

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年5月1日 (01.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/035899 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/04, G01N 33/48 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中臣 康雄  
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/10982 (NAKATOMI, Yasuo) [JP/JP]; 〒959-1695 新潟県 五泉  
市 南本町一丁目 2 番 2 号 デンカ生研株式会社内  
(22) 国際出願日: 2002年10月23日 (23.10.2002) Niigata (JP). 波多野 ハツエ (HATANO, Hatsue) [JP/JP];  
〒959-1695 新潟県 五泉市 南本町一丁目 2 番 2 号 デ  
(25) 国際出願の言語: 日本語 ンカ生研株式会社内 Niigata (JP).  
(26) 国際公開の言語: 日本語 (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒  
105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5  
(30) 優先権データ: 特願 2001-325125 森ビル 3 階 Tokyo (JP).  
2001年10月23日 (23.10.2001) JP (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): デンカ DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
生研株式会社 (DENKA SEIKEN CO., LTD.) [JP/JP]; ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
〒103-0025 東京都 中央区 日本橋茅場町三丁目 4 番 LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
2 号 Tokyo (JP). NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SEPARATING BLOOD CELLS FROM MICROORGANISM IN BLOOD AND MEHTOD OF DE-TECTING MICROORGANISM IN BLOOD

(54) 発明の名称: 血液中の血球と菌の分離方法および血液中の菌の検出方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of separating blood cells from a microorganism contained in blood or a liquid culture medium of blood in case of detecting the microorganism in blood employed as a specimen; a method of detecting a microorganism; and a kit therefor. Namely, a method of separating blood cells from a microorganism contained in blood or a liquid culture medium of blood in case of detecting the microorganism in blood which comprises eliminating the blood cells by bringing into contact with an aqueous solution of an alkali metal hydroxide or carbonate, an alkaline earth metal hydroxide or carbonate or an amine or an aqueous solution of a mixture thereof; a method of detecting a microorganism with the use of this separation method; and a detection kit.

(57) 要約:

本発明は血液を検体として該検体に含まれる菌を検出する際の血液または血液の液体培地培養液中に含まれる血球と菌の分離方法、菌の検出方法および検出キットに関するものである。本発明は、血液中の菌を検出する際の血液または血液の中の菌の液体培地培養液中に含まれる血球と菌を分離する方法であって、アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより血球を除去することを含む、血球と菌の分離方法、ならびに該分離方法を用いた菌の検出方法および検出キットを提供する。



WO 03/035899 A1



TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 血液中の血球と菌の分離方法および血液中の菌の検出方法

## 技術分野

本発明は血液を検体として該検体に含まれる菌を検出する際の液体培地培養液中に含まれる血球と菌の分離方法に関するものである。

## 背景技術

血液を検体として該検体に含まれる菌を検出する際の培養は主に敗血症、菌血症など血流中に細菌の存在が疑われる場合に行われている。このような場合、患者は重篤であることが多く早急に適切な化学療法が要求される。従来技術において、敗血症血液検査は次のように行われている。

(1) 細菌培養用液体培地約30mL～100mLに採取した血液2～5 mLを接種し、直ちに30～37℃で培養する。

(2) 菌の発育が認められるまで1～14日間毎日観察を行う。菌の発育は、培地の濁度、細菌による培地中のガスの発生、pHの変化などによって判断する。

(3) 菌の発育が確認された後、培養液を採取してグラム染色及び形態観察が行われ、染色所見と形態の特徴により大まかな菌種の分類、及び観察される菌が単一か複数かなどを確認する。

(4) 培養液中の血球等と菌を分離するために、培養液の一部を一般的細菌が生育する固形培地に接種して培養する。固形培地上に増殖した菌はその後の同定検査等に供されるが、この時、グラム染色所見で単一の菌種であり、固形培地上のコロニーが均一な場合は、血液中に存在していた菌の種類が単一（純培養状）と仮定し、直ちに固形培地上の菌が同定検査、感受性検査等に供されることがある。一方、グラム染色所見で複数の菌種が観察されたり、固形培地上に明らかに異なった形状のコロニーが増殖した場合は、それぞれのコロニーを釣菌し、単一菌形状のコロニー（集落）のみが発育するようになるまで培養を繰り返す。

