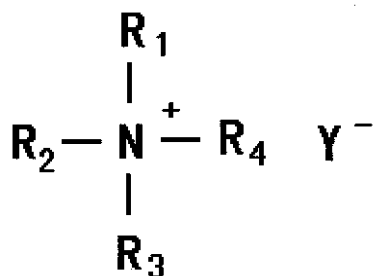
該緩衝剤が、クエン酸塩、リン酸塩、フタル酸塩、グリシン、コハク酸、乳酸、β-アラニン、ε-アミノカプロン酸及びフマル酸からなる群より選択される少なくとも1つである請求項1記載の細菌の染色用試薬。

20

【請求項 1 6】

カチオン性界面活性剤が、以下の式で示される四級アンモニウム塩

【化 3 6】



30

(式中、R₁は炭素数8～18のアルキル基；R₂、R₃及びR₄は同一又は異なって、炭素数1～3のアルキル基またはベンジル基；Y⁻はハロゲンイオンである)である請求項1記載の細菌の染色用試薬。

【請求項 1 7】

四級アンモニウム塩が、デシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩及びオクタデシルトリメチルアンモニウム塩からなる群より選択される少なくとも1つである請求項1記載の細菌の染色用試薬。

40

【請求項 1 8】

前記無機塩の水溶液中の濃度が、10～500mMである、請求項1記載の細菌の染色用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床試料中の細菌、とくに好適には尿試料中に存在する細菌の染色方法および検出方法に関する。

【0002】

50

【従来の技術】

尿中細菌数は感染の有無を判定する上で臨床診断上、重要なパラメーターである。一般的に、尿路感染症(Urinary Tract Infection)の判定基準として、尿中細菌数が105個/ml以上出現した場合を陽性とする。また103個/ml以下では汚染尿(常在菌)であるとして陰性としている。104個/ml程度の場合は判定保留域であるが、再検領域とする場合が多い。

【0003】

従来から行われている尿中細菌の確認方法としては、グラム染色した後顕微鏡下で確認する、無染色で顕微鏡下で確認する、蛍光染色した後顕微鏡下で確認する、といった方法などが挙げられる。

【0004】

尿中には夾雑物と言われる臨床上有用ではない粘液系、結晶、無晶性塩類、細胞の断片がしばしばみられこれらが重要な測定粒子(特に細菌)の妨害となり、細菌数を正確に計数することは困難であった。現実的には104個/ml程度の菌数を精度良く計数する方法は存在しなかった。

【0005】

例えば、グラム染色は、細菌と夾雑物が同時に染色されるため、顕微鏡下において数の少ない細菌の見落としが多い。また染色工程が複数あり、染色に時間を要する(約15分)ため、作業効率が悪かった。

【0006】

また、無染色鏡検は、方法としては迅速であるが、特に球菌状の夾雑物が出現した場合には菌との弁別が不可能である。

【0007】

蛍光染色鏡検については、細菌検出性能は上記二つの方法よりも高いが、細菌以外の夾雑物が混入した場合に、それらを効果的に除去し、さらに細菌を迅速に染色する方法については開示されていない。

【0008】

なお、標準法である寒天培地法の場合は、菌数の測定に16時間以上要し、迅速とは言い難い。

【0009】

また、米国特許第4,622,298号、特開平9-119926号には蛍光染色された尿試料をフローサイトメータで測定し細菌を検出する方法が提案されているが、いずれも夾雑物を含んだ試料を測定してはいない。さらに、特開平9-329596号には、尿中の有形成分の分析において、互いに弁別の困難な成分の分析方法として、尿試料を界面活性剤を含む水溶液で処理し、フローサイトメータで測定する方法が記載されているが、細菌と夾雑物を弁別する方法を開示してはいない。

【0010】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、試料中に夾雑物が存在しても、培養することなしに細菌を迅速に効率よく検出できるような染色方法ならびに、検出方法を提供することを目的とする。

