

(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
2018年4月5日(05.04.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/062573 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/02 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

義 (MORI, Yasuyoshi); 〒3240036 栃木県大田
原市下石上 1 3 8 1 - 3 栄研化学株式
会社 那須工場内 Tochigi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/036399

(22) 国際出願日: 2017年9月29日(29.09.2017)

(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 2016-192190 2016年9月29日(29.09.2016) JP

(71) 出願人: 栄研化学株式会社 (EIKEN KAGAKU
KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1108408 東京
都台東区台東 4 丁目 1 9 番 9 号 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所
(HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都
港区愛宕二丁目 5 - 1 愛宕グリーンヒルズ
MOR I タワー 3 2 階 Tokyo (JP).

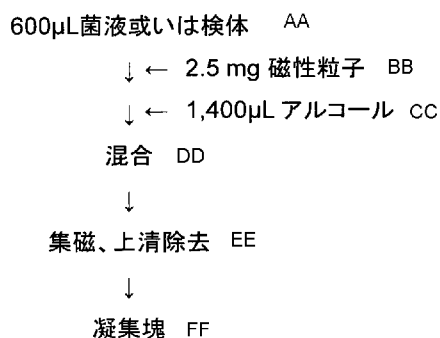
(72) 発明者: 幸保孝 (YUKI, Yasutaka); 〒3240036 栃
木県大田原市下石上 1 3 8 1 - 3 栄研化
学株式会社 那須工場内 Tochigi (JP). 森 安

(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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, 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,

(54) Title: METHOD FOR RECOVERING CELLS

(54) 発明の名称: 細胞の回収方法

図 3



AA Bacterial solution or specimen
BB Magnetic particles
CC Alcohol
DD Mixing
EE Magnetic collection, removal of supernatant
FF Aggregates

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an efficient method for recovering cells such as microorganisms or animal cells; specifically, the present invention pertains to a method for recovering cells, said method including a step for mixing cells and magnetic particles in the presence of an alcohol.

(57) 要約: 本発明は、微生物等の細胞又は動物細胞の効率的な回収方法を提供することを目的とし、具体的には、細胞と磁性粒子とをアルコール存在下で混合する工程を含む、細胞の回収方法に関する。

WO 2018/062573 A1

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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

細胞の回収方法

技術分野

本発明は、例えば検体中の微生物細胞又は動物細胞の回収方法に関する。

背景技術

病原体等の微生物細胞又は動物細胞に関する遺伝子検査キットには、最小検出感度が存在する。通常、遺伝子検査において供試される検体量は、1 試験当たり数～数十 μL である。このため、例えば、検体 1mL 当たり 1,000 個以上の病原体を含む検体は陽性と判定できるものの、1,000 個未満の病原体を含む検体を陽性と判定できず、検出できない場合がある。

このような検出感度の問題に対する手段としては、キットの検体量を上げる方法が挙げられる。しかしながら、単純に検体量を上げると、同時に、試薬成分が希釈されるため、また、検体由来の阻害成分の持ち込み量も増えてしまうため、検査結果に誤判定を生じる虞がある。この問題を回避するために、病原体等の微生物細胞又は動物細胞を検体成分から分離し、濃縮する操作が必要となる。

通常、微生物細胞又は動物細胞の分離及び濃縮方法としては遠心分離法が挙げられるものの、遠心分離法には高価な機器及び使用環境が必要となる。

このように、病原体等の微生物細胞又は動物細胞に関する遺伝子検査キットの検出性能を向上させるべく、安価且つ簡易な微生物細胞又は動物細胞の濃縮方法が望まれる。

従来知られている細胞の回収方法として、特許文献 1 は、高分子多糖類を菌体外に分泌産生する細菌の培養ブロスに、菌体のみ凝集し高分子多糖類は凝集しない濃度で脂肪族アルコールを加えて菌体を凝集させ、菌体を分離する一方で、菌体を除いた培養ブロスに、さらにアルコールを追加して、高分子多糖類を沈澱させ、回収する、高分子多糖類の精製方法を開示する。

特許文献 2 は、微粒子と試料とを接触させることで、試料中の微生物を微粒子に吸着させる、微生物回収方法を開示する。

特許文献 3 は、微生物を含有する水と磁性体又はその凝集体を接触させてスラリー液を作製し、当該スラリー液を濾過することにより凝集体からなるケーキと水とに固液分離し、当該ケーキを微生物と磁性体に分離して微生物を濃縮する、微生物の濃縮方法を開示する。

しかしながら、従来において、磁性粒子とアルコールとを併用して、微生物細胞又は動物細胞を効率的に濃縮できる方法は、知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

- 特許文献 1 特開平 6-209783 号公報
- 特許文献 2 国際公開第 2006/123781 号
- 特許文献 3 特開 2012-187083 号公報

発明の概要

上述のように、病原体等の微生物細胞又は動物細胞に関する遺伝子検査キットの検出性能を向上させるべく、微生物細胞又は動物細胞の効率的な回収方法が望まれている。

そこで、本発明は、細菌といった微生物細胞や動物細胞の効率的な回収方法を提供することを目的とする。

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、磁性粒子とアルコールとの共存下で微生物細胞又は動物細胞が当該磁性粒子と共凝集し、容易に微生物細胞又は動物細胞を回収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、本発明は以下を包含する。

- (1) 細胞と磁性粒子とをアルコール存在下で混合する工程を含む、細胞の回収方法。
- (2) 細胞が微生物細胞又は動物細胞である、(1) 記載の方法。
- (3) 磁性粒子が表面材質としてマグネタイト及び/又はシリカを含む磁性粒子である、(1) 又は (2) 記載の方法。

(4) アルコールがメタノール、エタノール、1-プロパノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、2,2'-イミノジエタノール、ポリエチレングリコール及びこれらの混合物から成る群より選択される、(1)～(3)のいずれか1記載の方法。

(5) ポリエチレングリコールが 20,000 以下の分子量を有するものである、(4)記載の方法。

(6) (1)～(5)のいずれか1記載の細胞の回収方法を含む検査方法。

(7) 磁性粒子とアルコールとを含む、細胞回収キット。

(8) 細胞が微生物細胞又は動物細胞である、(7)記載のキット。

(9) 磁性粒子が表面材質としてマグネタイト及び/又はシリカを含む磁性粒子である、(7)又は(8)記載のキット。

(10) アルコールがメタノール、エタノール、1-プロパノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、2,2'-イミノジエタノール、ポリエチレングリコール及びこれらの混合物から成る群より選択される、(7)～(9)のいずれか1記載のキット。

