

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月5日(05.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/248091 A1

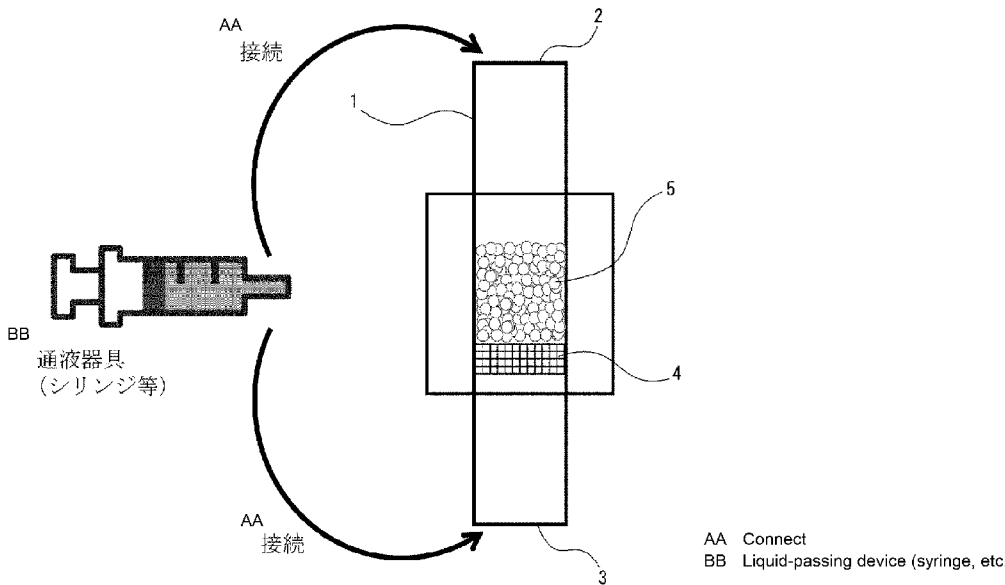
(51) 国際特許分類:
C12Q 1/06 (2006.01) C12M 1/28 (2006.01)
(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/019884
(22) 国際出願日: 2024年5月30日(30.05.2024)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願 2023-088824 2023年5月30日(30.05.2023) JP
(71) 出願人: 旭化成株式会社 (ASAHI KASEI
KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1000006 東京
都千代田区有楽町一丁目1番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 原 雄一 (HARA, Yuichi); 〒1000006 東京
都千代田区有楽町一丁目1番2号 旭
化成株式会社内 Tokyo (JP).
(74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.);
〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目2番3
号 虎ノ門ヒルズ森タワー 青和特
許法律事務所 Tokyo (JP).
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,

(54) Title: MICROORGANISM TESTING METHOD AND PRETREATMENT CONTAINER FOR MICROOR-
GANISM TESTING

(54) 発明の名称: 微生物検査法、及び微生物検査用前処理容器

図2



(57) Abstract: The present disclosure pertains to a microorganism testing method includes an adsorption step for adsorbing microorganisms in a liquid sample to particles, a seeding step for seeding the particles to which the microorganisms are adsorbed in a culture medium, and a culture step for culturing the microorganisms on the culture medium.

(57) 要約: 本開示は、以下の工程: 液体試料中の微生物を粒子に吸着させる吸着工程、微生物が吸着した粒子を培地に播種する播種工程、及び培地上で微生物を培養する培養工程、を含む微生物検査法に関する。

MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：微生物検査法、及び微生物検査用前処理容器

技術分野

[0001] 本発明は、微生物検査法、及び微生物検査用前処理容器に関する。

背景技術

[0002] 感染症診断、又は環境検査や食品微生物検査において病原体又は品質を害する有害微生物を試料中から迅速かつ簡便な方法で検出し、同定し、及び／又は計数することが求められている。

例えば、感染症診断では医師や看護師が被検者の傍らで早期に適切な臨床判断を行うためにPOCT（簡易迅速検査）による病原菌又はウイルスの同定が行われている。また、環境検査や食品微生物検査では、従業員又は環境の衛生管理、原料・中間品・最終製品の品質管理として一般細菌や大腸菌群などの環境指標菌や、食中毒菌、ウイルスなどの有害微生物を対象とした検査が行われている。特に小規模事業やオンサイトでは特殊機器や、微生物学知識を必要としない平易な操作方法が求められる。

[0003] これらの微生物の検査方法は、分離培養を経てその生化学的性状をもとに該微生物の同定を行う培養法、該微生物に特異的な遺伝子をもとにPCR法やLAMP法などにより増幅し検出する遺伝子法、該微生物特有の抗原マーカーと抗体との特異的反応を利用して検出を行う免疫法に大別できる。

その中でも感度、手順の簡便さより培養法が広く行われている。培養法の中には寒天培地などを用いて対象微生物毎に最適化された培養方法にてコロニーを形成させ、カウントを行う標準法と、微生物検査用途として開発されたシート・フィルム培地などを用いて培養を行う迅速微生物培養検査法がある。

いずれの検査法も利用する試料が0.01～1mL程度と少ないため、患者検体（例えば、尿や体液）、食品試料（例えば、液状試料やストマッカーによる細菌又はウイルス抽出液）、又は環境試料（例えば、水質）より採取

可能な0.01～1L程度に含まれる検出物質（菌やウイルスそのもの、又はその表面または内在成分）の含有量のごく一部しか利用できない。これは、微生物検査時の検出精度又は感度の制限につながっている。

かかる問題を解決し、かつ、大型装置を用いず十分な検出物質を確保する手段として、吸着担体による微生物の吸着、分離、回収による濃縮が行われる。

[0004] 例えば、以下の特許文献1では、無機微小粒子（非晶質金属珪酸塩）と試料とを1～20分間振盪することで大腸菌を吸着している。しかしながら、特許文献1に記載された粒子は、50%以上の吸着率を得るために10分以上の振盪を要しており、迅速な濃縮が難しい。また、 $1 \times 10^3 \text{ cfu/mL}$ の大腸菌試料10mLに対し10mgもの多量の無機微小粒子が必要である。更に、特許文献1記載の検出法では吸着した微生物を抽出液と接触させることで壊し、微生物内部の検体を放出させ、それを検出することで間接的に微生物量を定量している。この方法では放出した検体を微粒子から分離する必要があり、放出効率の低下や、非特異吸着により感度が低下するという問題がある。

[0005] また、以下の特許文献2には、ポリカチオンで修飾された多孔質セルロース微粒子を菌体、酵母、動植物細胞培養用のマイクロキャリアとして産業上利用できることが記載されているが、細胞の浮遊培養を前提としたものであって、そのまま微生物検査に用いることは難しい。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第5972174号公報

特許文献2：特開平4-91142号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 前述した従来技術の現状に鑑み、本発明が解決しようとする課題は、簡便

でかつ高感度な微生物検査法、及びそれに適した微生物検査用前処理容器を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、かかる課題を解決すべく鋭意検討し実験を重ねた結果、試料中の微生物を粒子に吸着させ、その後、微生物の吸着した粒子を培地に播種し培養することにより、前記課題を解決しうることを予想外に見出し、本発明を完成するに至ったものである。