【0011】**【課題を解決するための手段】**

本発明の細菌染色方法は、pH2.0~4.5において、細菌を含む試料に、カチオン性界面活性剤を作用させて細菌の色素透過性を亢進させ、さらに、色素を作用させて細菌を染色することからなる。

【0012】**【発明の実施の形態】**

本発明者らは、上記のpHにおいては、(1)細菌が中性やアルカリ性よりも良く染色されること、(2)粘液系の非特異染色を抑え、かつ粘液系をある程度溶解させることができること、を見出した。

【0013】

10

20

30

40

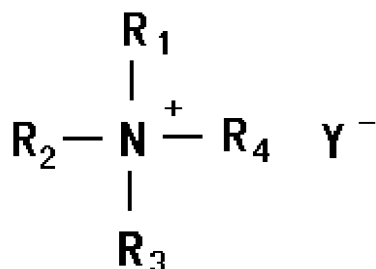
50

前記 pH を維持するために、酸あるいは pK_a 1 ~ 5 の緩衝剤を使用することができる。前記 pH 範囲、好ましくは pH 2.0 ~ 3.0 を維持できるものであれば緩衝剤としては特に限定されないが、好適には、クエン酸塩、リン酸塩、フタル酸塩、グリシン、コハク酸、乳酸、 β -アラニン、 ε -アミノカプロン酸及びフマル酸などが使用できる。使用量は、前記 pH 範囲を維持できる量で使用でき、10 ~ 500 mM の範囲で使用できる。

【0014】

カチオン性界面活性剤はとくに限定されないが、好適には以下の式で示される四級アンモニウム塩；

【化12】



10

(式中、 R_1 は炭素数 8 ~ 18 のアルキル基； R_2 、 R_3 及び R_4 は同一又は異なって、炭素数 1 ~ 3 のアルキル基またはベンジル基； Y^- はハロゲンイオンである) が使用できる。

【0015】

例えば、デシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩及びオクタデシルトリメチルアンモニウム塩が好適に使用される。使用量については、10 ~ 30000 mg/l、好ましくは 100 ~ 3000 mg/l が好適である。

【0016】

細菌を含む試料に、カチオン性界面活性剤を添加することにより、細菌の細胞膜が傷害され、色素が入り込みやすくなる。その結果、細菌の細胞内の物質と色素とが効率よく結合して細菌がよく染色され、夾雑物と弁別しやすくなる。一方、粘液糸や赤血球や細胞の破片などは、溶解あるいは収縮し、細菌の検出への影響が低減されることとなる。

30

【0017】

色素については、前記 pH 域で細菌を染色できるものであれば特に制限されない。濃度については、色素ごとに好適な濃度は異なるが、例えば、0.1 ~ 100 ppm (最終濃度) の範囲で使用できる。なお、細菌の検出能力の点から、使用する色素は、少なくとも細菌を構成する成分の一つと結合し、蛍光を発する蛍光色素を使うのが有利である。例えば、以下の(1) ~ (11)の色素が使用できる。

【0018】

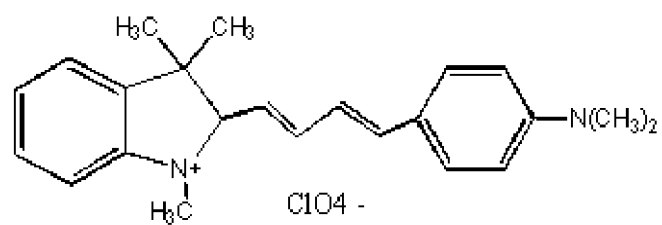
(1) チアゾールオレンジ

40

【0019】

(2)

【化13】

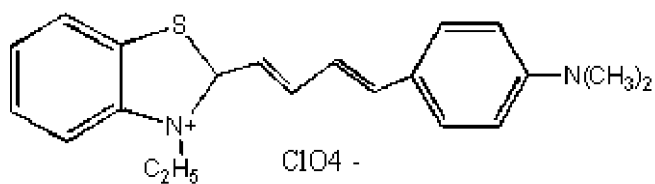


【 0 0 2 0 】

(3)