(5) 純培養されたコロニーを釣菌し、生化学性状検査による菌種の同定、あるいは抗菌薬感受性検査による治療薬の検索を行う。

上記のような従来の技術の菌検出法では、検体の採取から菌の同定まで日数が掛かっていた。敗血症、菌血症が疑われる場合には患者は重篤であることが多く、早急に適切な化学療法が要求される。しかし、従来の方法では操作を簡略化しても血液培養試験で菌が検出された以降も、その後の検査に最低3～4日は必要とするため、その間患者は適切な治療が施されず大きな負担となっていた。

このような問題を解決するために、培養液中の血球等と菌の分離が検討されていた。しかし、これまで、血液培養液中の血球と菌の分離方法については、菌と血球の比重の違いに基づいた血清分離剤入りスピッツなどを用いて簡便に菌と血球を分離する方法が開発されてきたが、分離効果は不十分で菌の画分に血球が残存することが多く、該画分を用いて直接菌の検査を行うことは困難であった。

結局、従来は血液培養液中の血球等と菌を分離するには、さらに培養を行う必要があり、迅速な検出を行うことはできなかった。

#### 発明の開示

本発明は、血液を検体として該検体に含まれる菌を検出するに際して、培養液中の血球等と菌を分離するために、培養液の一部を一般的細菌が生育する固形培地に接種して培養することなく、液体培地培養液中に含まれる血球と菌を分離する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、血液を検体として用いる液体培養試験において菌の発育が認められた場合、該培養液中の菌の同定に際して、血液成分である血球等が菌種の同定の妨げになることに鑑み、鋭意検討の結果、血球等と菌が含まれる液体培地培養液をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより血球等を除去し、血球等と菌を分離することができることを見出し本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

(1) 血液中の菌を検出する際の血液中の菌の液体培地培養液中に含まれる血球と菌を分離する方法であって、血液中の菌の液体培地培養液をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより血球を除去

することを含む、血球と菌を分離する方法。

(2) 前記水溶液のpHが11以上である、(1)の分離方法。

(3) 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン、あるいはこれらの混合物の濃度が0.01 M~1.0 Mである、(2)の血球と菌の分離方法。

(4) 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンが水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよびトリエタノールアミンからなる群から選択される、(1)~(3)のいずれかの血球と菌の分離方法。

(5) 血液中の菌を検出する方法であって、被験血液をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより該血液中の血球を除去し、血球を除去した血液中の菌を検出する方法。

(6) 血液中の菌を検出する方法であって、被験血液を接種した液体培地を培養し菌を増殖させ、該液体培地をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより該液体培地中の血球を除去し、血球を除去した液体培地中の菌を検出する方法。

(7) 前記水溶液のpHが11以上である、(5)または(6)の菌を検出する方法。

(8) 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン、あるいはこれらの混合物の濃度が0.01 M~1.0 Mである、(5)~(7)のいずれかの菌を検出する方法。

(9) 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンが水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよびトリエタノールアミンからなる群から選択される、(5)~(8)のいずれかの菌を検出する方法。

(10) 検出する菌が、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、大腸菌0157株、A群溶連菌からなる群から選択される、(5)~(9)のいずれかの菌を検出する方法。

(11) アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン、ならびに菌を検出するための試薬を含む、血液中の菌を分離検出するためのキット。

(12) さらに、菌を含む血液を培養するための液体培地を含む、(11)記載の血液中の菌を分離検出するためのキット。

(13) 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンが水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよびトリエタノールアミンからなる群から選択される、(11)または(12)の血液中の菌を分離検出するためのキット。

(14) 菌を検出するための試薬がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌、大腸菌0157株、A群溶連菌からなる群から選択される菌を検出するための試薬である、(11)～(13)のいずれかの血液中の菌を分離検出するためのキット。

好適と考える本発明の実施の形態を、その作用効果を示して詳細に説明する。

本発明において、被験体として用いる動物種は限定されず、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ等の敗血症、菌血症等の疾患にかかる動物のものをを用いる。本発明の対象となる菌としては、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、大腸菌、緑膿菌、腸球菌、カンジダ、溶連菌等の連鎖球菌等が挙げられるが、特に限定はされず、上記疾病に関するあらゆる細菌・真菌などがこれにあたる。