(11) ポリエチレングリコールが 20,000 以下の分子量を有するものである、(10)記載のキット。

(12) (7)～(11)のいずれか1記載の細胞回収キットを含む検査キット。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号 2016-192190 号の開示内容を包含する。

図面の簡単な説明

[図1]実施例1における各種溶媒中のマグネタイト粒子の観察結果(×200)を示す写真である(左:DW、右:70%EtOH)。

[図2]実施例1における菌液にマグネタイト粒子を混合し、EtOH添加条件にて凝集後、抗酸菌染色させた後の観察結果を示す写真である(写真a):×200、写真b)及びc):×400にて観察)。写真a):マグネタイト粒子と菌体の共凝集の様子を示す。黒色部分はマグネタイト粒子、赤く染色された部分は菌体を示す。写真b):マグネタイト粒子の凝集塊中に赤く染色された典型的菌体形状(桿菌形状)

の抗酸菌の菌体の様子を示す。写真 c) : マグネタイト粒子が少ない視野領域における抗酸菌の菌体と、菌体を縁取るように吸着するマグネタイト粒子の様子を示す。

[図3]本発明の方法における基本的な菌体回収プロトコルを示す。本発明の方法により、菌液或いは検体中の菌体は、マグネタイト粒子と菌体からなる凝集塊として回収される。回収された凝集塊は、その後、適当な核酸抽出法や遺伝子検査に供試し得る。

発明を実施するための形態

本発明に係る細胞の回収方法(以下、「本方法」と称する)は、細胞と磁性粒子とをアルコール存在下で混合する工程を含む方法である。本発明によれば、アルコール存在下で、細胞と磁性粒子とを混合することで、細胞と磁性粒子とが共凝集し、凝集塊を形成する。このように形成された凝集塊を回収し、遺伝子検査等の検査の対象物として使用することができる。

本方法で回収する細胞は、例えば検体(例えば、喀痰、胃液、便乳剤、尿、胸水、全血、血清、血漿等の臨床検体)中に存在する。また、細胞としては、例えばヒト等の動物細胞、微生物等の細胞が挙げられる。さらに、微生物は、いずれの属に属する微生物(又は病原菌)であってもよく、例えばマイコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*)BCG 株、結核菌(マイコバクテリウム・ツベルクローシス(*Mycobacterium tuberculosis*))、マイコバクテリウム・アビウム(*Mycobacterium avium*)及びマイコバクテリウム・イントラセルラーレ(*Mycobacterium intracellulare*)を含む抗酸菌等のグラム陽性菌、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、大腸菌(*Escherichia coli*)等のグラム陰性菌、酵母菌(サッカロマイセス・セレビシエ)等の真菌類が挙げられる。

本方法で使用する磁性粒子としては、磁性を有する粒子であれば、いずれの粒子であってもよく、例えば表面材質としてマグネタイト及び/又はシリカを含む(又はから成る)粒子が挙げられる。換言すれば、本方法では、マグネタイト及び/又はシリカで被覆した磁性粒子を使用することができる。また、磁性粒子は、例えばカルボキシル基、メチル基、オクタデシル基、アルブミン、ボロン酸等の官

能基で表面修飾されたものであってもよい。さらに、磁性粒子の形状としては、特に限定されるものではないが、例えば球形、八面体等が挙げられる。また、磁性粒子のサイズとしては、例えば直径(ϕ)25nm \sim 2 μ mが挙げられる。これら磁性粒子として、市販されているものを使用することができる。

一方、本方法で使用するアルコールとしては、例えばメタノール、エタノール(EtOH)、1-プロパノール、イソプロピルアルコール(2-プロパノール、IPA)、エチレングリコール、2,2'-イミノジエタノール、ポリエチレングリコール(PEG)及びこれらの混合物等が挙げられる。PEGとしては、例えば分子量20,000以下のもの(モノマーのエチレングリコールから分子量20,000までのもの)が挙げられる。

本方法では、先ず回収対象の細胞を含む検体に磁性粒子及びアルコールを添加し、混合する。磁性粒子及びアルコールは、検体に別々に添加してもよく、又は同時に添加してもよい。例えば、細胞を含む検体600 μ Lに対して、0.5 \sim 20mgの磁性粒子と1,400 μ Lのアルコールを添加し、混合し、0 \sim 10分静置する。EtOHを使用する場合には、例えば40 \sim 90%の終濃度となるようにEtOHを添加する。IPAを使用する場合には、例えば20 \sim 90%の終濃度となるようにIPAを添加する。PEG(分子量1,000)を使用する場合には、例えば2.5 \sim 30%の終濃度となるようにPEG(分子量1,000)を添加する。PEG(分子量8,000)を使用する場合には、例えば5.25 \sim 21%の終濃度となるようにPEG(分子量8,000)を添加する。

次いで、磁石を使用し、細胞と磁性粒子とを含む凝集塊を集磁する。このようにして、検体中の細胞を回収することができる。このように濃縮された細胞(凝集塊)を遺伝子検査等の検査に供することができる。従って、本発明は、また、本方法により回収した細胞から核酸を抽出する工程、及び抽出した核酸を遺伝子検査等の検査に供する工程を含む、遺伝子検査等の検査方法に関する。

本発明において、遺伝子検査とは、PCR(例えば、特開2001-286300号公報及び特開昭62-000281号公報)、SDA(例えば、特開平5-192195号公報)、NASBA(例えば、特開平2-005864号公報)、RCA(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92:4641-4645(1995))、及びLAM(例えば、特許第3313358号公報)、LCR(例えば、特開平2-002934号公報)等の核酸増幅法を利用する検査方法が挙げら

れる。

また、本方法により回収した細胞から核酸を抽出する方法としては、ゲノムやプラスミド等の核酸抽出に一般的に用いられている核酸抽出方法（例えば、フェノール・クロロホルム法やアルカリ抽出法等）や市販の核酸抽出キットを使用した核酸抽出方法であれば特に限定されない。

