(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6029688号
(P6029688)

(45)発行日　平成28年11月24日(2016.11.24)　(24)登録日　平成28年10月28日(2016.10.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04	
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	21/78	C
G01N 33/569	(2006.01)	G01N	33/569	D
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/569	F
		G01N	33/543	575

請求項の数 22　(全 45 頁)

(21)出願番号　特願2014-552604 (P2014-552604)
(86)(22)出願日　平成25年1月16日 (2013.1.16)
(65)公表番号　特表2015-505248 (P2015-505248A)
(43)公表日　平成27年2月19日 (2015.2.19)
(86)国際出願番号　PCT/EP2013/050712
(87)国際公開番号　WO2013/107759
(87)国際公開日　平成25年7月25日 (2013.7.25)
審査請求日　平成28年1月13日 (2016.1.13)
(31)優先権主張番号　12151622.3
(32)優先日　平成24年1月18日 (2012.1.18)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(73)特許権者　501089863
サントル　ナシオナル　ドゥ　ラ　ルシェルシェサイアンティフィク（セエヌエールエス）
フランス国，エフ－７５０１６　パリ，リュ　ミッシェル　アンジュ３
(73)特許権者　515275133
ユニベルシテ　パリ　サッド
フランス国，９１４００　オルセー，リュ　ジョルジュ　クレマンソー　１５
(74)代理人　110000914
特許業務法人　安富国際特許事務所
(72)発明者　デュカン，　サム
フランス国　エフ－１３００４　マルセイユ，　リュ　エスペランデュ　６

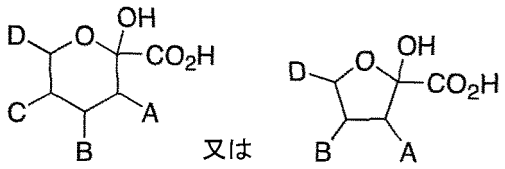
最終頁に続く

(54)【発明の名称】生菌を特異的に標識する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
細菌を含有する試料中の所定のカテゴリーの細菌の生菌を特異的に標識する方法であって、
ａ）単糖化合物の類似体の少なくとも１つと共に前記試料の前記細菌をインキュベートするステップであって、
前記単糖は前記所定のカテゴリーの細菌の外膜のグリカンの内在性単糖残基であり、
前記内在性単糖残基はウロソン酸又はウロソン酸塩残基を含み、
前記単糖化合物の類似体は、標識化分子の第２の反応性基と反応できる第１の反応性化学基によって所定の位置が置換された修飾単糖であり、
前記所定の位置は、好ましくは、前記細菌の外膜のグリカン内に取り込まれた前記内在性単糖残基中の遊離型の基を有する位置である、ステップと、
ｂ）前記第２の反応性基を有する前記標識化分子と前記細菌を接触させて、前記生菌の外膜のグリカン内に取り込まれた前記類似体残基の前記第１の反応性基を前記標識化分子の前記第２の反応性基と反応させるステップと
を含む方法。
【請求項２】
増殖可能な細菌を特異的に標識するための請求項１に記載の方法であって、
前記細菌は培養培地でインキュベートされ、その培地中又は培地上で前記細菌は増殖可能である、方法。

【請求項３】
さらに、
ｃ）前記細菌がその外膜のグリカンに結合した前記標識化分子を含むか否かを検出すること、及び／又は、前記標識化分子を含んでいる前記生菌を固体基材に固定化することにより、生菌を検出するステップ
を含む請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記標識化分子は、検出可能な物質を含む検出可能な分子、又は、検出可能な物質と反応若しくは結合できる検出可能な分子であるか、又は、
前記標識化分子は前記第２の反応性基を有する第１の分子であり、
該第１の分子は第２の分子及び／又は固体基材と反応又は結合でき、
好ましくは前記第２の分子は検出可能な物質を含んでいるか、及び／又は、前記固体基材に結合している、
請求項３に記載の方法。
【請求項５】
細菌を含有する試料中の所定のカテゴリーの細菌の生菌を特異的に検出するための請求項４に記載の方法であって、
前記標識化分子は、検出可能な物質を含む検出可能な分子であり、
前記方法は、ｃ）前記細菌がその外膜のグリカンに結合した前記検出可能な分子を含むか否かを検出することにより、生菌を検出するステップを含む、方法。
【請求項６】
前記標識化分子は、前記第２の反応性基を有する第１のリガンド又は第１の結合タンパク質であり、
ステップｃ）において、前記第１のリガンド又は第１の結合タンパク質に結合した前記生菌は、前記第１のリガンド又は第１の結合タンパク質を、前記第１のリガンド又は第１の結合タンパク質と特異的に反応又は結合する第２のリガンド又は第２の結合タンパク質と接触させることにより検出及び／又は固定化される、
請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記標識化分子は、前記第２の反応性基を有する第１のリガンド、好ましくはビオチンであり、
ステップｃ）において、前記第１のリガンドに結合した前記生菌は、前記第１のリガンドに特異的な抗体と前記細菌との反応によって検出され、前記抗体は検出可能な物質、好ましくは蛍光色素分子又は発光分子又は酵素を含む、
請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記検出可能な物質は、蛍光又は発光によって検出可能な蛍光色素分子又は発光分子である、
請求項４～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記単糖化合物の類似体は、以下の式（Ｉ）又は（ＩＩ）の１つで表されるウロソン酸又はウロソン酸塩である、
請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

【化１】



Ⅰ　　Ⅱ

（式中、
Ａ、Ｂ及びＣは、独立に、保護基で置換されているか又は置換されていないＨ、ＯＨ、ＮＨ$_2$、ＯＨ及びＮＨ$_2$、好ましくはアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アシル基、ホルミル基又はイミドイル基で置換されているＨ、ＯＨ、ＮＨ$_2$、ＯＨ及びＮＨ$_2$であってもよく、
Ｄは、炭素数２～４のアルキル鎖であって、その各炭素はＯＨ及びＮＨ$_2$で置換されているか又は置換されておらず、該ＯＨ及びＮＨ$_2$は保護基、好ましくはアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アシル基、ホルミル基又はイミドイル基で置換されているか又は置換されておらず、
Ａ、Ｂ、Ｃ又はＤ基のうち少なくとも１つは前記第１の反応性基で置換されている）

【請求項１０】
前記単糖の類似体は、置換オクツロソン酸若しくはオクツロソン酸塩化合物、又は、置換ノヌロソン酸若しくはノヌロソン酸塩化合物である、
請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】
グラム陰性菌の生菌を特異的に検出するための請求項１０に記載の方法であって、
前記細菌の所定のカテゴリーは前記グラム陰性菌のカテゴリーであり、
前記細菌の外膜のＬＰＳ層の前記内在性単糖残基は、デオキシオクツロソン酸又はデオキシオクツロソン酸塩残基であり、
前記単糖化合物の類似体は、置換デオキシオクツロソン酸又はデオキシオクツロソン酸塩化合物である、
方法。

【請求項１２】
前記デオキシオクツロソン酸又はデオキシオクツロソン酸塩化合物の類似体は、その単糖の３位、４位、５位、７位及び８位、好ましくは３位、７位及び８位から選択される１つの位置が前記反応性基によって置換されている、
請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】
前記式（Ｉ）又は（ＩＩ）のデオキシオクツロソン酸又はデオキシオクツロソン酸塩化合物の類似体は、８位が前記第１の反応性基Ｒ$_1$によって置換されており、前記式（Ｉ）中、Ｄ＝－ＣＨＯＨ－ＣＨ$_2$－Ｒ$_1$、Ａ＝Ｈ、Ｂ＝ＯＨ、Ｃ＝ＯＨ、又は、前記式（ＩＩ）中、Ｄ＝－ＣＨＯＨ－ＣＨＯＨ－ＣＨ$_2$－Ｒ$_1$、Ａ＝Ｈ、Ｂ＝ＯＨである、
請求項９～１２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】
前記グラム陰性菌は、大腸菌、ネズミチフス菌（サルモネラ・ティフィムリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ））、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）及び緑膿菌（シュードモナス・エルギノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ））を含む、
請求項１１～１３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】
レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）菌の生

菌を特異的に標識するための請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法であって、
前記細菌の所定のカテゴリーは前記レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）菌のカテゴリーであり、
前記細菌の外膜のＬＰＳ層の前記内在性単糖残基は、４－エピレジオナミン酸（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸）若しくは４－エピレジオナミン酸塩残基、又は、レジオナミン酸（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－ノヌ－２－ウロソン酸）若しくはレジオナミン酸塩残基であり、
前記単糖化合物の類似体は、それぞれ、置換４－エピレジオナミン酸若しくは４－エピレジオナミン酸塩化合物、又は、置換レジオナミン酸若しくはレジオナミン酸塩化合物であり、好ましくはその単糖環の３位、４位、５位、７位、８位及び９位、好ましくは５位、７位及び９位から選択される１つの位置が置換されている、方法。
【請求項１６】
緑膿菌（シュードモナス・エルギノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ））の生菌を特異的に標識する、好ましくは検出するための請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法であって、
前記細菌の所定のカテゴリーは前記緑膿菌（シュードモナス・エルギノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ））のカテゴリーであり、
前記細菌の外膜のＬＰＳ層の前記内在性単糖残基は、８－エピレジオナミン酸（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｌ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－ノヌ－２－ウロソン酸）若しくは８－エピレジオナミン酸塩残基、又は、プソイダミン酸（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｌ－グリセロ－Ｌ－マンノ－ノヌ－２－ウロソン酸）若しくはプソイダミン酸塩残基であり、
前記単糖化合物の類似体は、それぞれ、置換８－エピレジオナミン酸若しくは８－エピレジオナミン酸塩化合物、又は、置換プソイダミン酸若しくはプソイダミン酸塩化合物であり、好ましくはその単糖環の３位、４位、５位、７位、８位及び９位、好ましくは５位、７位及び９位から選択される１つの位置が置換されている、方法。
【請求項１７】
前記第１の反応性基は、アジド基そのもの又はアジド基を有する基、及び、アルキン基そのもの又はアルキン基を有する基から選択され、
前記第２の反応性基は、アルキン基そのもの又はアルキン基を有する基、及び、アジド基そのもの又はアジド基を有する基から選択され、
前記アジド反応性基を前記アルキン反応性基と反応させてアジドアルキン付加環化を行う、
請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記反応は、トリス－トリアゾリルリガンド、好ましくはＴＧＴＡの存在下、銅触媒条件で行われる、
請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
生菌の数を数えるための請求項２及び４及び８～１８のいずれか１項に記載の方法であって、
前記ステップａ）のインキュベーション及び前記ステップｂ）の反応は固体基材、好ましくはメンブランフィルター上で行われ、それにより、もともと同じ細菌から増殖した培養細菌を１つの群にして、顕微鏡を用いて可視化することができ、前記検出可能な分子は前記顕微鏡を用いて可視化することにより検出することができる、方法。
【請求項２０】
請求項１～１９のいずれか１項に記載の方法を行うためのキットであって、
前記第１の反応性化学基によって所定の位置が置換されたウロソン酸又はウロソン酸塩化合物を含む前記単糖化合物の類似体と、

前記第１の反応性基と反応できる前記第２の反応性基を有する前記標識化分子と、
前記細菌の外膜のグリカン内に取り込まれた前記類似体残基の前記第１の反応性基を前記標識化分子の前記第２の反応性基と反応させるための反応体と、
前記所定のカテゴリーの細菌を増殖させることができ、好ましくは前記所定のカテゴリーの細菌の増殖に特異的である培養培地又はインキュベーション培地と
を備えるキット。
【請求項２１】
請求項１９に記載の方法を行うための請求項２０に記載のキットであって、さらに、
前記第１の反応性基と反応できる前記第２の反応性基を有する前記検出可能な分子と、
前記細菌を、前記単糖化合物の類似体、前記反応体及び前記検出可能な分子と共にインキュベートした後に可視化することができる固体媒体と
を備えるキット。
【請求項２２】
アジド基又はアルキン基を含む前記第１の反応性基で置換されたデオキシオクツロソン酸又はデオキシオクツロソン酸塩化合物である前記単糖化合物の類似体と、
それぞれアルキン基又はアジド基を有する検出可能な分子の前記第２の反応性基と、
銅触媒及びトリス－トリアゾリルリガンドを含む前記反応体と
を備える請求項２０又は２１に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、特異的に標識する方法、より具体的には細菌を含有する試料中で生菌を特異的に検出する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
生菌を検出するための従来の方法には、細菌の培養と、固体培地上でコロニーを可視化することによりその数を数えることが含まれる。そのような方法は、培養に長時間を要することから迅速ではない。さらに上記方法は、必然的に、培養可能な細菌（生菌と同義ではない）の検出に限定される。実のところ、上記方法では固体培地上での培養のストレスにより一部の細菌が死滅することが確認されていることから、上記方法での定量化には信頼性がない。実際、微生物学者らは、平板計数（プレートカウント）法を用いる際、該方法は細菌に対して有害な作用がないと想定するという意味で一つの重大な仮説を立てている。しかしながら、１９５０年代以降、好気呼吸の間に自然に生じる活性酸素種のスカベンジャー（ピルビン酸塩、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼなど）を寒天プレート上に添加すると、見かけ上は死細胞であるように見える細胞でも再賦活化できることが報告されている［４０－４８（非特許文献１～９）］。例えば、飢餓、次亜塩素酸（ＨＯＣｌ）、ヒートショック及び乾燥などの種々のストレスは、細胞を、回復期において大気中の酸素によって主要なストレス源の毒性効果が高まってしまうような傷つきやすい生理学的状態にする場合がある。
【０００３】
これらの制限を克服するために、細菌の生存率を評価するための間接的な非培養法がいくつか提案されており、これらの方法は全て利点もあれば問題点もある。したがって、あらゆる場合において好適であると意見の一致が見られる方法はない。上記方法は２つの基準、すなわち代謝活性の発現か、細胞構造の維持のうちの１つによって生存率を評価する。
【０００４】
蛍光を利用した技術が用いられるようになる前、細胞の代謝活性の指標として用いられてきた方法としては、マイクロオートラジオグラフィーを使用した方法［２５（非特許文献１０）］、たん白質のデノボ合成の指標として誘導性酵素活性を使用した方法［２６（非特許文献１１）］、栄養素の添加時の細胞の肥大に基づくｄｉｒｅｃｔ　ｖｉａｂｌｅ　ｃｏｕｎｔ（ＤＶＣ）法［２７（非特許文献１２）］、活性電子伝達鎖の指標としてテト

ラゾリウム塩の還元を利用した方法［２８（非特許文献１３）］がある。しかしながら、これらの方法の使用に伴う問題点が存在する。ＤＶＣとテトラゾリウム塩還元法では、栄養素の添加が必要であり［２８、２９（非特許文献１３、１４）］、そのため、供給された栄養素に応答する生物の応答能により左右される。呼吸の測定もまた問題点がある。様々な要因がテトラゾリウム塩還元によるホルマザン沈着物の形成に影響を与えることが示されており［２９（非特許文献１４）］、報告によれば、テトラゾリウム塩である５－シアノ－２，３－ジトリルテトラゾリウムクロリドは、細菌の代謝を阻害することが示されている［３０（非特許文献１５）］。

【０００５】

また、蛍光色素を用いた細胞の染色に基づいた細胞生存率アッセイも開発されている。この方法では、安定した細胞構造が維持されているか否かにより生存率を評価する。アクリジンオレンジによる直接計数法［３１（非特許文献１６）］と４Ｐ，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール染色法［３２（非特許文献１７）］は、無傷の核酸が維持されているか否かを示す指標として使用されている。ローダミン１２３は膜電位の指標として広く使用されており、フローサイトメトリーの発展とともに、細胞の生理学的状態の特性を決定するための方法が急増した［３３（非特許文献１８）］。これらの色素の透過性は、一部の生物において問題になる場合がある。最近では、新たにいくつかのアッセイ法が細菌の生存率を評価するために用いられており、これらは、代謝活性（ＣｈｅｍＣｈｒｏｍｅ　Ｖ６蛍光プローブによるエステラーゼ活性など［３４（非特許文献１９）］）や、細胞の完全性（ｉｎｔｅｇｒｉｔｙ）（膜の完全性（ＢａｃＬｉｇｈｔキット）など）、膜電位、細胞内ｐＨ［３５（非特許文献２０）］、最後にＡＴＰ［３６（非特許文献２１）］といったいくつかの点について特性を決定するものである。最後に、２００２年以降、生存している細菌性病原体のメッセンジャーＲＮＡに基づく検出や、病原体のリアルタイムＰＣＲ定量を含む新しいアプローチが開発されている［３７（非特許文献２２）］。

【０００６】

微生物学者は、生存細胞を単一細胞レベルで検出できる方法を用いる際、これらの細胞が時間の経過とともに再増殖可能になると想定するという意味で一つの重大な仮説を立てている。しかしながら、一部の著者らは、この観察結果は細胞が劣化した結果であり、生存はしているが培養はできない細胞が細胞死へと向かう途中であると提唱している［４０，４９（非特許文献１及び２３）］。

【０００７】

結果として、見かけ上の生存細胞数は、真に生存している細胞（培養可能な細胞、すなわち時間の経過とともに分裂したり増殖したりできる細胞）の数を多く見積もりすぎていると予想できる。

【０００８】

これらの方法の多くには上述した制限があるが、さらに、生菌でない細菌が、これらの方法に関与する生存細胞の特定の特性（酵素活性など）を維持していることも明らかである。したがって、これらの方法では、偽陽性が多数検出及び定量され、検出し定量した細菌数の信頼性が充分でない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｃｕｎｙ，Ｃ．，Ｌｅｓｂａｔｓ，Ｍ．，ａｎｄ　Ｄｕｋａｎ，Ｓ．（２００７）Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ａ　ｇｌｏｂａｌ　ｓｔｒｅｓｓ　ｒｅｓｐｏｎｓｅ　ｄｕｒｉｎｇ　ｔｈｅ　ｆｉｒｓｔ　ｓｔｅｐ　ｏｆ　Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｐｌａｔｅ　ｇｒｏｗｔｈ．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７３，８８５－８８９．

【非特許文献２】Ｍａｃｋｅｙ，Ｂ．Ｍ．，ａｎｄ　Ｓｅｙｍｏｕｒ，Ｄ．Ａ．（１９８７）Ｔｈｅ　ｅｆｆｅｃｔ　ｏｆ　ｃａｔａｌａｓｅ　ｏｎ　ｒｅｃｏｖｅｒｙ　ｏｆ　ｈｅａｔ－ｉｎｊｕｒｅｄ　ＤＮＡ－ｒｅｐａｉｒ　ｍｕｔａｎｔｓ　ｏｆ　Ｅｓｃｈｅ

richia coli. J. Gen. Microbiol. 133, 1601－1610.
【非特許文献3】Marthi, B., Shaffer, B. T., Lighthart, B., and Ganio, L. (1991) Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2775－2776.
【非特許文献4】McDonald, L. C., Hackney, C. R. and Ray, B. (1983) Enhanced recovery of injured Escherichia coli by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. Appl. Environ. Microbiol. 45, 360－365.
【非特許文献5】Dukan, S., Belkin, S. and Touati D. (1999) Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. Arch. Biochem. Biophys. 367, 311－316.
【非特許文献6】Dukan, S., and Nystrom, T. (1999) Oxidative stress defense and deterioration of growth－arrested Escherichia coli cells. J. Biol. Chem. 274, 26027－26032.
【非特許文献7】Ohtomo, R., and Saito, M. (2001) Increase in the culturable cell number of Escherichia coli during recovery from saline stress: possible implication for resuscitation from the VBNC state. Microb. Ecol. 42, 208－214.
【非特許文献8】Ray, B., Jezeski, J. J., and Busta, F. F. (1971) Effect of rehydration on recovery, repair, and growth of injured freeze－dried Salmonella anatum. Appl. Microbiol. 22, 184－189.
【非特許文献9】Speck, M. L., Ray, B., and Read, R. B. Jr. (1975) Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure. Appl. Microbiol. 29, 549－550.
【非特許文献10】Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P. A., Russek－Cohen, E. and Colwell, R. R. (1994) Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable Shigella dysenteriae type 1. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3573－3578.
【非特許文献11】Nwoguh, C. E., Harwood, C. R. and Barer, M. R. (1995) Detection of induced L－galactosidase activity in individual nonculturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay. Mol. Biol. 17, 545－554.
【非特許文献12】Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. C

an. J. Microbiol. 25, 415−420.
【非特許文献13】Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgeway, H. F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1801−1808.
【非特許文献14】Thom, S. M., Horobin, R. W., Seidler, E. and Barer, M. R. (1993) Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. J. Appl. Bacteriol. 74, 433−443.
【非特許文献15】Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H.−G., Jeskulke, K. and Mehrens, M. (1996) Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5−cyano−2, 3−ditolyl tetrazolium chloride. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4587−4593.
【非特許文献16】Korgaonkar, K. S. and Ranade, S. S. (1966) Evaluation of acridine orange fuorescence test in viability studies of Escherichia coli. Can. J. Microbiol. 12, 185−190.
【非特許文献17】Porter, K. G. and Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. 25, 943−948.
【非特許文献18】Davey, H. M. and Kell, D. B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single−cell analyses. Microbiol. Rev. 60, 641−696.
【非特許文献19】Parthuisot, N., Catala P., Lemarchand, K., Baudart, J., and Lebaron, P. (2000) Evaluation of ChemChrome V6 for bacterial viability assessment in waters. J. ApplMicrobiol. 89, 370−380.
【非特許文献20】Breeuwer, P., and Abee, T. (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int. J. Food Microbiol. 10, 193−200.
【非特許文献21】Berney, M., Vital, M., Hulshoff, I., Weilenmann, HU, Egli, T., and Hammes, F. (2008) Rapid, cultivation−independent assessment of microbial viability in drinking water. Water Res. 4e, 4010−4018.
【非特許文献22】Rijpens, NP, and Herman, LM. (2002) J AOAC Int, 85, 984−995.
【非特許文献23】Bogosian, G., and Bourneuf E. V. (2001) A matter of bacterial life and death. EMBO Rep. 2：770−774.

