

(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2007-504811

(P2007-504811A)

(43) 公表日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G O 5 4
G O 1 N 21/77 (2006.01)	G O 1 N 21/77	4 B O 6 3
G O 1 N 21/80 (2006.01)	G O 1 N 21/80	4 B O 6 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15	B
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)		

(21) 出願番号	特願2006-525735 (P2006-525735)	(71) 出願人	503220392
(86) (22) 出願日	平成16年9月6日 (2004.9.6)		ディーエスエム アイビー アセツ ビー、ブイ、
(85) 翻訳文提出日	平成18年4月27日 (2006.4.27)		オランダ国, 6 4 1 1 ティーイー ヘーレン, ヘット オーバールーン 1
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/009948	(74) 代理人	100094318
(87) 国際公開番号	W02005/024048		弁理士 山田 行一
(87) 国際公開日	平成17年3月17日 (2005.3.17)	(74) 代理人	100123995
(31) 優先権主張番号	03102730.3		弁理士 野田 雅一
(32) 優先日	平成15年9月11日 (2003.9.11)	(74) 代理人	100128381
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 清水 義憲
		(72) 発明者	ゲイ, エディス, マグダ, ルチア
			オランダ, エヌエルー 2 6 4 1 ゼット
			アール ビジュナッカー, ナイチンゲール
			ルラーン 5
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液および尿試験

(57) 【要約】

本発明は、試験微生物、指示薬、およびイオン化形態での金属を含んでなり、前記金属の原子価が少なくとも2であるとともに、前記金属の濃度が0.001M～1Mである試験培地を提供する。さらに、金属塩が前記試験培地および／または前記流体サンプルに添加されることを特徴とする抗生物質の存在を判定するための方法が提供される。最後に、流体における抗生物質の判定に適したキットが提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験微生物、指示薬、およびイオン化形態での金属を含んでなり、前記金属の原子価が少なくとも 2 であるとともに、前記金属の濃度が 0.001 M ~ 1 M である試験培地。

【請求項 2】

前記金属がアルカリ土類金属および／またはランタニドであることを特徴とする請求項 1 に記載の試験培地。

【請求項 3】

前記アルカリ土類金属がカルシウムであることを特徴とする請求項 2 に記載の試験培地。

【請求項 4】

(a) 試験微生物および指示薬を含んでなる試験培地と前記流体のサンプルとを接触させるステップと、

(b) 抗生物質が流体サンプル中に存在しない場合に試験微生物を成長させる期間にわたって試験微生物をインキュベートするステップと、

(c) 試験微生物の成長または成長の抑制を指示薬で検出するステップとを含んでなる流体中の抗生物質の存在を判定するための方法であって、

金属塩（ここで、前記金属の原子価が少なくとも 2 であり、かつ金属塩が 20 °C 下の水中で少なくとも 0.02 M の溶解度である）が前記試験培地および／または前記流体のサンプルに添加されることを特徴とする方法。

【請求項 5】

指示薬が少なくとも 1 つの pH 指示薬および／または少なくとも 1 つのレドックス指示薬であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

その中の抗生物質が判定されるべき流体が血液または尿であることを特徴とする請求項 4 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記金属がアルカリ土類金属および／またはランタニドであることを特徴とする請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記アルカリ土類金属がカルシウムであることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試験培地中および／または前記流体のサンプルへの前記金属塩の濃度が 1 M を上回ることがないことを特徴とする請求項 4 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記金属塩が前記流体のサンプルに添加されることを特徴とする請求項 4 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

流体中の抗生物質の判定に適したキットであって、

(a) 試験微生物と少なくとも 1 つの指示薬とを含んでなる試験培地で部分的に充填した少なくとも 1 つの容器と、

(b) 金属塩であって、前記金属の原子価が少なくとも 2 であり、かつ金属塩が 20 °C 下の水中で少なくとも 0.02 M の溶解度である金属塩と、を含んでなり、または、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の試験培地を含んでなるキット。

【請求項 12】

設定温度で試験サンプルを保持するのに適した温度調節デバイスをさらに含んでなる請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

サンプル読取りデバイスから得られたデジタルデータを分析するコンピュータに指示を与えるために適したコンピュータプログラムを搭載したデータキャリアをさらに含んでな

10

20

30

40

50

る請求項 1 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 4】

前記金属塩が錠剤、ペーパーディスク、もしくは水溶液中に存在することを特徴とする請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 5】

微生物抑制試験における金属塩の使用。

【請求項 1 6】

微生物抑制試験における前記サンプル中の抗生物質の有無を判定する前にサンプルを処理する金属塩の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、尿および血液中の抗菌薬残留物の有無を迅速に検出するための新たな方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

抗菌薬は薬物として適用されているだけではなく、獣医薬における成長促進物質としても広く使用されている。近代農業経営においては、飼料添加物としての獣医用医薬品の合法的使用が慣行となっている。これらの飼料添加物は、動物の疾患を予防し、その成長を高め、または飼料効率を高める。この化合物は、動物の飼料、または飲料水に加えられる。一部の国々では、例えば成長促進物質の注射による投与が許可されており、したがってヒト用食品における抗菌薬の量を増大させる。もちろん獣医用医薬品の非合法の使用も起こりうる。