【 化 1 4 】

10

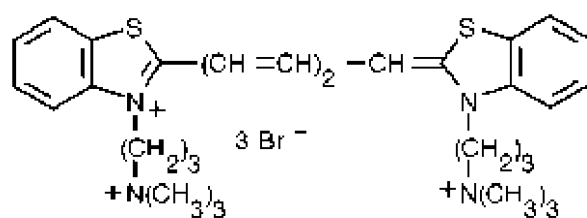


20

【 0 0 2 1 】

(4)

【 化 1 5 】

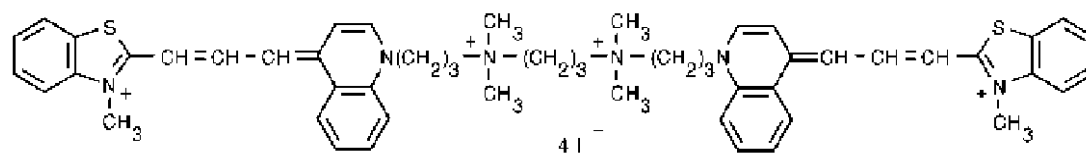


30

【 0 0 2 2 】

(5)

【 化 1 6 】

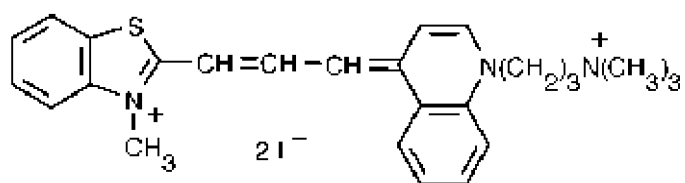


40

【 0 0 2 3 】

(6)

【 化 1 7 】

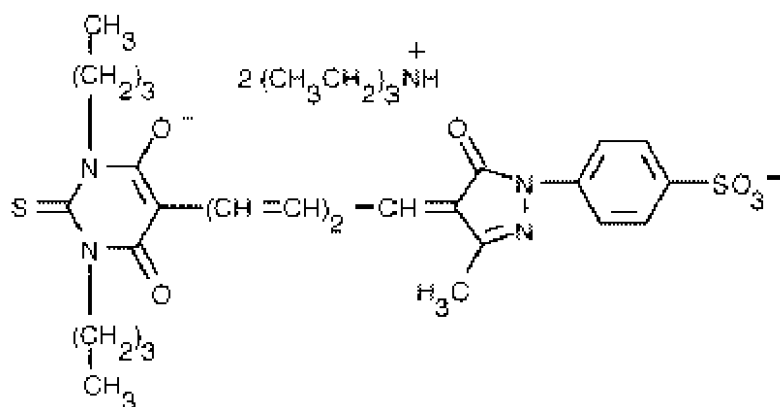


【 0 0 2 4 】

(7)

10

【 化 1 8 】

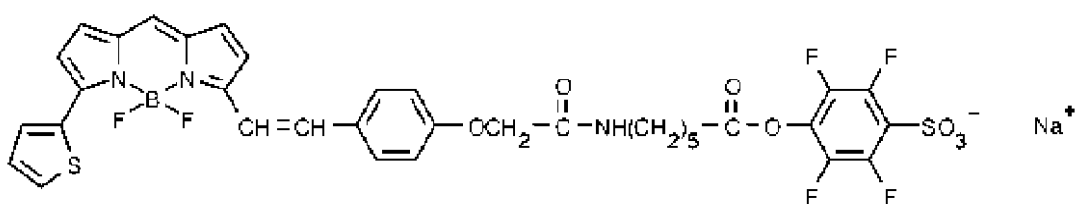


20

【 0 0 2 5 】

(8)