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
本発明の目標は、生菌を特異的に検出するための改善された新規の間接的非培養法であって、とりわけ上述した欠点を克服し、培養可能な細菌の正確な数をより信頼性高く検出し定量する方法を提供することにある。
【００１１】
グリカンの代謝標識法［１］は、細胞表面のグリカンを研究するための非常に強力なツールとして近年登場し、ゼブラフィッシュやマウスなどの生存している多細胞生物における画像化から、転移に関連する細胞表面のシアロ糖タンパク質の同定にまで及ぶ応用例がある［２］。この方策は、生体直交型の化学レポーター（ｂｉｏｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ　ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｒｅｐｏｒｔｅｒ）を含む修飾単糖の細胞の生合成機構による同化に基づくものである。さらに、このレポーターのグリカン内への代謝的取り込みは、蛍光プローブなどの標識との化学的連結によって可視化することができる。幾分驚くべきことに、研究が主に焦点を当てているのは、Ｎ－アセチルノイラミン酸又はそのＮ－アセチルマンノサミン前駆体、Ｎ－アセチルグルコサミン、Ｎ－アセチルガラクトサミン及びフコースなどの一般的な単糖類の誘導体を使用する脊椎動物グリカンの標識［３］である。
【００１２】
その単糖ビルディングブロックが非常に高度な多様性を有し、細菌－宿主相互作用及び細菌の病原性において重要な役割を果たしているにもかかわらず、細菌の多糖は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの構造的修飾に関して充分に検討されていない。細菌はグラム陽性菌とグラム陰性菌に分けられる。グラム陽性菌は、ペプチドグリカン細胞壁によって囲まれているのに対し、グラム陰性菌は、その外膜中に埋入されたリポ多糖（ＬＰＳ）の緻密層により覆われており、これらは、細胞の構造的完全性に関与し、しばしば病原性決定因子と考えられている。
【００１３】
ＬＰＳ中に含まれる反復グリカンポリマーは、細菌のＯ抗原、Ｏ多糖又はＯ側鎖と呼ばれる。Ｏ抗原はコアオリゴ糖に結合し、ＬＰＳ分子の最も外側の領域を構成する。Ｏ鎖の組成は株ごとに異なる。例えば、異なる大腸菌株によって産生されたＯ抗原構造が１６０種類を超えて存在する。Ｏ抗原は、細菌細胞の最も外側の表面に露出している。コアドメインは、リピドＡに直接結合するオリゴ糖成分を常に含み、ヘプトースや３－デオキシ－Ｄ－マンノオクツロソン酸（ＫＤＯ、ケトデオキシオクトン酸としても知られる）などの糖を通常含んでいる。
【００１４】
リポ多糖（ＬＰＳ）は、外膜の完全性において重要な構造的役割を果たすとともに、宿主－病原体相互作用の重要な媒介物質であることから、細胞表面多糖のなかで最も重要なものの一つである。
【００１５】
細菌の外膜の他の細菌グリカンは莢膜多糖（ＣＰＳ）を含む。莢膜多糖は直線状で、単糖及び糖タンパク質の繰り返しサブユニットからなる。
【００１６】
糖タンパク質は、細菌が感染する際の付着及び侵入に重要であることが示されている。
【００１７】
ＬＰＳは、グラム陰性菌における特異的で明確なグリカン代謝標識のための興味深い標的として登場したが、それを用いた試みは、意図的に遺伝子操作された大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）株への修飾Ｌ－フコース誘導体の導入に未だ限定されている［４］。しかしながら、まさにこのアプローチにも以下の様ないくつかの制限がある。
【００１８】
（ａ）Ｌ－フコースは、通常全てのグラム陰性菌のＬＰＳ中に存在しているわけではなく、特定株のＯ－抗体に見られる［５］。

【００１９】
（ｂ）遊離のＬ－フコースは、大腸菌の通常の「デノボ」経路における中間体ではないため、「サルベージ経路」と呼ばれる代替経路の遺伝子工学（代謝経路工学）を用いて目的の生物に導入しない限り、ヌクレオチド－糖供与体へと直接活性化することはできないはずである［６］。
【００２０】
（ｃ）修飾Ｌ－フコース類似体は、ＧＤＰ－Ｆｕｃの形態で活性化されると、デノボ経路の逆方向の経路に沿ってＧＤＰ－Ｍａｎに変換され、潜在的にはさらに他の種々の化合物へと代謝され得る。こうして、化学レポーターは他の糖代謝の経路を通して（又はそれを超えて）拡散しやすくなる。
【００２１】
このように、上述の細菌のＬＰＳ標識は、細菌の遺伝子修飾を必要とするため、本発明の被験試料中の生菌を検出する方法において用いることはできない。
【課題を解決するための手段】
【００２２】
本発明においては、代謝修飾が細菌の生存率の証拠になるという事実を利用して、他の糖が、少なくとも所定のカテゴリーの細菌のグリカン代謝修飾のターゲットとして、該細菌を遺伝子修飾せずに、使用できるか否かを調べた。
【００２３】
したがって、本発明の方法は、図２Ｂに概略的に示すような全体として迅速な過程で、生体直交型の化学レポーターを含んでいる修飾糖成分を生菌の膜グリカン、とりわけリポ多糖に取り込むことで細胞表面を装飾し、化学反応、とりわけクリックケミストリー（ｃｌｉｃｋ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）反応によって検出できるようにし、さらには化学レポーターを検出できるようにすることによって、生菌の膜グリカン、とりわけＬＰＳの代謝修飾を通じて細菌膜を標識することで生菌を本質的に検出することを含む方法である。
【００２４】
本発明によれば、ウロソン酸又はウロソン酸塩残基を有する修飾糖は、そのような残基を全てのグラム陰性菌の細菌膜のグリカン、とりわけＬＰＳに見出すことができ、さらに、上記グラム陰性菌のグリカン、とりわけＬＰＳに取り込まれる形態へと直接同化することができるが、ＬＰＳの他の糖のほとんどは異なる単糖前駆体由来であるという点から、特に有利であることが分かった。
【００２５】
ウロソン酸（ケトアルドン酸又はアルドウロソン酸とも呼ばれる）はケトース類に属する単糖であり、Ｃ－２にケトン基を、Ｃ－１にカルボン酸を有する。オクツロソン酸及びノヌロソン酸は別種の天然グリカン類、例えば様々な形態の細菌グリカン類（とりわけＬＰＳ、ＣＰＳ、糖タンパク質）などに見られる。これらのグリカンの合成へと至る生合成経路には、通常、遊離のウロソン酸が中間体として関与する。この遊離のウロソン酸はその後、ＣＭＰ－糖供与体の形態で直接活性化される。これは、単糖そのものの少しの種類の一次活性供与体からヌクレオチド二リン酸－糖供与体の形態で直接生合成されることが多い他の多くの単糖とは対照的である。
【００２６】
本発明は、生菌の外膜のグリカンに結合する第１の反応性化学基を取り込むことで、細菌を含有する試料中の所定のカテゴリーの細菌の生菌を特異的に標識する方法を提供する。
【００２７】
より厳密には、本発明は、細菌を含有する試料中の所定のカテゴリーの細菌の生菌を特異的に標識する方法であって、
ａ）単糖化合物の類似体の少なくとも１つと共に上記試料の上記細菌をインキュベートするステップであって、
上記単糖は上記所定のカテゴリーの細菌の外膜のグリカンの内在性単糖残基であり、
上記内在性単糖残基はウロソン酸又はウロソン酸塩残基を含み、

上記単糖化合物の類似体は、標識化分子の第２の反応性基と反応できる第１の反応性化学基によって所定の位置が置換された修飾単糖であり、
上記所定の位置は、好ましくは、上記細菌の外膜のグリカン内に取り込まれた上記内在性単糖残基中の遊離型の基を有する位置である、ステップと、
ｂ）上記第２の反応性基を有する上記標識化分子と上記細菌を接触させて、上記生菌の外膜のグリカン内に取り込まれた上記類似体残基の上記第１の反応性基を上記標識化分子の上記第２の反応性基と反応させるステップと
を含む方法を提供する。

【００２８】

生菌には、増殖可能な細菌だけでなく、増殖できないが生存はしている細菌も含まれる。ほとんどの衛生上の規則が、増殖可能な細菌、とりわけ固体増殖培地上で増殖可能な細菌の計数について言及しているように、本発明は、特に、増殖可能な細菌を特異的に標識する方法であって、上記細菌が培養培地でインキュベートされ、その（液体培地）中又は（固体培地）上で上記細菌が増殖可能である、方法を提供するものであり、有利である。

【００２９】

好ましくは、本発明の方法は、さらに、
ｃ）上記細菌がその外膜のグリカンに結合した上記標識化分子を含むか否かを検出すること、及び／又は、上記標識化分子を含んでいる上記生菌を固体基材に固定化することにより、生菌を検出するステップ
を含む。

【００３０】

上記検出ステップｃ）は、液体培地中又は固体基材上で行うことができる。

【００３１】

より具体的には、上記標識化分子は、検出可能な物質を含む検出可能な分子、又は、検出可能な物質と反応若しくは結合できる検出可能な分子であるか、又は、
上記標識化分子は上記第２の反応性基を有する第１の分子であり、
該第１の分子は第２の分子及び／又は固体基材と反応又は結合でき、
好ましくは上記第２の分子は検出可能な物質を含んでいるか、及び／又は、上記固体基材に結合している。

【００３２】

第１の実施形態においては、上記標識化分子は、検出可能な分子、すなわち検出可能な物質そのものである分子又は検出可能な物質を含む分子、すなわち、蛍光色素若しくは発光物質又はペルオキシダーゼなどの酵素のような検出が可能な物質である。上記酵素は、より具体的には、共反応体と反応した後に検出される。

【００３３】

生菌を単離するために有用なさらに具体的な実施形態においては、ステップｂ）を行う際に上記標識化分子が固体基材に結合していてもよい。

【００３４】

さらに具体的な実施形態においては、上記標識化分子は、上記第２の反応性基を有する第１のリガンド又は第１の結合タンパク質である分子であり、
ステップｃ）において、上記第１のリガンド又は第１の結合タンパク質に結合した上記生菌は、上記第１のリガンド又は第１の結合タンパク質を、上記第１のリガンド又は第１の結合タンパク質と特異的に反応又は結合する第２のリガンド又は第２の結合タンパク質である第２の分子と接触させることにより検出及び／又は固定化される。

【００３５】

その場合、上記第１又は第２のリガンド又は結合タンパク質は、蛍光色素若しくは発光物質又はペルオキシダーゼなどの酵素のような上記検出可能な物質を含む第３の結合タンパク質と反応又は結合することができ、有利である。上記第３の結合タンパク質は、上記第１及び／又は第２のリガンド又は結合タンパク質に特異的に結合する。上記第２のリガンド又は第２の結合タンパク質又は第３の結合タンパク質を介して上記検出可能な物質を検

出することにより、上記検出可能な物質のシグナルを増幅することができる。
【００３６】
より具体的には、上記第１のリガンド又は第１の結合タンパク質は以下のものであってもよい。
・ビオチン（この場合、上記第２及び第３の結合タンパク質はそれぞれアビジン又はストレプトアビジン（ビオチンに対する抗体）である）、あるいは、
・アビジン又はストレプトアビジン（この場合、上記第２のリガンド及び上記第３の結合タンパク質はそれぞれビオチン（アビジン又はストレプトアビジンに対する抗体）である）、あるいは、
・第１の抗体（この場合、上記第２及び第３の結合タンパク質はそれぞれ上記第１の抗体に特異的な第２及び第３の抗体である）。
【００３７】
より具体的には、上記標識化分子は、上記第２の反応性基を有する第１のリガンド、好ましくはビオチンであり、
ステップｃ）において、上記第１のリガンドに結合した上記生菌は、上記第１のリガンドに特異的な抗体と上記細菌との反応によって検出され、上記抗体は検出可能な物質、好ましくは蛍光色素分子又は発光分子又は酵素を含む。
【００３８】
また、より具体的には、上記標識化分子は、上記第２の反応性基を有する第１のリガンド、好ましくはビオチンであり、ステップｃ）において、上記第１の結合タンパク質に結合した上記生菌は、上記第１のリガンドと、上記第２の結合タンパク質、好ましくはアビジン又はストレプトアビジンに結合した固体基材、好ましくは磁気ビーズとの反応によって固定化される。その後、上記生菌は、細菌ＤＮＡの酵素的増幅によって、又は、上記細菌と、上記第１のリガンド若しくは第２の結合タンパク質と特異的に反応若しくは結合する第３の結合タンパク質との反応によって検出される。上記第３の結合タンパク質は検出可能な物質、好ましくは蛍光色素分子又は発光分子又は酵素を含み、上記第３の結合タンパク質は、好ましくは上記第１のリガンド又は第１の結合タンパク質に特異的な抗体である。
【００３９】
上記生菌が上記固体基材上に固定化される上記実施形態によれば、試料を上記細菌そのものへと濃縮することができ、ＰＣＲ、とりわけリアルタイムＰＣＲなどのＤＮＡの酵素的増幅や、ＥＬＩＳＡテストなどの標識抗体との免疫学的反応を用いた方法などの公知の方法によって上記生菌を定量化することができる。
【００４０】
より具体的には、本発明は、細菌を含有する試料中の所定のカテゴリーの細菌の生菌を特異的に検出する方法であって、
上記標識化分子は、検出可能な物質を含む検出可能な分子であり、
上記方法は、ｃ）上記細菌がその外膜のグリカンに結合した上記検出可能な分子を含むか否かを検出することにより、生菌を検出するステップを含む、方法を提供する。
【００４１】
ステップａ）では、生菌の外膜のグリカン、とりわけリポ多糖層に上記単糖化合物の類似体の残基を取り込むことにより、上記カテゴリーに属する全ての生菌が特異的に標識されることとなる。
【００４２】
ステップｂ）では、上記培養細菌の上記グリカン中、とりわけＬＰＳ中の上記修飾単糖の上記第１の反応性基と、上記第２の反応性基を有する上記標識化分子とを適切な条件下かつ適切で好適な反応体の存在下、反応させることにより、上記標識化分子が生菌の上記グリカン、とりわけＬＰＳに取り込まれた類似体残基と結合することとなる。
【００４３】
ステップａ）において、上記内在性単糖の上記所定の位置は、上記細菌の外膜のグリカン

内に取り込まれた上記内在性単糖残基中の遊離型の基を有する位置であるのが好ましい。「遊離型の基（ｆｒｅｅ　ｇｒｏｕｐ）」とは、上記グリカン中、とりわけＬＰＳ中の共有結合に関与していない位置を意味する。

【００４４】

修飾ウロソン酸又はウロソン酸塩を代謝的に同化することによって、代謝的に活性／生存しているグラム陰性菌を迅速に検出する（全工程が１日未満で終了）上記方法が使用できる。細菌株にもよるが、生存細菌の検出には通常２日間から１ヶ月を超える期間が必要である事実を考慮すると、上記方法は非常に強力である。

【００４５】

グラム陰性菌のなかには重大な病原体が隠れており、生存細胞を迅速に同定することは衛生上重要な課題である。したがって、本発明は、代謝的に活性なグラム陰性菌の細胞表面の標識を、修飾ウロソン酸又はウロソン酸塩残基をそのリポ多糖に代謝的に取り込ませた後、クリックケミストリーを用いてさらに結合させることにより行う簡易な方策を提供する。

【００４６】

内在性同等物（ＫＤＯなど）との競合状態での、細菌細胞における外因性ウロソン酸塩類似体（ＫＤＯ類似体など）の同化及びそのＬＰＳ内への取り込みは全く明らかにはなっていない。これは、これらの分子の極性が高く、膜を通過しにくいからである。抗菌剤としてのＫＤＯ類似体を使用した試みは、該類似体の細胞内濃度を充分高くすることが難しいため、失敗している［１０］。

【００４７】

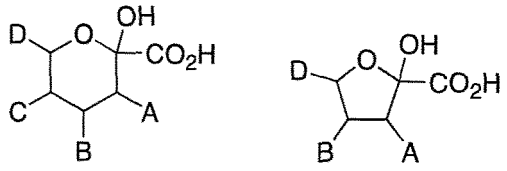
より具体的には、細菌濃度が10^{11}ｃｅｌｌ／ｍｌ以内、より具体的には10^{9}ｃｅｌｌ／ｍｌ以内のものを検出するためには、ステップａ）におけるインキュベーション時間は１時間～２４時間、好ましくは２時間～１２時間であり、単糖類似体化合物の濃度は10^{-8}Ｍ～１Ｍ、より具体的には10^{-5}Ｍ～１Ｍである。