20

【0 0 0 3】

食品中の抗菌薬の存在は消費者の間で関心が高まっている。抗生物質によって引き起こされるヒト腸内細菌叢に対するアレルギー反応および影響は公知である。別の問題は耐性菌の発現である。抗生物質の濫用（すなわち、これが医療上の理由で必要ではない投与、または不完全な治療経過）が抗生物質耐性の発現の最も重要な原因であることが公知である。また、食品中の抗菌性化合物の存在も薬物耐性菌の増大をもたらす。したがって、ヒト病原菌は、飼料添加物として、かつヒト用医薬において両方に使用される抗菌剤に対する耐性を発現しうる。成長促進剤としての飼料における抗生物質使用の他の欠点は、抗生物質が、スターターカルチャーの抑制により、マイナスの形でソーセージなど発酵肉製品の製造過程に影響を及ぼすことである。

30

【0 0 0 4】

大部分の獣医用医薬品は、食肉処理動物の肉を通じ、または牛乳および卵など畜産物を通じてヒト食物連鎖に入る。

【0 0 0 5】

食肉処理動物、畜産物、および食品における抗菌薬の存在に対する管理は食品業界における重要な問題である。大部分の国々では新鮮な肉および肉製品における薬物残留物の最大残留基準値または許容レベルが確立されている。許可されていない化合物に対してはゼロトレランスがあり、かかる物質は決して畜産物中に存在してはならない。大部分の薬物に対しては消退期間が決定されている。これは最後の処理と食肉処理の時間との最小期間である。この期間中に薬物残留物は最大残留基準以下のレベルに低下する。しかし、場合によっては、消退期間後でも高過ぎる薬物濃度が動物中に依然として存在しうる。これは代謝における自然の個体差によって、または疾患による薬物の排泄過程の障害のため引き起こされうる。最後に、諸手順は消退期間において正しく適用されていない場合がある。大部分の国々では、食品中の獣医用医薬品残留物に関する法律が、公的管理プログラムを使用することによって維持されている。一般に、政府機関は、獣医用医薬品残留物の存在について食肉処理動物の一定の割合を試験する。また、食肉処理場またはスーパーマーケットも生肉、肉製品、および腎ならびに肝などの臓器を試験しうる。

40

50

【0006】

大部分の重要な抗菌薬の多くは尿を通じて排泄されるが、尿はこれまでは食肉処理動物における抗菌剤残留物の有無を試験するための基質としてほとんど使用されていない。尿を通じて排泄されている抗菌動物薬の例は、アモキシシリン、アンピシリン、ペニシリンG、およびペニシリンVなどのβ-ラクタム、クロルテトラサイクリンおよびオキシテトラサイクリンなどのテトラサイクリン、ゲンタマイシンおよびストレプトマイシンなどのアミノグリコシド、およびスルファミジンなどのスルホンアミドである。

【0007】

尿中の抗菌性化合物の量は、動物の食用部分、例えば、筋組織および肝における抗菌性化合物のレベルを示す。尿の試験が莫大な利点を提供することを理解するのは容易である。多くの動物種では、多くの動物は尿が排泄される間の一定時点を有するため、尿サンプルを得ることはきわめて容易である。 10

【0008】

肉における抗菌薬の存在を試験するサンプルとしての尿の使用は、食肉処理前に動物が試験されることを可能にするであろう。これは農業従事者に消退期間が予想どおり完了したかどうかチェックする可能性を提供する。完了していない場合には、農業従事者は動物を食品処理場に輸送する前に数日待つことを決めることになる。動物が食肉処理後に抗生物質に対して陽性が確定した場合の経済損失は高い。ヒト食物連鎖における抗菌薬残留物を検出する全管理システムは、動物が食肉処理の後ではなく前に試験される場合にはより効率的になる。 20

【0009】

代替として動物の血液サンプルも使用し、食肉処理動物における抗菌薬残留物の有無を判定することができる。尿および血液サンプルはもちろん動物の食肉処理後にも得られる。その場合には、有用な肉部分はサンプルを得るために損傷される必要はない。

【0010】

抗菌剤残留物は、微生物抑制試験（例えば、寒天拡散試験）を使用して検出されうる。かかる方法は主に牛乳および肉流体を試験するために使用され、GBA 1467439、EP0005891、DE3613794、CA2056581、EP0285792、および米国特許第5,494,805号明細書に記載されている。これらの記述はすべて、試験微生物を使用する試験をいつでも使用できることをテーマにしている。試験微生物は主に寒天培地に組込まれているが、これは指示薬、緩衝液、栄養素、およびプラスまたはマイナスの形で一定の抗菌性化合物の感度を変化する物質を含有しうる。 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

適切な微生物は、桿菌（*Bacillus*）、連鎖球菌（*Streptococcus*）、および／または大腸菌（*Escherichia coli*）の菌株である。一般に、試験の原理は、抗菌化合物が試験微生物の成長を阻害するのに十分な濃度でサンプル中に存在する場合、酸／塩基またはレドックス指示薬の色が保持されるが、抑制の非存在下では試験微生物の成長が指示薬の色を変える代謝産物の形成によって達成される。現在利用可能な試験方法は、多くの異なる種類のサンプルにおける抗菌剤残留物の検出に適している。しかし、これらの試験方法の問題は、尿および血液における抗菌剤残留物の検出が妨害物質の存在により不可能であることである。これらの物質は試験を妨げ、偽陽性結果をもたらす。 40