【 化 1 9 】

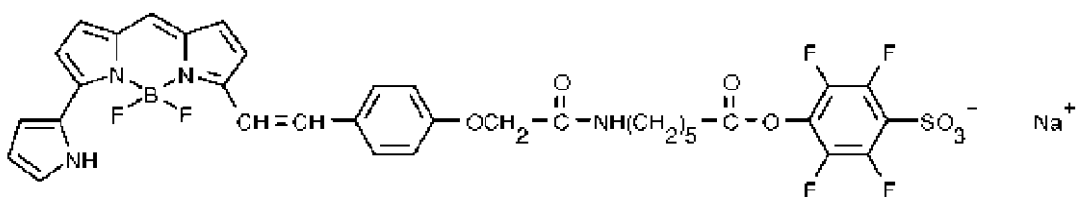


30

【 0 0 2 6 】

(9)

【 化 2 0 】



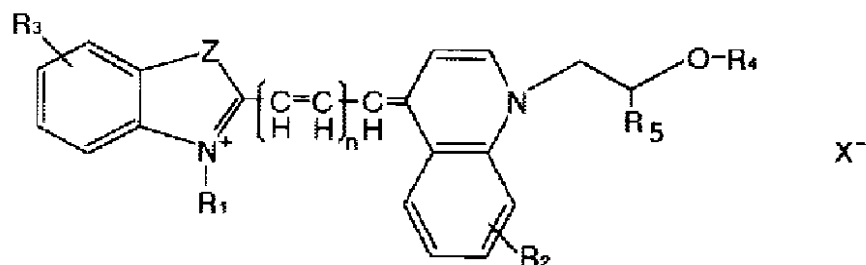
40

【 0 0 2 7 】

(1 0) 以下の一般式で表される化合物：

【 化 2 1 】

50

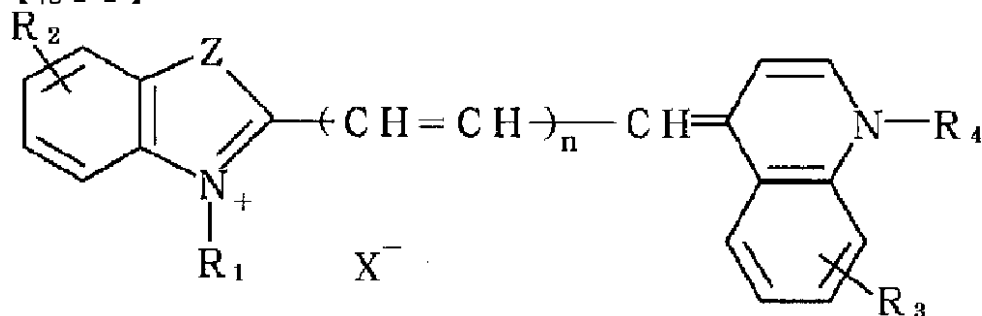


(式中、 R_1 は水素原子又は炭素数1～3のアルキル基； R_2 及び R_3 は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基； R_4 は水素原子、アシル基又は炭素数1～3のアルキル基； R_5 は水素原子、置換されていてもよい炭素数1～3のアルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子又は炭素数1～3のアルキル基で置換された炭素原子；nは1又は2； X^- はアニオンである)

【0028】

(11)以下の一般式で表される化合物：

【化22】



(式中、 R_1 は水素原子又は炭素数1～18のアルキル基； R_2 及び R_3 は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基； R_4 は水素原子、アシル基、又は炭素数1～18のアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは炭素数1～3のアルキル基を有する炭素であり；nは0,1又は2であり； X^- はアニオンである)。

【0029】

これらの色素のうち、(1)は市販品を入手できる。(2)、(3)は日本感光色素研究所(株)より入手できる。(5)～(9)は、Molecular Probes, Inc.より入手できる。