まず、細菌培養用液体培地約30mL～100mLに被験体より採取した血液2～10mL接種し、直ちに30～37℃で培養する。この際、液体培地としてトリプチケースソイブロス、ブレインハートインフュージョンブロス、普通ブイヨン、ミューラーヒントンブロス、ハートインフュージョンブロスなどが挙げられるが、特に限定されるものではない。次に、菌の発育が認められるまで1～14日間毎日観察を行う。菌の発育は、培地の濁度、細菌による培地中のガスの発生、pHの変化、培地中の炭酸ガス濃度の変化などによって判断する。菌の発育が確認された後、培養液を採取してグラム染色及び形態観察が行われ、染色所見と形態の特徴により大まかな菌種の分類、及び観察される菌が単一か複数かなどを確認する。

その後、血球等と細菌を含む液体培地培養液を、アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と混合し接触させる。

アルカリ金属またはアルカリ土類金属の水酸化物の例として、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ルビジウム、水酸化セシウム、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム、水酸化ストロンチウム、水酸化バリウムを挙げることができ、これらのうち、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムが好ましい。また、アルカリ金属またはアルカリ土類金属の炭酸塩の例として、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸ルビジウム、炭酸セシウム、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸ストロンチウム、炭酸バリウムを挙げることができ、これらのうち、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム及び炭酸カリウムが好ましい。また、本発明の方法に用いることができるアミンの例として、トリエタノールアミン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、水酸化アミンなどを挙げることができる。

液体培地培養液はそのままアルカリ金属水酸化物等と接触させてもよいし、一旦、液体培地培養液の適当量を遠心分離し、上清を捨て、血球と菌が混在する沈渣を得て、この沈渣をアルカリ金属水酸化物等と接触させてもよい。この際の遠心分離は、800～5000Gで行うことが望ましい。この沈渣には血球と菌が混在する。

また、免疫学的手法により、すなわち菌に対する抗体を用いた検出方法により菌を検出する場合は、血球と菌の混合物（溶液または沈渣）をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させる前に、上述のように菌を増殖させることが好ましい。一方、菌の遺伝子を増幅させて菌を検出するPCR等の遺伝子検査では、菌を増殖させることなく、血球と菌の混合物をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより、血球のみを除去でき血球の影響なしに菌の遺伝子を増幅させることができ、より迅速に菌の存在を検出することができる。この際、血液をそのまま、または生理食塩水、適当な緩衝液等で希釈した後に、アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させて、血液中の菌の遺伝子を検出することができる。また、血液または生理食塩水、適当な緩衝液等で希釈した血液を遠心分離し、血球と菌を含む沈渣を得て、その沈渣をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカ

り土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させても、血液中の菌の遺伝子を検出することができる。

接触させる温度、時間は特に限定されないが、血液中の血球が破壊され、血球を構成する成分が溶解される条件ならばよく、好ましくは2~37℃、数秒~数分程度がよく、攪拌などにより均一に接触させることはより効果を高めるためには望ましい。この結果、血球は破壊され、血球を構成する成分は上記水溶液に溶解されるが、菌は溶解されないため、これを遠心分離することにより、血球などの夾雑物質を効率よく分離することができ、遠心分離の沈渣からは高純度の菌を得ることができる。

また、接触させるアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液のpHは、血液中の血球が破壊され、血球を構成する成分が溶解されるが菌の構成成分が溶解されないpHならばよく、該水溶液と接触させる血球および菌の混合物が沈査の場合は、好ましくは9以上であり、さらに好ましくは10以上であり、特に好ましくは11以上である。血球と菌を含む液体培地培養液をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させるとき、または血液をそのまま、または生理食塩水、適当な緩衝液等で希釈した後に、アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させるときは、接触後の溶液の最終pHが好ましくは9以上、さらに好ましくは10以上、特に好ましくは11以上になるようにアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液を調整しておけばよい。この調整は、接触に用いる血球と菌を含む溶液およびアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液の体積比により適宜変更できる。

このときの、前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液の濃度は、pHが上記範囲になるような濃度が好ましい。その濃度としては、該水溶液と接触させる血球および菌の混合物が沈査の場合は、0.01 M~1.0 Mが好ましい。血球と菌を含む液体培地