【００４８】

特に、上記類似体単糖は、以下の式（Ｉ）又は（ＩＩ）の１つで表される置換ウロソン酸又はそのウロソン酸塩である。

【００４９】

【化１】



Ｉ　　ＩＩ

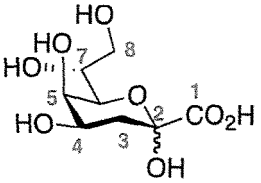
【００５０】

（式中、
Ａ、Ｂ及びＣは、独立に、保護基で置換されているか又は置換されていないＨ、ＯＨ、NH_2、ＯＨ及びNH_2、好ましくはアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アシル基、ホルミル基又はイミドイル基で置換されているＯＨ及びNH_2であってもよく、
Ｄは、炭素数２～４のアルキル鎖であって、その各炭素はＯＨ又はNH_2で置換されているか又は置換されておらず、該ＯＨ及びNH_2は保護基で置換されているか又は置換されておらず、好ましくはアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アシル基、ホルミル基又はイミドイル基で置換されており、
Ａ、Ｂ、Ｃ又はＤ基のうち少なくとも１つは上記第１の反応性基で置換されている）

【００５１】

一方がピラノース環を有する式（Ｉ）であり、他方がフラノース環を有する式（ＩＩ）であるこれら２つの化学式は、実際には２つの種が自然に平衡状態にあるが、通常は式（Ｉ

）の方が優勢である。
【００５２】
より具体的には、ＯＨの場合、保護基は好ましくはアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アシル基又はホルミル基であってもよい。
【００５３】
より具体的には、NH_2の場合、保護基はアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アシル基、ホルミル基又はイミドイル基から選択することができる。
【００５４】
NH_2は１つ又は２つの保護基によって保護することができ、とりわけ１つのCH_3基と１つのアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アシル基、ホルミル基又はイミドイル基、とりわけアセチル基（Ａｃ）、アセトイミドイル基（Ａｍ）、Ｎ－メチル－アセトイミドイル基、Ｎ，Ｎ－ジメチル－アセトイミドイル基、ホルミル基（Ｆｏ）又はヒドロキシブタノイル基とによって保護することができる。
【００５５】
より具体的には、上記単糖化合物の類似体は、置換オクツロソン酸又はオクツロソン酸塩化合物である。
【００５６】
式（Ｉ）のオクツロソン酸又はオクツロソン酸塩化合物は、Ｄ基として炭素数２のアルキル鎖を有する。
【００５７】
式（ＩＩ）のオクツロソン酸又はオクツロソン酸塩化合物は、Ｄ基として炭素数３のアルキル鎖を有する。
【００５８】
上記単糖化合物の類似体は、置換ノヌロソン酸又はノヌロソン酸塩化合物であってもよい。
【００５９】
式（Ｉ）のノヌロソン酸又はノヌロソン酸塩化合物は、Ｄ基として炭素数３のアルキル鎖を有する。
【００６０】
式（ＩＩ）のノヌロソン酸又はノヌロソン酸塩化合物は、Ｄ基として炭素数４のアルキル鎖を有する。
【００６１】
内在性ウロソン酸又はウロソン酸塩残基のうち、特によく見られるのが以下のカテゴリーの細菌に特異的に存在するものである。
【００６２】
以下の式（Ｉ）の１－オクツロソン酸又はオクツロソン酸塩残基（式中、Ｄは－ＣＨＯＨ－CH_2OH（Ｉａ－１、Ｉａ－２）又は－ＣＨＯＨ－CH_2NH_2（Ｉａ－３）である）：
【００６３】
１．１）
【００６４】
【化２】



【００６５】
・（Ｉａ－１）Ｋｄｏ（３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクト－２－ウロソン酸、又は、ケトデオキシオクトン酸）。これは以下のカテゴリーの細菌に特異的なものである。グラム

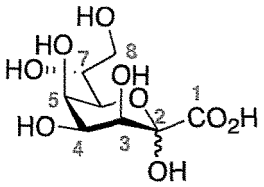
陰性菌の全て。Ｋｄｏはシュワネラ属（Ｓｈｅｗｅｎｅｌｌａ）の一部を除く全てのグラム陰性菌のＬＰＳ内部コアや、プロビデンシア属（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ）、クロノバクター属（Ｃｒｏｎｏｂａｃｔｅｒ）及びシュードアルテロモナス属（Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ）の細菌のＬＰＳのＯ－抗原で見ることができ、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、リゾビア（ｒｈｉｚｏｂｉａ）、アクチノバチルス・プルロニューモニア（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｌｅｕｒｏｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、モラクセラ・ノンリクファシエンス（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｎｏｎｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ）、類鼻疽菌（バークホルデリア・シュードマレイ（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉ））、バークホルデリア・セパシア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｐａｃｉａ）、バークホルデリア・カリベンシス（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃａｒｉｂｅｎｓｉｓ）、シュードアルテロモナス・ニグリファシエンス（Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ｎｉｇｒｉｆａｃｉｅｎｓ）の一部の莢膜多糖（ＣＰＳ）にも見られる。

【００６６】

１．２）

【００６７】

【化３】



【００６８】

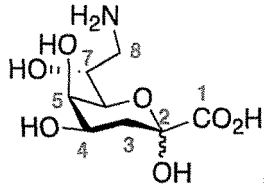
・（Ｉａ－２）Ｋｏ（Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－オクト－２－ウロソン酸、又は、ケトオクトン酸）。（Ｉａ－２）は以下のカテゴリーの細菌において見ることができる。エルシニア属（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）、アシネトバクター属（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、バークホルデリア属（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）。

【００６９】

１．３）

【００７０】

【化４】



【００７１】

・（Ｉａ－３）Ｋｄｏ８Ｎ（８－アミノ－３，８－ジデオキシ－Ｄ－マンノ－オクト－２－ウロソン酸）。（Ｉａ－３）はシュワネラ属（Ｓｃｈｅｗａｎｅｌｌａ）細菌に見られる。

【００７２】

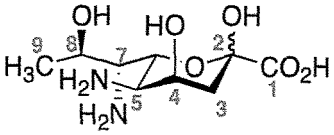
下記式の２－ノヌロソン酸又はノヌロソン酸塩残基（式中、Ｄは－ＣＨＮＨ$_2$－ＣＨＯＨ－ＣＨ$_3$（Ｉｂ－１、Ｉｂ－２、Ｉｂ－５、Ｉｂ－６）、－ＣＨＯＨ－ＣＨＯＨ－ＣＨ$_2$ＯＨ（Ｉｂ－３、Ｉｂ－４）、－ＣＨＮＨ$_2$－ＣＨＮＨ$_2$－ＣＨ$_3$（Ｉｂ－７））：

【００７３】

２．１）

【００７４】

【化５】



【００７５】

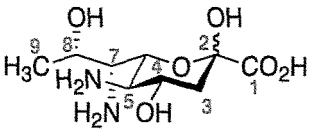
・（Ｉｂ－１）４ｅＬｅｇ（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸）。（Ｉｂ－１）は、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）細菌のＬＰＳ及びシュワネラ・ジャポニカ（Ｓｃｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｊａｐｏｎｉｃａ）に見られる。

【００７６】

２．２）

【００７７】

【化６】



【００７８】

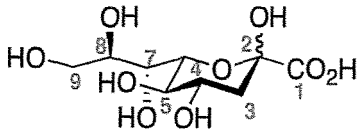
・（Ｉｂ－２）８ｅＬｅｇ（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｌ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－ノヌ－２－ウロソン酸）。（Ｉｂ－２）は大腸菌株、プロビデンシア・スチュアルティイ（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ　ｓｔｕａｒｔｉｉ）、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、エルシニア・ラッケリ（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｒｕｃｋｅｒｉ）、サルモネラ・アリゾネ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ａｒｉｚｏｎａｅ）、モーガネラ・モーガニイ（Ｍｏｒｇａｎｅｌｌａ　ｍｏｒｇａｎｉｉ）、シュワネラ・プトレファシエンス（Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｐｕｔｒｅｆａｃｉｅｎｓ）に見られる。

【００７９】

２．３）

【００８０】

【化７】



【００８１】

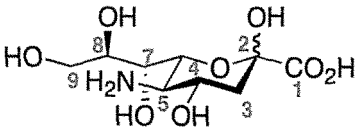
・（Ｉｂ－３）Ｋｄｎ（３－デオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－ノヌ－２－ウロソン酸）。（Ｉｂ－３）は臭鼻菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｏｚａｅｎａｅ）及びシノリゾビウム・フレディ（Ｓｉｎｏｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｆｒｅｄｉｉ）（５－Ｏ－メチルＫｄｎの形態）のＣＰＳにおいて見られる。Ｋｄｎを含有する多糖又はオリゴ糖は、グラム陽性菌（アクチノマイセタレス（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔａｌｅｓ）目）の細胞壁に見られる。

【００８２】

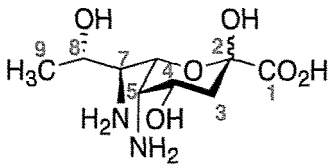
２．４）

【００８３】

【化８】

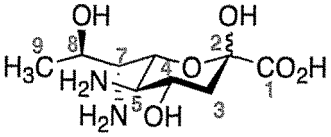


【００８４】
・（Ｉｂ－４）Ｎｅｕ（５－アミノ－３，５－ジデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－ノヌ－２－ウロソン酸）。（Ｉｂ－４）は、大腸菌、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、モラクセラ・ノンリクファシエンス（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｎｏｎｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ）及びマンヘミア（パスツレラ）・ヘモリチカ（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ） ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ）、ストレプトコッカス・アガラクティアエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）（グラム陽性）、ストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ）（グラム陽性）のＣＰＳや、ハフニア・アルベイ（Ｈａｆｎｉａ ａｌｖｅｉ）、エシェリヒア・アルベルティ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ａｌｂｅｒｔｉｉ）、サルモネラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ）、大腸菌、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）、コレラ菌（ビブリオ・コレレ（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ））、シュワネラ・アルガ（Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ ａｌｇａｅ）などの細菌のＬＰＳのＯ－抗原、並びに、髄膜炎菌（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、インフルエンザ菌（Ｈ．ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、軟性下疳菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｄｕｃｒｅｙｉ）、ヒストフィルス・ソムニ（Ｈｉｓｔｏｐｈｉｌｕｓ ｓｏｍｎｉ）、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ）及びヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）などの種々の病原体のＬＰＳコアに見ることができる。
【００８５】
２．５）
【００８６】
【化９】



【００８７】
・（Ｉｂ－５）Ｐｓｅ（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｌ－グリセロ－Ｌ－マンノ－ノヌ－２－ウロソン酸）。（Ｉｂ－５）は、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、ボイド赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｂｏｙｄｉｉ）、大腸菌、プロテウス・ブルガリス（Ｐｒｏｔｅｕｓ ｖｕｌｇａｒｉｓ）、シュードアルテロモナス・アトランティカ（Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ａｔｌａｎｔｉｃａ）、シュードアルテロモナス・ディスティンクタ（Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ｄｉｓｔｉｎｃｔａ）、シノリゾビウム・フレディ（Ｓｉｎｏｒｈｉｚｏｂｉｕｍ ｆｒｅｄｉｉ）及びコレラ菌（ビブリオ・コレレ（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ））、シュードアルテロモナス・アトランティカ（Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ａｔｌａｎｔｉｃａ）のＯ－抗原（ＬＰＳ）、並びに、クリベラ属（Ｋｒｉｂｅｌｌａ ｓｐｐ．）５（グラム陽性）及びアクチノプラネス・ウタヘンシス（Ａｃｔｉｎｏｐｌａｎｅｓ ｕｔａｈｅｎｓｉｓ）（グラム陽性）の細胞壁、並びに、腸炎ビブリオ（ビブリオ・パラヘモリティカス（ｖｉｂｒｉｏ ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ））のＬＰＳコア、並びに、グラム陽性カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ）、カンピロバクター・コリ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｃｏｌｉ）、ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）及びボツリヌス菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）の鞭毛の糖タンパク質、並びに、シノリゾビウム属（Ｓｉｎｏｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）細菌のＣＰＳに見ることができる。
【００８８】
２．６）
【００８９】

【化１０】



【００９０】

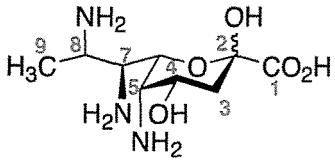
・（Ｉｂ－６）Ｌｅｇ（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－ノヌ－２－ウロソン酸）。（Ｉｂ－６）は、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、ビブリオ・アルギノリチカス（Ｖｉｂｒｉｏ　ａｌｇｉｎｏｌｙｔｉｃｕｓ）、アシネトバクター・バウマニ（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ｂａｕｍａｎｎｉｉ）、蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）及びビブリオ・サルモニシダ（Ｖｉｂｒｉｏ　ｓａｌｍｏｎｉｃｉｄａ）に見られる。

【００９１】

２．７）

【００９２】

【化１１】



【００９３】

・（Ｉｂ－７）：５，７，８－トリアミノ－３，５，７，８，９－ペンタデオキシノヌ－２－ウロソン酸（Ｃ－８での立体配座が未知）は、テナキバクラム・マリティマム（Ｔｅｎａｃｉｂａｃｕｌｕｍ　ｍａｒｉｔｉｍｕｍ）（以前は海産魚の滑走細菌症菌（Ｆｌｅｘｉｂａｃｔｅｒ　ｍａｒｉｔｉｍｕｓ））に見られる。

【００９４】

上記式Ｉｂ－ｉにおいて、ｉが１～７の場合、NH_2基はＮ－アセチル（ＮＨＡｃ）の形態か、又は、Ｎ－アセトイミドイル（ＮＨＡｍ）、Ｎ－（Ｎ－メチルアセトイミドイル）、Ｎ－（Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトイミドイル）、Ｎ－ホルミル（ＮＨＦｏ）、ＮＨ－ヒドロキシブタノイル（ＮＨ－Ｈｂ）の形態であってもよく、さらにＮ－メチル化されていてもされていなくてもよい。

【００９５】

好ましくは、上記所定のカテゴリーの細菌はグラム陰性菌を構成し、上記細菌の外膜のＬＰＳ層の上記内在性単糖残基はデオキシオクツロソン酸塩残基であり、上記単糖化合物の類似体は、置換デオキシオクツロソン酸又はデオキシオクツロソン酸塩化合物（ケトデオキシオクトネート（いわゆるＫＤＯ）とも呼ばれる）である。

【００９６】

「グラム陰性菌」というのは、上記ＫＤＯを用いた方法では、グラム陽性菌と、同じ内在性単糖を有していない他のグラム陰性菌の標識ができないことを意味する。実際に、グラム陰性菌のＬＰＳは全て上記デオキシオクツロソン酸塩残基を有しているのに対し、グラム陽性菌のグリカン中にはその残基は含まれていない。

【００９７】

「デオキシオクツロソン酸塩」（Ｋｄｏとも呼ぶ）は、式（Ｉａ－１）の３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸塩残基を意味する。

【００９８】

より具体的には、上記デオキシオクツロソン酸塩残基は、単糖環の３位、４位、５位、７位又は８位、好ましくは３位、７位又は８位から選択される位置が上記反応性基によって置換されている。上記内在性単糖の２位は、ＬＰＳとの共有結合に関与している。

【００９９】
グラム陰性菌は全て、少なくとも１つの残基の３位、４位、５位、７位又は８位の１つにおいて上記第１の反応性基によって置換することができる遊離型の基を有する上記デオキシオクツロソン酸塩残基を含む。また、シュワネラ属（Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ）細菌の一部を除き、グラム陰性菌は全て、少なくとも１つの残基の８位に遊離型の基を有する。
【０１００】
グラム陰性菌を特異的に検出するために、ステップａ）及びｂ）においてグラム陰性菌に特異的な培養培地を用い、それによりグラム陽性菌を培養させないことがより有利である場合がある。
【０１０１】
より具体的には、上記デオキシオクツロソン酸塩残基は、式（Ｉ）又は（ＩＩ）の化合物、より具体的には式（Ｉａ－１）の化合物であって、８位が上記反応性基R_1で置換されている。すなわち、式（Ｉ）中、Ｄ＝－ＣＨＯＨ－CH_2－R_1、Ａ＝Ｈ、Ｂ＝ＯＨ、Ｃ＝ＯＨ、又は、式（ＩＩ）中、Ｄ＝－ＣＨＯＨ－ＣＨＯＨ－CH_2－R_1、Ａ＝Ｈ、Ｂ＝ＯＨ。
【０１０２】
より具体的には、取り込まれた内在性ＫＤＯを有する上記グラム陰性菌は、大腸菌、ネズミチフス菌（サルモネラ・ティフィムリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ））、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）及び緑膿菌（シュードモナス・エルギノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ））から選択される。これらの細菌は、８位が遊離型である内在性ＫＤＯを有する。
【０１０３】
ウロソン酸又はウロソン酸塩残基の少なくとも１つの位置が遊離型である他のグラム陰性病原菌は、バクテロイデス・フラジリス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｆｒａｇｉｌｉｓ）、バルトネラ・バシリホルミス（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｂａｃｉｌｌｉｆｏｒｍｉｓ）、バルトネラ・クインターナ（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｑｕｉｎｔａｎａ）（ロシャリメア・クインターナ（Ｒｏｃｈａｌｉｍａｅａ ｑｕｉｎｔａｎａ））、バルトネラ属（Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ ｓｐｐ.（ロシャリメア属（Ｒｏｃｈａｌｉｍａｅａ ｓｐｐ.））、気管支敗血症菌（ボルデテラ・ブロンキセプティカ（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｂｒｏｎｃｈｉｓｅｐｔｉｃａ））、パラ百日咳菌（ボルデテラ・パラペルツッシス（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐａｒａｐｅｒｔｕｓｓｉｓ））、百日咳菌（ボルデテラ・パータッシス（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ））、ブラキスピラ属（Ｂｒａｃｈｙｓｐｉｒａ ｓｐｐ.）、カンピロバクター・フェタス（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｆｅｔｕｓ）、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｓｐｐ）、カルジオバクテリウム・ホミニス（Ｃａｒｄｉｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｈｏｍｉｎｉｓ）、クラミドフィラ・アボルタス（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ａｂｏｒｔｕｓ）、クラミドフィラ・キャビエ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｃａｖｉａｅ）、クラミドフィラ・フェリス（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｆｅｌｉｓ）、クラミドフィラ・ニューモニエ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（肺炎クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ））、エドワジェラ・タルダ（Ｅｄｗａｒｄｓｉｅｌｌａ ｔａｒｄａ）、エーリキア属（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｓｐｐ.）、エイケネラ・コローデンス（Ｅｉｋｅｎｅｌｌａ ｃｏｒｒｏｄｅｎｓ）、エリザベトキンギア・メニンゴセプティカ（Ｅｌｉｚａｂｅｔｈｋｉｎｇｉａ ｍｅｎｉｎｇｏｓｅｐｔｉｃａ）（フラボハクテリウム・メニンゴセプチカム（Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｍｅｎｉｎｇｏｓｅｐｔｉｃｕｍ）、クリセオバクテリウム（Ｃｈｒｙｓｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、エニンゴセプチカム（ｅｎｉｎｇｏｓｅｐｔｉｃｕｍ））、エンテロバクター・アエロゲネス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）（＝クレブシエラ・モビリス（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｍｏｂｉｌｉｓ））、エンテロバクター・クロアカエ（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｃ

loacae）、エンテロバクター属（Enterobacter spp.）、腸球菌（エンテロコッカス）属（Enterococcus spp.）、野兎病菌亜種ホルアークティカ（Francisella tularensis subsp. holarctica（“Francisella tularensis var. palaearctica”））、野兎病菌タイプB（Francisella tularensis type B）、壊死桿菌（フソバクテリアム・ネクロフォラム（Fusobacterium necrophorum））、軟性下疳菌（Haemophilus ducreyi）、インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）、ヘモフィルス属（Haemophilus spp.）、ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）、カンピロバクター・ピロリ（Campylobacter pylori）、クレブシエラ・オキシトカ（Klebsiella oxytoca）、肺炎桿菌（クレブシエラ・ニューモニエ（Klebsiella pneumoniae））、クレブシエラ属（Klebsiella spp.）、レジオネラ・ボゼマナエ（Legionella bozemanae corrig.（フルオリバクター・ボゼマナエ（Fluoribacter bozemanae））、レジオネラ・ニューモフィラ（Legionella pneumophila）、レジオネラ属（Legionella spp.）、レプトスピラ・インテロガンス（Leptospira interrogans）、レプトスピラ・アレキサンデリを含む広義のレプトスピラ・インテロガンス（Leptospira interrogans sensu lato inclut Leptospira alexanderi）、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ（Leptospira borgpetersenii）、レプトスピラ・ファイネイ（Leptospira fainei）、レプトスピラ・イナダイ（Leptospira inadai）、レプトスピラ・インテロガンス（Leptospira interrogans）、レプストピラ・カースクネリー（Leptospira kirschneri）、レプストピラ・ノグチ（Leptospira noguchii）、レプストピラ・サンタロサイ（Leptospira santarosai）、レプトスピラ・ウェイリイ（Leptospira weilii）、モーガネラ・モーガニイ（Morganella morganii）（プロテウス・モーガニイ（Proteus morganii））、淋菌（ナイセリア・ゴナーリエ（Neisseria gonorrhoeae））、髄膜炎菌（ナイセリア・メニンギティディス（Neisseria meningitidis））、ネオリケッチア・センネツ（Neorickettsia sennetsu（エーリキア・センネツ（Ehrlichia sennetsu）、リケッチア・センネツ（Rickettsia sennetsu））、パスツレラ・ムルトシダ（Pasteurella multocida）、パスツレラ属（Pasteurella spp.）、プレジオモナス・シゲロイデス（Plesiomonas shigelloides）、ポルフィロモナス属（Porphyromonas spp.）、プレボテラ属（Prevotella spp.）、プロテウス・ミラビリス（Proteus mirabilis）、プロテウス・ペンネリ（Proteus penneri）、プロテウス・ブルガリス（Proteus vulgaris）、プロビデンシア・アルカリファシエンス（Providencia alcalifaciens）、プロビデンシア・レットゲリ（Providencia rettgeri（プロテウス・レットゲリ（Proteus rettgeri））、プロビデンシア属（Providencia spp.）、緑膿菌（シュードモナス・エルギノーサ（Pseudomonas aeruginosa））、リケッチア属（Rickettsia spp.）（オリエンティア（リケッチア）・ツツガムシ（Orientia（Rickettsia） tsutsugamushi）を除く）、リケッチア・アカリ（Rickettsia akari）、リケッチア・カナデンシス（Rickettsia canadensis）、リケッチア・コノリイ（Rickettsia conorii）、リケッチア・モンタネンシス（Rickettsia montanensis）、リケッチア・プロワゼキイ（Rickettsia

ｐｒｏｗａｚｅｋｉｉ）、リケッチア・リケッチィ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉ）及び発疹熱リケッチア（リケッチア・チフィ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｔｙｐｈｉ））、サルモネラ・エンテリカ亜種アリゾネ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｕｂｓｐ． Ａｒｉｚｏｎａｅ（サルモネラ・アリゾネ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ａｒｉｚｏｎａｅ）、サルモネラ・コレラエスイス亜種アリゾネ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｃｈｏｌｅｒａｅｓｕｉｓ ｓｕｂｓｐ． ａｒｉｚｏｎａｅ））、サルモネラ・エンテリカ亜種エンテリカ血清型エンテリティディス（（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｕｂｓｐ． ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｅｒｏｖａｒ Ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ（サルモネラ・エンテリティディス（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ））、サルモネラ・エンテリカ亜種エンテリカ血清型パラチフィＡ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｕｂｓｐ． ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｅｒｏｖａｒ Ｐａｒａ ｔｙｐｈｉ Ａ（サルモネラ・パラチフィ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｐａｒａｔｙｐｈｉ））、パラチフィＢ（Ｐａｒａｔｙｐｈｉ Ｂ）及びパラチフィＣ（Ｐａｒａｔｙｐｈｉ Ｃ）、サルモネラ・エンテリカ亜種エンテリカ血清型ティフィムリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｕｂｓｐ． ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｅｒｏｖａｒ Ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ（ネズミチフス菌（サルモネラ・ティフィムリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ））、ボイド赤痢菌（シゲラ・ボイディイ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｂｏｙｄｉｉ））、志賀赤痢菌（シゲラ・ディゼンテリエ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ））（タイプ１を除く）、フレクスナー赤痢菌（シゲラ・フレックスネリ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｆｌｅｘｎｅｒｉ））、ソンネ赤痢菌（シゲラ・ソンネイ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ））、ストレプトバチルス・モニリフォルミス（Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｉｓ）、トレポネーマ・カラテウム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｃａｒａｔｅｕｍ）、梅毒トレポネーマ（トレポネーマ・パリズム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ））、トレポネーマ・ペルテヌエ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐｅｒｔｅｎｕｅ）（トレポネーマ・パリズム亜種ペルテヌエ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ ｓｕｂｓｐ． ｐｅｒｔｅｎｕｅ））、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｓｐｐ．）、コレラ菌（ビブリオ・コレレ（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ））、腸炎ビブリオ（ビブリオ・パラヘモリティカス（ｖｉｂｒｉｏ ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ））（＝ベネッケア・パラヘモリティカ（Ｂｅｎｅｃｋｅａ ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃａ））、ビブリオ属（Ｖｉｂｒｉｏ ｓｐｐ．）、エルシニア・エンテロコリティカ（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｅｎｔｅｒｏｃｏｌｉｔｉｃａ）、偽結核菌（エルシニア・シュードツベルクローシス（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｓｅｕｄｏｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ））、ブルセラ・メリテンシス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｍｅｌｉｔｅｎｓｉｓ）（狭義）、ブルセラ・メリテンシス次亜種アボルツス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｍｅｌｉｔｅｎｓｉｓ ｂｉｏｖａｒ Ａｂｏｒｔｕｓ（ブルセラ・アボルツス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ａｂｏｒｔｕｓ））、ブルセラ・メリテンシス次亜種カニス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｍｅｌｉｔｅｎｓｉｓ ｂｉｏｖａｒ Ｃａｎｉｓ（ブルセラ・カニス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｃａｎｉｓ））、ブルセラ・メリテンシス次亜種スイス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｍｅｌｉｔｅｎｓｉｓ ｂｉｏｖａｒ Ｓｕｉｓ（ブルセラ・スイス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ｓｕｉｓ））、鼻疽菌（バークホルデリア・マレイ（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｍａｌｌｅｉ）（シュードモナス・マレイ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｍａｌｌｅｉ））、類鼻疽菌（バークホルデリア・シュードマレイ（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉ）（シュードモナス・シュードマレイ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉ））、クラミドフィラ・シタッシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｐｈｉｌａ ｐｓｉｔｔａｃｉ）（クラミジア・シタッシ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｐｓｉｔｔａｃｉ））、コクシエラ・バーネッティイ（Ｃｏｘｉｅｌｌａ ｂｕｒｎｅｔｉｉ）、野兎病菌亜種チュラレンシス（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ ｓｕｂｓｐ． Ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ（フランシエラ・チュラレンシス亜種ニアークティカ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ ｓｕｂｓｐ． ｎｅａｒｃｔｉｃａ）、フランシエラ・チュラレンシス次亜種チュランレンシス（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉ

ｓ ｂｉｏｖａｒ Ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ）、フランシエラ・チュラレンシス タイプＡ（
Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ ｔｙｐｅ Ａ）、オリエンティア・ツツガムシ（Ｏｒｉｅｎｔｉａ ｔｓｕｔｓｕｇａｍｕｓｈｉ（リケッチア・ツツガムシ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｔｓｕｔｓｕｇａｍｕｓｈｉ））、リケッチア・アカリ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ａｋａｒｉ）、リケッチア・カナデンシス（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｃａｎａｄｅｎｓｉｓ ｃｏｒｒｉｇ.）、リケッチア・コノリイ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｃｏｎｏｒｉｉ）、リケッチア・モンタネンシス（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｍｏｎｔａｎｅｎｓｉｓ ｃｏｒｒｉｇ.）、リケッチア・プロワゼキイ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｐｒｏｗａｚｅｋｉｉ）、リケッチア・リケッチィ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉ）、発疹熱リケッチア（リケッチア・チフィ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｔｙｐｈｉ））、サルモネラ・エンテリカ亜種エンテリカ血清型チフィ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｕｂｓｐ. ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｅｒｏｖａｒ Ｔｙｐｈｉ（サルモネラ・チフィ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉ）、シゲラ・ディゼンテリエタイプ１（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ ｔｙｐｅ １）及びペスト菌（エルシニア・ペスティス（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｅｓｔｉｓ））から選択することができる。

【０１０４】

他の好ましい実施形態においては、本発明の方法は、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）菌の生菌を特異的に標識する、好ましくは検出するための方法であり、

上記細菌の所定のカテゴリーは上記レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）菌のカテゴリーであり、

上記細菌の外膜のＬＰＳ層の上記内在性単糖残基は、４－エピレジオナミン酸（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸）若しくは４－エピレジオナミン酸塩残基、又は、レジオナミン酸（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－ノヌ－２－ウロソン酸）若しくはレジオナミン酸塩残基であり、

上記単糖化合物の類似体は、それぞれ、置換４－エピレジオナミン酸若しくは４－エピレジオナミン酸塩化合物、又は、置換レジオナミン酸若しくはレジオナミン酸塩化合物であり、好ましくはその単糖環の３位、４位、５位、７位、８位及び９位、好ましくは５位、７位及び９位から選択される１つの位置が置換されている。上記内在性単糖の２位はＬＰＳとの共有結合に関与している。

【０１０５】

上記単糖化合物の類似体は、式（Ｉ）、より具体的には（Ｉｂ－１）の置換４－エピレジオナミン酸若しくは４－エピレジオナミン酸塩化合物、又は、式（Ｉ）、より具体的には（Ｉｂ－６）の置換レジオナミン酸若しくはレジオナミン酸塩化合物であって、９位が上記反応性基$Ｒ_{1}$によって置換されており、Ｄ＝－ＣＨＮ$Ｈ_{2}$－ＣＨＯＨ－$ＣＨ_{2}Ｒ_{1}$、Ａ＝Ｈ、Ｂ＝ＯＨ、Ｃ＝$ＮＨ_{2}$であることが好ましい。

【０１０６】

上記単糖化合物の類似体の他の好ましい構造は、式（Ｉ）、より具体的には（Ｉｂ－１）の置換４－エピレジオナミン酸若しくは４－エピレジオナミン酸塩化合物、又は、式（Ｉ）、より具体的には（Ｉｂ－６）の置換レジオナミン酸若しくはレジオナミン酸塩化合物であって、５位及び７位のうち少なくとも１つが上記反応性基$Ｒ_{1}$によって置換されており、Ｄ＝－ＣＨＮＨ$Ｒ_{2}$－ＣＨＯＨ－$ＣＨ_{3}$、Ａ＝Ｈ、Ｂ＝ＯＨ、Ｃ＝ＮＨ$Ｒ_{3}$（$Ｒ_{2}$及び$Ｒ_{3}$はそれぞれ独立にＨ又は$Ｒ_{1}$）であるものである。

【０１０７】

他の好ましい実施形態においては、本発明の方法は、緑膿菌（シュードモナス・エルギノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ））の生菌を特異的に標識する、好ましくは検出するための方法であり、

上記細菌の所定のカテゴリーは上記緑膿菌（シュードモナス・エルギノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ））のカテゴリーであり、
上記細菌の外膜のＬＰＳ層の上記内在性単糖残基は、８－エピレジオナミン酸（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｌ－グリセロ－Ｄ－ガラクト－ノヌ－２－ウロソン酸）若しくは８－エピレジオナミン酸塩残基、又は、プソイダミン酸（５，７－ジアミノ－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｌ－グリセロ－Ｌ－マンノ－ノヌ－２－ウロソン酸）若しくはプソイダミン酸塩残基であり、
上記単糖化合物の類似体は、それぞれ、置換８－エピレジオナミン酸若しくは８－エピレジオナミン酸塩化合物、又は、置換プソイダミン酸若しくはプソイダミン酸塩化合物であり、好ましくはその単糖環の３位、４位、５位、７位、８位及び９位、好ましくは５位、７位及び９位から選択される１つの位置が置換されている。上記内在性単糖の２位はＬＰＳとの共有結合に関与している。

【０１０８】

上記単糖化合物の類似体は、式（Ｉ）、より具体的には（Ｉｂ－２）の置換８－エピレジオナミン酸若しくは８－エピレジオナミン酸塩化合物、又は、式（Ｉ）、より具体的には（Ｉｂ－５）の置換プソイダミン酸若しくはプソイダミン酸塩化合物であって、９位が上記反応性基R_1によって置換されており、Ｄ＝－ＣＨＮＨ$_2$－ＣＨＯＨ－ＣＨ$_2$Ｒ$_1$、Ａ＝Ｈ、Ｂ＝ＯＨ、Ｃ＝ＮＨ$_2$であることが好ましい。

【０１０９】

上記単糖化合物の類似体の他の好ましい構造は、式（Ｉ）、より具体的には（Ｉｂ－２）の置換８－エピレジオナミン酸若しくは８－エピレジオナミン酸塩化合物、又は、式（Ｉ）、より具体的には（Ｉｂ－５）の置換プソイダミン酸若しくはプソイダミン酸塩化合物であって、５位及び７位のうち少なくとも１つが上記反応性基R_1によって置換されており、Ｄ＝－ＣＨＮＨＲ$_2$－ＣＨＯＨ－ＣＨ$_3$、Ａ＝Ｈ、Ｂ＝ＯＨ、Ｃ＝ＮＨＲ$_3$（Ｒ$_2$及びＲ$_3$はそれぞれ独立にＨ又はＲ$_1$）であるものである。

【０１１０】

より具体的には、上記検出可能な物質は、蛍光又は発光によって検出可能な蛍光色素分子又は発光分子である。

【０１１１】

上記第１の反応性基R_1は、アジド基（－Ｎ$_3$）そのもの又はアジド基を有する基、及び、アルキン基（－Ｃ≡Ｃ－）そのもの又はアルキン基を有する基から選択され、
上記第２の反応性基R_2は、アルキン基（－Ｃ≡Ｃ－）そのもの又はアルキン基を有する基、及び、アジド基（－Ｎ$_3$）そのもの又はアジド基を有する基から選択され、
上記アジド反応性基を上記アルキン基（－Ｃ≡ＣＨ）と反応させてアジドアルキン付加環化を行うことが好ましい。

【０１１２】

アジドアルキン付加環化は、銅触媒の存在下で行う周知のいわゆるクリックケミストリー反応である。この反応においては、アジド基はアルキン基と反応してトリアゾールを生成する。

【０１１３】

より具体的には、上記反応は、トリス－トリアゾリルリガンド、好ましくはＴＧＴＡの存在下、銅触媒条件で行われる。

【０１１４】

より具体的には、上記検出可能な分子は、末端アルキン基を有するフルオロフォアである。

【０１１５】

より具体的には、細菌の外膜のＬＰＳ層内に取り込まれた内在性３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸に置き換わるＫｄｏ類似体は、Ｋｄｏ－Ｎ$_3$（８－アジド－３，８－ジデオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸）類似体であり、該類似体をＴＧＴＡ（トリス（（１－（β－Ｄ－グリコピラノシル）－１Ｈ－［１，２，３］－トリアゾール－４－イ

ル）メチル）アミン）又はＴＢＴＡ（トリス－［（１－ベンジル－１Ｈ－１，２，３－トリアゾール－４－イル）メチル］アミン）などのトリス－トリアゾールリガンドと、末端アルキン基を有するＡｌｅｘａ標識化フルオロフォア分子と、触媒との存在下で反応させて、上記フルオロフォアと上記Ｋｄｏ－$Ｎ_3$のアジドアルキン付加環化を行う。

【０１１６】

よく使用される他の好適なリガンドは、トリス（３－ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル）アミン（ＴＨＰＴＡ）、２－（４－（（ビス（（１－ｔｅｒｔ－ブチル－１Ｈ－１，２，３－トリアゾール－４－イル）メチル）アミノ）メチル）－１Ｈ－１，２，３－トリアゾール－１－イル）エタンスルホン酸（ＢＴＴＥＳ）、トリス（（１－（（Ｏ－エチル）カルボキシメチル）－（１，２，３－トリアゾール－４－イル））メチル）アミン、バソフェナントロリンジスルホネート、又は、トリス（２－ベンズイミダゾリルメチル）アミン（５３）である。

【０１１７】

以下のような他の反応性基及び他の反応も可能である。Ｓｔａｕｄｉｎｇｅｒライゲーション（第１の反応性基＝アジド、第２の反応性基＝ホスフィン）、銅フリークリックケミストリー（第１の反応性基＝アジド、第２の反応性基＝束縛（ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ）アルキン（環内アルキン））、カルボニル縮合（第１の反応性基＝アルデヒド又はケトン、第２の反応性基＝ヒドラジド又はオキシアミン）、Ｈｉｓ－ｔａｇ（第１の反応性基＝オリゴ－ヒスチジン、第２の反応性基＝ニッケル錯体又はニッケルリガンド）、チオール－エンクリックケミストリー（第１の反応性基＝チオール、第２の反応性基＝アルケン）、ニトリル－オキシド－エンクリックケミストリー（第１の反応性基＝ニトリルオキシド又はアルデヒド、オキシム、又は、塩化ヒドロキシモイル又はクロロオキシム、第２の反応性基＝アルケン又はアルキン）、ニトリルイミン－エンクリックケミストリー（第１の反応性基＝ニトリルイミン又はアルデヒド、ヒドラゾン、又は、塩化ヒドラゾノイル又はクロロヒドラゾン、第２の反応性基＝アルケン又はアルキン）、逆電子要請型ディールス・アルダー（ｉｎｖｅｒｓｅ ｅｌｅｃｔｒｏｎ ｄｅｍａｎｄ Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ）ライゲーション（第１の反応性基＝アルケン、第２の反応性基＝テトラジン）、Ｓｕｚｕｋｉ－Ｍｉｙａｕｒａカップリング（第１の反応性基＝ハロゲン化アリール、第２の反応性基＝ボロン酸アリール）。