【0012】

尿および血液サンプルを調製する一部の方法は周知である。最も簡単な方法は、サンプルを水で（少なくとも3倍）希釈することである。しかし、サンプルの希釈は同じ倍数で感度の損失をもたらすことが明らかである。

【0013】

各尿または血液サンプルのpHを一定の値に調整することは部分的にサンプル間の差を 50

除去する。尿の場合には、pHは相当に異なりうる。これらの変動は、種間、同じ種の動物間、および個々の動物のその日その日で確認される。例えば、飼料および尿サンプルを得るために必要な時間の差異により、pHは酸と塩基の値間できわめて強く変動しうる。しかし、農業従事者の現場で尿サンプルを試験することが最も便利であるため、実際にはかかる方法を使用することはできない。正確なpHを測定し、酸性またはアルカリ性溶液を使用して一定のpH値に滴定することは現状では複雑すぎる。この点については、エラスムソン（Erasmusson）ら（Analyst 123、2497-2499頁（1998年））が、pH5.5への酸性処理によって分析前に尿サンプルから重炭酸塩を除去することを提案した。この方法の欠点は、数アリコートの酸の添加、pH値の測定、および二酸化炭素を放出させるなど多くの工程を行う必要あり、かつサンプルがそれによって希釈され、感度を低下させることである。さらに、pHの調整により、偽陽性結果がいまだに起こるためサンプルの大部分に十分な溶液が得られないことも確認された。最後に、pHを調整することによっても、主な欠点はこの場合もやはりサンプルの希釈である。

【0014】

これまで尿および血液サンプルにおける抗菌剤残留物の検出用の適切な試験が利用可能ではないと結論されうる。現在の方法は不確実で時間がかかり、偽陽性結果をもたらしうる。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の目的は、流体、特に血液および尿における抗生物質の判定のための改善された試験培地および方法を提供することである。意外にも、われわれは、金属塩を試験培地に適用すると達成できる実質的な改善があることを見出した。

【0016】

このために、試験微生物、指示薬、およびイオン化形態での金属を含んでなり、前記金属の原子価が少なくとも2であるとともに、前記金属の濃度が0.001M~1Mである試験培地が提供される。

【0017】

さらに、

(a) 試験微生物および指示薬を含んでなる試験培地と前記流体のサンプルとを接触させるステップと、

(b) 抗生物質が流体サンプル中に存在しない場合に試験微生物を成長させる期間にわたって試験微生物をインキュベートするステップと、

(c) 試験微生物の成長または成長の抑制を指示薬で検出するステップとを含んでなる流体中の抗生物質の存在を判定するための方法であって、

金属塩（ここで、前記金属の原子価が少なくとも2であり、かつ金属塩が20℃下の水中で少なくとも0.02Mの溶解度である）が前記試験培地および／または前記流体のサンプルに添加されることを特徴とする方法が提供される。

【0018】

また、流体中の抗生物質の判定に適したキットであって、

(a) 試験微生物と少なくとも1つの指示薬とを含んでなる試験培地で部分的に充填した少なくとも1つの容器と、

(b) 金属塩であって、前記金属の原子価が少なくとも2であり、かつ金属塩が20℃下の水中で少なくとも0.02Mの溶解度である金属塩と、を含んでなり、または、請求項1~3のいずれか一項に記載の試験培地を含んでなるキットも提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

以下に示されている用語および略語は本開示の全体を通じて使用され、以下のとおり規定されている。

10

20

30

40

50

【0020】

「抗生物質」という語は、細菌に対して活性を示す1つもしくはそれ以上の物質またはサンプルの化学成分を指す。

【0021】

「流体」という語は、容易に移動し、塊の分離なしにその相対位置を変え、容易に圧力に屈し、かつ流動が可能である粒子を有する物質または組成物を指す。本発明に関する限りでは、「流体」という語は、水溶液、血液、肉流体、牛乳、尿などの組成物を指す。

【0022】

「β-ラクタム抗生物質」という語は、その化学構造内のβ-ラクタム基礎構造を含んでなり、かつ細菌に対する活性を示す抗生物質を指す。前記β-ラクタム抗生物質の例は、アモキシシリン、アンピシリン、セファクロール、セファドロキシル、セフprozil、セフトリオキサリム、セフトリアキソン、セフトピリン、セフトラジン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、オキサシリン、ペニシリンG、ペニシリンV、およびチカルシリンである。

【0023】

「指示薬」という語は、ある状態から別の状態への変化と同時に色または蛍光における変化など検出可能シグナルを提供する化合物または物質を指す。

【0024】

「試験」という語は、1つもしくはそれ以上の抗生物質または抗生物質クラスを同定し、特徴づけ、または定量化するために使用される方法、手順、工程、または反応を指す。

【0025】

「試験デバイス」という語は、それで試験を実施するのに適した構成要素または構成要素の一部を指す。

【0026】

「試験培地」という語は、試験微生物の、さらに場合により少なくとも1つの指示薬を含んでなり、かつ場合により栄養素および緩衝物質を含んでなる液体または固化懸濁液を指す。好ましくは、試験培地はゲル化剤によってゲルまたはゾルの形で固化されている。

【0027】

「試験微生物」という語は、抗生物質に対して感受性であり、その成長の有無をモニタリングするのに適している微生物を指す。

【0028】

「閾値」という語は、それ以上であると所定の抗生物質が存在するとみなされ、それ以下であると前記抗生物質が存在しないとみなされる濃度値を指す。一般に、閾値は、地方、地域、または地域間の当局によって特定のサンプルにおける特定の抗生物質に対して示されているが、一定の研究目的のために事前設定されうる。