培養液をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させるとき、または血液をそのまま、もしくは生理食塩水、適当な緩衝液等で希釈した後に、アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させるときは、接触後の溶液の最終濃度が上記濃度になるように接触させるアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン、あるいはこれらの混合水溶液の濃度を調整しておけばよい。この調整は、接触に用いる血球と菌を含む溶液およびアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液の体積比により適宜変更できる。例えば、血球と菌を含む被験液10mLと水酸化ナトリウム溶液10mLを混合し、水酸化ナトリウムの最終濃度を0.1Mにする場合には、0.2Mに調整した水酸化ナトリウム溶液10mLを血球と菌を含む被験液10mLと接触混合すればよい。

血球が破壊溶解された溶液から遠心分離により最終的に得られた菌は、MRSA-LA「生研」（デンカ生研社製）、病原大腸菌免疫血清0157「生研」（デンカ生研社製）、A群溶連菌検出用キット、AストレプトAD「生研」（デンカ生研社製）等の市販の凝集法、ELISA法、ウエスタンブロット法による細菌検査試薬を用いて検出することができる。また、菌のDNAをPCR法等により検出する場合も、菌のDNAを公知手段で抽出し、市販のDNA検査試薬を用いて、検出することができる。

従って、本発明で用い得るアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンおよび菌の検査試薬を組み合わせることにより、迅速かつ正確に血液中の菌を検出できる、菌検出キットを構成することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕 血液中のMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）の検出

血液培養： 抗凝固剤を添加したウマ血液10mLにMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）、またはMSSA（メチシリン感受性黄色ブドウ球菌）を $10^8$ cfu/mL含む菌液を1白金耳量（0.001~0.0015mL）添加し、このうち8mLを血液培養用液体培地入りボトル（BBLセプティチェックTSB（登録商標））に接種し、35℃で一晩培養した。

MRSA株： ANJ-10 [mecA (+) /PCR, MIPPC (R) /KBディスク]

ANJ-12 [mecA (+) /PCR, MIPPC (R) /KBディスク]

ANJ-131 [mecA (+) /PCR, MIPPC (R) /KBディスク]

ATCC43300 [mecA (+) /PCR, MIPPC (R) /KBディスク]

MSSA株： ATCC25923 [mecA (-) /PCR, MIPPC (S) /KBディスク]

FDA209P [mecA (-) /PCR, MIPPC (S) /KBディスク]

培養液10mLを採取した後、これを1500Gで15分間遠心した。ここで得られた沈渣は、赤血球の存在により赤色であり、一部を採取してグラム染色後に顕微鏡観察したところ、グラム陽性球菌と血球が観察された。

遠心後、上清を廃棄して残った沈渣に0.1M水酸化ナトリウム溶液を5mL添加し、試験管ミキサーを用いて30秒間攪拌を行った。

攪拌後、再び1500Gで15分間遠心した。

遠心後、上清を廃棄し、沈渣を得た。ここで得られた沈渣は白色で、顕微鏡観察では血球は観察されなかった。

得られた沈渣から2白金耳量の沈渣を採取し、これを検体としてMRSA-LA「生研」（デンカ生研社製）を用いたPBP2'（ペニシリン結合蛋白 (Penicillin binding protein) 検出試験を行ったところ、MRSAを添加した血液を接種した血液培養液由来の菌はPBP2'陽性と判定され、MSSAを添加した血液を接種した血液培養液由来の菌はPBP2'陰性であった。

結果を表1に示す。

表1

菌 株	PBP2'検出結果	判 定
MRSA ANJ-10	陽 性	メチシリン耐性菌
ANJ-12	陽 性	メチシリン耐性菌
ANJ-131	陽 性	メチシリン耐性菌
ATCC43300	陽 性	メチシリン耐性菌
MSSA ATCC25923	陰 性	メチシリン感受性菌
FDA209P	陰 性	メチシリン感受性菌

### 〔実施例2〕 血液中の大腸菌0157の検出

以下の実施例は、実際の臨床診断に直ちに適用可能な臨床検査法をあらわすものではなく、本発明を具体的に説明する上で行った実施例である。

血液培養： 抗凝固剤を添加したウマ血液10mLに大腸菌0157、または他の血清型の大腸菌を $10^8$ cfu/mL含む菌液を1白金耳量(0.001~0.0015mL)添加し、このうち8mLを血液培養用液体培地入りボトル(BBLセプティチェックBHI(登録商標))に接種し、35℃で一晩培養した。