[0009] すなわち、本発明は以下の通りのものである。

[1] 以下の工程：

液体試料中の微生物を粒子に吸着させる吸着工程、

微生物が吸着した粒子を培地に播種する播種工程、及び

培地上で微生物を培養する培養工程、

を含む微生物検査法。

[2] 前記培養工程後に、コロニーを数える計数工程をさらに含む、[1]に記載の微生物検査法。

[3] 前記培地が平膜培地、シート培地又はフィルム培地である、[1]又は[2]に記載の微生物検査法。

[4] 播種工程において、液体を用いて粒子を培地に播種する、[1]～[3]のいずれか1項に記載の微生物検査方法。

[5] 前記播種工程で粒子の播種に用いる液体の量が、前記吸着工程における液体試料の量よりも少ない、[4]に記載の微生物検査方法。

[6] 前記液体試料中の微生物濃度が100cfu/mL以下である、[1]～[5]のいずれか1項に記載の微生物検査方法。

[7] 前記粒子がセルロースから構成される、[1]～[6]のいずれか1項に記載の微生物検査法。

[8] 前記粒子が多孔粒子である、[1]～[7]のいずれか1項に記載の微生物検査法。

[9] 前記多孔粒子が、該多孔粒子の内部に多数の空孔を有し、かつ、隣接

した空孔間を隔てる膜の開口部により互いに連通した連続孔構造を有する、
〔 8 〕に記載の微生物検査法。

〔 1 0 〕前記多孔粒子の平均開孔径が $5\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下である、〔 9 〕に記載の微生物検査法。

〔 1 1 〕前記粒子の平均粒子径が $1000\text{ }\mu\text{m}$ 以下である、〔 1 〕～〔 1 0 〕のいずれか 1 項に記載の微生物検査法。

〔 1 2 〕前記粒子の乾燥時の比表面積が $0.3\text{ m}^2/\text{g}$ 以上 $4.4\text{ m}^2/\text{g}$ 以下である、〔 1 〕～〔 1 1 〕のいずれか 1 項に記載の微生物検査法。

〔 1 3 〕前記粒子の表面がカチオン性置換基で修飾された、〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれか 1 項に記載の微生物検査法。

〔 1 4 〕前記粒子の荷電容量が 0.5 mmol/g 以上である、〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれか 1 項に記載の微生物検査法。

〔 1 5 〕前記吸着工程において、粒子を内包したカラムに微生物を含む液体試料を通液する、〔 1 〕～〔 1 4 〕のいずれか 1 項に記載の微生物検査法。

〔 1 6 〕

その内部に粒子が充填された、入口開口と出口開口を有する筒状の微生物検査用前処理容器であって、該入口開口と該出口開口はいずれも、通液が可能であるが、該出口開口近傍に、該粒子の通過を阻止するフィルターがあり、該フィルター上の空間に該粒子が充填されていることを特徴とする、微生物検査用前処理容器。

〔 1 7 〕

前記粒子がセルロースから構成される、〔 1 6 〕に記載の微生物検査用前処理容器。

〔 1 8 〕

前記粒子が多孔粒子である、〔 1 6 〕又は〔 1 7 〕に記載の微生物検査用前処理容器。

〔 1 9 〕

前記多孔粒子が、該多孔粒子の内部に多数の空孔を有し、かつ、隣接した

空孔間を隔てる膜の開口部により互いに連通した連続孔構造を有する、[18]に記載の微生物検査用前処理容器。

[20]

前記多孔粒子の平均開孔径が $5\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下である、[19]に記載の微生物検査用前処理容器。

[21]

前記粒子の平均粒子径が $100\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $1000\text{ }\mu\text{m}$ 以下である、[16]～[20]のいずれか1項に記載の微生物検査用前処理容器。

[22]

前記粒子の乾燥時の比表面積が $0.3\text{ m}^2/\text{g}$ 以上 $4.4\text{ m}^2/\text{g}$ 以下である、[16]～[21]のいずれか1項に記載の微生物検査用前処理容器。

[23]

前記粒子の表面がカチオン性置換基で修飾された、[16]～[22]のいずれか1項に記載の微生物検査用前処理容器。

[24]

前記粒子の荷電容量が 0.5 mmol/g 以上である、[16]～[23]のいずれか1項に記載の微生物検査用前処理容器。

発明の効果

[0010] 本発明に係る微生物検査法を用いれば、微生物を回収したり、微生物を破壊して抗原を取り出したりする必要がないため、微生物を簡便かつ高感度に検査することができる。また、本発明に係る微生物検査用前処理容器は、かかる微生物検査法に好適に利用可能である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本実施形態の微生物検査法の説明図である。

[図2]本実施形態の微生物検査用前処理容器（符号1）の概略図（図2の右手側）である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。

本発明の第一の実施形態は、以下の工程：

液体試料中の微生物を粒子に吸着させる吸着工程、

微生物が吸着した粒子を培地に播種する播種工程、及び

培地上で微生物を培養する培養工程、

を含む微生物検査法である。

[0013] 本実施形態の微生物検査法の吸着工程は、粒子と微生物を含有する試料が接触すればどのような方法でも可能であるが、例えば、粒子の充填されたカラムに微生物を含有する試料を通液することで行うことができる。また、粒子の充填された容器に微生物を含有する試料を添加することでも可能である。どちらの場合でも微生物を含有する試料を通液、充填した後に静置、攪拌することもできる。更にこれらの吸着工程は複数回繰り返すことで更に感度を高めることも可能である。これらの吸着工程により液体試料中の微生物が粒子に吸着することで、多量の試料液中に分散していた微生物を粒子表面に効率良く濃縮することが可能である。

[0014] 本実施形態の微生物検査法の播種工程は、微生物が吸着した粒子を培地に播種することにより実行される。この時、微生物を粒子から剥離する必要はなく、微生物が吸着した粒子を直接培地に播種すればよい。播種する方法に特に制限はないが、例えば、微生物が吸着した粒子が充填されたカラムから、生理食塩水などを用いて粒子を押し出すことで培地に播種する方法である。このような方法で播種を行う際には、カラム出口にのみフリット等のフィルターを配置し、入口側にはフィルターを配置せずに用い、出口より生理食塩水など通液し入口から微生物が吸着した粒子を押し出すことができる。例えば、その内部に粒子が充填された、入口開口と出口開口を有する筒状の微生物検査用前処理容器であって、該入口開口と該出口開口はいずれも、通液が可能であるが、該出口開口近傍に、該粒子の通過を阻止するフィルターがあり、該フィルター上の空間に該粒子が充填されていることを特徴とする、微生物検査用前処理容器に、入口開口側（上側から）から、微生物を含有する液体試料を通液し、その後、該容器をひっくり返し、下側になった該入口

開口から、粒子を落下させればよい。

また、微生物が吸着した粒子と試料液体を含む容器を静置、又は遠心することで粒子を沈殿させ、その後、粒子だけをピペットなどで取り出し播種してもよい。

[0015] 微生物が吸着した粒子は、液体を用いて培地に播種してよい。上述したように、カラム中の粒子は生理食塩水などの液体を通液することで押し出して播種してよく、容器中に沈殿した粒子は液体とともに取り出して播種してよい。粒子の播種に用いる液体の量は、吸着工程における液体試料の量よりも少ないことが好ましい。例えば、吸着工程で使用する液体試料の量が10 mLから1000 mLの際には、播種工程において1 mLの液体で播種することができる。吸着前の試料液量（液体試料の量）よりも少ない液量で播種工程が行われることで、播種液量中の播種微生物量を好適に増やすことができ、微生物を簡便かつ高感度に検査する観点で有利になり易い。濃縮倍率（吸着前の試料液量／播種液量）は1倍超、10倍以上、100倍以上、1000倍以上であってよい。但し、培養工程後のコロニーを容易に計数できる濃縮倍率として、播種液量中の播種微生物量が100 c f u / mL以下となる濃縮倍率であることが好ましい。