【0029】

「原子価」という語は、元素の原子量がそれと結合し、もしくはそれが置換され、または比較されうる一価元素（水素としての）の原子量の数によって示される金属など元素の結合能の程度を指す。

【0030】

本発明の第1の態様においては、検出物質として1つもしくはそれ以上の種類の試験微生物、場合により指示薬およびイオン化形態での金属を含んでなる流体中の抗菌性化合物の検出用の試験培地が提供される。意外にも、イオン化形態での金属が試験培地で使用されると、上記の従来技術の問題が試験の感度の保持により克服されることが見出されている。好ましくは、前記金属の原子価は少なくとも2である。かかる金属の例は、アルミニウム、バリウム、ベリリウム、ビスマス、カルシウム、クロム、コバルト、銅、鉄、ランタン、鉛、マグネシウム、マンガン、ニッケル、ストロンチウム、スズ、チタン、および亜鉛である。より好ましくは、前記金属はアルカリ土類金属および／またはランタニドである。最も好ましくは、前記金属はバリウムまたはカルシウムである。好ましくは、前記試験培地における前記金属の濃度は、0.005～1Mであり、より好ましくは、0.

10

20

30

40

50

0.1～0.1 Mである。金属イオンの適切な対イオンは、溶解度要件を満たすイオンである。好ましい対イオンは、酢酸塩、安息香酸塩、臭化物、塩化物、ヨウ化物、硝酸塩、亜硝酸塩、および場合によっては、硫酸塩である。金属塩は、試験サンプルまたは試験培地における金属塩の容易な溶解を可能にする水中溶解度を有しなければならない。一般に、前記水中溶解度は、0.01 M以上、好ましくは、0.02 M以上、より好ましくは、0.1 M以上、最も好ましくは、1 M以上である。好ましい金属塩は、臭化バリウム、塩化バリウム、ヨウ化バリウム、硝酸バリウム、塩化ベリリウム、硝酸ベリリウム、酢酸カルシウム、臭化カルシウム、塩化カルシウム、ヨウ化カルシウム、硝酸カルシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、および塩化亜鉛である。最も好ましくは、金属塩は塩化カルシウムである。

10

【0031】

場合により、試験培地は、栄養素、安定剤、およびプラスまたはマイナスの形で一定の抗菌性化合物に対する感度を変える物質、および／または粘度増加剤も含有しうる。一定の抗菌性化合物に対する感度を変える物質の例は、サルファ化合物に対する試験微生物の感度を改善するアデノシン、およびオルメトプリム、テトロキシプリム、およびトリメトプリムなどの抗葉酸剤、またはテトラサイクリンに対する感度を改善するシュウ酸またはフッ化水素酸の塩である。システインを添加し、必要に応じて、ペニシリンに対する感度を減少させることができる。粘度増加剤の例は、アスコルビン酸メチルシラノールペクテネート、カルボマー、カルボキシメチルセルロース、セテアリアルアルコール、セチルアルコール、セチルエステル、ココミド DEA、乳化ろう、グルコース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラウリルアミド DEA、リノールアミド DEA、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、マルトデキストリン、ジステアリン酸 PEG-8、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、PVP／ヘキサデセンコポリマー、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、ソイアミドプロピルベタイン、キサンタンガムなどである。あるいは、上記の試験培地の任意の成分も外から添加されうる。

20

【0032】

場合により、試験培地は、1つもしくはそれ以上の指示薬を含んでなるが、しかし、これらの化合物は試験方法の間にも添加されうる。少なくとも1つの指示薬が、反応培地において起こる変化を示すために流体のサンプルの存在下で微生物の成長中に存在する。当業者は、多くの指示薬がこのために適していることを理解するであろう。特に有用であるのは、ある状態から他の状態への変化と同時に、色または蛍光における変化など視覚的に検出可能なシグナルを示す指示薬である。かかる指示薬は、「H. J. Conn's Biological Stains」、R. D. リリー (Lillie) 編、ボルチモア (Baltimore)、1969年などの手引書から容易に選択されうる。好ましい指示薬は、pH指示薬および／またはレドックス指示薬である。適切な指示薬の例は、アシドブルー120、アシドオレンジ51、アシドイエロー38、アリザリンアシド、アリザリンブルー、アズールA、アズールB、ベーシックブルー3、ブリリアントブラック、ブリリアントクレジルブルー、ブリリアントクロセインMOO、ブリリアントイエロー、プロモクレゾールパープル、プロモフェノールブルー、プロモフェノールレッド、プロモチモールブルー、コンゴレッド、ガロシアニン、インジゴカルミン、ヤーヌスグリーンB、リトマス、メチレンブルー、ナイルブルーA、ニトラゾールイエロー (ニトラジンイエローとも呼ばれる)、o-ニトロフェノール、p-ニトロフェノール、1-10フェナントロリン、フェノールフタレイン、サフラニンO、チオニン、トルイジンブルーである。