また、本発明は、本方法に使用される磁性粒子とアルコールとを含む細胞回収キットに関する。当該細胞回収キットは、磁性粒子及びアルコール以外に、例えば細胞回収に使用する試薬、容器、取扱い説明書等を含むことができる。

さらに、当該細胞回収キットは、遺伝子検査等の検査キットに含むことができ、前処理試薬のキットとして提供することもできる。当該検査キットは、さらに核酸抽出及び遺伝子検査に使用する試薬、容器、取扱い説明書等を含むことができる。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕 マグネタイト粒子の観察

1. 目的

本実施例の目的は、以下の通りである：

アルコール中にて凝集させたマグネタイト粒子の観察；

菌体とマグネタイト粒子が共存する条件にて凝集させた場合における、細菌の所在の観察。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

マイコバクテリウム・ボビス BCG Tokyo KK-12-21 株；

マグネタイト粒子：酸化二鉄(III)鉄(II) (和光純薬工業)；

生理食塩水(以下、「生食」と表記する。大塚製薬工場)；

集磁用磁石；

凝集溶媒：エタノール(以下、「EtOH」と表記する。和光純薬工業)、蒸留水(以下、「DW」と表記する。大塚製薬工場)；

光学顕微鏡：オリンパス生物顕微鏡 CH2 (OLYMPUS)；

分光光度計：C08000 Biowave (Biochrom Ltd.) ;

チールネルゼン染色液：石炭酸フクシン液、メチレンブルー液

3. 方法

1) 菌液調製

培養したマイコバクテリウム・ボビス BCG Tokyo KK-12-21 株 1 白金耳相当を生食に懸濁した(なお、以降、当該菌の細胞を「菌体」、生食懸濁液を「菌液」と記す)。

次いで、菌液中の遊離 DNA を除く為、遠心分離(3,000xg、20min)での洗浄操作を2回行った。洗浄後、遠心沈渣に生食を1mL加え、再懸濁した。

分光光度計により、吸光波長600nmにて上記菌液の吸光値を測定し、McFarland No. 1 (OD₆₀₀=0.25)に調製した。調製した菌液を10⁷CFU/mLとし、10倍希釈により10⁶CFU/mLの菌液を調製した。

2) 菌液中の菌体回収

生食、あるいは10⁶CFU/mLの菌液300 μ Lに2.5mgのマグネタイト粒子を懸濁した。次いで、凝集溶媒(EtOH, あるいはDW)を700 μ L混合した(終濃度70%)。

混合後、磁石にてマグネタイト粒子を集磁し、上清を除去した。上清除去後、300 μ Lの生食にマグネタイト粒子を再懸濁した。

3) 観察

観察(1)：生食使用条件にて、2)の処理を行ったマグネタイト粒子をx200の倍率にて観察した。

観察(2)：菌液使用条件にて、2)の処理を行ったマグネタイト粒子を抗酸菌染色に供した後、x200~x400にて観察した。

4. 結果

結果を図1及び2に示す。

観察(1)：DW添加時はマグネタイト粒子が凝集せずに分散している状態が観察された。一方、EtOH添加時はマグネタイト粒子が凝集する様子が観察された(図1)。マグネタイト粒子がEtOH共存下において凝集する現象は、疎水性相互作用が関与している可能性が考えられたが、詳細なメカニズムについては明らかでない。

観察(2)：マグネタイト粒子の中に赤色に染色された菌体が観察された(図2 a)x200)。x400 で観察した場合は、マグネタイト粒子が密な視野領域では、菌体が凝集した粒子塊に埋もれる様子と共に抗酸菌の典型的な菌体形状が観察され(図2 b)x400)、マグネタイト粒子が粗な視野領域では、菌体表面が吸着したマグネタイト粒子に覆われている様子が観察された(図2 c)x400)。

マグネタイト粒子が凝集現象を生じる条件下において、菌体は、その表面にマグネタイト粒子が吸着すると共にマグネタイト粒子と共凝集を起こすことが確認されたことから、この現象を利用して、菌体を磁性回収できるものと予想された。

[実施例2] 本方法による菌体回収に必要な条件

1. 目的

本実施例の目的は、本方法による菌体回収に必要な条件の検討である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

マイコバクテリウム・ボビス(Mycobacterium bovis)BCG Tokyo KK-12-21 株；

マグネタイト粒子：酸化二鉄(III)鉄(II)(和光純薬工業)；

生食(大塚製薬工場)；

集磁用磁石

凝集溶媒：EtOH(和光純薬工業)、2-プロパノール(以下、「IPA」と表記する。和光純薬工業)、ポリエチレングリコール 1,000(以下、「PEG1,000」と表記する。和光純薬工業)、DW(大塚製薬工場)、PEG1,000 は 20%(w/v)水溶液を調製して以下の実験に用いた。；

分光光度計：C08000 Biowave(Biochrom Ltd.)。

2) 遺伝子増幅試験

Loopamp PURE DNA 抽出キット(栄研化学、特許第 5432891 号)；

Loopamp 結核菌群検出試薬キット(栄研化学)；

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320c(栄研化学)。

3. 方法

1) 菌液調製

McFarland No. 1 の菌液調製方法については実施例 1 と同様の方法を使用した。

調製した菌液を 10^7 CFU/mL とし、これを 10,000 及び 100,000 倍希釈し、それぞれ 10^3 、 10^2 CFU/mL の菌液を調製した。

2) 菌液中の菌体回収(図 3)

10^2 CFU/mL の菌液 600 μ L に 2.5mg のマグネタイト粒子を懸濁した。次いで、1,400 μ L の凝集溶媒を添加、混合した。凝集溶媒の終濃度は表 2 を参照されたい。この混合液から磁石にてマグネタイト粒子を集磁し、上清を除去した。

3) 核酸の抽出

1) 「菌液調製」にて調製した各濃度の菌液についても、それぞれ 60 μ L から Loopamp PURE DNA 抽出キットを用いて DNA 抽出液を調製した。

一方、2)の方法で回収したマグネタイト粒子と菌体からなる凝集塊に 10mL の DW を添加して、マグネタイトを分散させ、次いで、再度マグネタイト粒子を集磁し、上清を除去し、60 μ L の生食にマグネタイト粒子を再懸濁し、この再懸濁液 60 μ L (全量) から Loopamp PURE DNA 抽出キットを用いて DNA 抽出液を調製した。