[0016] 本実施形態の微生物検査法の培養工程で、培地上で粒子に随伴した微生物を培養する。

上記吸着工程で粒子に微生物を濃縮し、その後の、播種工程・培養工程で、粒子に随伴した微生物を播種・培養することで、従来よりも高感度で検査することができる。また、濃縮後の処理、具体的には濃縮媒体からの微生物の回収や、微生物を破壊し抗原を取り出すといった工程が必要なく、更には試料溶液中の培養阻害物質の影響の低減しながら、微生物を簡便かつ高感度に検査することができる。

[0017] 本実施形態の微生物検査法では、吸着工程の後に、残留した溶液を除去する脱液工程を含めることができる。脱液工程は、残存した液体を除去できればどのような方法でもよいが、例えば、微生物含有試料を通液した後のカラ

ムに通気することで行うことができる。また、微生物が吸着した粒子の充填された容器から、ろ過や液体の吸い取りにより上清を除去することでも可能である。脱液工程を行うことで、残存する溶液の影響を軽減することが可能になり、微生物を高感度に検査する観点で有利になり易い

[0018] 本実施形態の微生物検査法では、吸着工程の後に、阻害物質などを分離する洗浄工程を含めることができる。洗浄工程は、微生物が吸着した粒子と阻害物質とを分離できればどのような方法でもよいが、例えば、微生物含有試料を通液した後のカラムに、生理食塩水など微生物の活性を阻害しない液体を通液することで行うことができる。また、微生物が吸着した粒子が充填された容器から上清を除去した後に、生理食塩水を加え攪拌し除去することで行うこともできる。阻害物質は培養に影響する物質がすべて該当するが、例えば塩類、糖類、酸・塩基類、カテキン、パラベン等防腐剤があげられるが、特にこれらに限定はされない。洗浄工程を行うことで、培養の阻害物質を除去することができ、微生物を阻害物質の影響を軽減しつつ、高感度に検査する観点で有利になり易い。

[0019] 本実施形態の微生物検査法で検査する液体試料中の微生物濃度の上限は 100 cfu/mL 以下が好ましく、より好ましくは 50 cfu/mL 以下であり、さらに好ましくは 10 cfu/mL 以下である。上述した濃度の試料は一般的なシート培地では評価のばらつきが大きくなり、サンプリングの影響も大きくなるが、本実施形態の微生物検査法であれば上述した濃度であっても高感度に検査する観点で有利になり易く、サンプリングの影響を低減し易い。

吸着前の試料液量（液体試料の量）よりも少ない液量で播種工程を行う場合は、微生物濃度の上限は、5 cfu/mL 以下、1 cfu/mL 以下、0.1 cfu/mL 以下、0.01 cfu/mL 以下であってもよい。

本実施形態の微生物検査法で検査する液体試料中の微生物濃度の下限は、0 cfu/mL 超えでよい。

[0020] 本実施形態の粒子の種類に特に制限はないが、セルロースなどの多糖類で

あることが好ましい。セルロースであれば微生物検査のための培養を阻害しない。また、表面修飾も容易であり均質に微生物吸着に適した表面を形成することができる。

尚、明細書中、用語「表面」とは、多孔粒子の場合、外表面と、該多孔粒子内部の空孔の内表面の両者を包含する。

[0021] セルロースの種類としては特に制限はないが、銅アンモニア再生セルロース、ビスコース再生セルロース、コットン、パルプ、ポリノジックなどの公知のセルロースが用いられ、好ましくは銅アンモニア再生セルロース、ビスコース再生セルロースであり、より好ましくは銅アンモニア再生セルロースである。銅アンモニア再生セルロースは、結晶化度が低いため各種官能基修飾の際の反応性が高く、多孔粒子であっても粒子内部にまで均質に修飾することが可能である、かつ、粒子の形態安定性にも優れる。

[0022] 本実施形態の微生物検査法に用いる粒子とは、試料液中にて好適に分散する形状であり、例えば、球体、楕円体、棒状、繊維状、粉砕物などが挙げられる。これらの構造であれば効率よく試料液体と接触することができ、効率的に微生物の吸着が可能である。

[0023] 本実施形態の粒子の形状は、好ましくは多孔粒子であり、該多孔粒子の内部に多数の空孔を有し、かつ、隣接した空孔間を隔てる膜の開口部により互いに連通した連続孔構造を有するものである。多孔粒子であれば表面積が高く、試料中の微生物を効率よく吸着できる。また、カラムに粒子を充填した際に、カラム内の充填密度が高くなり、ショートパスによる吸着効率の低下を抑制することができる。また、連続孔構造を有する粒子であれば粒子の内部まで試料が容易に拡散するため粒子内部にまで効率よく微生物を吸着でき、更にはカラムに粒子を充填した際には通液時の圧損を少なくできる。

[0024] 本実施形態の微生物検査法に用いる粒子が多孔粒子である場合、空孔の平均開孔径の下限は、 $5\ \mu\text{m}$ 以上が好ましく、より好ましくは $10\ \mu\text{m}$ 以上である。平均開孔径を $5\ \mu\text{m}$ 以上とすることで、粒子中での微生物や試料液、微生物検査用の培養液の移動の自由度が高くなり、粒子内部に微生物が入り

込むことができ、効率よく微生物を吸着・増殖させることができる。平均開孔径の上限としては $100\mu\text{m}$ 以下が好ましく、より好ましくは $80\mu\text{m}$ 以下であり、さらに好ましくは $50\mu\text{m}$ 以下である。平均開孔径が $100\mu\text{m}$ より小さいと微生物の増殖に十分な表面積を確保することができ、効率よく微生物が増殖する。

本明細書中、用語「平均開孔径」とは、多孔粒子を水、エタノール、 t -ブタノールの順で溶媒置換後に、残留した余分な溶媒を凍結乾燥にて除去し、水銀圧入式ポロシメーターによって求めた細孔分布の極大値を指す。

[0025] 本実施形態の微生物検査法に用いる粒子の平均粒子径の上限は、好ましくは $1000\mu\text{m}$ 以下であり、より好ましくは $500\mu\text{m}$ 以下であり、さらに好ましくは $400\mu\text{m}$ 以下である。平均粒子径が $1000\mu\text{m}$ より小さいと、粒子の中心部にまで効率よく微生物を吸着できる。また、カラムに詰めた際に粒子間の隙間を最小限にすることができるためショートパスによる吸着効率の低下を抑制でき、更には微生物培養の際に培地表面に均質に播種することが可能である。

本明細書中、用語「平均粒子径」とは、多孔粒子を水で膨潤した後に余分な水を除去し、光学顕微鏡により適当な倍率に設定して、20粒子以上測定した平均の粒子径である。多孔粒子の具体的な膨潤工程としては、 10mL の生理食塩水に 1mg の多孔粒子を半日浸漬して膨潤させた後、エンプティカラム（BIO-RAD社製、7311550）を用いて、自重で落下する程度まで、余分な水をろ過して取り除く。