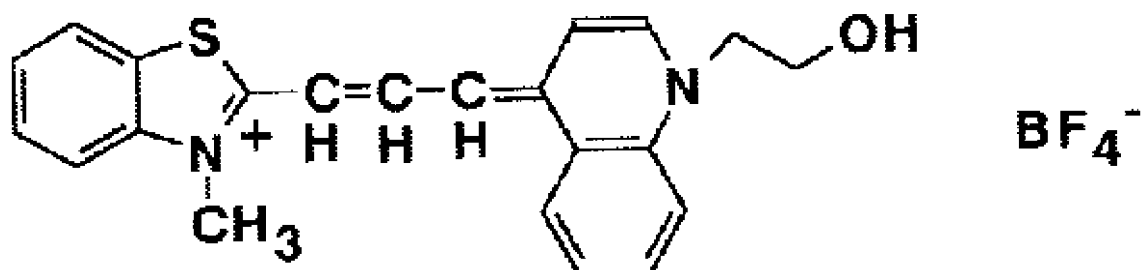
【0030】

また、(10)は、特開平9-104683号に、(11)は、特開平10-319010号に製造方法が記載されている。

【0031】

なお、(10)の一般式で示される色素のうち、特に、次の色素；

【化23】



【0032】

また、(11)の一般式で示される色素のうち、特に次の色素；

【化24】

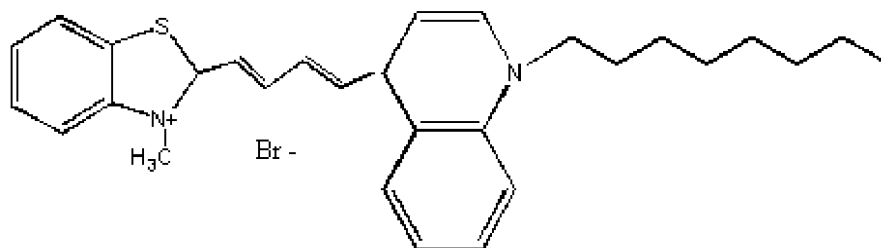
10

20

30

40

50



が好適である。

【 0 0 3 3 】

さらに、硫酸塩または硝酸塩のうちいずれかの無機塩の共存下で染色を行うことで、細菌の蛍光染色性を増大させ、夾雑物の非特異染色を抑制することができるので好ましい。使用量としては、10～500mM、好ましくは50～200mMの濃度範囲で使用できる。

【 0 0 3 4 】

本発明の染色法では、尿試料で確認される細菌、例えば、*E.coli*, *Staphyrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp.及び*Citrobacter* sp.などが好適に染色される。また、尿試料に限らず、血液、髄液など他の臨床試料にも適用できる。

【 0 0 3 5 】

本発明の染色法は、試料、カチオン性界面活性剤を含む水溶液、色素を含む溶液を混合することで実施できる。なお、色素はカチオン性界面活性剤を含む水溶液中に含有させてもよいが、使用する色素が水溶液中では不安定な場合には、色素をメタノール、エタノールやエチレングリコールなどの水溶性有機溶媒中に溶解しておき、使用時にカチオン性界面活性剤を含む水溶液と混合するようにしておけば、色素の保存安定性を向上させることができる。

【 0 0 3 6 】

反応温度・時間は特に限定されないが、温度は、15～50℃、時間は、混合直後から15分間で実施できる。

【 0 0 3 7 】

本発明の染色法により染色された試料は、顕微鏡や画像認識装置で観察して細菌を検出することもできるが、フローサイトメトリによって細菌を高精度で検出・計数することができる。

【 0 0 3 8 】

すなわち本発明の細菌の検出方法は、▲1▼細菌を含む試料を、カチオン性界面活性剤を含むpH2.0～4.5の水溶液で希釈し、細菌の色素透過性を亢進させ、

▲2▼該試料を蛍光色素を用いて一定時間染色反応させ、

▲3▼前記工程で処理された試料をフローサイトメータの検出部に導入し、染色された細菌の細胞一つ一つに光を照射し、該細胞から発せられる散乱光及び蛍光を測定し、

▲4▼測定した散乱光及び蛍光の信号強度または、粒子の長さを反映するパルス幅に基づいて細菌と他の成分を分離・計数する工程を含む。

【 0 0 3 9 】

細菌と他の成分を分離・計数するには、測定によって得られた信号を組み合わせを行うことができる。信号の組み合わせとして例えば、前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅、前方散乱光強度と蛍光強度、前方散乱光パルス幅と蛍光強度の組み合わせが挙げられる。好適には、例えばまず前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅の組み合わせで2次元分布図（スキャッタグラム）を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行い、主に粘液系を分離し、さらに、ゲーティングされた集団に対して、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで、さらに2次元分布図を作成し、蛍光強度の違いから細菌と他の成