4) 遺伝子増幅試験

Loopamp 結核菌群検出試薬キットを用いた一連の試験を、以下、「PURE-TB-LAMP」と記す。

実験 A : 方法 1) 「菌液調製」にて調製した各濃度の菌液から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP に供試した。

実験 B : 方法 2) 「菌液中の菌体回収」方法にて回収した凝集塊から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP に供試した。

4. 結果

結果を表 1 及び 2 に示す。

1) 実験 A として、方法 1) の 10^2 、 10^3 CFU/mL の菌液から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP にて 3 重測定した結果(表 1)、

10^2 CFU/mL は、3 重測定のうち、n=2 にて陰性となった；

10^3 CFU/mL は、3 重測定全てより陽性検出された。

本実験において、遺伝子増幅試験に用いた PURE-TB-LAMP が安定して陽性結果を得られる菌液の最低濃度は 10^3 CFU/mL であった。

2) 実験 B として、方法 2) の方法により、且つ表 2 の a~f の条件にて、回収した凝集塊から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP にて 3 重測定した結果(表 2)、

- ・マグネタイトを添加し、且つ、溶媒として DW を使用した条件 a では、3 重測定全て陰性となった；

- ・マグネタイトを添加し、且つ、溶媒として EtOH、IPA、PEG を使用した条件 b、c、d では、3 重測定全て陽性となった；

- ・マグネタイトを添加し、溶媒を使用しなかった条件 e では、3 重測定のうち n=2 にて陰性となった；

- ・マグネタイト未添加で、溶媒として EtOH を使用した条件 f では、3 重測定全て陰性となった。

10²CFU/mL の菌液 600 μL から菌体回収を実施した結果、実験 B の条件 b、c、d にて、安定して陽性結果を得られたことから、

- ・上記条件にて供試した菌液中の菌体が回収され、且つ、回収された菌体(つまり再懸濁液の菌)の濃度は、10³CFU/mL の菌液と同等であること、

- ・本方法で得た再懸濁液から DNA を抽出して、得られた DNA を鋳型として核酸増幅反応実施可能であること、

が確認されたことから、本方法にて菌体が回収されたと判断された。

また、実験 B の条件 a、e の結果より、使用したマグネタイト粒子そのものに菌を回収する性能はなく、実験 B の条件 f の結果より、凝集溶媒の単独使用により菌体回収することはできないことが確認されたことから、本方法による菌体の回収条件として、粒子(マグネタイト粒子)と凝集溶媒(EtOH、IPA、PEG)の併用が必須であると判断された。

[表 1]

菌液 60μL の PURE-TB-LAMP 測定結果

実験条件	M. bovis BCG 懸濁液		PURE-TB-LAMP		
	濃度 (CFU/mL)	量 (μL)			
Ref.	10 ²	60	+	-	-
	10 ³	60	+	+	+

[表 2]

菌体回収したマグネタイト懸濁液 60 μ L の PURE-TB-LAMP 測定結果

実験条件	M. bovis BCG 懸濁液		磁性粒子	溶媒 (終濃度)	PURE-TB-LAMP		
	濃度 (CFU/mL)	量 (μ L)					
a	10 ²	600	添加	DW	-	-	-
b	10 ²	600	添加	EtOH (70%)	+	+	+
c	10 ²	600	添加	IPA (70%)	+	+	+
d	10 ²	600	添加	PEG1,000(14%)	+	+	+
e	10 ²	600	添加	未添加	-	-	+
f	10 ²	600	未添加	EtOH (70%)	-	-	-

〔実施例 3〕 本方法による細菌の回収 (1)

1. 目的

本実施例の目的は、本方法による菌体回収率の推定である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 2 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

2) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

McFarland No. 1 の菌液調製方法については実施例 1 と同様の方法を使用した。

調製した菌液を 10⁷CFU/mL とし、これを 10,000 倍希釈して 10³CFU/mL の菌液を調製した。

続いて 15.6~10³CFU/mL の 2 倍段階希釈系列を調製した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 3 に示す。

菌液の段階希釈系列から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP に供試した結果、最小検出感度は 500CFU/mL であった。

実施例 2 の「菌液中の菌体回収」方法を用いて回収した凝集塊から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP に供試した結果、最小検出感度は 62.5CFU/mL であった。

菌液の測定結果と比較して、安定して陽性結果を得られる菌液の最低濃度が 8 倍に改善されたこと、菌体の回収方法に供試した菌液の使用量に 10 倍の差があることを考慮すると、本方法は菌液中の菌体を相当の割合で回収できるものと推察された。

[表 3]

菌回収操作の有無による TB-LAMP 最小検出感度の比較

BCG (CFU/mL)	60 μ L			600 μ L 菌回収		
1000	+	+	+	+	+	+
500	+	+	+	+	+	+
250	-	-	+	+	+	+
125	+	-	-	+	+	+
62.5	+	-	-	+	+	+
31.3	-	-	-	+	-	-
15.6	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-

[実施例 4] 本方法による細菌の回収 (2)

1. 目的

本実施例の目的は、高濃度の菌液からの菌体回収、及び回収率調査である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

2) 遺伝子増幅試験

PURE DNA 抽出キット (栄研化学)；

市販リアルタイム PCR 測定装置 : Mx3005P (Agilent Technologies) ;
in house 作製の鋳型定量 LAMP 反応試薬 ;
を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例 1 と同様の方法を使用した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実験 A : 方法 1) 「菌液調製」にて調製した菌液から抽出した DNA の量を定量した。

実験 B : 方法 2) 「菌液中の菌体回収」にて回収した凝集塊から抽出した DNA の量を定量した。

4. 結果

結果を表 4 に示す。

実験 A の定量値は $(1.6 \pm 0.2) \times 10^6$ copies/mL、実験 B の定量値は $(1.7 \pm 0.2) \times 10^7$ copies/mL であったことから、本実験において、本方法は懸濁液中の菌体をほぼ 100%回収できることが確認された。また、実施例 3 の結果を踏まえ、本方法は幅広い濃度範囲の菌液に適用可能であることが推察された。

[表 4]