大腸菌0157株 : DK-02株 [0157:H7]  
 : DK-03株 [0157:H7]  
 : DK-04株 [0157:H-]  
 : DK-05株 [0157:H7]  
 大腸菌026株 : DK-01株 [026:H-]  
 : DK-06株 [0111:H-]  
 : DK-EC-1株 [01:H-]

培養液10mLを採取した後、これを1500Gで15分間遠心した。ここで得られた沈渣は、赤血球の存在により赤色であり、一部を採取してグラム染色後に顕微鏡観察したところ、グラム陰性短桿菌と血球が観察された。

遠心後、上清を廃棄して残った沈渣に0.2M水酸化カリウム溶液を5mL添加し、試験管ミキサーを用いて30秒間攪拌を行った。攪拌後、再び1500Gで15分間遠心した。

遠心後、上清を廃棄し、沈渣を得た。ここで得られた沈渣は白色で、顕微鏡観

察では血球は観察されなかった。

得られた沈渣に0.1Mリン酸緩衝液pH7.0を0.1mL添加して菌の濃厚液を調製し、これ検体として病原大腸菌免疫血清0157「生研」（デンカ生研社製）を用いたスライド凝集反応試験を行ったところ、大腸菌0157を添加した血液を接種した血液培養液由来の菌は凝集陽性と判定され、0157以外の菌株を接種した血液培養液由来の菌は陰性であった。

結果を表2に示す。

表2

菌 株		判 定
大腸菌 O157 株	DK-02 株	陽 性
	DK-03 株	陽 性
	DK-04 株	陽 性
	DK-05 株	陽 性
大腸菌 O26	DK-01 株	陰 性
大腸菌 O111	DK-06 株	陰 性
大腸菌 O1	DK-EC-1 株	陰 性

〔実施例3〕 A群溶連菌の検出

血液培養： 抗凝固剤を添加したウサギ血液10mLにA群溶連菌、または他の群の溶連菌を $10^8$ cfu/mL含む菌液を1白金耳量（0.001~0.0015mL）添加し、このうち8mLを血液培養用液体培地入りボトル（BBLセプティチェックTSB（登録商標））に接種し、35℃で一晩培養した。

A群溶連菌株： T-1 株  
 : T-2 株  
 : T-3 株  
 : T-4 株

B群溶連菌株： I a 株  
 : II株  
 : III株

培養液10mLを採取した後、これを1500Gで15分間遠心した。ここで得られた沈渣は、赤血球の存在により赤色であり、一部を採取してグラム染色後に顕微鏡観察したところ、グラム陽性連鎖状の球菌と血球が観察された。

遠心後、上清を廃棄して残った沈渣に0.05Mトリエタノールアミン、0.1M NaCl溶液を5mL添加し、試験管ミキサーを用いて30秒間攪拌を行った。攪拌後、再び1500Gで15分間遠心した。

遠心後、上清を廃棄し、沈渣を得た。ここで得られた沈渣は白色で、顕微鏡観察では血球は観察されなかった。

得られた沈渣に1%酢酸溶液5mLを添加して遠心し、得られた沈渣を検体としてA群溶連菌検出用キット、AストレプトAD「生研」（デンカ生研社製）を用いたスライドラテックス凝集反応試験を行ったところ、A群溶連菌を添加した血液を接種した血液培養液由来の検体は陽性と判定され、B群溶連菌を接種した血液培養液由来の検体は陰性であった。結果を表3に示す。

表3

	菌 株	判 定
A 群溶連菌株	T-1 株	陽 性
	: T-2 株	陽 性
	: T-3 株	陽 性
	: T-4 株	陽 性
B 群溶連菌株	I a 株	陰 性
	: II 株	陰 性
	: III 株	陰 性

これらの結果は、本発明の方法により血球と菌を含む培養液から血球を除去し、

精度よく迅速に菌を検出できることを示す。

#### 産業上の利用可能性

実施例に示すように、アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液と接触させることにより血液中の菌を検出する際の血液中の、または血液中の菌の液体培地培養液中に含まれる血球を除去することにより血球と菌を効率よく分離することができる。