[0026] 本実施形態の微生物検査法に用いる粒子の乾燥時 1g 当たりの表面積（比表面積）の下限は、 $0.3\text{m}^2/\text{g}$ 以上が好ましく、より好ましくは $0.6\text{m}^2/\text{g}$ 以上であり、さらに好ましくは $0.8\text{m}^2/\text{g}$ 以上である。微生物の培養に必要な表面積は、効率よく微生物を吸着させる観点から、 $0.3\text{m}^2/\text{g}$ 以上が好ましい。該比表面積の上限は、 $4.4\text{m}^2/\text{g}$ 以下であることが好ましく、 $3.3\text{m}^2/\text{g}$ 以下がより好ましく、 $2.0\text{m}^2/\text{g}$ 以下がさらに好ましく、 $1.7\text{m}^2/\text{g}$ 以下が特に好ましい。単位面積当たりの荷電量を低下さ

せず、微生物の付着率が低下することを防止する観点から、比表面積は $4.4 \text{ m}^2/\text{g}$ 以下であることが好ましい。

本明細書中、用語「比表面積」とは、BET法により測定した乾燥重量 1 g 当たりの表面積である。

[0027] 本実施形態の微生物検査法に用いる粒子は、カチオン性の置換基により修飾されていることが好ましい。カチオン性の置換基は好ましくは、第一級アミノ基、第二級アミノ基、第三級アミノ基からなる群より選択される少なくとも1種であり、より好ましくは第一級アミノ基、第三級アミノ基であり、更に好ましくはジエチルアミノエチル基である。

[0028] 本実施形態の微生物検査法に用いる粒子の荷電容量は、基材自体の水酸基等の官能基の影響も考慮する必要がある、微生物が良好に接着し、微生物検査用の培地で増殖するのに最適な荷電の範囲が異なることを考慮する必要がある。本実施形態の微生物検査法に用いる粒子の荷電容量の下限は、 0.1 mmol/g 以上が好ましく、より好ましくは 0.5 mmol/g 以上である。荷電容量が 0.1 mmol/g より高いと短時間の試料液との接触で効率よく微生物の吸着濃縮が可能であるため迅速・高感度に微生物の検査が可能である。また、粒子の荷電容量の上限は、 3.5 mmol/g 以下が好ましく、より好ましくは 3.0 mmol/g 以下である。荷電容量が 3.5 mmol/g 以下であると、培地中で微生物が好適にコロニーを形成することができるため、コロニーカウントに影響がなく、微生物カウントの際の偽陰性が起こりにくい。

本明細書中、用語「荷電容量」とは、多孔粒子中のアミンに塩酸を用いて塩化物イオンを吸着させた後に、硫酸ナトリウム溶液で吸着した塩化物イオンを洗い流した溶液を、クロム酸カリウムを指示薬として硝酸銀を用いて塩化物イオン濃度を滴定することで評価し、3サンプル以上測定した平均値を荷電容量とした。

[0029] [荷電容量測定]

多孔粒子を 5.0 g 測りとり、ロート、吸引ろ過器を用いて、蒸留水 30 m

Lで2回洗浄し、水で置換する。0.3 Nの塩酸水溶液30 mLで2回、10-4 N塩酸の塩酸水溶液50 mLで4回の順に洗浄する。その後ロート、吸引ろ過器を用いて、10%硫酸ナトリウム水溶液50 mL×4回洗浄し、ろ液を回収する。回収したろ液に0.1 Nクロム酸カリウム水溶液を2 mLずつ入れて攪拌する。そして1 N硝酸銀水溶液にて滴定し、クロム酸銀の赤褐色沈殿が生じ始める瞬間の滴定量A (mL)を求める。

また、別途上述の工程にて10%硫酸ナトリウム水溶液で洗浄まで終えた試料を純水50 mLで4回洗浄し、105℃で15時間以上乾燥し、天秤にて重量を測定し、乾燥重量B (g)を求める。

荷電容量測定は、上記測定した滴定量A (mL)と試料の乾燥重量B (g)を用いて下記式(1)によって算出する(N=3)。

$$\text{荷電容量 (mmol/g)} = 1 \text{ (N)} \text{ (mol/L)} \times A \text{ (mL)} / B \text{ (g)} \cdots \text{式 (1)}$$

[0030] 本実施形態の微生物検査法に用いる粒子は、例えば、セルロースを溶解した溶液を所望の形状に成形しつつ溶液の固化温度以下に冷却して凍結させ、次いで、溶媒を抽出除去するか又は溶解能力を失わせる方法によって製造することができる。一般には、凍結温度は、溶媒等の凍結温度よりも40℃以上低くは設定されないことが好ましく、通常は凍結温度よりも0～20℃低い範囲に選ばれることが多い。

[0031] また、凍結されたセルロース溶液又はセルロース誘導体溶液は、次いで、セルロース又はセルロース誘導体を溶解している溶媒を抽出除去するか、その溶解能を低めて（以下、これらの処理を総称して「溶媒除去等」ともいう。）、固化されたセルロース多孔体とする。溶媒除去等の条件は特に制限されるものではない。通常は、凍結体を素早く任意の凝固浴または再生浴中に投入すれば足りるが、凝固浴または再生浴も溶液の凍結温度以下にすることが好ましく推奨される。但し、セルロース誘導体の場合、セルロース再生工程が必要であり、この再生は溶媒除去等と同時に又は逐次的に（すなわち、溶媒除去等を行った後に）行なう。再生自体は常法によって行うことができ

る。上記製造方法を用いれば、製造時に高分子溶液には多孔化材などの異物を入れる必要がないため、微小な均一径の液滴を容易に作ることができ、粒径コントロールを任意に行なうことができる。空孔の径と形状は基本的に溶液中の溶媒などが凍結固化する際に形成する溶媒などの結晶の大きさと形状により決まる。従って、高分子溶液の種類、温度などの凍結固化条件を変化させることにより空孔の形状及び孔径を調整することができる。

尚、上記の製造方法を用いれば、得られる多孔質セルロース微粒子は、空孔間を隔てる膜の開口部により互いに連通した連続孔構造を形成しているものとなる。

[0032] 本実施形態の微生物検査法に用いる多孔質セルロース微粒子としては、造粒したセルロース粒子をそのまま使用することもできるが、架橋して使用することが好ましい。架橋の方法に制限はないが、セルロース多孔体の分子間架橋は、セルロースの水酸基と反応結合し得る官能基を2つ以上もつものならば架橋剤として使用できる。例として、二官能性有機物質が挙げられる。その例としては、アルカリ性反応物質存在下で比較的容易に反応するX-R-Z形〔式中、Rは炭素原子を含有する脂肪族残基を表し、X及びZは、各種ハロゲン、エポキシ等であり、それらは脂肪族残基の炭素と結合している。〕がある。上記反応に適する二官能性化合物の例には、エピクロロヒドリン、ジクロロヒドリン、1, 2-若しくは3, 4-ジエポキシブタン、ビスエポキシ・プロピルエーテル、エチレングリコールビスエポキシ・プロピルエーテル、1, 4-ブタンジオールビスエポキシプロピルエーテル、これらに密接に関係ある化合物類があるが、特にこれらに限定されるものではない。架橋を行えばカチオン性の置換基を多く修飾した際にも、セルロースの結晶構造を維持することができるため、粒子の構造を安定に保つことができる。

[0033] 本実施形態の微生物検査法に用いる粒子を構成するセルロースにカチオン性の置換基を修飾する方法は特に制限はないが、直接水酸基に修飾する方法や、エポキシ基を有する官能基を介して修飾する方法など、複数の方法で導