【０１１８】

反応に関与する基の上記リストにおいて、第１の反応性基と第２の反応性基を入れ替えてもよい。

【０１１９】

他に、２つの異なる上記単糖類似体化合物と２つの異なる検出可能な分子を用いて細菌試料をインキュベートすることにより、より特異性の高い検出を行うことができる。

【０１２０】

本発明の方法の他の具体的な実施形態においては、上記ステップａ）のインキュベーション及び上記ステップｂ）の反応はメンブランフィルター上で行われ、それにより、もともと同じ細菌から増殖した培養細菌を１つの群にして、顕微鏡を用いて可視化することができ、上記検出可能な分子は上記顕微鏡を用いて可視化することにより検出することができる。したがって、培養可能な細菌の数はそれにより定量化できる。

【０１２１】

この実施形態により、上記修飾単糖の同化の前に、被験試料をポリエステル膜などの上記メンブランフィルター上でろ過することができ、それにより同化期の間に起こり得る増殖によって生存細菌を多く見積もりすぎることを防ぐことができる。実際に、そのような膜の頂部に固定した細胞が増殖し始める時、該細胞はまとまって存在し、マイクロコロニーを形成するので、同じ単一の細胞に由来するものとして容易に検出することができる。したがって、培養可能な細菌を計数することによって数を数えることができる。

【０１２２】

本発明は、上記本発明の方法を行うためのキットであって、

上記第１の反応性化学基によって所定の位置が置換されたウロソン酸又はウロソン酸塩化合物を含む上記単糖化合物の類似体と、
上記第１の反応性基と反応できる上記第２の反応性基を有する上記標識化分子と、
上記細菌の外膜のグリカン内に取り込まれた上記類似体残基の上記第１の反応性基を上記標識化分子の上記第２の反応性基と反応させるための反応体と、
上記所定のカテゴリーの細菌を増殖させることができ、好ましくは上記所定のカテゴリーの細菌の増殖に特異的である培養培地又はインキュベーション培地と
を備えるキットも提供する。

【０１２３】

上記培養培地又はインキュベーション培地は、さらに、増殖速度、及び／又は、上記所定のカテゴリーの細菌のコロニー形成能を高める及び／又は加速させる物質をさらに含むことが好ましい。より具体的には、上記インキュベーション培地は、ピルビン酸塩又はカタラーゼなどの酸化防止剤を少なくとも含む。

【０１２４】

より具体的には、ある実施形態においては、上記キットは、さらに、
検出可能な物質、好ましくは蛍光色素分子又は発光分子又は酵素を含む上記検出可能な分子又は第２の分子、及び／又は、
上記標識化分子と特異的に反応若しくは結合できる上記第２の分子を含む固体基材
を備える。

【０１２５】

より具体的には、ある実施形態においては、本発明のキットは、さらに、
上記第１の反応性基と反応できる上記第２の反応性基を有する上記検出可能な分子と、
・上記細菌を、上記単糖化合物の類似体、上記反応体及び上記検出可能な分子と共にインキュベートした後に可視化することができる固体媒体と
を備える。

【０１２６】

さらに、より具体的には、上記キットは、
アジド基又はアルキン基を含む上記第１の反応性基で置換されたデオキシオクツロソン酸又はデオキシオクツロソン酸塩化合物である上記単糖化合物の類似体と、
それぞれアルキン基又はアジド基を有する検出可能な分子の上記第２の反応性基と、
銅触媒及びトリス－トリアゾリルリガンドを含む上記反応体と
を備える。

【０１２７】

本発明の他の特徴や利点は、以下に示す図を参照として、以下の発明の詳細な説明からより明確になるであろう。

【図面の簡単な説明】

【０１２８】

【図１Ａ】大腸菌Ｋ１２株のリポ多糖の主要成分の構造を示す。ＫＤＯ糖残基がグラム陰性菌のＬＰＳのＩＣ（内部コア）内に取り込まれている。ＩＣは、ＯＣ（外部コア）とＬＡ（リピドＡ）の間にある。また、Ｏ－抗原に対するアンカー部位Ａと、８位におけるＫＤＯの修飾可能部位Ｂを示す。Ｇｌｃ：Ｄ－グルコース；ＧｌｃＮ：２－アミノ－２－デオキシ－Ｄ－グルコース；ＫＤＯ：３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸塩；Ｈｅｐ：Ｌ－グリセロ－Ｄ－マンノ－ヘプトース；Ｇａｌ：Ｄ－ガラクトース

【図１Ｂ】ＫＤＯ生合成経路（ＫＤＯ経路）を示す。

【図２Ａ】本例で使用した分子を示す（１＝ＫＤＯ－$Ｎ_3$、２＝ＴＧＴＡ、３＝Ａ４８８－イン（Ａ４８８－ｙｎｅ））。

【図２Ｂ】大腸菌のＬＰＳ代謝標識を概略的に示す（１＝ＫＤＯ－$Ｎ_3$）。

【図３Ａ】代謝的に取り込まれたＫＤＯ－$Ｎ_3$が存在する場合（＋ＫＤＯ－Ｎ３）と、代謝的に取り込まれたＫＤＯが存在しない場合（－ＫＤＯ－$Ｎ_3$）の大腸菌Ｋ１２株の写真である。Ａ４８８－インを用いたＣｕ（Ｉ）触媒による５分間のクリックケミストリーに

より明らかになる前のもの（グレーの図）と、明らかになった後のもの（黒の図）とを示す。
【図３Ｂ】ＫＤＯ－Ｎ$_3$を添加した場合（グレーの棒グラフ）と、ＫＤＯ－Ｎ$_3$を添加しない場合（黒の棒グラフ）において得てプロットした細菌の蛍光値の度数分布についてのグラフである。蛍光の任意単位（“ａ．ｕ．ｆ．”）の範囲は横軸に０～１３００であり、相対度数（“ｒ．ｆ．”）の範囲は０～１である。
【図３Ｃ】Ａ４８８－インを用いたＣｕ（Ｉ）触媒による５分間のクリックケミストリーによって標識されており、大腸菌の細胞表面で濃縮されている蛍光を示す写真である。画像は、実験点拡がり関数と共にルーシー・リチャードソンアルゴリズムを用いてデコンボルブしている。
【図４】図４は、種々の細菌株によって代謝的に取り込まれたＫＤＯ－Ｎ$_3$の検出を表す写真である。種々の細菌によって代謝的に取り込まれたＫＤＯ－Ｎ$_3$は、Ａ４８８－インを用いたＣｕ（Ｉ）触媒によるクリックケミストリーを６０分間行うことにより明らかとなった。位相差及び蛍光像について、ＫＤＯ－Ｎ$_3$を添加していないもの（左側のパネル）と、ＫＤＯ－Ｎ$_3$を添加したもの（右側のパネル）を示す。スケールバーの１μｍは図３Ａと同じである。ＫＤＯ－Ｎ$_3$を添加した場合（＋ＫＤＯ－Ｎ$_3$）とＫＤＯを添加しない場合（－ＫＤＯ－Ｎ$_3$）の細菌を示す。Ａ４８８－インを用いたＣｕ（Ｉ）触媒による５分間のクリックケミストリーにより明らかになる前のもの（グレーの図）と、明らかになった後のもの（黒の図）を示す。
【図５】図５は、種々の細菌株によって代謝的に取り込まれたＫＤＯ－Ｎ$_3$の検出結果（写真及びグラフ）を表す。種々の細菌株によって代謝的に取り込まれたＫＤＯ－Ｎ$_3$は、Ａ４８８－インを用いたＣｕ（Ｉ）触媒によるクリックケミストリーを６０分間行うことにより明らかとなった。ＫＤＯ－Ｎ$_3$を添加する場合（グレーの棒グラフ）と、ＫＤＯ－Ｎ$_3$を添加しない場合（黒の棒グラフ）において細菌の蛍光値の度数分布を得てプロットした。
【発明を実施するための形態】
【０１２９】
以下の記載は修飾ＫＤＯを用いてＬＰＳ内部コアの代謝修飾を通じてグラム陰性菌の細菌膜をクリック標識した実施例を例示的に説明するものである。
【０１３０】
生存しているグラム陰性菌は、そのリポ多糖に修飾ＫＤＯを特異的に取り込み、細胞表面を生体直交型の化学レポーターで装飾することが可能である。クリックケミストリーによって、図１に概略的に示すような全体として迅速な過程により生存細胞をさらに標識することができる。
【０１３１】
実施例１：８－アジド－３，８－ジデオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸（ＫＤＯ－Ｎ$_3$）の同化及びグラム陰性菌の特異的検出
【０１３２】
１）全てのターゲット候補のなかで、３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸（ＫＤＯ）は非常に魅力的な候補であると考えられる。実際に、ＫＤＯは、ＬＰＳの内部コアに特異的でかつ必須の成分であり［７，８］、グラム陰性菌株のほとんど全て（さらに高等植物や藻）のＬＰＳ中に存在すると長い間考えられている。その残基は少なくとも１つはリピドＡに直接結合している（図１Ａ）［９］。その極めて高い重要性から、ＫＤＯは、グラム陰性菌を特性決定するための決定因子と考えられ、ＫＤＯ経路は新規抗菌剤の開発のためのターゲット候補と考えられている［１０］。この経路において（図１Ｂ）、ＬＰＳの合成前に、アラビノース－５－ＰをＰＥＰと縮合するとＫＤＯ－８－Ｐが形成され、その後、これが遊離型ＫＤＯに変換され、さらに活性化されてＣＭＰ－ＫＤＯ供与体の形態になる。
【０１３３】
こうした全ての理由から、このＫＤＯ経路は、ＬＰＳに特異的な経路として、８－アジド

－８－デオキシ－ＫＤＯ（１、図２Ａ）などの修飾ＫＤＯを大腸菌のＬＰＳのコアへ、さらに潜在的には他のグラム陰性菌のコアへ取り込むのに充分な耐性があるかどうかが調べられている。上記経路において中間体として遊離型ＫＤＯが存在しているとすると、上記ＫＤＯの類似体の細胞透過が充分であれば［１１］、その類似体は直接活性化される可能性があり、ＬＰＳ中の内在性ＫＤＯの一部と置き換わり、アジド－アルキンクリックケミストリーにより細胞表面で検出することができると本発明者らは仮定した（図２Ｂ）［１２］。また、生体直交型のアジド基によってＫＤＯのＣ－８位を修飾することにより、ＫＤＯ－８－Ｐホスファターゼ（３．１．３．４５）による逆代謝が防止され、化学レポーターの他の炭水化物及び代謝物への拡散の可能性が制限されるはずである。

【０１３４】

８－アジド－３，８－ジデオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸１を得るのに利用できる多くの考えられる多段階合成ストラテジーのなかで［１３］、上記化合物は、Ｇｈａｌａｍｂｏｒ とＨｅａｔｈによって１９６３年に説明された直接ＫＤＯ合成のためのアプローチ［１５］を改変した直接的な方法で調製される（スキーム１）［１４］。すなわち５－アジド－５－デオキシ－Ｄ－アラビノフラノース［１６］（６）をオキサロ酢酸ナトリウム（７）と縮合し、微酸性条件下、脱カルボキシル化してＫＤＯ－N_3（１）とした後、これをアンモニウム塩として５７％の収率（回収した６に基づけば８６％）で単離した。５－アジド－５－デオキシ－Ｄ－アラビノフラノース前駆体６は、後述するように、市販のＤ－アラビノースから非常に直接的かつ簡潔で時間を節約できるストラテジーにより得ることができた。

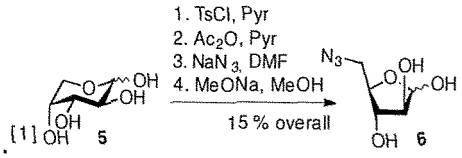
【０１３５】

１ａ）アンモニウム５－アジド－５－デオキシ－Ｄ－アラビノフラノース６の合成

５－アジド－５－デオキシ－Ｄ－アラビノフラノース前駆体６は、非常に直接的かつ簡潔で時間を節約できるストラテジーにより得ることができ、嵩高いトリチル基による一時的な保護を代わりに用いる必要がなかった。市販のＤ－アラビノースは、そのフラノース型の１位で直接的にトシル化され、さらにアセチル化され、アジドアニオンによって求核置換されたが、中間体を精製する必要はなかった。このステップにおいて、生成物はフラッシュクロマトグラフィーによって他の副生成物から容易に分離することができた。最終的な脱アシル化によって、全収率１５％で６が得られた。

【０１３６】

【化１２】



スキーム１．アンモニウム５－アジド－５－デオキシ－Ｄ－アラビノフラノース６の合成

【０１３７】

５－アジド－５－デオキシ－Ｄ－アラビノフラノース（６）

市販のＤ－アラビノース５（６．００ｇ、４０ｍｍｏｌ）をピリジン（４０ｍｌ）中で１００℃で２時間加熱した。溶液を自然冷却させ、さらに塩化トシル（８．３８ｇ、４４ｍｍｏｌ；１．１当量）で処理し、１６時間室温で撹拌した。次に無水酢酸（２０ｍｌ）を添加した。アセチル化が完全に終わったことをＴＬＣで確認した後、溶媒を留去し、残った痕跡量をトルエンと共に数回共留去した。残渣をＤＭＦ（１００ｍｌ）に溶解させ、NaN_3（５．２０ｇ、８０ｍｍｏｌ、２当量）を添加し、懸濁液を８０℃で２０時間加熱した。酢酸エチルで希釈し、水で洗浄した後、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、濃縮した。残渣をフラッシュクロマトグラフィー（石油エーテル／酢酸エチル＝７：３）で精製した。最初の溶出物が所望の５－アジド－１，２，３－トリ－Ｏ－アセチル－Ｄ－アラビノフラノース（１．８３ｇ、１５％、α／β＝約２：１）であることが確認された。ＬＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）３２４．０［Ｍ＋Ｎａ］$^+$；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）［$C_{11}H_1$

$_5N_3NaO_7]^+$に対する計算値：３２４．０８０２，実測値：３２４．０８０２；^{1}Ｈ ＮＭＲ（$CDCl_3$，３６０ＭＨｚ）δ（ｐｐｍ）：６．４１（ｄ，０．３３Ｈ，$J_{1,2}$ ３．５Ｈｚ，Ｈ－１β）；６．２３（ｄ，０．６７Ｈ，Ｈ－１α）；５．４０－５．３７（ｍ，１，３４Ｈ，Ｈ－２β，Ｈ－３β）；５．２３（ｄ，０．６７Ｈ，$J_{1,2}$ 約１Ｈｚ，Ｈ－２α）；５．０６（ｄ，０．６７Ｈ，$J_{3,4}$ ４．６Ｈｚ，Ｈ－３α）；４．３０（ｄｄｄ，０．６７Ｈ，Ｈ－４β）；４．１６－４．１０（ｍ，０．３３Ｈ，Ｈ－４β）；３．６９（ｄｄ，０．６７Ｈ，$J_{4,5a}$ ３．１Ｈｚ，$J_{5a,5b}$ １３．５Ｈｚ，Ｈ－５ａα）；３．６１（ｄｄ，０．３３Ｈ，$J_{4,5a}$ ３．６，$J_{5a,5b}$ １３．１Ｈｚ，Ｈ－５ａα）；３．５１－３．４３（ｍ，１Ｈ，Ｈ－５ｂα，Ｈ－５ｂβ）；２．１５，２．１３，２．１２，２．１１，２．１１，２．０９（６ｓ，１８Ｈ，６CH_3CO）；^{13}Ｃ ＮＭＲ（$CDCl_3$，６２．５ＭＨｚ）δ（ｐｐｍ）：１７０．３，１７０．０，１６９．１（ＯＣ（Ｏ）CH_3），９９．２（Ｃ－１α），９３．５（Ｃ－１β），８４．１（Ｃ－４α），８０．８（Ｃ－４β），８０．６（Ｃ－３α），７７．４（Ｃ－２α），７５．１（Ｃ－２β），７４．８（Ｃ－３β），５３．０（Ｃ－５β），５１．３（Ｃ－５α），２０．９，２０．６，２０．３（ＯＣ（Ｏ）CH_3）。

【０１３８】

１ｂ）次に、保護された５－アジド－１，２，３－トリ－Ｏ－アセチル－Ｄ－アラビノースを無水メタノール（３０ｍｌ）に溶解させ、ＭｅＯＮａのメタノール溶液（０．２ｍｏｌ／ｌ、３ｍｌ）で処理し、アルゴン雰囲気下、室温で３時間撹拌した。中和（Ｄｏｗｅｘ ５０（H^+））、濾過及び濃縮の後、５－アジド－５－デオキシ－Ｄ－アラビノフラノース６を９９％（１．０３ｇ）の収率で得た。ＬＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）１９８．０［Ｍ＋Ｎａ］$^+$，４０％，２３０［Ｍ＋ＭｅＯＨ＋Ｎａ］$^+$，１００％；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ$^+$）［$C_5H_9N_3NaO_4$］$^+$に対する計算値：１９８．０４８５，実測値：１９８．０４８５；^{1}Ｈ ＮＭＲ（D_2O，３００ＭＨｚ）δ（ｐｐｍ）：５．２０（ｄ，０．４５Ｈ，$J_{1,2}$ ３Ｈｚ，Ｈ－１β）；５．１６（ｄ，０．５５Ｈ，$J_{1,2}$ ３Ｈｚ，Ｈ－１α）；４．１２－４．０５（ｍ，０．５５Ｈ，Ｈ－４α）；４．０２－３．８５（ｍ，２Ｈ，Ｈ－２α，Ｈ－２β，Ｈ－３α，Ｈ－３β）；３．８４－３．７６（ｍ，０．４５Ｈ，Ｈ－４β）；３．５６（ｄｄ，０．５５Ｈ，$J_{5a,5b}$ １３．５，$J_{4,5a}$ ３．０Ｈｚ，Ｈ－５ａα）；３．５１（ｄｄ，０．４５Ｈ，$J_{5a,5b}$ １３．０Ｈｚ，$J_{4,5a}$ ３．５Ｈｚ，Ｈ－５ａβ）；３．３５（ｄｄ，０．５５Ｈ，$J_{4,5b}$ ６．５Ｈｚ，Ｈ－５ｂα）；３．３３（ｄｄ，０．４５Ｈ，$J_{4,5b}$ ６．５Ｈｚ，Ｈ－５ｂβ）；^{13}Ｃ ＮＭＲ（D_2O，７５ＭＨｚ）δ（ｐｐｍ）：１０１．１ Ｃ－１α；９５．３ Ｃ－１β；８１．４，８１．３，７９．７，７６．４，７５．９及び７４．８ Ｃ－２α，２β，３α，３β，４α，４β；５２．７ Ｃ－５β；５１．６，Ｃ－５α。

【０１３９】

１ｃ）８－アジド－３，８－ジデオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸アンモニウム（１・NH_3）の合成

５－アジド－５－デオキシ－Ｄ－アラビフラノース６（４３７ｍｇ、２．５ｍｍｏｌ）の冷（４℃）水（２．１ｍＬ）溶液をオキサロ酢酸（５２８ｍｇ、４．０ｍｍｏｌ）の水（２．５ｍＬ）溶液に添加し、溶液のｐＨをＮａＯＨ（１０Ｍ）水溶液を添加して約１１に調整した。２時間室温で撹拌した後、溶液を中和し（Ｄｏｗｅｘ ５０（Ｈ＋））、濾過し、８０℃で２０分間加熱した。