30

40

【0033】

本発明の第1の態様の一実施形態においては、試験培地は、好ましくは、ゾルまたはゲルの形である。ゲル化剤の適切な例は、寒天、アルギン酸およびその塩、カラギナン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルグアーおよびその誘導体、ローガストビームガム (カロブ (Carob) ガム)、加工ユーケマ藻類などである。試験培地中のゲル化剤の量は2～100 g. l⁻¹、好ましくは、5～50 g. l⁻¹、より好ましくは、10～20 g. l⁻¹、最も好ましくは、12から15 g. l⁻¹である。しかし、当業者は、他の種類の

50

固体試験培地が、セラミック、綿、ガラス、金属粒子、紙、任意の形のポリマー、ケイ酸塩、スポンジ、ウールなどに基づきうることを理解するであろう。プレミ (Premi) (登録商標) テストまたはデルボテスト (Deltovotest) (登録商標) など市販の試験デバイスの場合、試験培地はチューブまたはプレートに存在する。本発明の目的に有用なデバイスの例は、単一もしくは一連の、またはその中に成形された多くの穴を備えた半透明の材料の塊に結合された透明チューブである。試験デバイスは、好ましくは、確定サイズを有する。これは試験の信頼性のためである。寒天拡散法に基づく試験の場合、好ましくは、チューブが使用される。試験デバイスは、好ましくは、3-30 mm、より好ましくは、5-15 mmの高さに対応する寒天培地およびサンプルの量を含むのに十分な高さとなる。試験ユニットの内部断面寸法は、好ましくは、1-30 mm、より好ましくは、5-15 mmである。試験デバイスは、好ましくは、保存中に気密であり、この条件下でそれらは少なくとも数か月間保存されうる。もちろん、本発明の方法を実行するために適した他の試験デバイスが本発明に含まれる。試験デバイス中の寒天培地量は、試験デバイスの高さ、試験デバイスの内部断面寸法、および寒天培地で充填されている試験デバイスの容積の割合によって決定される。寒天培地量は、好ましくは、0.01-5 ml、より好ましくは、0.1-1 mlである。代替の実施形態においては、試験デバイスは、試験培地を含む1つもしくはそれ以上のウェルを含んでなるプレートである。分析される流体のサンプルは、試験培地を含むウェルに直接添加され、または、例えば、分析される流体のサンプルを最初にペーパーディスクなどキャリア材料に塗布し、次いでキャリア材料を流体が試験培地に付着または吸着している場所に配置する。

10

20

【0034】

本発明の第1の態様の別の実施形態においては、微生物は、バチルス種 (*Bacillus species*)、好ましくは、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、またはストレプトコッカス種 (*Streptococcus species*)、好ましくは、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) など熱安定性微生物である。これらの種は、コロニー、またはコロニー形成単位 (CFU) を産生することが可能な単位として試験に導入されうる。前記CFUは、孢子、増殖性細胞、または両方の混合物でありうる。前記CFUの濃度は試験培地ml当たりのコロニー形成単位で表され ($\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$)、通常、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12} \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、好ましくは、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10} \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、より好ましくは、 $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、最も好ましくは、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、又はなおさら好ましくは $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ である。好ましい菌株の例は、バチルス・ステアロサーモフィルス・var. カリドラクチス (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) C953 (デルフト工科大学微生物学研究所 (the Laboratory of Microbiology of the Technical University of Delft) により登録番号 LMD74.1、および the Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS)、Baarn、登録番号 CBS760.83で寄託) およびストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) T101 (DSM4022) である。両方の菌株は抗菌性化合物、特にサルファ化合物など化学療法剤、およびペニシリンやテトラサイクリンなど抗生物質に対してきわめて感受性である。大腸菌 (*Escherichia coli*) 株または他の適切なグラム陰性菌を、例えば、キノロンの検出用に使用することができる。バチルス・ステアロサーモフィルス・var. カリドラクチス (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) C953 およびストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) T101 は急成長性であり、好熱性である利点を有する。例えば、前記バチルス菌株の最適な成長温度は $50^\circ \sim 70^\circ \text{C}$ である。好熱性微生物の使用により試験物の保存または輸送中に微生物の成長が妨げられる。試験微生物がバチルス (*Bacillus*)

30

40

50

us) 菌株の場合、好ましくは、孢子懸濁液の形で寒天培地へ組込まれるが、これは周知の方法（例えば、GBA 1467439を参照）によって固化前に寒天培地へ調製および組込まれる。試験微生物がストレプトコッカス（Streptococcus）菌株である場合、細菌は好ましくは、細菌細胞の形で寒天培地へ組込まれ、これは周知の方法（例えば、欧州特許第0285792号明細書を参照）に従って調製される。寒天培地中の試験微生物の濃度は、好ましくは、寒天培地1ml当たり $10^5 \sim 10^{10}$ コロニー形成単位（CFU・ml⁻¹）である。

【0035】

本発明の第1の態様のさらに別の実施形態においては、栄養素および／または金属の塩が、別の供給源として、例えば、顆粒、粉末、錠剤、ディスク、またはろ紙として添加される。指示薬、安定剤、および／または抗葉酸剤など他の化合物も別の供給源として添加され、場合により、栄養素培地に組込まれている。抗菌剤残留物の非存在下で試験微生物の増殖を可能にする適切な栄養素は、例えば、同化炭素源（例えば、乳糖、グルコース、またはデキストロース）、同化窒素源（例えば、ペプトン）、および成長因子源、ビタミンおよびミネラル（例えば、酵母エキス）である。