入することが可能である。好ましくは2-（ジエチルアミノ）エチルクロリド塩酸塩などを用いて、直接セルロースの水酸基に修飾する方法である。セルロースには水酸基が多く存在するため、直接水酸基を修飾することで粒子の内部にまで均質に多量のカチオン性の置換基を修飾することが可能である。他方、エポキシ基などの第三置換基を介して導入する際には、カチオン性の置換基の導入量、ばらつきが第三置換基の導入量に依存してしまい、粒子内部の導入量まで制御することが困難である。また2-（ジエチルアミノ）エチルクロリド塩酸塩を用いてカチオン性の置換基を導入する際の反応条件は特に制限はないが、2-（ジエチルアミノ）エチルクロリド塩酸塩自体による溶液のpHの変化を考慮した最適なpHの設定と、セルロースの水酸基の荷電の影響を最小限にするために芒硝などの添加物を入れることで、孔内部荷電密度を制御することができる。

[0034] 本実施形態微生物検査法に用いる培地は、微生物を増殖できる培地、例えば、LB培地、M9培地、TB培地、SOB培地、SOC培地、2XYT培地、NZCYM液体培地、酵母培地、酵母窒素原基礎培地、ファージ培地、NZ Amino（登録商標）液体培地等を広く包含する。また培地の形態は、平膜培地又はシート培地、フィルム培地が好ましい。これらの培地の形態では、微生物濃度の低い試料を検査する際には低感度になり、更には偽陰性が発生しやすい。しかしながら、微生物の吸着した粒子を播種してコロニーを形成することで、高感度になり偽陰性が発生しなくなる。

[0035] 本発明の第二の実施形態は、その内部に粒子が充填された、入口開口と出口開口を有する筒状の微生物検査用前処理容器であって、該入口開口と該出口開口はいずれも、通液が可能であるが、該出口開口近傍に、該粒子の通過を阻止するフィルターがあり、該フィルター上の空間に該粒子が充填されていることを特徴とする、微生物検査用前処理容器である。

かかる第二の実施形態で用いる粒子は、前記した第一の実施形態で用いるものと同一であることができる。

[0036] 微生物検査用前処理容器は、入口開口側は粒子が通過できる構造になって

おり、かつ、入口開口と出口開口のどちらからでも通液が可能である。この構造とすることで、入口開口から微生物を含む試料を吐出することで粒子に微生物を吸着させることができる。また、吸着工程後、一度カラムを取り外し、出口開口から生理食塩水等を吐出することで、微生物が吸着した粒子をカラム内から簡便に排出することができ、培地への播種が容易となる。

[0037] 本明細書中、用語「微生物」とは、特に制限はなく、各種細菌、例えば、大腸菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、サルモネラ菌、各種ウイルス、真菌、原虫、リケッチア等を広く包含する。本実施形態では、これらの微生物が濃縮される対象である。また、細菌、ウイルス等を含有する試料液体とは、特に制限はなく、患者検体（例えば、尿や体液）又は食品試料（例えば、液状試料やストマッカーによる細菌又はウイルス抽出液）、又は環境試料（例えば、水質）を広く包含する。

実施例

[0038] 以下、実施例、比較例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

[0039] [荷電容量測定]

試料を5.0 g 測りとり、ロート、吸引ろ過器を用いて、蒸留水30 mLで2回洗浄し、水で置換する。0.3 Nの塩酸水溶液30 mLで2回、 10^{-4} N塩酸の塩酸水溶液50 mLで4回の順に洗浄する。その後ロート、吸引ろ過器を用いて、10%硫酸ナトリウム水溶液50 mL×4回洗浄し、ろ液を回収する。回収したろ液に0.1 Nクロム酸カリウム水溶液を2 mLずつ入れて攪拌する。そして1 N硝酸銀水溶液にて滴定し、クロム酸銀の赤褐色沈殿が生じ始める瞬間の滴定量A (mL) を求める。

また、別途上述の工程にて10%硫酸ナトリウム水溶液で洗浄まで終えた試料を純水50 mLで4回洗浄し、105℃で15時間以上乾燥し、天秤にて重量を測定し、乾燥重量B (g) を求める。

荷電容量測定は、上記測定した滴定量A (mL) と試料の乾燥重量B (g) を用いて下記式(1)によって算出する(N=3)。

荷電容量 (mmol/g) = 1 (N) (mol/L) × A (mL) /
B (g) …式 (1)

[0040] [大腸菌液の調製]

オートクレーブ滅菌した3%Trypticase Soy Broth
液体培地 (211768、BD社製) 1mLに大腸菌株15μL (ATCC
No. 25922) を植菌し、好気性条件下37℃で16時間振盪培養す
る。4000×gで15分間遠心分離を行い、上澄み液を除去し、1mLの
蒸留水を添加してOD (600nm) = 1 (凡そ1e9cfu/mL) の菌
液を得る。得られた大腸菌液を生理食塩水で約1cfu/mLに希釈して使
用する。

[0041] [セルロース粒子の作製]

精製リンターを原料として調整した5℃における粘度2ポイズ、セルロー
ス濃度2%、銅濃度1.2%、アンモニア濃度4%のセルロース銅安溶液を
、二流体ノズルを用いて窒素ガスと共に500mL噴霧し、-40℃に冷却
したシリコンオイル (SH200、1.5cs、東レ社) 10L中に攪拌し
ながら受けた。シリコンオイルを-20℃に昇温し20分間攪拌を続け、-
35℃に冷却した40%硫酸10Lを投入した。硫酸投入後、8時間攪拌を
続け20℃に昇温し、シリコンオイルを除去して残りを抜き出し水洗し、多
孔質セルロース粒子を得た。分級ふるいを用いて平均粒子径が240μm、
平均開孔径が30μmであるセルロース多孔粒子を得た。カチオン化修飾す
る前のセルロース粒子を粒子1とした。

[0042] [セルロース粒子のカチオン化]

粒子1を6.66g測り取り、純水、無水芒硝、ドデシル硫酸ナトリウム
、2- (ジエチルアミノ) エチルクロリド塩酸塩水溶液 (50%) を以下の
表1に示す量で添加し、攪拌した。すぐに反応開始液 (48%水酸化ナトリ
ウム水溶液) を添加し、70℃での恒温槽内で1時間攪拌しながら反応した
。1時間経過後、36%塩酸をpH7になるまで加えて中和し、吸引ろ過に
より8000mLの純水で3回試料を洗浄する。上記工程を1~2回繰り返

しカチオン性セルロース多孔粒子である粒子 2 ～ 7 を得た。乾燥後の粒子の荷電容量を測定した。

[0043]

[表1]

【表1】								
	粒子2	粒子3	粒子4	粒子5	粒子6	粒子7	粒子8	
純水	217.3g	236.5g	236.5g	218.3g	218.3g	218.3g	218.3g	
無水芒硝	88.8g	91.5g	93.2g	89.3g	124.3g	146.7g	146.7g	
ドデシル硫酸ナトリウム	0.016g	0.016g	0.016g	0.016g	0.016g	0.016g	0.016g	
2-(ジエチルアミノ)エチルクロリド塩酸塩水溶液	0.46g	2.32g	4.65g	11.1g	27.8g	44.4g	44.4g	
水酸化ナトリウム	0.39g	1.94g	3.87g	5.36g	13.4g	21.4g	21.4g	
反応回数	1	1	1	1	1	1	2	
反応後に得られた粒子の荷電容量 [mmol/g]	0.1mmol/g	0.5mmol/g	0.9mmol/g	1.8mmol/g	2.5mmol/g	3.0mmol/g	3.5mmol/g	

[0044] [評価用カラム（微生物検査用前処理容器）の作製]