10

20

30

40

50

分（結晶や細胞の破片など）を分離する。概念図を図 7 に示す。

【 0 0 4 0 】

【実施例】

以下に好適な実施例を示すが、本発明はこれに限定されない。

実施例 1

試薬組成

（希釈液）

クエン酸

100mM

NaOH

pH4.1になる量

テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド

0.1%(w/v)

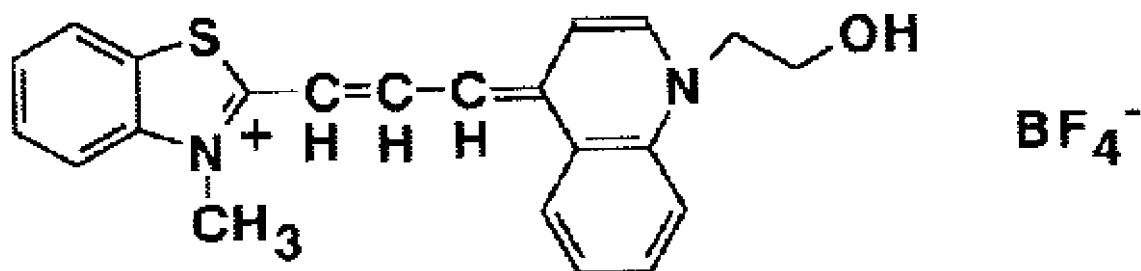
10

（染色液）

色素 A（以下の構造式）

40ppm（エチレングリコール溶液）

【化 2 5】



20

【 0 0 4 1 】

培養大腸菌を含む試料100 μ lに、上記組成の希釈液1000 μ l及び染色液を色素 A の最終濃度が1ppmになるように添加し、40、30秒間反応させ、赤色半導体レーザーを光源とするフローサイトメータで散乱光及び蛍光の測定を行った（分析容量7.8 μ l）。対照として、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを含まない試薬を用いて測定を行った。結果を図 1 に示す。

【 0 0 4 2 】

テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを含まない試薬を用いた場合（図中左）は、蛍光強度が30ch以下で、大腸菌はほとんど染色されていなかった。一方、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを0.1%(w/v)を含む場合は（図中右）、大腸菌の集団が蛍光強度で50ch以上に分布し、染色性が増大していることが確認された。

30

【 0 0 4 3 】

実施例 2

試薬組成

（希釈液）

クエン酸

100mM(pH2.5)

テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド

0.1%(w/v)

硫酸ナトリウム

90mM

（染色液）

40

実施例 1 と同じ

【 0 0 4 4 】

上記組成の試薬を用いて、各培養細菌（E.coli, S.aureus, K.pneumoniae, C.freundii, E.faecalis）を含む試料を実施例 1 と同様に測定した。結果を図 2 に示す。

【 0 0 4 5 】

各細菌とも、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを含まない場合は、蛍光強度が低く、ほとんど染色されていないが、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを添加することによって、蛍光強度が増大し、よく染色されていることが確認された。また、大腸菌測定において、硫酸ナトリウムをさらに添加している場合（本実施例）と、硫酸ナトリウムを含まない場合（実施例 1）と比べて、本実施例においては、蛍光強度が

50

より増大しており、硫酸ナトリウムの添加による効果が認められた。

【0046】

実施例 3

希釈直線性

大腸菌を培養し、希釈係数1,10,100,1000,10000,100000の希釈試料を作成し、実施例2と同じ試薬を用いて同様に測定を行った。結果を図3に示す。なお、菌数は、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで2次元分布図を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行うことにより求めた。