高濃度 BCG 懸濁液(約 10^6 CFU/mL)での菌回収率

	実験 A	実験 B
定量値 (BCG genome DNA/mL)	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^6$	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^7$
比率	1.0	10.7 ± 1.1

[実施例 5] 本方法での DNA の回収

1. 目的

本実施例の目的は、本方法での DNA 回収能の確認である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

2) 市販 DNA 抽出キット

ISOPLANT II (ニッポンジーン社)；

10mM Tris-HCl (pH8.0)。

3) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌体のゲノム DNA 抽出、精製

培養したマイコバクテリウム・ボビス BCG Tokyo KK-12-21 株 1 白金耳相当を生食に懸濁した。次いで、市販 DNA 抽出キット ISOPLANT II にてゲノム DNA を抽出、精製した。

得られた DNA 溶液を、10mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解し、分光光度計を用い、吸光波長 260nm にて DNA 溶液の吸光値を測定し、得られた重量濃度からコピー数を算出した。

算出したコピー数に準じて、生食にて $100 \sim 10^5$ copies/mL の 10 倍段階希釈系列の DNA 溶液を調製した。

2) DNA 溶液中からの DNA 回収

方法 1) で調製した DNA 溶液を実施例 2 と同様の方法に供試した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

Loopamp 結核菌群検出試薬キットを用いた一連の試験を、以下、「PURE-TB-LAMP」と記す。

実験 A: 方法 1) にて調製した各濃度の DNA 溶液から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP

に供試した。

実験 B : 方法 2) にて回収した凝集塊から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP に供試した。

4. 結果

結果を表 5 に示す。

実験 A では、 10^3 copy/mL まで陽性反応が全検出され、実験 B では、 10^4 copy/mL まで陽性反応が全検出されことから、本方法は DNA 自体を殆ど回収しないことが確認され、実施例 2～4 の結果は、本方法により菌体を回収したことによる遺伝子検査の検出感度上昇であることが示唆された。

[表 5]

ゲノム DNA の回収状況

DNA 濃度	LAMP 検出結果					
	実験 A			実験 B		
10^5 copy/mL	+	+	+	+	+	+
10^4 copy/mL	+	+	+	+	+	+
10^3 copy/mL	+	+	+	+	-	-
100 copy/mL	+	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-

[実施例 6] 利用可能な磁性粒子種の検討

1. 目的

本実施例の目的は、磁性粒子の表面材質、粒子表面の官能基の有無、形状及び粒径と菌体回収との関係性調査である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

なお、当実験で使用した磁性粒子種については表 6 を参照されたい。シリカで表面が被覆されたマグネタイト粒子としては、SiMAG-active、SiMAG-hydrophobe、SiMAG-affinity シリーズ (Chemicell) を使用した。また、マグネタイト粒子としては、酸化二鉄(III)鉄(II) (和光純薬工業) の他、酸化二鉄(III)鉄(II) ナノ

粒子(和光純薬工業)やマグネタイト製品シリーズ(三井金属工業株式会社)を用いた。

2) 遺伝子増幅試験

実施例3と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例2と同様の方法を使用した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例2と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。

3) 核酸の抽出

実施例2と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例2と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表6に示す。

10²CFU/mL の菌液 60 μL を PURE-TB-LAMP にて 3 重測定した結果、3 重測定のうち、n=2 にて陰性となった。

菌体回収を行った粒子各 12 種からは、全てから 3 重測定にて全て陽性を得た。

これらの結果より、本実験において検討した範囲において、粒子の表面材質、表面修飾官能基の有無、形状及び粒径によらず、本方法による菌体の回収は可能であることが確認された。

[表6]

様々な粒子種での菌回収

BCG 濃度	使用量	磁性粒子種					LAMP 検出		
		材質	表面修飾	磁性	形状	φ(μm)			
100 CFU/mL	600μL (菌回収 操作)	シリカ	カルボキシル基	有	球形	1.00	+	+	+
		シリカ	メチル基	有	球形	1.00	+	+	+
		シリカ	オクタデシル基	有	球形	1.00	+	+	+
		シリカ	アルブミン	有	球形	1.00	+	+	+
		シリカ	ボロン酸	有	球形	1.00	+	+	+
		マグネタイト	-	有	不明	0.025	+	+	+
		マグネタイト	-	有	八面体	0.17	+	+	+
		マグネタイト	-	有	球形	0.25	+	+	+
		マグネタイト	-	有	八面体	0.26	+	+	+
		マグネタイト	-	有	八面体	0.45	+	+	+
		マグネタイト	-	有	八面体	2.00	+	+	+
		マグネタイト	-	有	不定形	不明	+	+	+
		60μL	-	-	-	-	-	ND	+

〔実施例 7〕 磁性粒子の使用量の検討

1. 目的

本実施例の目的は、使用可能な粒子量の範囲調査である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

なお、使用した粒子量については表 7 を参照されたい。

2) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例 2 と同様の方法を使用した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 7 に示す。

粒子の添加量 0.5~20mg の範囲で菌回収が可能であった。

[表 7]

凝集粒子量と菌回収

BCG conc.	検体使用量	マグネタイト 使用量(mg)	PURE-TB-LAMP		
100 CFU/mL	600 μ L (菌回収操作)	0	-	-	-
		0.001	-	-	-
		0.005	-	-	-
		0.01	-	-	-
		0.05	+	-	-
		0.1	-	-	+
		0.5	+	+	+
		1.0	+	+	+
		2.5	+	+	+
		5.0	+	+	+
		10	+	+	+
		20	+	+	+
	60 μ L	-	+	-	-

〔実施例 8〕凝集溶媒の検討 (1)

1. 目的

本実施例の目的は、利用可能な溶媒種 (アルコール種) の調査である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。

なお、使用した凝集溶媒種については表 8 を参照されたい。

2) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例 2 と同様の方法を使用した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。凝集溶媒はいずれも終濃度 70% で使用した。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 8 に示す。

EtOH、IPA (2-プロパノール) の他、メタノール、1-プロパノール、エチレングリコール、2, 2'-イミノジエタノールにて菌回収が認められた。

[表 8]