ルアー型カートリッジカラム（株式会社巴製作所 CL0311）に付属のフリットを押し込む。粒子1～8、又はCytodex1（Cytiva製）を10mg/mLの濃度になるように粒子を計量し、純水中へ懸濁する。10mg/mLに懸濁した粒子溶液を200μL又は800μLずつカラムに通液する。滅菌袋にカラムを入れ、オートクレーブにて121℃、20分以上滅菌を行い以下の表2に示すようにカラム1～10を得た。

[0045] [表2]

【表2】	カラム10	カラム9	カラム8	カラム7	カラム6	カラム5	カラム4	カラム3	カラム2	カラム1	カラム	カラム
	Cytodex1	粒子8	粒子7	粒子6	粒子5	粒子4	粒子3	粒子2	粒子1	粒子5	1	粒子種
	8mg	8mg	8mg	8mg	8mg	8mg	8mg	8mg	8mg	8mg	2mg	充填量

[0046] [比較例1：シート培養評価]

MC-Media Pad EC（大腸菌・大腸菌群用）（JNC株式会社）のフィルム表面フィルムを剥がし、約1 c f u / m L に調整した大腸菌液を1 m L 滴下し、再度フィルムを貼り付ける。35℃、24 h 培養し、コロニー数をカウントする。カウントした結果を以下の表3に示す。

[0047] [実施例1～12：カラム濃縮後粒子播種によるシート培養評価]

表3に記載のように生理食塩水、ハトムギ化粧水(ナチュリエ)（メチルパラベン含有）、又は2.0%食塩水を用いて約1 c f u / m L に調整した大腸菌液100 m L をビーカーに測り取り、ペリスタポンプを用いてカラム1～10のフリットがある面を下に向けた状態で15 m L / m i n で通液した。その後生理食塩水を1 m L シリンジに測り取り、フリットがある面を上に向けた状態で取り付けた。MC-Media Pad EC（大腸菌・大腸菌群用）（JNC株式会社）の表面フィルムを剥がした状態で、生理食塩水を通液し、カラム内の粒子ごと培地上に通液した液を滴下した。通液した液を均質に培地上で伸ばした後、再度フィルムを貼り付けた。35℃、24 h 培養し、コロニーの数をカウントし、3サンプルの平均値をコロニー数とした。また、コロニーサイズを下記判定基準に従い評価した。

（判定基準）

大：濃縮無時より小さいコロニーが50%未満、

中：濃縮無時より小さいコロニーが50%以上80%未満

小：濃縮無時より小さいコロニーが80%以上。

コロニー数のカウント、コロニーサイズの評価を行った結果を以下の表3に示す。

[0048] [実施例13：低濃度菌液のカラム濃縮後粒子播種によるシート培養評価]

約1 c f u / m L に調整した大腸菌液を、生理食塩水を用いて約0.01 c f u / m L にさらに希釈した。約0.01 c f u / m L に調整した大腸菌液1000 m L をビーカーに測り取り、ペリスタポンプを用いてカラム6のフリットがある面を下に向けた状態で15 m L / m i n で通液した。その後生理食塩水を1 m L シリンジに測り取り、フリットがある面を上に向けた状

態で取り付けた。MC-Media Pad EC（大腸菌・大腸菌群用）（JNC株式会社）の表面フィルムを剥がした状態で、生理食塩水を通液し、カラム内の粒子ごと培地上に通液した液を滴下した。通液した液を均質に培地上で伸ばした後、再度フィルムを貼り付けた。35℃、24h培養し、コロニーの数をカウントし、3サンプルの平均値をコロニー数とした。また、コロニーサイズは、上記判定基準と同一とした。

コロニー数のカウント、コロニーサイズの評価を行った結果を以下の表3に示す。

[0049] [比較例2、3：カラム濃縮後微生物抽出によるシート培養評価]

生理食塩水を用いて約1cfu/mLに調整した大腸菌液100mLをビーカーに測り取り、ペリスタポンプを用いてカラム1のフリットがある面を下に向けた状態で15mL/minで通液した。その後0.01、1Mに調整した塩化マグネシウム水溶液を1mLシリンジに測り取り、フリットがある面を下に向けた状態で取り付けた。MC-Media Pad EC（大腸菌・大腸菌群用）（JNC株式会社）の表面フィルムを剥がした状態で、塩化マグネシウム水溶液を通液し、ろ液を滴下した。通液した液を均質に培地上で伸ばした後、再度フィルムを貼り付けた。35℃、24h培養し、コロニーの数をカウントし、3サンプルの平均値をコロニー数とした。また、コロニーサイズは、上記判定基準と同一とした。

コロニー数のカウント、コロニーサイズの評価を行った結果を以下の表3に示す。

[0050] [比較例4、5：シート培養評価]

MC-Media Pad EC（大腸菌・大腸菌群用）（JNC株式会社）のフィルム表面フィルムを剥がし、ハトムギ化粧水(ナチュリエ)（メチルパラベン含有）又は2.0%食塩水を用いて約1cfu/mLに調整した大腸菌液を1mL滴下し、再度フィルムを貼り付けた。35℃、24h培養し、コロニー数をカウントした。カウントした結果を以下の表3に示す。

[0051]

[表3]

表3

	カラム種	カラム濃縮 工程有無	播種時粒子 有無	溶液 (大腸菌液調整)	粒子種	溶液 (播種工程)	平均値	コロニー サイズ
比較例1	-	無	無	生理食塩水	-	-	1	-
比較例2	カラム1	有	無	生理食塩水	多孔粒子	1M MgCl2	0	N.D.
比較例3	カラム1	有	無	生理食塩水	多孔粒子	0.01M MgCl2	0	N.D.
比較例4	カラム6	無	無	ハトムギ化粧水	-	-	0	N.D.
比較例5	カラム6	無	無	2.0%食塩水	-	-	0	N.D.
実施例1	カラム1	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	150	大
実施例2	カラム2	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	27	大
実施例3	カラム3	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	86	大
実施例4	カラム4	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	166	大
実施例5	カラム5	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	200	中
実施例6	カラム6	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	172	中
実施例7	カラム7	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	162	中
実施例8	カラム8	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	184	中
実施例9	カラム9	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	149	小
実施例10	カラム10	有	有	生理食塩水	非多孔粒子	生理食塩水	9	大
実施例11	カラム6	有	有	ハトムギ化粧水	多孔粒子	生理食塩水	49	大
実施例12	カラム6	有	有	2.0%食塩水	多孔粒子	生理食塩水	86	大
実施例13	カラム6	有	有	生理食塩水	多孔粒子	生理食塩水	14	大

[0052] 表3に示すように、本実施形態の微生物検査法及び微生物検査用前処理容器を用いて、微生物の吸着した粒子を培地に直接播種し、シート培地で培養することで、該粒子を用いないで得た、又は該粒子を用いた後に、該粒子から分離して得た微生物を直接コロニー形成させるよりも、10～200倍高い感度で菌の検査が可能であった。

実施例13に示すように、濃縮倍率（吸着前の試料液量／播種液量）を1000倍にすることで、約0.01cfu/mLの微生物濃度の低い試料においても、高い感度で菌の検査が可能であった。

[0053] また実施例11、12に示すように、パラベンや、高濃度の食塩など培養の阻害物質の影響を低減しながら高感度に菌の検査が可能であった。

産業上の利用可能性

[0054] 本発明に係る微生物検査法及び微生物検査用前処理容器を用いれば迅速かつ簡便に微生物の濃縮を行うことができ、更に微生物の吸着した粒子を培地に直接播種し培養し検査することができるため、微生物の回収や微生物を破壊し抗原を取り出す必要がなく、微生物を直接高感度に検査することができる。それゆえ、本発明に係る微生物検査法及び微生物検査用前処理容器は、微生物検査等において好適に利用可能である。