【0036】

本発明の第2の態様においては、尿および血液中の抗菌性化合物の検出を実行する確実かつ簡単な方法が提供される。本発明によれば、2以上の原子価を有する金属塩が、試験システムにサンプルを添加する前に、分析される流体のサンプル、例えば、尿または血液サンプルに添加される。あるいは、試験システム自体は、本発明の第1の態様で概要が示されているように前記金属塩を含有しうる。意外にも、金属塩が試験方法において使用されると、上記の従来技術の問題が試験の感度の保持により克服されることが見出されている。金属塩、試験培地、指示薬、微生物、および添加成分の要件、および好ましいオプションは、第1の態様で概要が示されたものと同じである。前記金属塩は試験培地および／または分析される流体のサンプルに添加される。

【0037】

第2の態様の実施形態においては、金属塩は、溶液、好ましくは、水溶液によって分析される流体のサンプルに添加される。

【0038】

本発明の第2の態様の別の実施形態においては、金属塩は固形で分析される流体のサンプルに添加される。場合により、固形の金属塩および分析される流体のサンプルは分析前に混合される。好ましくは、固形の金属塩は粉末、顆粒、錠剤、ディスク、またはろ紙の形で添加される。前記顆粒、粉末、錠剤、ディスク、またはろ紙は、場合により、栄養素および／または1つもしくはそれ以上の指示薬および／または安定剤、および／またはプラスまたはマイナスの形で一定の抗菌性化合物に対する感度を変える物質、および／または粘度増加剤も本発明の第1の態様において上記で概要が示されているように含有しうる。好ましくは、分析される前記流体のサンプル中の前記金属の濃度は、0.005～1M、より好ましくは、0.01～0.1Mである。

【0039】

試験培地に添加される尿または血液サンプルの量は、試験システムによって決まる。試験物は製作者の指示に従ってインキュベートされる。微生物拡散試験では、0.01～1.0ml、好ましくは、0.05～0.5mlは公知の方法を使用して試験培地に添加される。試験物のインキュベーション時間は環境によって決まる。バチルス・ステアロサーモフィルス（Bacillus stearothermophilus）を使用する寒天拡散試験の場合には、試験物は水浴または蓄熱ヒーターにおいて60～70℃下、好ましくは、62～65℃下でインキュベートされる。結果は1.5～4時間後、好ましくは、2.5～3.5時間後に得られる。

【0040】

本発明の方法に適切な試験が本発明に含まれる。例は、選択感受性微生物が使用される試験、例えば、微生物寒天拡散試験、および検出される化合物の選択的結合に基づく試験

である。選択的結合は、公知の抗体技術を使用し、または特異的トレーサーを使用することによって達成されうる。流体のいかなるサンプルも本発明の方法による分析に適している。注目すべきは、本発明の方法は固形物質にも適していることであり、目的とする流体は、拡散、圧力、または自然の流体喪失のいずれかによって抽出されうる。この後者の特定の例は、分析される流体が含浸されている肉およびキャリア材料である。

【0041】

本発明の第3の態様においては、本発明の第2の態様の方法を実施するためのキットが提供される。かかるキットは、本発明の第1の態様に記載されている試験培地および金属塩で充填された1つもしくはそれ以上の容器を含んでなる。容器は、任意の形状およびサイズの、および指示薬変化の観察が可能であるという条件で、入手可能な任意の材料の試験管でありうる。また、容器は、マイクロタイタープレートに組込まれたものなどウェルでもありうる。

10

【0042】

前記金属塩は、本発明の第1の態様で概要が示されている金属イオンを形成することが可能な金属塩である。金属塩は、溶液、好ましくは、容器に保存された水溶液として存在しうる。好ましくは、前記金属塩は、固形、例えば、錠剤の形、ディスク、またはろ紙の形において存在する。固形中のキットにおいて金属塩を供給する利点は、所定量が、例えば、投与を促進する錠剤に容易に包装されうることである。さらに別の利点は、乾燥型の金属塩の使用によりサンプルの希釈がもたらされず、その結果として試験の感度を低下させることがないことである。

20

【0043】

場合により、前記キットは、インキュベーション中に試験培地で充填された前記容器の密閉のための手段、および／または使用説明書を有する挿入物、および／またはインキュベーションに必要な時間を設定するための手段を含んでなる。

【0044】

第3の態様の一実施形態においては、前記キットは栄養素を含んでなる。好ましくは、前記栄養素は、錠剤、ディスク、またはろ紙など培地内に含まれている。指示薬、安定剤、および／または抗葉酸剤など他の化合物も別の供給源として添加され、場合により、栄養素培地に組込まれうる。前記培地が存在する場合、その中に金属塩を組込むこともきわめて有利である。

30

【0045】

本発明の第3の態様の別の実施形態においては、前記キットは温度調節デバイスを含んでなり、それによって試験サンプルが設定温度で維持されうる。好ましくは、前記温度調節デバイスは、試験培地で充填された前記容器を保持しうるような方法で設計されている。場合により、温度調節デバイスは、加熱および／または冷却が設定期間の経過後に停止するようにインキュベーションに必要な時間を設定するための手段に結合されている。