様々なアルコール種での菌回収

	使用量			LAMP 検出		
		名称	濃度			
100 CFU/mL	600 μ L (菌回収操作)	メタノール	70%	+	+	+
		エタノール (EtOH)		+	+	+
		1-プロパノール		+	+	+
		2-プロパノール (IPA)		+	+	+
		エチレングリコール		+	+	+
		2, 2'-イミノジエタノール		+	+	+
	60 μ L		-	-	-	

〔実施例 9〕凝集溶媒の検討 (2)

1. 目的

本実施例の目的は、凝集溶媒種であるアルコールの至適濃度範囲調査である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。凝集溶媒は EtOH 及び IPA を使用した。

2) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例 2 と同様の方法を使用した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。菌液 600 μ L に対して添加する凝集溶媒の量を変えた。凝集溶媒の混合時の濃度、すなわち終濃度の範囲については表 9 を参照されたい。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 9 に示す。

EtOH では 40~80%、IPA では 20~80%の範囲にて菌回収が認められた。

これらの結果から、凝集溶媒毎に菌体回収に至適な濃度範囲が存在することが明らかとなった。

EtOH より IPA のほうが広い有効濃度を示した理由として、疎水性の強さ(疎水性を示すアルキル基の炭素鎖の長さの違い)による可能性が考えられた。

[表 9]

アルコール種と菌回収

BCG conc.	PURE 使用量	混合時 濃度(%)	PURE-TB-LAMP					
			EtOH			IPA		
100 CFU/mL	600 μ L (菌回収操作)	0	+	-	+	-	-	-
		10	+	-	+	-	+	+
		20	-	+	+	+	+	+
		30	+	+	-	+	+	+
		40	+	+	+	+	+	+
		50	+	+	+	+	+	+
		60	+	+	+	+	+	+
		70	+	+	+	+	+	+
		80	+	+	+	+	+	+
	90	-	+	+	+	+	+	
	60 μ L	-	-	-	+	+	-	-

〔実施例 10〕凝集溶媒の検討（3）

1. 目的

本実施例の目的は、PEG の分子量および至適濃度範囲調査である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。

なお、使用した凝集溶媒は PEG 分子量 1,000、3,350、8,000、20,000 の 4 種であり、それぞれ 20%(w/v) 水溶液を調製して実験 A に使用した。また、PEG1,000 の 50%(w/v) 水溶液、と PEG8,000 の 30%(w/v) 水溶液をそれぞれ調製して実験 B に使用した。

2) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例 2 と同様の方法を使用した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用し、以下 2 種類の実験を行った。

実験 A: 終濃度 15% の条件にて、PEG1,000~20,000 での菌回収状況を調査した。

実験 B: 菌液 600 μ L に対して添加する PEG1,000、PEG8,000 の量を変えて菌回収状況を調査した。

実験 A, B で使用した凝集溶媒の混合時の濃度、すなわち終濃度の範囲については表 10~12 を参照されたい。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 10~12 に示す。

本実験 A の結果より、使用したすべての分子量にて菌回収が認められた。

実験 B の結果より、PEG1,000 では 2.5~30%、PEG8,000 では 5.25~21% の範囲にて菌回収が認められた。

当実験並びに実施例 8 のエチレングリコール(モノマー)の結果を踏まえると、分子量 62.1~20,000 の範囲にて回収可能であることが確認された。

また、PEG の場合においても菌体回収に至適な濃度範囲が存在することが明らかとなった。

[表 10]

PEG 分子量と菌体回収 (終濃度 15%)

BCG conc.	PURE 使用量	PEG	PURE-TB-LAMP		
100 CFU/mL	600 μ L (菌回収操作)	PEG1,000	+	+	+
		PEG3,350	+	+	+
		PEG8,000	+	+	+
		PEG20,000	+	+	+
	60 μ L	-	-	-	-

[表 11]

PEG 分子量、濃度と菌体回収

BCG conc.	PURE 使用量	混合時 濃度(%)	PURE-TB-LAMP		
			PEG1,000		
100 CFU/mL	600 μ L (菌回収操作)	30	+	+	+
		15	+	+	+
		7.5	+	+	+
		2.5	+	+	+
	60 μ L	-	+	-	+

[表 1 2]

PEG 分子量、濃度と菌体回収

BCG conc.	PURE 使用量	混合時 濃度(%)	PURE-TB-LAMP		
			PEG8,000		
100 CFU/mL	600 μ L (菌回収操作)	21	+	+	+
		10.5	+	+	+
		5.25	+	+	+
		1.75	-	+	+

〔実施例 1 1〕 菌体の回収 (1)

1. 目的

本実施例の目的は、適用菌種の範囲調査 1: マイコバクテリウム・ボビス以外の同属菌種への本方法の適用である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

なお、本実験ではマイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv KK11-291 株を使用した。

2) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例 3 と同様の方法を使用した。ただし、当実験では、7.8~500CFU/mL の 2

倍段階希釈系列を調製した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 3 と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。

3) 核酸の抽出

実施例 3 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 1 3 に示す。

実験 A：方法 1) 「菌液調製」にて調製した菌液の各希釈液から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP に供試し、最小検出感度を調査した結果、125CFU/mL であった。

実験 B：方法 2) 「菌液中の菌体回収」方法により回収した凝集塊から抽出した DNA を PURE-TB-LAMP に供試した結果、最小検出感度は 15.6CFU/mL であった。

これらの結果より、本方法は、マイコバクテリウム・ボビス以外のマイコバクテリウム属の他の菌種にも適用できることが確認された。

また、実験 A において、当実験に用いたマイコバクテリウム・ツベルクローシスの検出感度がマイコバクテリウム・ボビスと比較して 8 倍が高かったことは、それぞれの菌種のゲノム DNA 上の標的遺伝子 (IS6110) のコピー数の違い (マイコバクテリウム・ツベルクローシス H37Rv KK11-291 株は 16 コピー、マイコバクテリウム・ボビス BCG Tokyo KK-12-21 株は 2 コピー) を反映しているものと考えられた。

[表 1 3]

菌回収操作の有無による TB-LAMP 最小検出感度の比較

MTB H37Rv (CFU/mL)	実験 A			実験 B		
500	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+
62.5	-	+	-	+	+	+
31.3	+	+	-	+	+	+
15.6	-	-	+	+	+	+
7.8	+	-	+	+	-	-
0 (NC)	-	-	-	-	-	-

〔実施例 1 2〕 菌体の回収 (2)