図3に示したように、菌数約 $10^3 \sim 10^7$ 個/mlの範囲で良好な直線性が得られた。

【0047】

10

実施例 4

尿試料の測定

実施例2と同じ試薬を用いて尿検体62検体について測定を行い、対照としたCLED培地による培養法での測定結果との相関について検討した。

【0048】

菌数の測定は、まず前方散乱光強度と前方散乱光パルス幅の組み合わせで2次元分布図を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行い、さらに、ゲーティングされた集団について、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで、さらに2次元分布図を作成し、蛍光強度の違いから細菌の領域を特定し、特定された領域内の数を求めた。結果を図4に示す。

20

【0049】

CLED培地による培養法での結果と良好な相関が得られた。なお、図4において、縦軸にいくつか点が見られるが、これはCLED培地による培養法では、生きた細菌のみ検出するのに対し、本発明では、培地では生えにくい菌（静菌；薬剤などの影響により生育しにくくなっている菌）及び死菌も検出しているためと考えられる。

【0050】

実施例 5

血液培養試料の測定

細菌を含む血液試料を血液培養ボトルを用いて培養し、培養液を測定した。グラム陰性桿菌（*Pseudomonas* sp.）の結果を図5に、グラム陽性球菌（*Staphyrococcus* sp.）の結果を図6に示す。なお、菌数は、前方散乱光強度と蛍光強度の組み合わせで2次元分布図を作成し、分布図上で細菌を含む集団を特定してゲーティングを行うことにより求めた。対照は、KOBA 10グリッド（HYCOR BIOMEDICAL INC.）を用いて目視で確認した。グラム陰性桿菌は、本発明では、 5.2×10^5 /mlに対し、目視法では、 2.9×10^5 /ml、また、グラム陽性球菌では、本発明では 2.3×10^4 /mlに対し、目視法では、 8.8×10^3 /mlであった。

30

【0051】

【発明の効果】

本発明の染色方法によれば、水系で染色されるため、グラム染色のような乾燥固定は必ずしも必要としない。このため、染色工程を含めて短時間で測定用試料が調製でき、染色時間の大幅な短縮が可能である。

40

【0052】

また、検体と試薬を混合するだけの簡単な操作で実施でき、グラム染色のような熟練は必要でない。さらに、染色工程が簡単であるため、染色から測定（フローサイトメトリや画像解析など）までの自動化が容易である。

【0053】

さらに、本発明の細菌検出方法によれば、夾雑物の影響を受けることなく、精度よく細菌を計数することが可能である。具体的には、 10^4 個/ml程度の菌数を計数可能である。

【0054】

また、培地では生えにくい菌（静菌作用のある検体など）についても確実に捉えることができる。

50

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の実施例 1 において、培養大腸菌を測定したときの蛍光強度 - 前方散乱光強度のスクアッタグラムである。

【図 2】本発明の実施例 2 において、培養した各種細菌を測定したときの蛍光強度 - 前方散乱光強度のスクアッタグラムである。

【図 3】本発明の実施例 3 において、希釈直線性試験の結果を示したグラフである。

【図 4】本発明の実施例 4 において、本発明の方法と CLED 培地での測定結果との相関図である。

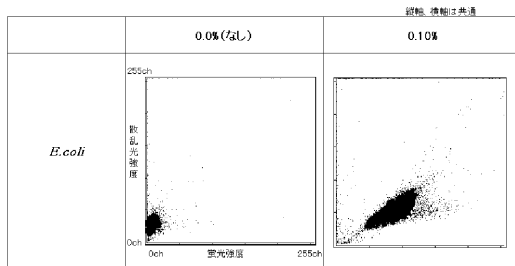
【図 5】本発明の実施例 5 において、グラム陰性桿菌の測定結果を示したスクアッタグラムである。