【０１４０】

ＡｃＯＨ（０．５Ｍ）を用いてｐＨを約７に調整した後、混合物をアニオン交換クロマトグラフィー（Ｄｏｗｅｘ １Ｘ８（HCO_2^-））を用いて精製した。水による最初の溶出分は未反応の６（１５０ｍｇ、３４％）であった。濃度勾配をつけたギ酸（０．５ｍｏｌ／ｌ→２ｍｏｌ／ｌ）を用いてさらに溶出させ、凍結乾燥し、Ｄｏｗｅｘ ５０（H^+）樹脂で処理し、アンモニア（０．２ｍｏｌ／ｌ）で中和することにより、濃縮後に８－

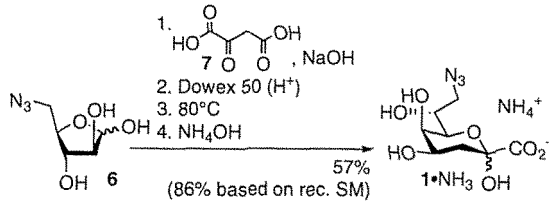
アジド－３，８－ジデオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸アンモニウム（１・ＮＨ３、４００ｍｇ、５７％）を得た。

【０１４１】

Ｒｆ　０．３８（イソプロピルアルコール／水＝９：１）．ＬＲＭＳ（ＥＳＩ－）２６２．１［Ｍ－Ｈ］－，１００％；５２５．１［２Ｍ－Ｈ］－，５％；５４７．１［２Ｍ－２Ｈ＋Ｎａ］－，１０％；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ－）［$C_8H_{12}N_3O_7$］－の計算値：２６２．０６８１，実測値：２６２．０６６７。ＩＲ　ν（cm^{-1}）＝３２１０，２１１１（N_3），１６０４，１４０１，１０７７。化合物１のＮＭＲは、遊離型ＫＤＯや誘導体と同様に、複数の形態が存在するため複雑である（例えばα－ピラノース（αｐ，５８％）、β－ピラノース（βｐ，４％）、α－フラノース（αｆ，２４％），β－フラノース（βｆ，１４％））。選択したＮＭＲデータ：^{1}Ｈ　ＮＭＲ（D_2O，４００ＭＨｚ）δ（ｐｐｍ）：３．５６（ｄｄ，$J_{8a,8b}$　１３．２，$J_{7,8a}$　２．４Ｈｚ，Ｈ－８ａαｐ）；３．３９（ｄｄ，$J_{7,8b}$　６．０Ｈｚ，Ｈ－８ｂαｐ）；２．５５（ｄｄ，$J_{3a,3b}$　１４．３Ｈｚ，$J_{3a,4}$　７．２Ｈｚ，Ｈ－３ａαｆ）；２．３３（ｄｄ，$J_{3a,3b}$　１３．１，$J_{3a,4}$　６．６Ｈｚ，Ｈ－３ａβｆ）；２．２６（ｄｄ，$J_{3b,4}$　７．３Ｈｚ，Ｈ－３ｂβｆ）；２．０３（ｄｄ，$J_{3b,4}$　３．６，Ｈ－３ｂαｆ）；１．９４（ｄｄ，$J_{3a,3b}$＝１２．７，$J_{3a,4}$　１２，７Ｈｚ，Ｈ－３ａαｐ）；１．８４（ｄｄ，$J_{3b,4}$＝４．９Ｈｚ，Ｈ－３ｂαｐ）；１．７１（ｄｄ，$J_{3a,3b}$～$J_{3b,4}$　１２．０Ｈｚ，Ｈ－３ｂβｐ）；^{13}Ｃ　ＮＭＲ（D_2O，１００ＭＨｚ）δ（ｐｐｍ）：１７６．４（Ｃ－１αｐ），１０４．１（Ｃ－２αｆ），９６．２（Ｃ－２αｐ），８５．３（Ｃ－５αｆ），７１．５，６８．０，６６．３及び６６．０（Ｃ－４αｐ，５αｐ，６αｐ，７αｐ），５３．８（Ｃ－８αｐ），４４．６（Ｃ－３αｆ），３３．５（Ｃ－３αｐ）。

【０１４２】

【化１３】



スキーム２．８－アジド－３，８－ジデオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸アンモニウムの合成

【０１４３】

２）Ｏ－抗原を欠く非病原性大腸菌Ｋ１２株［１７］を、以下の段落３）に記載の通り、ＫＤＯ－N_3（１）の存在下、一晩培養し、経時的実験の間、以下の段落２ａ）に記載の通り最適化した、銅を触媒とするクリック条件［１８］を用いて、グルコース由来のトリスートリアゾリルリガンド（２）［１９］と、末端アルキン基を有するＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８フルオロフォア（３）との存在下、さらに処理した。５分間のインキュベーションの後、非常に鮮やかに細菌が標識されたことが確認できた。一方、（ＫＤＯ－N_3類似体の非存在下の）対照実験においてはいずれのシグナルも観察されなかった（図３Ａ、Ｂ）。蛍光発光は、以下の段落２ｂ）に記載の通り行なった。蛍光は細胞の周辺部辺りで概ねはっきりと確認できた。このことは、細胞膜が期待した通り選択的に標識されたことを示している（図３Ｃ）。

【０１４４】

２ａ）銅を触媒とするクリックケミストリー

一晩培養した培養物を、ＫＤＯ－N_3（４ｍＭ）を含有する新鮮培地で１０００倍に希釈し（最終体積１００μｌ）、細菌を３７℃で１２時間インキュベートした後、リン酸緩衝液（０．０５Ｍ、ｐＨ７．５）を用いて遠心分離を室温下、１３０００×ｇで１分間行うことにより３回洗浄を行った。

【０１４５】
最終濃度がそれぞれ２ｍＭ、４ｍＭのＣｕＳＯ$_4$及びＴＧＴＡをリン酸緩衝液（０．０５Ｍ、ｐＨ７．５）中で３７℃において激しく振盪させながら一晩混合した。次に、最終濃度がそれぞれ４ｍＭ、５ｍＭ、０．１３ｍＭのアミノグアニジン、アスコルビン酸ナトリウム及びＡ４８８－インを、一晩混合させたＣｕＳＯ$_4$／ＴＧＴＡ混合物に添加した。最後に、細菌をこの溶液に再懸濁させた。５分、３０分、６０分又は１８０分後に、リン酸緩衝液を用いて遠心分離を室温下、１３０００×ｇで１分間行うことにより細胞を３回洗浄し、顕微鏡で分析した。
【０１４６】
２ｂ）蛍光顕微鏡分析
細菌をカバーガラス上に接種した後、希釈したＬＢ（１／１０、リン酸緩衝液中）で作製した薄い（厚さ１ｍｍ）半固形状１％寒天パッドで覆った。ＣｏｏｌＳＮＡＰ　ＨＱ　２カメラ（Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＳＡＲＬ、フランス）と１００×／１．４ＤＬＬ対物レンズを備えたエピ蛍光自動顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ　ＴＥ２０００－Ｅ－ＰＦＳ、Ｎｉｋｏｎ、フランス）を用いて画像を記録した。励起光を１２０Ｗメタルハライドライトから放射し、適切なフィルターを用いてシグナルをモニターした。上述の方法［５０，５１］に従って、カスタム自動化スクリプト（Ｖｉｓｕａｌ　Ｂａｓｉｃ）により、Ｍｅｔａｍｏｒｐｈ　７．５（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｆｒａｎｃｅ、フランス）の下でデジタル分析及び画像処理を行った。
【０１４７】
３）このアプローチをより強固なものとするために、ＫＤＯを利用する他の３種のグラム陰性菌（大腸菌Ｏ８６株、ネズミチフス菌（サルモネラ・ティフィムリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ））、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）Ｐａｒｉｓ株）について、その有効性と特異性を調べた。同様に、３種の陰性対照、すなわち、最近ＫＤＯの代わりに８－アミノ－８－デオキシ－ＫＤＯを利用することが示されたシュワネラ・オネイデンシス（Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓ）［２１］、及び、ＫＤＯを産生しない２種のグラム陽性菌（枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ））［２２］についても調べた。
【０１４８】
細菌株及び増殖条件は以下の通りであった。大腸菌Ｋ１２株、大腸菌Ｏ８６株及びネズミチフス菌（Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）１２０２３株をＭ９培地（カザミノ酸０．２％、グルコース０．２％、ＣａＣｌ$_2$ １ｍＭ、ＭｇＳＯ$_4$ ５ｍＭを共に含む）で増殖させ、Ｓ．オネイデンシス（Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓ）、枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）及び黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）はルリア－ベルターニ（ＬＢ）培地で増殖させ、Ｌ．ニューモフィラ（Ｌ．ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ　ｓｐ．）Ｐａｒｉｓ株は、Ｌ－システテイン、ピロリン酸第２鉄及びα－ケトグルタル酸塩（ＹＥＣ）を添加したイーストエキス培地で増殖させた。Ｓ．オネイデンシス（Ｓ．ｏｎｅｉｄｅｎｓｉｓ）（２８℃で増殖させた）を除く全ての菌株を回転式振盪機（１６０ｒｐｍ）内で３７℃で増殖させた。
【０１４９】
予想した通り、２種の大腸菌株、ネズミチフス菌及びＬ．ニューモフィラＰａｒｉｓ株の細胞表面が有効かつ明確に標識されていることが示され、また、Ｓ．オネイデンシス又はグラム陽性菌では、これらの細菌の細胞表面にはＫＤＯが存在しないことから、標識は確認できなかった（図４及び図５）。
【０１５０】
４）メンブランフィルター上でのインキュベーション及び反応
細菌を含有する試料を、０．４５ｍｍの細孔径を有する２５ｍｍ黒色ポリエステルメンブランフィルターを通して濾過した。ペトリ皿中、０．５％ピルビン酸塩又はカタラーゼ（酸素毒性作用から保護したもの）及びＫＤＯ－Ｎ$_3$（４ｍＭ）を添加した６５０μｌの栄

養培地（ｎｕｔｒｉｔｉｖｅ　ｂｒｏｔｈ）（対象とする細菌に応じて、異なる栄養培地を用いることができる）に浸したセルロースパッド（２５ｍｍ）上に個々のメンブランを置いた。試料の入ったペトリ皿を３７℃である一定時間（対象とする細菌によって異なる）インキュベートした。

【０１５１】

次に、最終濃度がそれぞれ２ｍＭ、４ｍＭの$CuSO_4$及びＴＧＴＡをリン酸緩衝液（０．０５Ｍ、ｐＨ７．５）中で３７℃において激しく振盪させながら一晩混合した。次に、最終濃度がそれぞれ４ｍＭ、５ｍＭ、０．１３ｍＭのアミノグアニジン、アスコルビン酸ナトリウム及びＡ４８８－インを、一晩混合させた$CuSO_4$／ＴＧＴＡ混合物に添加した。

【０１５２】

最後に、ペトリ皿中、６５０μｌのこの溶液に浸したセルロースパッド上に個々のメンブランを置き、室温で３０分間インキュベートした。

【０１５３】

ＣｏｏｌＳＮＡＰ　ＨＱ　２カメラ（Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＳＡＲＬ、フランス）と１００×／１．４ＤＬＬ対物レンズを備えたエピ蛍光自動顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ　ＴＥ２０００－Ｅ－ＰＦＳ、Ｎｉｋｏｎ、フランス）を用いて画像を記録した。励起光を１２０Ｗメタルハライドライトから放射し、適切なフィルターを用いてシグナルをモニターした。上述の方法［５０，５１］に従って、カスタム自動化スクリプト（Ｖｉｓｕａｌ　Ｂａｓｉｃ）により、Ｍｅｔａｍｏｒｐｈ　７．５（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｆｒａｎｃｅ、フランス）の下でデジタル分析及び画像処理を行った。

【０１５４】

５．結論として、ＫＤＯ類似体は、遺伝子工学的に改変された細菌を用いなくても代謝的に同化され、ＬＰＳに取り込まれることが実証された。より興味深いことに、修飾ＫＤＯがまず代謝的に同化されることが必要であり、これにより、代謝的に活性／生存しているグラム陰性菌を迅速に検出する（全工程が１日未満で終了）上記方法が使用できる。細菌株にもよるが、生存細菌の検出には通常２日から１ヶ月を超える期間が必要である事実を考慮すると、上記応用は非常に強力である。

【０１５５】

グラム陰性菌のなかには重大な病原体が隠れており、生存細胞を迅速に同定することは衛生上重要な課題である。したがって、本発明は、代謝的に活性なグラム陰性菌の細胞表面の標識を、修飾ウロソン酸又はウロソン酸塩残基（ＫＤＯなど）をそのリポ多糖に代謝的に取り込ませた後、クリックケミストリーを用いてさらに結合させることにより行う簡易な方策を提供する。

【０１５６】

当然ながら、$KDO-N_3$の同化の後、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）［２４］や、所望の生存細菌を特異的に検出できる他の周知の方法を組合せてもよい。

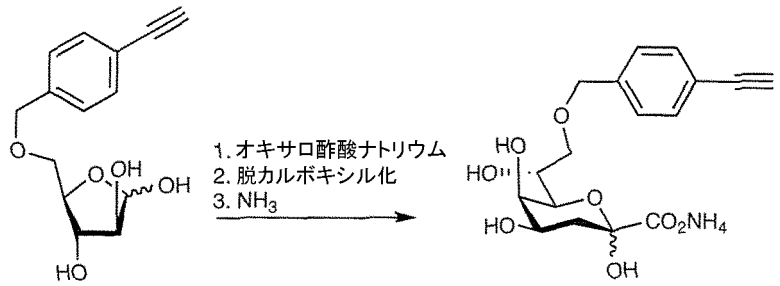
【０１５７】

微生物の進化や生態環境に対するリボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）アプローチは、環境微生物学と一体化したものとなっている。オリゴヌクレオチドプローブは、ｒＲＮＡの斑状の保存に基づいて、種レベルから門のレベルまで、あるいはドメインのレベルまでの特異性を有するように設計することができる。これらのプローブは、例えば蛍光色素やホースラディッシュペルオキシダーゼ酵素などで標識される場合、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）［３８］によって直接微生物の単一細胞を同定するために用いることができる。特異的にファージを用いる新しいアプローチも提案されている［３９］。

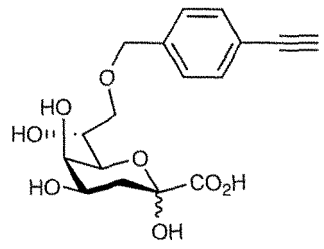
【０１５８】

実施例２：８－Ｏ－（４－エチニルベンジル）－３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソ

ン酸（ＫＤＯ－ＣＣＨ）の同化
【０１５９】
本化合物８－Ｏ－（４－エチニルベンジル）－３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸又はその塩（８－Ｏ－（４－エチニルベンジル）－３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸塩）（化合物（Ｉａ－１）の類似体）は、以下のプロセスによって調製することができる。
【０１６０】
【化１４】

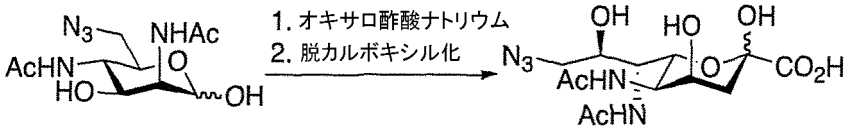


【０１６１】
５－Ｏ－（４－エチニルベンジル）－Ｄ－アラビノフラノースの冷水溶液をオキサロ酢酸水溶液に添加することができ、そのｐＨをＮａＯＨ水溶液を添加して約１０．５～１１に調整する。室温で撹拌した後、その溶液を中和し、８０℃で短時間加熱することができる。
【０１６２】
ＡｃＯＨを用いてｐＨを約７に調整した後、混合物をホルメート樹脂上でアニオン交換クロマトグラフィーによって精製することができる。水を用いて最初の溶出を行った後、濃度勾配をつけたギ酸を用いてさらに溶出させ、凍結乾燥し、酸性樹脂で処理し、アンモニアで中和し、濃縮することにより、８－Ｏ－（４－エチニルベンジル）－３－デオキシ－Ｄ－マンノ－オクツロソン酸アンモニウムを得ることができる。
【０１６３】
その後、細菌ＬＰＳへの上記化合物の取り込み及び標識は、アジド由来の標識化分子を使用し、ＫＤＯ－Ｎ$_3$（実施例１）の場合と同様の試薬及び方法を用いて行うことができる。
【０１６４】
ＫＤＯ－ＣＣＨ（アンモニアによる中和前）：
【０１６５】
【化１５】

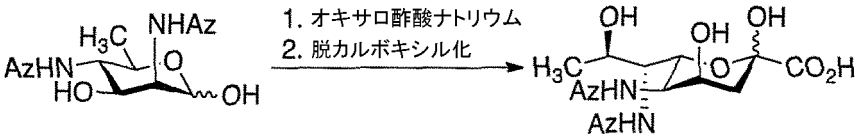


【０１６６】
実施例３：９－アジド－５，７－ジアセトアミド－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸の同化及びレジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）菌の特異的検出
本化合物９－アジド－５，７－ジアセトアミド－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸又はその塩（９－アジド－５，７－ジアセトアミド－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸塩）（化合物（Ｉｂ－１）の類似体）は以下のプロセスによって調製することができ

る［５２］。
【０１６７】
【化１６】



【０１６８】
６－アジド－２，４－ジアセトアミド－２，４，６－トリデオキシ－Ｄ－マンノピラノースは、オキサロ酢酸水溶液に添加することができ、そのｐＨをＮａＯＨ水溶液を添加して約１０．５～１１に調整し、混合物を四ホウ酸ナトリウムの存在下又は非存在下、室温で撹拌する。良好な転化率を確保するためにさらにオキサロ酢酸を添加することが必要な場合もある。酸性樹脂を用いて中和し、ろ過し、濃縮して体積を少なくした後、溶液をホルメート樹脂にアプライし、水で洗浄し、ギ酸で溶出することができる。例えば逆相ＨＰＬＣなどによってさらに精製することが必要な場合もある。
【０１６９】
その後、細菌ＬＰＳへの上記化合物の取り込み及び標識は、ＫＤＯ（実施例１）の場合と同様の反応性基、試薬及び方法を用いて行うことができる。
【０１７０】
実施例４：５，７－ジアジドアセトアミド－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸の同化及びレジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）菌の特異的検出
【０１７１】
本化合物５，７－ジアジドアセトアミド－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸又はその塩（５，７－ジアジドアセトアミド－３，５，７，９－テトラデオキシ－Ｄ－グリセロ－Ｄ－タロ－ノヌ－２－ウロソン酸塩）（化合物（Ｉｂ－１）の類似体）は、２，４－ジアジドアセトアミド－２，４，６－トリデオキシ－Ｄ－マンノピラノースとオキサロ酢酸の反応によって上述の実施例２と同様に調製することができる。
【０１７２】
【化１７】



Ａｚ＝アジドアセチル基
【０１７３】
その後、細菌ＬＰＳへの上記化合物の取り込み及び標識は、ＫＤＯの場合と同様に行うことができる。
【０１７４】
実施例５：種々の培養培地の使用
培養培地の種類は限定されないが、Ｍ９及びＬＢの大腸菌培養培地を用いると両方ともに首尾よく試験できた。
【０１７５】
１）材料及び方法
１．１）細菌株及び増殖条件
Ｍ９培地（カザミノ酸０．２％、グルコース０．２％、$CaCl_2$ １ｍＭ、$MgSO_4$ ５ｍＭを共に含む）又はルリア－ベルターニ（ＬＢ）培地で増殖させた大腸菌Ｋ１２野生株［５４］。細胞は、回転式振盪機（２００ｒｐｍ）内で３７℃で増殖させた。
【０１７６】