1. 目的

本実施例の目的は、適用菌種の範囲調査 2 : グラム陰性菌への適用である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 2 と同様の材料を使用した。

なお、本実験では、

百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) Tohama 株；

マグネタイト粒子；

凝集溶媒：ポリエチレングリコール 8000 (PEG8,000, 和光純薬工業)、PEG8,000 は、15%(w/v) 水溶液を調製して以下の実験に使用した。

を使用した。

2) 遺伝子増幅試験

Loopamp SR DNA 抽出キット (栄研化学)；

Loopamp 百日咳菌群検出試薬キット (栄研化学)；

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C (栄研化学)；

卓上遠心分離機：マイクロ冷却遠心機 3780 (久保田商事)；

を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

培養した百日咳菌 1 白金耳相当を生食に懸濁した(なお、以降、当該菌の細胞を「菌体」、生食懸濁液を「菌液」と記す)。

次いで、菌液中の遊離 DNA を除く為、遠心分離(15,000xg、20min)での洗浄操作を2回行った。洗浄後、遠心沈渣に生食を1mL加え、再懸濁した。

分光光度計により、吸光波長 600nm にて上記菌液の吸光値を測定し、McFarland No. 0.5 (OD600=0.13)に調製した。調製した菌液を 1.5×10^8 CFU/mL とし、これを 10,000 倍希釈して 1.5×10^3 CFU/mL の菌液を調整し、続いて 4、8 倍希釈し、3,750、1,875CFU/mL の菌液を調製した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。ただし、菌体回収菌液は 300 μ L、凝集溶媒は 700 μ L (凝集溶媒の終濃度 10.5%) を用いた。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。ただし、DNA 抽出キットには、Loopamp SR DNA 抽出キットを用いた。また、方法 2) で回収した凝集塊は、DW による洗浄ステップを行わず、直接 50 μ L の生食に再懸濁し、DNA 抽出キットに供した。

4) 遠心分離による菌回収

各濃度の菌液 300 μ L を 15,000xg、5min の条件にて遠心分離に供した。次いで、上清を除去し、50 μ L の生食に再懸濁した。

5) 遺伝子増幅試験

方法 3) で菌液或いは回収した凝集塊からそれぞれ抽出した DNA 10 μ L を使用し、Loopamp 百日咳菌群検出試薬キットにて 4 重測定した。

4. 結果

結果を表 1 4 に示す。

Loopamp 百日咳菌群検出試薬キットにて、各 DNA 抽出液を測定した結果、PEG8,000 を使用した場合にのみ両検体とも 4 重測定全てで陽性となり、遠心分離処理では 3,750CFU/mL にて 3/4、1,875CFU/mL にて 1/4 の陽性検出率であった。

[表 1 4]

百日咳菌の回収及び検出結果

菌回収方法	Loopamp 百日咳菌群検出試薬キット							
	3,750CFU/mL				1,875CFU/mL			
本方法	+	+	+	+	+	+	+	+
遠心分離	+	+	+	-	-	+	-	-

〔実施例 1 3〕 菌体の回収（3）

1. 目的

本実施例の目的は、適用菌種の範囲調査である。

2. 材料

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 2 と同様の材料を使用した。

なお、本実験で使用した菌種として、

- ・マイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*) BCG Tokyo KK 12-21

株

- ・マイコバクテリウム・アビウム (*Mycobacterium avium*) JATA51-01 株
- ・マイコバクテリウム・イントラセルラー (*Mycobacterium intracellulare*)

JATA52-01 株

- ・大腸菌 (*Escherichia coli*) ATCC11775 株
- ・酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) BY611 株

を、培地より約 1 白金耳相当採取し、生食に懸濁した菌液を使用した。

また、凝集溶媒として、EtOH, および PEG1,000 を用いた。PEG1,000 は、15%(w/v) 水溶液を調製して以下の実験に使用した。

2) DNA 抽出

Loopamp PURE DNA 抽出キット (栄研化学)を使用した。

3) DNA 測定

吸光値測定は SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices 社) を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

- ・培養した上記菌体 1 白金耳相当を生食に懸濁した。

・菌液中の遊離 DNA を除く為、遠心分離 (15,000xg、20min) での洗浄操作を 2 回行った。

・遠心沈渣に生食を 1mL 加え、再懸濁した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH (70%)、PEG1,000 の終濃度はそれぞれ 70%、10.5%。

3) 核酸の抽出

各種菌液を用いて、以下の処理を行った。

処理 A: 方法 1) 「菌液調製」により調製した菌液 60 μ L から実施例 2 の方法を使用して DNA を抽出した。

処理 B: 方法 2) 「菌液中の菌体回収」方法、且つ凝集溶媒には EtOH (70%) を使用して回収した凝集塊を、実施例 2 の核酸抽出方法を使用して DNA を抽出した。

処理 C: 方法 2) 「菌液中の菌体回収」方法、且つ凝集溶媒には PEG1,000 (15%) を使用回収した凝集塊を、実施例 2 の核酸抽出方法を使用して DNA を抽出した。

4) DNA 濃度測定

得られた各 DNA 抽出液を Tris-HCl pH8.0 (和光純薬工業) にて 2~10 倍に希釈し、吸光度測定値より DNA 濃度を算出した。

4. 結果

結果を表 15 に示す。

本試験に供試した全ての菌種において、本方法による菌体回収操作 (処理 B, C) を行った場合に、何れの DNA 抽出液も、本方法を用いずに調製 (処理 A) した DNA 抽出液と比較して、より高い DNA 濃度及び濃縮倍率を示した。

このことから、本方法は、抗酸菌 (グラム陽性菌)、グラム陰性菌、真菌類の細胞を回収可能であることが確認された。

[表 15]

各 DNA 抽出液の DNA 濃度及び濃縮倍率

菌種	DNA 濃度 (濃縮倍率)*		
	処理 A	処理 B	処理 C
M. bovis BCG	0.6µg/mL (1.0)	4.99µg/mL (8.1)	Not tested
M. avium	2.4µg/mL (1.0)	14.7µg/mL (6.3)	Not tested
M. intracellulare	1.5µg/mL (1.0)	12.0µg/mL (8.0)	10.8µg/mL (7.1)
E. coli	0.4µg/mL (1.0)	2.9µg/mL (7.4)	3.8µg/mL (9.7)
S. cerevisiae	22.6µg/mL (1.0)	198.7µg/mL (8.8)	215.7µg/mL (9.5)