符号の説明

- [0055] 1 微生物検査用前処理容器
2 入口開口
3 出口開口
4 フィルター
5 粒子

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程：
液体試料中の微生物を粒子に吸着させる吸着工程、
微生物が吸着した粒子を培地に播種する播種工程、及び
培地上で微生物を培養する培養工程、
を含む微生物検査法。
- [請求項2] 前記培養工程後に、コロニーを数える計数工程をさらに含む、請求項1に記載の微生物検査法。
- [請求項3] 前記培地が平膜培地、シート培地又はフィルム培地である、請求項1又は2に記載の微生物検査法。
- [請求項4] 播種工程において、液体を用いて粒子を培地に播種する、請求項1又は2に記載の微生物検査方法。
- [請求項5] 前記播種工程で粒子の播種に用いる液体の量が、前記吸着工程における液体試料の量よりも少ない、請求項4に記載の微生物検査方法。
- [請求項6] 前記液体試料中の微生物濃度が100cfu/mL以下である、請求項1又は2に記載の微生物検査法。
- [請求項7] 前記粒子がセルロースから構成される、請求項1又は2に記載の微生物検査法。
- [請求項8] 前記粒子が多孔粒子である、請求項1又は2に記載の微生物検査法。
- [請求項9] 前記多孔粒子が、該多孔粒子の内部に多数の空孔を有し、かつ、隣接した空孔間を隔てる膜の開口部により互いに連通した連続孔構造を有する、請求項8に記載の微生物検査法。
- [請求項10] 前記多孔粒子の平均開孔径が5 μ m以上100 μ m以下である、請求項9に記載の微生物検査法。
- [請求項11] 前記粒子の平均粒子径が1000 μ m以下である、請求項1又は2に記載の微生物検査法。
- [請求項12] 前記粒子の乾燥時の比表面積が0.3m²/g以上4.4m²/g

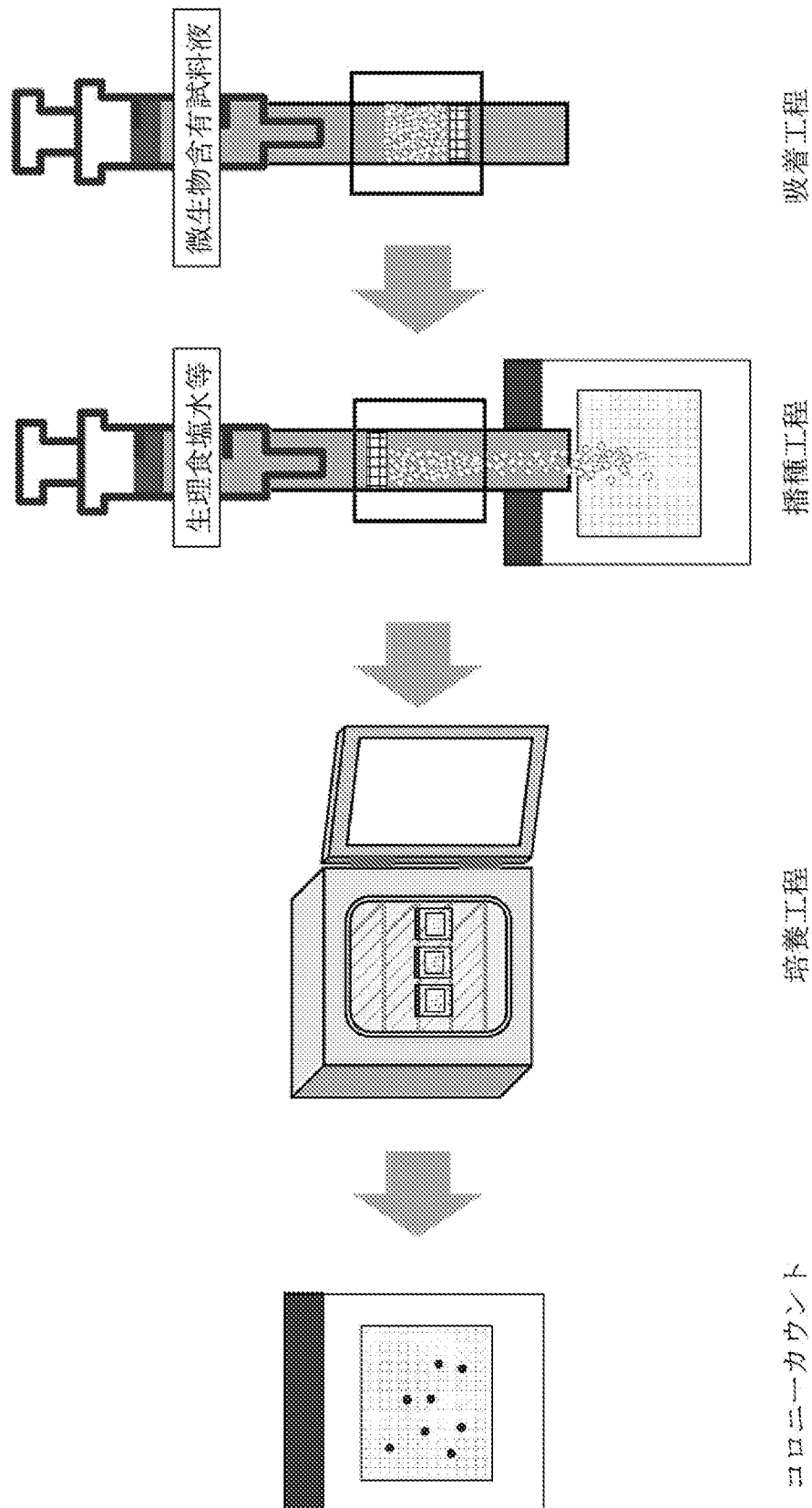
以下である、請求項 1 又は 2 に記載の微生物検査法。

- [請求項13] 前記粒子の表面がカチオン性置換基で修飾された、請求項 1 又は 2 に記載の微生物検査法。
- [請求項14] 前記粒子の荷電容量が 0.5 mmol/g 以上である、請求項 1 又は 2 に記載の微生物検査法。
- [請求項15] 前記吸着工程において、粒子を内包したカラムに微生物を含む液体試料を通液する、請求項 1 又は 2 に記載の微生物検査法。
- [請求項16] その内部に粒子が充填された、入口開口と出口開口を有する筒状の微生物検査用前処理容器であって、該入口開口と該出口開口はいずれも、通液が可能であるが、該出口開口近傍に、該粒子の通過を阻止するフィルターがあり、該フィルター上の空間に該粒子が充填されていることを特徴とする、微生物検査用前処理容器。
- [請求項17] 前記粒子がセルロースから構成される、請求項 16 に記載の微生物検査用前処理容器。
- [請求項18] 前記粒子が多孔粒子である、請求項 16 又は 17 に記載の微生物検査用前処理容器。
- [請求項19] 前記多孔粒子が、該多孔粒子の内部に多数の空孔を有し、かつ、隣接した空孔間を隔てる膜の開口部により互いに連通した連続孔構造を有する、請求項 18 に記載の微生物検査用前処理容器。
- [請求項20] 前記多孔粒子の平均開孔径が $5 \mu\text{m}$ 以上 $100 \mu\text{m}$ 以下である、請求項 19 に記載の微生物検査用前処理容器。
- [請求項21] 前記粒子の平均粒子径が $100 \mu\text{m}$ 以上 $1000 \mu\text{m}$ 以下である、請求項 16 又は 17 に記載の微生物検査用前処理容器。
- [請求項22] 前記粒子の乾燥時の比表面積が $0.3 \text{ m}^2/\text{g}$ 以上 $4.4 \text{ m}^2/\text{g}$ 以下である、請求項 16 又は 17 に記載の微生物検査用前処理容器。
- [請求項23] 前記粒子の表面がカチオン性置換基で修飾された、請求項 16 又は 17 に記載の微生物検査用前処理容器。
- [請求項24] 前記粒子の荷電容量が 0.5 mmol/g 以上である、請求項 16