10

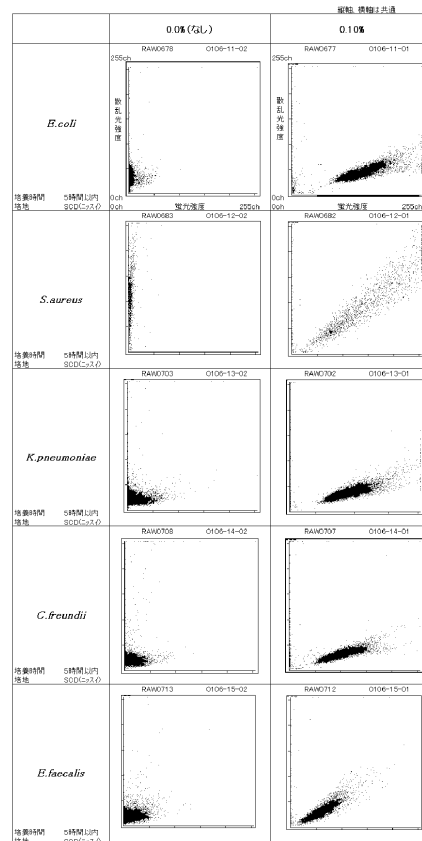
【図 6】本発明の実施例 6 において、グラム陽性球菌の測定結果を示したスクアッタグラムである。

【図 7】本発明における細菌の検出方法の概念図である。

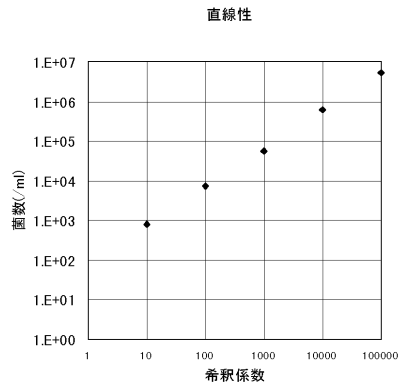
【図 1】



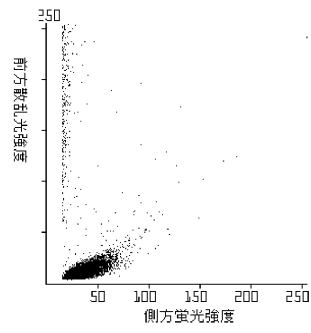
【図 2】



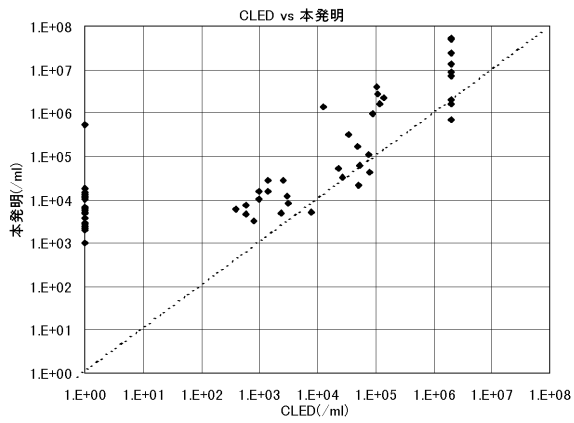
【図 3】



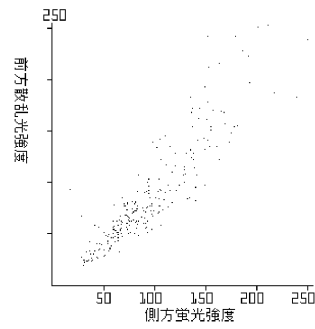
【図 5】



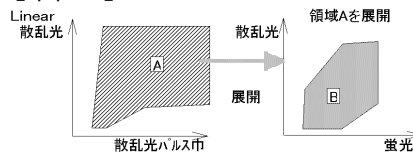
【図 4】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/04
C 1 2 R 1:01

審査官 飯室 里美

(56) 参考文献 特開平 1 0 - 1 3 6 9 9 6 (J P , A)
MIKROBIOLOGIJA (1989) vol.58, no.2, p.217-221

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12Q1/00-3/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JMEDPlus(JDream2)