【0046】

本発明の第3の態様のさらに別の実施形態においては、前記キットは、サンプル読取りデバイスから得られたデジタルデータを分析するコンピュータに指示するために適したコンピュータプログラムを搭載したデータキャリアを含んでなる。前記データキャリアは、CD-ROM、ディスク、DVD、メモリスティック、磁気テープ、または同種のものなどデジタル情報を保存するために適したキャリアでありうる。有利には、前記コンピュータプログラムを搭載したデータキャリアは、本発明の方法における使用に適した最新の利用可能なコンピュータプログラムへの容易なアクセスを提供する。

40

【実施例】

【0047】

実施例 1

尿サンプルへの塩化カルシウム (CaCl_2) の添加

尿サンプルを寒天に存在する栄養素でEP0005891に記載されている方法に従って製造された微生物抑制試験アンプルを使用して試験した。前記試験は、プレミ (Pre

50

mi) (登録商標) テスト (DSM デルフト オランダ (Delft, The Netherlands) より市販) としても周知である。

【0048】

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.81mg、0.0055mmol) を、薬物残留物を含わない豚肉 (合計10個のサンプルを評価) または子牛 (合計35個のサンプルを評価) から得られた尿100 μl 中に溶解した。対照サンプルには CaCl_2 を添加しなかった。サンプルを試験アンプルに添加した。室温下で20分間のプレインキュベーション後、サンプルを除去し、メーカーの指示に従って試験物を $64 \pm 1^\circ\text{C}$ 下で水浴中でインキュベートした。紫色から黄色への色の変化を読むことによって3-4時間後に結果を得た。

【0049】

以下に要約された結果は、 CaCl_2 による尿の処理がプレミ (Premi) (登録商標) テストにおける偽陽性試験結果を最小限にするために不可欠であることを明らかに示す。

【0050】

【表1】

表1

	偽陽性結果の量 (%)	
	子牛	豚肉
尿	60	10
尿 + CaCl_2	9	0

【0051】

実施例 2

微生物抑制試験に対する CaCl_2 の影響

サンプルを実施例1に記載されているように試験した。 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を水または鶏肉流体中に0、0.0078、0.0156、0.0312、0.0625、0.125、0.25、0.5、および1Mの濃度で溶解した。サンプルを試験アンプルに添加した。室温下で20分間のプレインキュベーション後、サンプルを除去し、メーカーの指示に従って試験物を $64 \pm 1^\circ\text{C}$ 下で水浴中でインキュベートした。鶏肉流体については165分後、水の場合には185分後に、紫色から黄色への色の変化を読むことによって結果を得た。以下に要約された結果は、水中の0.25Mまでの CaCl_2 の濃度が試験結果に影響を及ぼさないことを明らかに示す。鶏肉流体においては、 CaCl_2 の濃度が1Mまでの場合に抑制は認められない。

【0052】

10

20

30

【表 2】

表2

濃度CaCl ₂ (M)	微生物抑制試験において観察された色	
	水	鶏肉流体
0(対照)	黄色	黄色
0.0078	黄色	黄色
0.0156	黄色	黄色
0.0312	黄色	黄色
0.0625	黄色	黄色
0.125	黄色	黄色
0.25	黄色	黄色
0.5	紫色	黄色
1	紫色	黄色

10

【0053】

実施例 3

20

ウシ尿サンプルへの塩化カルシウム (CaCl₂) の添加

本実験においては、尿へのCaCl₂の添加が微生物抑制試験での偽結果を削減することが示されている。

【0054】

サンプルを寒天に存在する栄養素でEP0005891に記載されている方法に従って製造された微生物抑制試験アンプルを使用して試験した。前記試験は、プレミ (Premi) (登録商標) テスト (DSM デルフト オランダ (Delft, The Netherlands) より市販) としても周知である。

【0055】

CaCl₂・2H₂O (1mg、0.0068mmol) を、いかなる薬物残留物をも含有しないウシ (合計25個のサンプルを評価) から得られた尿100μl中に溶解した。対照サンプルにはCaCl₂を添加しなかった。サンプルを試験アンプルに添加した。室温下で20分間のプレインキュベーション後、サンプルを除去し、メーカーの指示に従って試験物を64±1℃下で水浴中でインキュベートした。紫色から黄色への色の変化を読むことによって3-4時間後に結果を得た。

30

【0056】

表3に要約された結果は、CaCl₂による尿の処理がプレミ (Premi) (登録商標) テストにおける偽陽性試験結果を最小限にするために不可欠であることを明らかに示す。

【0057】

40

【表 3】

表3

	偽陽性結果の量 (%)
	ウシ
尿	100
尿 + CaCl ₂ (1 mg/100 μl)	12

50

【0058】

実施例 4

ウシおよびブタ尿サンプルへの酢酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) の添加

本実験では、 CaCl_2 または $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ のいずれかのアルカリ土類金属カルシウムの尿への添加が、微生物抑制試験での偽結果を削減することが明らかにされている。

【0059】

サンプルを寒天に存在する栄養素で E P 0 0 0 5 8 9 1 に記載されている方法に従って製造された微生物抑制試験アンプルを使用して試験した。前記試験は、プレミ (Premi) (登録商標) テスト (DSM デルフト オランダ (Delft, The Netherlands) より市販) としても周知である。 10