１．２）銅を触媒とするクリックケミストリー
一晩培養した培養物をＫＤＯ－Ｎ$_3$（１ｍＭ）を含有する新鮮培地で１００倍に希釈し（最終体積２００μｌ）、細菌を３７℃で１２時間インキュベートした後、リン酸緩衝液（０．０５Ｍ、ｐＨ７．５）を用いて遠心分離を室温下、１４０００×ｇで２分間行うことにより３回洗浄を行った。
【０１７７】
ＣｕＳＯ$_4$とＴＧＴＡをそれぞれ最終濃度２ｍＭ、４ｍＭで含有するクリック用予混合物をリン酸緩衝液（０．０５Ｍ、ｐＨ７．５）中で３７℃において激しく振盪させながら一晩インキュベートした。次に、一晩インキュベートしたクリック用予混合物に、最終濃度がそれぞれ４ｍＭ、５ｍＭ、０．１３ｍＭのアミノグアニジン、アスコルビン酸ナトリウム及びＡ４８８－インを添加した。その後、この溶液に細菌を再懸濁し、振盪しながら３７℃で３０分間インキュベートした。最後に、リン酸緩衝液を用いて遠心分離を室温下、１４０００×ｇで２分間行うことにより細胞を３回洗浄した。
【０１７８】
１．３）蛍光顕微鏡分析
カバーガラス上に接種し、希釈したＬＢ（１／１０、リン酸緩衝液中）で作製した薄い（厚さ１ｍｍ）半固形状１％寒天パッドで覆った状態の細菌に対して銅クリックケミストリーを行った後、顕微鏡分析を行った。ＣｏｏｌＳＮＡＰ　ＨＱ　２カメラ（Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＳＡＲＬ、フランス）と１００×／１．４ＤＬＬ対物レンズを備えたエピ蛍光自動顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ　ＴＥ２０００－Ｅ－ＰＦＳ、Ｎｉｋｏｎ、フランス）を用いて画像を記録した。励起光を１２０Ｗメタルハライドライトから放射し、適切なフィルターを用いてシグナルをモニターした。カスタム自動化スクリプト（Ｖｉｓｕａｌ　Ｂａｓｉｃ）により、Ｍｅｔａｍｏｒｐｈ　７．５（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｆｒａｎｃｅ、フランス）の下でデジタル分析及び画像処理を行った。
【０１７９】
２）結果
どの培養培地を用いてもＫＤＯの同化は起こる。
【０１８０】
ＬＢ培地から得た６１６個の大腸菌細胞と最小培地（Ｍ９）から得た５９８個の大腸菌細胞について分析を行った。
【０１８１】
細胞をＬＢ培地で増殖させた場合の方がＭ９培地で増殖させた場合と比べてより高いＫＤＯの同化率が得られる。しかしながら、これらの培地は両方ともに使い勝手がよく、培養可能な細菌を検出し、定量化するのに充分である。
【０１８２】
実施例６：培養可能／生菌である大腸菌細胞と死菌の大腸菌細胞の検出及び計数
両方ともに数が既知の、増殖することができる培養可能な大腸菌と死菌の大腸菌をＫＤＯ－Ｎ$_3$に接触させた。ＫＤＯ－Ｎ$_3$は、大腸菌の生菌にのみ取り込まれていた。ＫＤＯ－Ｎ$_3$は大腸菌の全ての生菌に取り込まれていた。
【０１８３】
１）材料及び方法
１．１）細菌株及び増殖条件
大腸菌Ｋ１２株は、回転式振盪機（２００ｒｐｍ）内でルリア－ベルターニ（ＬＢ）培地において３７℃で増殖させた。１２０℃で１５分間加熱した後に大腸菌Ｋ１２株の死菌を得た。
【０１８４】
１．２）銅を触媒とするクリックケミストリー（実施例５に開示）
【０１８５】
１．３）細菌の計数及び蛍光顕微鏡分析

１．３．１）全細菌スコアを付けるために、細胞を固定化し、パラホルムアルデヒド３％－ＤＡＰＩ２μｇ／ｍｌの溶液で染色し、アイソポアポリカーボネートメンブラン（Ｍｉｌｉｐｏｒｅ）上でろ過した。

【０１８６】

１．３．２）コロニー形成ユニット（ＣＦＵ）も、銅クリックケミストリー前に希釈物を平板培養することによりモニターした。

【０１８７】

１．３．３）カバーガラス上に接種し、希釈したＬＢ（１／１０、リン酸緩衝液中）で作製した薄い（厚さ１ｍｍ）半固形状１％寒天パッドで覆った状態の細菌に対して銅クリックケミストリーを行った後、顕微鏡分析を行った。ＣｏｏｌＳＮＡＰ　ＨＱ　２カメラ（Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｐｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＳＡＲＬ、フランス）と１００×／１．４ＤＬＬ対物レンズを備えたエピ蛍光自動顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ　ＴＥ２０００－Ｅ－ＰＦＳ、Ｎｉｋｏｎ、フランス）を用いて画像を記録した。励起光を１２０Ｗメタルハライドライトから放射し、適切なフィルターを用いてシグナルをモニターした。カスタム自動化スクリプト（Ｖｉｓｕａｌ　Ｂａｓｉｃ）により、Ｍｅｔａｍｏｒｐｈ　７．５（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｆｒａｎｃｅ、フランス）の下でデジタル分析及び画像処理を行った。

【０１８８】

２）結果

２．１）１．３．１）に開示した全スコア付けによって算出した全細胞濃度は9×10^{9}　＋／－　0.1×10^{9}ｃｅｌｌ／ｍｌであり、１．３．２）に開示したコロニーの計数によって計数した培養可能な細胞の濃度は、4×10^{9}　＋／－　0.15×10^{9}ｃｆｕ／ｍｌであった。これらの結果は、この試料に含まれる全細胞のうち４４．５％（＋／－４％）が培養可能な細胞であることを示している。

【０１８９】

２．２）段落１．２／１．３．３）に開示した、クリックケミストリー後の蛍光を用いた計数法により、以下のような結果が得られた。ある試料は$KDO-N_3$なしでインキュベートし、またある試料は$KDO-N_3$と共にインキュベートした。蛍光分析は、$KDO-N_3$を用いた１８７８個の大腸菌細胞と、$KDO-N_3$を用いていない３０３９個の大腸菌細胞について行った。これにより、任意の蛍光単位のしきい値（この値に達していない場合、細胞が死んでおり、これを上回っている場合、細胞が培養可能である）が３０であると決定することができた。次に、このしきい値（３０）を適用することにより、１．３．３）に示すようなクリックケミストリーを通じて反応した細菌について、死んでいると同定される細胞（３０未満）と、培養可能であると同定される細胞（３０超）を計数することができた。この評価を行うと、１５８７個の死細胞（$KDO-N_3-$）と１４５２個の培養可能な細胞（$KDO-N_3+$）が確認され、４７．７％が培養可能な細胞であることがわかった。この値は、死細胞及び培養可能な細胞を用いて得られる値（４４．５％）と統計学的に同一であると思われ、これは培養可能な細胞のみが本発明の方法によって検出されることを示している。

【０１９０】

実施例７：グラム陰性の培養可能な細胞のみの検出

グラム陽性菌（枯草菌）及びグラム陰性菌（大腸菌）の混合物を$KDO-N_3$に接触させた。培養可能なグラム陰性菌のみが$KDO-N_3$で標識され、検出された。

【０１９１】

１）材料及び方法

１．１）細菌株及び増殖条件

大腸菌Ｋ１２野生株をｍ－ｃｈｅｒｒｙを用いて蛍光性とし［５５］、大腸菌Ｋ１２　ｓｏｄＡ－ｍＣｈｅｒｒｙ株［５５］と枯草菌を回転式振盪機（２００ｒｐｍ）内でルリア－ベルターニ（ＬＢ）培地において３７℃で増殖させた。

【０１９２】

１．２）銅を触媒とするクリックケミストリー（実施例６に開示）
【０１９３】
１．３）細菌の計数及び蛍光顕微鏡分析（実施例５に開示）
【０１９４】
２）結果
枯草菌及び大腸菌をＬＢ培地で１２時間増殖させた。その後、大腸菌（１．６６×10^9ｃｆｕ／ｍｌ）及び枯草菌（５．９×10^8ｃｆｕ／ｍｌ）の培養可能な細胞の濃度を段落１．３２）に開示した計数法により特定した。それによると、枯草菌では２６％が培養可能な細胞、大腸菌では７４％が培養可能な細胞であった。
【０１９５】
また、大腸菌ｓｏｄＡ－ｍＣｈｅｒｒｙ株を使用していることから、上で開示したもの（但しクリックケミストリー前）と同様に蛍光を用いて大腸菌と枯草菌を識別することができた。６９６個の分析した細胞のうち、１７０個がｍＣｈｅｒｒｙ陰性であり（２４．４％）、これは結果として枯草菌を表しており、５２６個がｍＣｈｅｒｒｙ陽性であり（７５．６％）、これは結果として大腸菌を表している。これらの結果はｃｆｕ値から得られる割合によって確認されている。
【０１９６】
次に、同一の試料中の細菌全てに対して上述のクリックケミストリー反応を行い、蛍光を通じて計数を行った結果を以下の表１に示す。
【０１９７】
ＫＤＯ－N_3陰性細胞のうち、結果として枯草菌を表すｍＣｈｅｒｒｙ陰性細胞の数（１６６）と、結果として大腸菌数を表すｍＣｈｅｒｒｙ陽性細胞の数（９）を評価した。ＫＤＯ－N_3陽性細胞のうち、結果として枯草菌数を表すｍＣｈｅｒｒｙ陰性細胞の数（４）と、結果として培養可能な大腸菌数を表すｍＣｈｅｒｒｙ陽性細胞の数（５１７）を評価した。
【０１９８】
これらの値を全て用いると、４個（約２％）の枯草菌が偽陽性であることが特定できた。一方、標準法の誤差範囲がおおよそ１０％であることから、９個（約２％）のＫＤＯ陰性大腸菌が偽陽性か偽陰性である可能性がある。
【０１９９】
【表１】

	KDO-N3+	KDO-N3-	合計
mCherry +（大腸菌）	517	9	526
mCherry -（枯草菌）	4	166	170
合計	521	175	696

【０２００】
したがって、これらの上記結果から、ＫＤＯ－N_3が、実質的に、培養可能な大腸菌細胞のみにおいて充分に同化され、培養可能な枯草菌細胞においては同化されないことが実証される。
【０２０１】
実施例８：ビオチン－アルキンを用いた検出
Ｋｄｏ－N_3の同化の後、ビオチン－アルキンを用いてクリックケミストリーを行い、生存している大腸菌細胞を、蛍光色素であるＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　Ａ４９４と結合した

抗ビオチン抗体を用いて検出した。培養可能な細胞の計数及びＫｄｏ陽性細胞の計数と比較することでわかるように、生存している大腸菌全てを以下の実験手順によって検出した。

【０２０２】

１）細胞株及び増殖条件

大腸菌Ｋ１２野生株を回転式振盪機（２００ｒｐｍ）内でルリアーベルターニ（ＬＢ）培地において３７℃で増殖させる。

【０２０３】

２）銅を触媒とするクリックケミストリー：

一晩培養した培養物をＫＤＯ－$Ｎ_3$（１ｍＭ）を含有する新鮮培地（最終体積２００μｌ）で１００倍に希釈した。細菌を３７℃で１２時間インキュベートし、リン酸緩衝液（０．０５Ｍ、ｐＨ７．５）を用いて遠心分離を室温下、１４０００×ｇで２分間行うことにより３回洗浄を行った。$ＣｕＳＯ_4$とＴＧＴＡをそれぞれ最終濃度２ｍＭ、４ｍＭで含有するクリック用予混合物をリン酸緩衝液中で３７℃において激しく振盪させながら一晩インキュベートした。次に、一晩インキュベートしたクリック用予混合物に、最終濃度がそれぞれ４ｍＭ、５ｍＭのアミノグアニジン、アスコルビン酸ナトリウムを添加した。この「クリック用混合物」を洗浄後の培養物に添加し、ビオチンーアルキン（Ｃａｒｂｏｓｙｎｔｈ）（１～１００μｇ）を補充し、あるいは補充せずに、振盪下、３７℃で１～６０分間インキュベートした。

【０２０４】

３）細菌の計数及び蛍光顕微鏡分析：

銅クリックケミストリーの前後でいずれも全細菌スコアを付けるために、細胞を固定化し、パラホルムアルデヒド３％－ＤＡＰＩ２μｇ／ｍｌの溶液で染色し、アイソポアポリカーボネートメンブラン（Ｍｉｌｉｐｏｒｅ）上でろ過した。

【０２０５】

Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ Ａ５９４（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｓｈ）と結合した抗ビオチン抗体を、標識した細菌に対して１０～１０００倍に希釈して使用した。コロニー形成ユニット（ＣＦＵ）も、銅クリックケミストリー前に希釈物を平板培養することによりモニターした。

【０２０６】

カバーガラス上に接種し、希釈したＬＢ（１／１０、リン酸緩衝液中）で作製した薄い（厚さ１ｍｍ）半固形状１％寒天パッドで覆った状態の細菌に対して銅クリックケミストリーを行った後、顕微鏡分析を行った。ＣｏｏｌＳＮＡＰ ＨＱ ２カメラ（Ｒｏｐｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｒｏｐｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＳＡＲＬ、フランス）と１００×／１．４ＤＬＬ対物レンズを備えたエピ蛍光自動顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ ＴＥ２０００－Ｅ－ＰＦＳ、Ｎｉｋｏｎ、フランス）を用いて画像を記録した。励起光を１２０Ｗメタルハライドライトから放射し、適切なフィルターを用いてシグナルをモニターした。カスタム自動化スクリプト（Ｖｉｓｕａｌ Ｂａｓｉｃ）により、Ｍｅｔａｍｏｒｐｈ ７．５（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ Ｆｒａｎｃｅ、フランス）の下でデジタル分析及び画像処理を行った。

【０２０７】

引用文献

［1］Ｅ．Ｓｌｅｔｔｅｎ，Ｃ．Ｒ．Ｂｅｒｔｏｚｚｉ，Ａｃｃ．Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．２０１１，ｉｎ ｐｒｅｓｓ，ＤＯＩ：１０．１０２１／ａｒ２００１４８ｚ；Ｍ．Ｂｏｙｃｅ，Ｃ．Ｒ．Ｂｅｒｔｏｚｚｉ，Ｎａｔｕｒｅ ｍｅｔｈｏｄｓ ２０１１，８，６３８－６４２；Ｄ．Ｈ．Ｄｕｂｅ，Ｋ．Ｃｈａｍｐａｓａ，Ｂ．Ｗａｎｇ，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．２０１１，４７，８７－１０１；Ｓ．Ｔ．Ｌａｕｇｈｌｉｎ，Ｃ．Ｒ．Ｂｅｒｔｏｚｚｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ２００９，１０６，１２－１７；Ｊ．Ｄｕ，Ｍ．Ａ．Ｍｅｌｅｄｅｏ，Ｚ．Ｗａｎｇ，Ｈ．Ｓ．Ｋｈａｎｎａ，Ｖ．Ｄ．Ｐ．Ｐａｒｕｃｈｕｒｉ，Ｋ．Ｊ．Ｙａｒｅｍａ，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ２

００９，１９，１３８２－１４０１；Ｓ．Ｒ．Ｈａｎｓｏｎ，Ｗ．Ａ．Ｇｒｅｅｎｓｂｅｒｇ，Ｃ．－Ｈ．Ｗｏｎｇ，ＱＳＡＲ　Ｃｏｍｂ．Ｓｃｉ．２００７，２６，１２４３－１２５３．

【０２０８】

［２］Ｌ．Ｙａｎｇ，Ｊ．Ｏ．Ｎｙａｌｗｉｄｈｅ，Ｓ．Ｇｕｏ，Ｒ．Ｒ．Ｄｒａｋｅ，Ｏ．Ｊ．Ｓｅｍｍｅｓ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　２０１１，１０，Ｍ１１０．００７２９４．

【０２０９】

［３］イーストグリカンに対する応用例として、Ｍ．Ａ．Ｂｒｅｉｄｅｎｂａｃｈ，Ｊ．Ｅ．Ｇ．Ｇａｌｌａｇｈｅｒ，Ｄ．Ｓ．Ｋｉｎｇ，Ｂ．Ｐ．Ｓｍａｒｔ，Ｐ．Ｗｕ，Ｃ．Ｒ．Ｂｅｒｔｏｚｚｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２０１０，１０７，３９８８－３９９３を参照のこと。

【０２１０】

［４］Ｗ．Ｙｉ，Ｘ．Ｌｉｕ，Ｙ．Ｌｉ，Ｊ．Ｌｉ，Ｃ．Ｘｉａ，Ｇ．Ｚｈｏｕ，Ｗ．Ｚｈａｎｇ，Ｗ．Ｚｈａｏ，Ｘ．Ｃｈｅｎ，Ｐ．Ｇ．Ｗａｎｇ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２００９，１０６，４２０７－４２１２．

【０２１１】

［５］例えば、Ｇ．Ｓａｍｕｅｌ，Ｊ．－Ｐ．Ｈｏｇｂｉｎ，Ｌ．Ｗａｎｇ，Ｐ．Ｒ．Ｒｅｅｖｅｓ，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．２００４，１８６，６５３６－６５４３；Ｂ．Ｍａ，Ｊ．Ｌ．Ｓｉｍａｌａ－Ｇｒａｎｔ，Ｄ．Ｅ．Ｔａｙｌｏｒ，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　２００６，１６，１５８Ｒ－１８４Ｒを参照のこと。

【０２１２】

［６］外因性Ｌ－フルコースは、実際に、Ｌ－ラクテート又はＬ－１，２－プロパンジオールへと代謝される。これにより、様々な代謝物中へ化学レポーターが拡散する原因が潜在的に証明される。Ｌ．Ｂａｌｄｏｍａ，Ｊ．Ａｇｕｉｌａｒ，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１９８８，１７０，４１６－４２１を参照のこと。

【０２１３】

［７］Ｌ．Ｃｉｐｏｌｌａ，Ｌ．Ｇａｂｒｉｅｌｌｉ，Ｄ．Ｂｉｎｉ，Ｌ．Ｒｕｓｓｏ，Ｎ．Ｓｈａｉｋｈ，Ｎａｔ．Ｐｒｏｄ．Ｒｅｐ．，２０１０，２７，１６１８－１６２９．

【０２１４】

［８］しかしながらＫＤＯを欠く生存大腸菌株が最近報告されている。Ｔ．Ｃ．Ｍｅｒｅｄｉｔｈ，Ｐ．Ａｇｇａｗａｌ，Ｕ．Ｍａｍａｔ，Ｂ．Ｌｉｎｄｎｅｒ，Ｒ．Ｗ．Ｗｏｏｄｗａｒｄ，ＡＣＳ　Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２００６，１，３３－４２を参照のこと。