特に、前記水溶液のpHを11以上とすることにより、さらに効率よく血球と菌を分離することができる。

また、前期アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの濃度を0.01 M~1.0 Mとすることにより、さらに効率よく血球と菌を分離することができる。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

## 請求の範囲

1. 血液中の菌を検出する際の血液中の菌の液体培地培養液に含まれる血球と菌を分離する方法であって、血液中の菌の液体培地培養液をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより血球を除去することを含む、血球と菌を分離する方法。
2. 前記水溶液のpHが11以上である、請求項1記載の分離方法。
3. 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン、あるいはこれらの混合物の濃度が0.01 M~1.0 Mである、請求項2記載の血球と菌の分離方法。
4. 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンが水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよびトリエタノールアミンからなる群から選択される、請求項1~3のいずれか1項記載の血球と菌の分離方法。
5. 血液中の菌を検出する方法であって、被験血液をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより該血液中の血球を除去し、血球を除去した血液中の菌を検出する方法。
6. 血液中の菌を検出する方法であって、被験血液を接種した液体培地を培養し菌を増殖させ、該液体培地をアルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンの水溶液、あるいはこれらの混合水溶液と接触させることにより該液体培地中の血球を除去し、血球を除去した液体培地中の菌を検出する方法。
7. 前記水溶液のpHが11以上である、請求項5または6記載の菌を検出する方法。
8. 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン、あるいはこれらの混合物の濃度が0.01 M~1.0 Mである、請求項5~7のいずれか1項記載の菌を検出する方法。
9. 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンが水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよびトリエタノールアミンからなる群から選択される、請求項5~7のいずれか1項記載の菌を検出する方法。

エタノールアミンからなる群から選択される、請求項5～8のいずれか1項記載の菌を検出する方法。

10. 検出する菌が、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、大腸菌0157株、A群溶連菌からなる群から選択される、請求項5～9のいずれか1項記載の菌を検出する方法。

11. アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミン、ならびに菌を検出するための試薬を含む、血液中の菌を分離検出するためのキット。

12. さらに、菌を含む血液を培養するための液体培地を含む、請求項11記載の血液中の菌を分離検出するためのキット。

13. 前記アルカリ金属の水酸化物若しくは炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物若しくは炭酸塩、又はアミンが水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよびトリエタノールアミンからなる群から選択される、請求項11または12記載の血液中の菌を分離検出するためのキット。

14. 菌を検出するための試薬がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌、大腸菌0157株、A群溶連菌からなる群から選択される菌を検出するための試薬である、請求項11～13のいずれか1項記載の血液中の菌を分離検出するためのキット。



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP02/10982

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/04, G01N33/48

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)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-C12Q1/24, G01N33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 113103 A1 (Eastman Kodak Co.), 11 July, 1984 (11.07.84), & US 4610961 A & JP 59-120100 A & DE 3365480 G	1-14
Y	WO 93/25711 A1 (Gen-Probe Inc.), 23 December, 1993 (23.12.93), & EP 574267 A3 & JP 8-501208 A	1-14
A	WO 94/18828 A1 (Abbott Lab), 01 September, 1994 (01.09.94), & EP 685994 A1 & US 5516675 A & JP 8-507147 A	1-14

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 "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 13 December, 2002 (13.12.02)	Date of mailing of the international search report 14 January, 2003 (14.01.03)
---	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/04, G01N33/48

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))

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00~C12Q1/24, G01N33/48

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

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)  
 BIOISIS (DIALOG)

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 請求の範囲の番号
Y	EP 113103 A1 (ESTMAN KODAK CO.) 1984.07.11 & US 4610961 A & JP 59-120100 A & DE 3365480 G	1-14
Y	WO 93/25711 A1 (GEN-PROBE INC.) 1993.12.23 & EP 574267 A3 & JP 8-501208 A	1-14
A	WO 94/18828 A1 (ABBOTT LAB) 1994.09.01 & EP 685994 A1 & US 5516675 A & JP 8-507147 A	1-14

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、一般的な技術水準を示すもの
- 「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矛盾するものではなく、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  
 13.12.02

国際調査報告の発送日  
**14.01.03**

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
 鈴木 恵理子   
 4N 8114  
 電話番号 03-3581-1101 内線 3448