又は 17 に記載の微生物検査用前処理容器。

[図1]

図1



[図2]

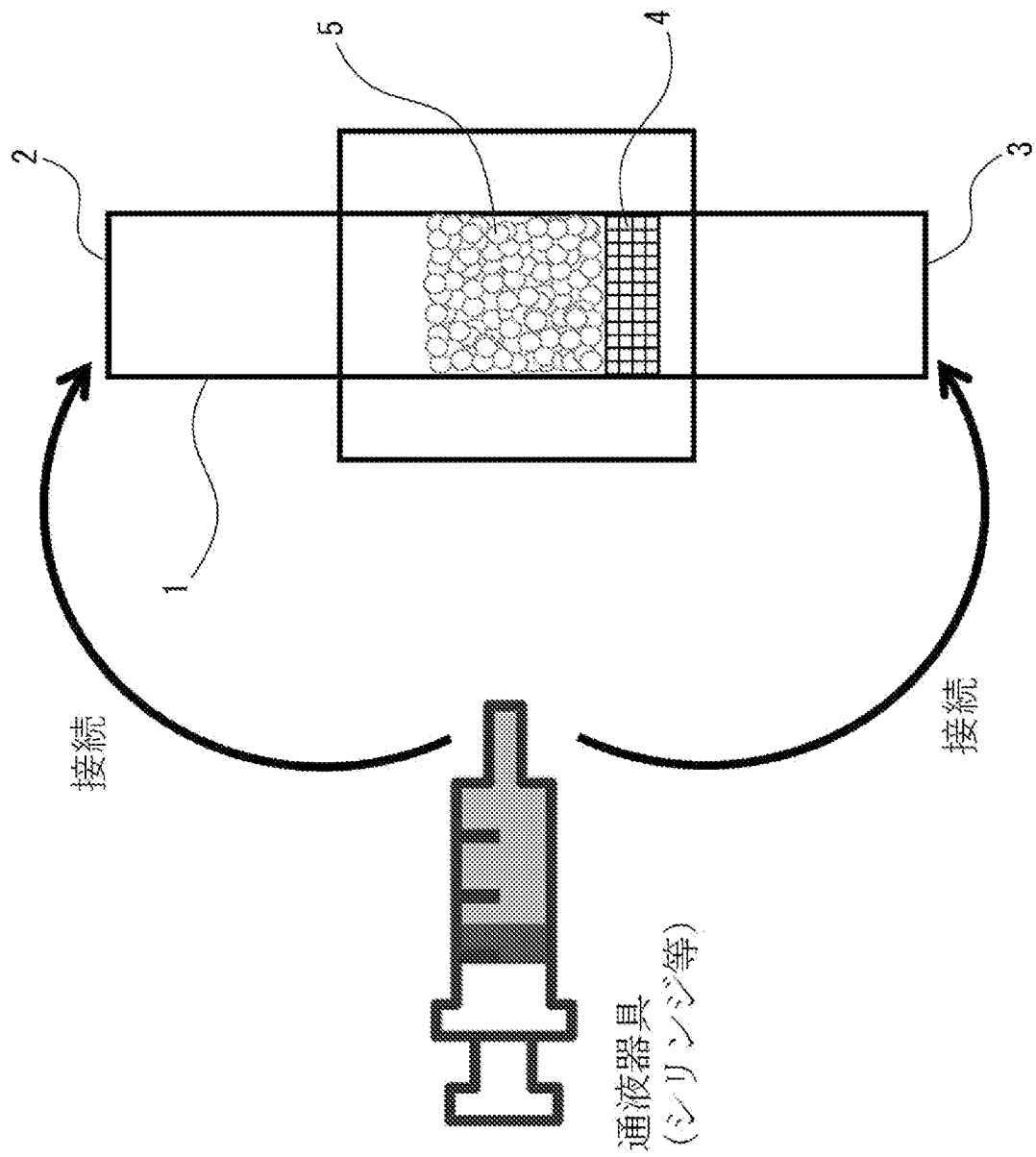


図2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/019884

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q 1/06</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/28</i> (2006.01)i FI: C12Q1/06; C12M1/28 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) C12Q1/06; C12M1/28 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-517768 A (HITACHI CHEMICAL COMPANY, LTD.) 20 May 2013 (2013-05-20) claims, paragraphs [0028], [0045]-[0048]	1-24
A	JP 2013-514810 A (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY) 02 May 2013 (2013-05-02)	1-24
A	JP 2003-289899 A (AQUAS CORP.) 14 October 2003 (2003-10-14)	1-24
A	JP 9-329602 A (OKAMI, Yoshiro) 22 December 1997 (1997-12-22)	1-24
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 August 2024		Date of mailing of the international search report 20 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/019884

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2013-517768	A	20 May 2013	US	2012/0295818	A1	
				claims, examples			
				WO	2011/090802	A1	
				EP	2526188	A1	
JP	2013-514810	A	02 May 2013	US	2012/0276580	A1	
				WO	2011/079038	A1	
				EP	2516984	A1	
				CN	106085863	A	
JP	2003-289899	A	14 October 2003	(Family: none)			
JP	9-329602	A	22 December 1997	US	2002/0064866	A1	
				WO	1997/047969	A1	
				EP	926496	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12Q 1/06(2006.01)i; C12M 1/28(2006.01)i

FI: C12Q1/06; C12M1/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12Q1/06; C12M1/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報

1922 - 1996年

日本国公開実用新案公報

1971 - 2024年

日本国実用新案登録公報

1996 - 2024年

日本国登録実用新案公報

1994 - 2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2013-517768 A（日立化成株式会社）20.05.2013（2013 - 05 - 20） 特許請求の範囲、[0028]、[0045] - [0048]	1-24
A	JP 2013-514810 A（スリーエム イノベイティブ プロパティズ カンパニー） 02.05.2013（2013 - 05 - 02）	1-24
A	JP 2003-289899 A（アクアス株式会社）14.10.2003（2003 - 10 - 14）	1-24
A	JP 9-329602 A（岡見 吉郎）22.12.1997（1997 - 12 - 22）	1-24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.08.2024

国際調査報告の発送日

20.08.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

千葉 直紀 4N 3434

電話番号 03-3581-1101 内線 3461

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/019884

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2013-517768	A	20.05.2013	US	2012/0295818	A1	
				Claims, Examples			
				WO	2011/090802	A1	
				EP	2526188	A1	

JP	2013-514810	A	02.05.2013	US	2012/0276580	A1	
				WO	2011/079038	A1	
				EP	2516984	A1	
				CN	106085863	A	

JP	2003-289899	A	14.10.2003	(ファミリーなし)			

JP	9-329602	A	22.12.1997	US	2002/0064866	A1	
				WO	1997/047969	A1	
				EP	926496	A1	