【０２１５】

［９］Ｏ．Ｈｏｌｓｔ，ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．２００７，２７１，３－１１．

【０２１６】

［１０］Ｌ．Ｃｉｐｏｌｌａ，Ａ．Ｐｏｌｉｓｓｉ，Ｃ．Ａｉｒｏｌｄｉ，Ｐ．Ｇａｌｌｉａｎｉ，Ｐ．Ｓｐｅｒａｎｄｅｏ，Ｆ．Ｎｉｃｏｔｒａ，Ｃｕｒｒ．Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃｏｖ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．２００９，６，１９－３３．

【０２１７】

［１１］Ｊ．Ｏ．Ｃａｐｏｂｉａｎｃｏ，Ｒ．Ｐ．Ｄａｒｖｅａｕ，Ｒ．Ｃ．Ｇｏｌｄｍａｎ，Ｐ．Ａ．Ｌａｒｔｅｙ，Ａ．Ｇ．Ｐｅｒｎｅｔ，Ｊ．Ｂａｃｅｒｉｏｌ．１９８７，１６９，４０３０－４０３５．

【０２１８】

［１２］Ｃ．Ｗ．Ｔｏｒｎｏｅ，Ｃ．Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ，Ｍ．Ｍｅｌｄａｌ，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．２００２，６７，３０５７－３０６４；Ｖ．Ｖ．Ｒｏｓｔｏｖｔｓｅｖ，Ｌ．Ｇ．Ｇｒｅｅｎ，Ｖ．Ｖ．Ｆｏｋｉｎ，Ｋ．Ｂ．Ｓｈａｒｐｌｅｓｓ，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．２００２，４１，２５９６－２５９９．

【０２１９】
［１３］検討のために、Ａ．Ｂａｎａｓｚｅｋ，Ｊ．Ｍｌｙｎａｒｓｋｉ ｉｎ Ｓｔｕｄｉｅｓ ｉｎ Ｎａｔｕｒａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｖｏｌ．３０（Ｅｄ．：Ａｔｔａ－ｕｒ－Ｒａｈｍａｎ），Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，２００５，ｐｐ．４１９－４８２を参照のこと。
【０２２０】
［１４］本研究の最中に８－アジド－８－デオキシ－ＫＤＯへの非常に類似したアクセスが公表された。Ｒ．Ｗｉｎｚａｒ，Ｊ．Ｐｈｉｌｉｐｓ，Ｍ．Ｊ．Ｋｉｅｆｅｌ，Ｓｙｎｌｅｔｔ ２０１０，５８３－５８６．
【０２２１】
［１５］Ｍ．Ａ．Ｇｈａｌａｍｂｏｒ，Ｅ．Ｃ．Ｈｅａｔｈ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１９６３，１１，２８８－２９３．
【０２２２】
［１６］Ｉ．Ａ．Ｓｍｅｌｌｉｅ，Ｓ．Ｂｈａｋｔａ，Ｅ．Ｓｉｍ，Ａ．Ｊ．Ｆａｉｒｂａｎｋｓ，Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００７ ５，２２５７－２２６６．
【０２２３】
［１７］Ｓ．Ｍｕｌｌｅｒ－Ｌｏｅｎｎｉｅｓ，Ｂ．Ｌｉｎｄｎｅｒ，Ｈ．Ｂｒａｄｅ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２００３，２７８，３４０９０－３４１０１．
【０２２４】
［１８］Ｖ．Ｈｏｎｇ，Ｎ．Ｓ．Ｓｔｅｉｎｍｅｔｚ，Ｍ．Ｍａｎｃｈｅｓｔｅｒ，Ｍ．Ｇ．Ｆｉｎｎ，Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．２０１０，２１，１９１２－１９１６．
【０２２５】
［１９］Ａ．Ｂａｒｏｎ，Ｙ．Ｂｌｅｒｉｏｔ，Ｍ．Ｓｏｌｌｏｇｏｕｂ，Ｂ．Ｖａｕｚｅｉｌｌｅｓ，Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００８，６，１８９８－１９０１．
【０２２６】
［２０］Ｊ．Ａ．Ｍａｙ，Ａ．Ｃ．Ｓａｒｔｏｒｅｌｌｉ，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．１９７９，２２，９７１－９７６．
【０２２７】
［２１］Ｅ．Ｖｉｎｏｇｒａｄｏｖ，Ａ．Ｋｏｒｅｎｅｖｓｋｙ，Ｔ．Ｊ．Ｂｅｖｅｒｉｄｇｅ，Ｃａｒｂｏｈｙｄｒ．Ｒｅｓ．２００３，３３８，１９９１－１９９７；Ｓ．Ｌｅｏｎｅ，Ａ．Ｍｏｌｉｎａｒｏ，Ｃ．Ｄｅ Ｃａｓｔｒｏ，Ａ．Ｂａｉｅｒ，Ｅ．Ｌ．Ｎａｚａｒｅｎｋｏ，Ｒ．Ｌａｎｚｅｔｔａ，Ｍ．Ｐａｒｒｉｌｌｉ，Ｊ．Ｎａｔ．Ｐｒｏｄ．２００７，７０，１６２４－１６２７．
【０２２８】
［２２］Ｄ．Ｃ．Ｅｌｌｗｏｏｄ，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１９７０，６０，３７３－３８０．
【０２２９】
［２３］Ｂ．Ｌ．Ｒｉｄｌｅｙ，Ｂ．Ｓ．Ｊｅｙａｒｅｔｎａｍ，Ｒ．Ｗ．Ｃａｒｌｓｏｎ，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ２０００，１０，１０１３－１０２３．
【０２３０】
［２４］Ｍ．Ｗａｇｎｅｒ，Ｐ．Ｈ．Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ａ．Ｌｏｙ，Ｊ．Ｌ．Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｈ．Ｄａｉｍｓ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００６，１７，８３－９１．
【０２３１】
［２５］Ｒａｈｍａｎ，Ｉ．，Ｓｈａｈａｍａｔ，Ｍ．，Ｋｉｒｃｈｍａｎ，Ｐ．Ａ．，Ｒｕｓｓｅｋ－Ｃｏｈｅｎ，Ｅ．ａｎｄ Ｃｏｌｗｅｌｌ，Ｒ．Ｒ．（１９９４）Ｍｅｔｈｉｏｎｉｎｅ ｕｐｔａｋｅ ａｎｄ ｃｙｔｏｐａｔｈｏｇｅｎｉｃｉｔｙ ｏｆ ｖｉａｂｌｅ ｂｕｔ ｎｏｎｃｕｌｔｕｒａｂｌｅ Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ ｔｙｐｅ １．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６０，３５７３－３５７８．

【0232】
[26] Nwoguh, C. E., Harwood, C. R. and Barer, M. R. (1995) Detection of induced L-galactosidase activity in individual nonculturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay. Mol. Biol. 17, 545-554.
【0233】
[27] Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiol. 25, 415-420.
【0234】
[28] Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgeway, H. F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1801-1808.
【0235】
[29] Thom, S. M., Horobin, R. W., Seidler, E. and Barer, M. R. (1993) Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. J. Appl. Bacteriol. 74, 433-443.
【0236】
[30] Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H.-G., Jeskulke, K. and Mehrens, M. (1996) Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4587-4593.
【0237】
[31] Korgaonkar, K. S. and Ranade, S. S. (1966) Evaluation of acridine orange fluorescence test in viability studies of Escherichia coli. Can. J. Microbiol. 12, 185-190.
【0238】
[32] Porter, K. G. and Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. 25, 943-948.
【0239】
[33] Davey, H. M. and Kell, D. B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. Microbiol. Rev. 60, 641-696.
【0240】
[34] Parthuisot, N., Catala P., Lemarchand, K

., Baudart, J., and Lebaron, P. (2000) Evaluation of ChemChrome V6 for bacterial viability assessment in waters. J. ApplMicrobiol. 89, 370−380.
【0241】
[35] Breeuwer, P., and Abee, T. (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int. J. Food Microbiol. 10, 193−200.
【0242】
[36] Berney, M., Vital, M., Hulshoff, I., Weilenmann, HU, Egli, T., and Hammes, F. (2008) Rapid, cultivation−independent assessment of microbial viability in drinking water. Water Res. 4e, 4010−4018.
【0243】
[37] Rijpens, NP, and Herman, LM. (2002) J AOAC Int, 85, 984−995.
【0244】
[40] Cuny, C., Lesbats, M., and Dukan, S. (2007) Induction of a global stress response during the first step of Escherichia coli plate growth. Appl. Environ. Microbiol. 73, 885−889.
【0245】
[38] Amman, R. and Fuchs, B. M. Single−cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques (2008) Nature Reviews Microbiology, 6, 339−348.
【0246】
[39] Wu, L, Huang, T., Yang L;, Pan, J., Zhu, S., and Yan X. (2011) Sensitive and selective bacterial detection using tetracysteine−tagged phages in conjunction with biarsenical dye. Angew Chem Int Ed Engl. 50, 5873−5877.
【0247】
[41] Mackey, B. M., and Seymour, D. A. (1987) The effect of catalase on recovery of heat−injured DNA−repair mutants of Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 133, 1601−1610.
【0248】
[42] Marthi, B., Shaffer, B. T., Lighthart, B., and Ganio, L. (1991) Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2775−2776.
【0249】
[43] McDonald, L. C., Hackney, C. R. and Ray, B. (1983) Enhanced recovery of injured Esche

richia coli by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. Appl. Environ. Microbiol. 45, 360−365.
【0250】
[44] Dukan, S., Belkin, S. and Touati D. (1999) Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. Arch. Biochem. Biophys. 367, 311−316.
【0251】
[45] Dukan, S., and Nystrom, T. (1999) Oxidative stress defense and deterioration of growth−arrested Escherichia coli cells. J. Biol. Chem. 274, 26027−26032.
【0252】
[46] Ohtomo, R., and Saito, M. (2001) Increase in the culturable cell number of Escherichia coli during recovery from saline stress:possible implication for resuscitation from the VBNC state. Microb. Ecol. 42, 208−214.
【0253】
[47] Ray, B., Jezeski, J. J., and Busta, F. F. (1971) Effect of rehydration on recovery, repair, and growth of injured freeze−dried Salmonella anatum. Appl. Microbiol. 22, 184−189.
【0254】
[48] Speck, M. L., Ray, B., and Read, R. B. Jr. (1975) Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure. Appl. Microbiol. 29, 549−550.
【0255】
[49] Bogosian, G., and Bourneuf E. V. (2001) A matter of bacterial life and death. EMBO Rep. 2:770−774.
【0256】
[50] I. A. Smellie, S. Bhakta, E. Sim, A. J. Fairbanks, Org. Biomol. Chem. 2007 5, 2257−2266.
【0257】
[51] A. Ducret, E. Maisonneuve, P. Notareschi, A. Grossi, T. Mignot, S. Dukan, PLoS One, 2009, 4, e7282.
【0258】
[52] Y. E. Tsvetkov, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, U. Zahringer, Carbohydr. Res. 2001, 335, 221−243.
【0259】
[53] Valentin O. Rodionov, Stanislav I. Presolski, Sean Gardinier, Yeon−Hee Lim, and M.

G. Finn, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 12696−12704.

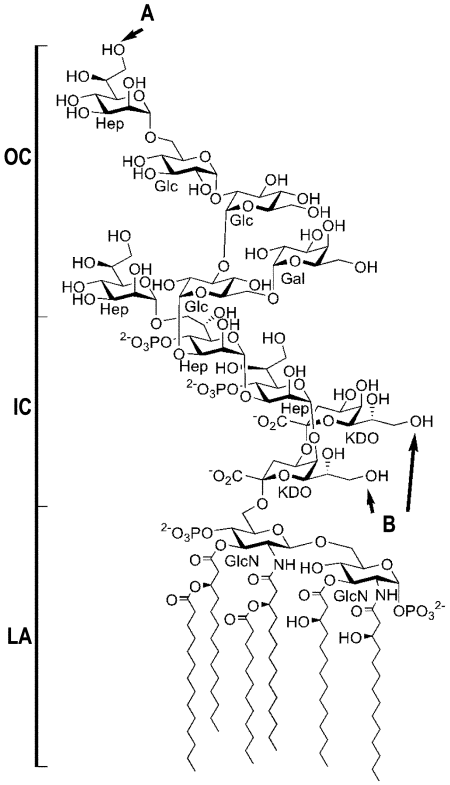
【0260】

[54] Bachmann BJ (1987) Derivations and genotypes of some mutant derivatives of Escherichia coli K−12. Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, SchaechterM&Umbarger HE, eds), pp. 1190−1219. American Society for Microbiology, Washington, DC.

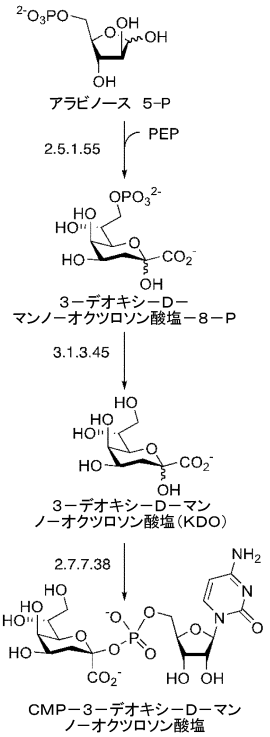
【0261】

[55] A. Ducret, E. Maisonneuve, P. Notareschi, A. Grossi, T. Mignot and S. Dukan (2009) A microscope automated fluidic system to study bacterial processes in real time. PLoS One. 2009 Sep 30;4(9):e7282.

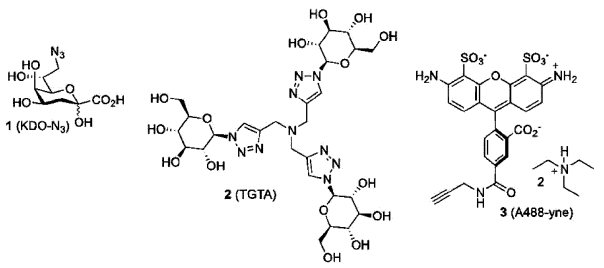
【図１Ａ】



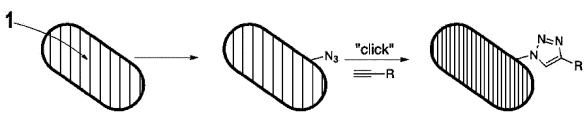
【図１Ｂ】



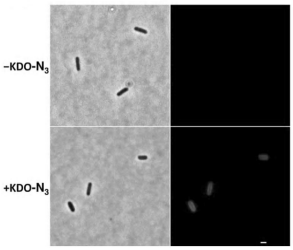
【図２Ａ】



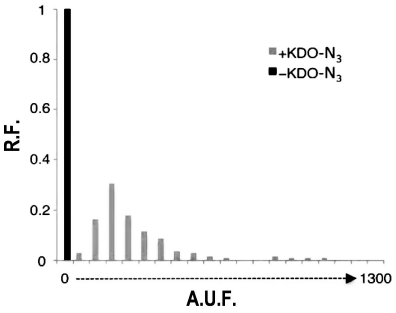
【図２Ｂ】



【図３Ａ】



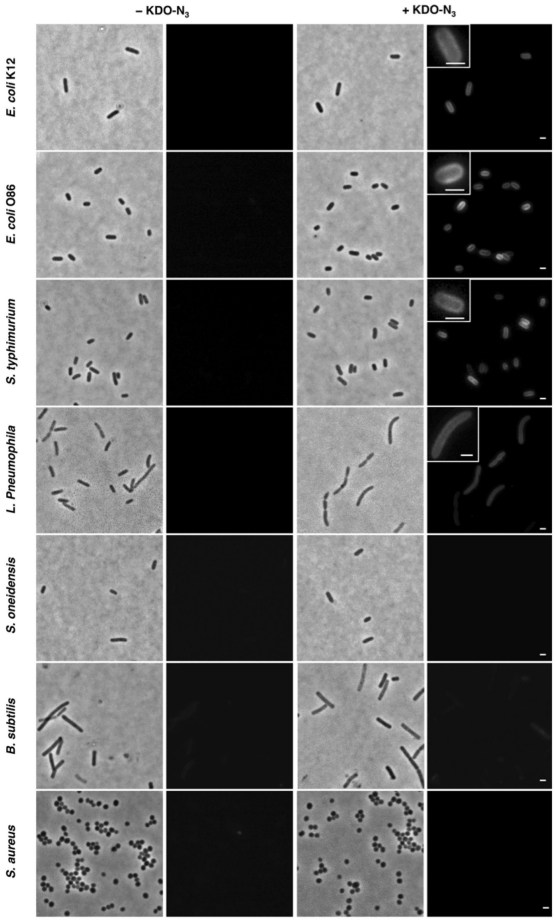
【図３Ｂ】



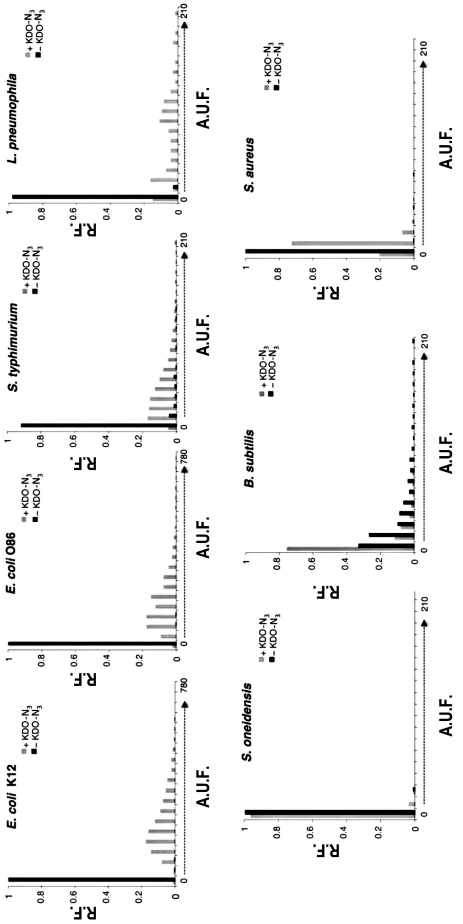
【図３Ｃ】



【図４】



【図５】



フロントページの続き

(72)発明者 デュモン, オードレ
フランス国 エフ－１３０１０ マルセイユ, リュ フランソワ モーリアック １０
(72)発明者 アワド, モンゼール
フランス国 エフ－９４２３０ カシャン, レジダンス ヴォルティ. アパルトマン ２０５, アヴニュ ドゥ ラ ディヴィジョン ルクレール ３４－３６
(72)発明者 マルロン, アニ
フランス国 エフ－９１４６０ マルクシ, アレ ルノワール ２
(72)発明者 ヴォゼイユ, ボリス
フランス国 エフ－９２３３０ ソー, アヴニュ デュ プレジダン ペ. ローズヴェルト １０

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 米国特許出願公開第２００８／０２６８４６８（ＵＳ，Ａ１）
特表２００２－５３２７１９（ＪＰ，Ａ）
特表昭６１－５００３５５（ＪＰ，Ａ）
Hong, V., et al., Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne-Azide Click Chemistry, Bioconjug Chem, ２０１０年, Vol.21, No.10, pp.1912-1916
Yi, W., et al., Remodeling bacterial polysaccharides by metabolic pathway engineering, Proc Natl Acad Sci USA, ２００９年, Vol.106, No.11, pp.4207-4212

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ １／００－ ３／００
Ｇ０１Ｎ ２１／７５－２１／８３
Ｇ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）