【0060】

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mg、0.0068 mmol)、 $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1.0 mg、0.0041 mmol)、および $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (2.0 mg、0.0082 mmol) を、薬物残留物を含有しないウシ (合計 25 個のサンプルを評価) およびブタ (合計 9 個のサンプルを評価) から得られた尿 100 μl 中に溶解した。対照サンプルにはアルカリ土類金属カルシウムを添加しなかった。サンプルを試験アンプルに添加した。室温下で 20 分間のプレインキュベーション後、サンプルを除去し、メーカーの指示に従って試験物を $64 \pm 1^\circ\text{C}$ 下で水浴中でインキュベートした。紫色から黄色への色の変化を読むことによって 3-4 時間後に結果を得た。 20

【0061】

表 4 に要約された結果は、アルカリ土類金属カルシウムによる尿の処理がプレミ (Premi) (登録商標) テストにおける偽陽性試験結果を最小限にすることを明らかに示す。

【0062】

【表 4】

表4

	偽陽性結果の量(%)	
	ウシ	ブタ
尿	100	89
尿 + CaCl_2 (1 mg/100 μl)	12	11
尿 + $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1 mg/100 μl)	20	0
尿 + $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (2 mg/100 μl)	4	12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/009948

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/18		
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 7 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 practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	EP 0 005 891 A (GIST BROCADES NV) 12 December 1979 (1979-12-12) cited in the application claims 7,9	1-16
Y	LOPEZ MERCEDES ET AL: "Influence of recovery conditions on apparent heat resistance of Bacillus stearothermophilus spores" INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 32, no. 4, August 1997 (1997-08), pages 305-311, XP002270444 ISSN: 0950-5423 page 307, column 1, paragraph 4 ----- -/-	1-3
☒ Further documents are listed in the continuation of box C ☒ Patent family members are listed in 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 document 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 February 2005		Date of mailing of the international search report 18/02/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009948

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 656 421 A (BIO MERIEUX) 7 June 1995 (1995-06-07) page 2, lines 2,3,12	15
Y	page 3, lines 9,10 page 7, line 4 - line 13	4-16
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 012, no. 472 (C-551), 9 December 1988 (1988-12-09) & JP 63 192387 A (TOSOH CORP), 9 August 1988 (1988-08-09) abstract	1
A	SIKES A ET AL: "Recovery of heat-stressed spores of Bacillus stearothermophilus on solid media containing calcium- and magnesium-deficient agar" JOURNAL OF FOOD PROTECTION, vol. 56, no. 8, 1993, pages 706-709, XP008027658 ISSN: 0362-028X abstract	1
A	GB 1 467 439 A (GIST BROCADES NV) 16 March 1977 (1977-03-16) example 1	1-16
A	EP 0 702 087 A (LANDESVEREINIGUNG DER BAYERISC) 20 March 1996 (1996-03-20) the whole document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/009948

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0005891 A	12-12-1979	NL 7806086 A	07-12-1979
		AR 220393 A1	31-10-1980
		AU 528996 B2	19-05-1983
		AU 4774079 A	13-12-1979
		BR 7903419 A	15-01-1980
		CA 1136031 A1	23-11-1982
		DE 2966519 D1	09-02-1984
		DK 230779 A ,B,	06-12-1979
		EP 0005891 A1	12-12-1979
		FI 791736 A ,B,	06-12-1979
		IE 48345 B1	12-12-1984
		JP 54159295 A	15-12-1979
		NO 791821 A ,B,	06-12-1979
		NZ 190570 A	31-05-1982
		ZA 7902414 A	25-06-1980
EP 0656421 A	07-06-1995	FR 2713240 A1	09-06-1995
		AT 141954 T	15-09-1996
		CA 2137170 A1	03-06-1995
		DE 69400427 D1	02-10-1996
		DE 69400427 T2	16-01-1997
		EP 0656421 A1	07-06-1995
		ES 2092388 T3	16-11-1996
		US 5536645 A	16-07-1996
JP 63192387 A	09-08-1988	NONE	
GB 1467439 A	16-03-1977	AR 210724 A1	15-09-1977
		AU 6953574 A	04-12-1975
		BE 815759 A1	02-12-1974
		CA 1040517 A1	17-10-1978
		CH 611033 A5	15-05-1979
		DE 2425999 A1	19-12-1974
		DK 292674 A ,B,	20-01-1975
		FR 2231966 A1	27-12-1974
		IE 39293 B1	13-09-1978
		IT 1043931 B	29-02-1980
		JP 1206835 C	11-05-1984
		JP 50033897 A	01-04-1975
		JP 58032879 B	15-07-1983
		NL 7407251 A ,B,	03-12-1974
		SE 418621 B	15-06-1981
		SE 7407176 A	02-12-1974
		US 3941658 A	02-03-1976
		US 4946777 A	07-08-1990
		ZA 7403465 A	28-05-1975
EP 0702087 A	20-03-1996	DE 4432771 A1	21-03-1996
		AT 189002 T	15-02-2000
		DE 59507634 D1	24-02-2000
		DK 702087 T3	08-05-2000
		EP 0702087 A1	20-03-1996
		ES 2145193 T3	01-07-2000

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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 スターク, ヤコブ
オランダ, エヌエルー 3 0 6 9 ゼットエム ロッテルダム, ヨースト ヴァン オスパド
3 1

Fターム(参考) 2G054 AA07 BB13 CA20 CE02 EA03 GB04 GE06 JA01 JA05
4B063 QA01 QQ06 QQ98 QR50 QR66 QR69 QS20 QS36 QX02
4B065 AA15 AA26 AA49 BB02 BB40 CA41 CA44 CA46