*処理 A で得られた DNA 濃度を 1 とした場合の比率

〔実施例 1 4〕 様々な検体種への適用

1. 目的

本実施例の目的は、本方法にて菌体回収可能な生体由来の検体種の調査である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

2) 検体

生体由来検体として喀痰、胃液、10%便懸濁液上清(便乳剤)、尿、胸水、全血を使用した。

なお、喀痰検体については、同検体 600 µL に 1, 200 µL の 0.5M NaOH を添加し、混合して溶解した検体を使用した。

3) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例 2 と同様の方法を使用した。ただし、当操作では 10³CFU/mL の菌液を調製した。

2) 検体調製

各生体由来の検体に 1) の菌液を 1/10 量添加し、 10^2 CFU/mL の各種菌液を調製した。

3) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。

4) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

5) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 1 6 に示す。

上記に挙げた全ての検体から LAMP にて陽性検出された。

このことから、本方法により幅広い検体種から菌体の回収が可能であることが確認された。

[表 1 6]

種々の検体からの菌体回収

検体種	使用量-処理法	PURE-TB-LAMP (n=3)		
生食	600 μ L-菌回収法	+	+	+
喀痰		+	+	+
人工胃液		+	+	+
10%便乳剤		+	+	+
尿		+	+	+
胸水		+	+	+
全血		+	+	+
生食	60 μ L	+	+	-

[実施例 1 5] 粒子と凝集溶媒の添加順序の検討

1. 目的

本実施例の目的は、粒子と凝集溶媒の添加順序についての調査である。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

2) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。なお、マグネタイト粒子、溶媒の添加順序を表 1 7 に記した。

[表 1 7]

粒子、凝集溶媒の添加順序

No.	条件
(1)	粒子→溶媒の順で添加
(2)	溶媒→粒子の順で添加
(3)	粒子と溶媒を同時添加

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 1 8 に示す。

実験 A: 三重測定で 1/3 の陽性検出率であった。

実験 B: 条件(1)～(3)のいずれの添加順序でも、全て陽性反応が得られた。

これらの結果から、本方法は試薬の添加順序によらず実施可能であることが確認された。

[表 1 8]

本方法におけるマグネタイト、溶媒添加順序と菌回収

実験	菌濃度	検体量	PURE-TB-LAMP		
実験 A	10 ² CFU/mL	60 μ L	-	+	-
実験 B 条件(1)		600 μ L	+	+	+
実験 B 条件(2)			+	+	+
実験 B 条件(3)			+	+	+

〔実施例 1 6〕凝集溶媒添加後の静置時間の検討

1. 目的

凝集溶媒を添加した後の静置時間と菌体回収との関係性調査

2. 材料

1) 菌液調製、菌体回収

実施例 3 と同様の材料を使用した。当実験では凝集溶媒として EtOH を使用した。

2) 遺伝子増幅試験

実施例 3 と同様の材料を使用した。

3. 方法

1) 菌液調製

実施例 2 と同様の方法を使用した。

2) 菌液中の菌体回収

実施例 2 と同様の方法を使用した。凝集溶媒 EtOH の終濃度は 70%。

凝集溶媒添加後の静置時間を 0, 1, 3, 5, 10 分とした。

3) 核酸の抽出

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4) 遺伝子増幅試験

実施例 2 と同様の方法を使用した。

4. 結果

結果を表 1 9 に示す。

10²CFU/mL の菌液 60 μ L を PURE-TB-LAMP にて 3 重測定した結果、3 重測定のうち、n=2 にて陰性となった。

本方法による菌体回収操作を行った場合、0~10 分の静置時間によらず、3 重測定にてすべて陽性となった。

これらの結果より、本実験により検討した静置時間の範囲においては、本方法は、菌液に凝集溶媒を添加した後の静置時間によらず菌体を回収できることが確認された。

[表 19]

凝集溶媒添加後の静置時間と PURE-TB-LAMP による検出結果

BCG conc.	検体使用量	凝集溶媒添加後の静置時間 (分)	PURE-TB-LAMP		
100 CFU/mL	600 μ L (菌回収操作)	0	+	+	+
		1	+	+	+
		3	+	+	+
		5	+	+	+
		10	+	+	+
	60 μ L	-	+	-	-

〔実施例 17〕 動物細胞の回収

1. 目的

適用細胞種の範囲調査：動物細胞への本方法の適用。

2. 材料

本実施例で使用した材料は以下の通りであった：

1) 細胞懸濁液調製、細胞回収

細胞：ヒト末梢血単核球（クラボウ）

生理食塩水（生食）：大塚生食注（大塚製薬工場）

血球計算盤（東京硝子器械）

マグネタイト粒子：MG-1310（三井金属鉱業）

集磁用磁石

凝集溶媒：20% ポリエチレングリコール 1,000 (PEG1,000, 和光純薬工業)、20% ポリエチレングリコール 8,000 (PEG8,000, 和光純薬工業)

2) 遺伝子増幅試験

Loopamp PURE DNA 抽出キット（栄研化学）

Loopamp DNA 増幅試薬 D（栄研化学）

ヒトシトクローム遺伝子（CYP2C19）検出用 LAMP プライマー

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320c（栄研化学）

3. 方法

1) 細胞懸濁液調製

生理食塩水にヒト末梢血単核球を懸濁した後、血球計算盤にて細胞計数し、14,300cells/ μ Lの細胞懸濁液を得た。これを生理食塩水にて10倍段階希釈し、以下の濃度の細胞懸濁液を作製した。

- a. 1,430cells/ μ L
- b. 143cells/ μ L
- c. 14.3cells/ μ L

2) 懸濁液中の細胞回収

実施例2と同様の方法を使用した。

- ・300 μ Lの細胞懸濁液bに2.5mgのマグネタイト粒子を懸濁した。
- ・各凝集溶媒を700 μ L混合した（各PEGの終濃度=14%）。
- ・磁石にてマグネタイト粒子を集磁し、上清を除去した。
- ・磁石を取り外し、10mLの生理食塩水を添加して、マグネタイト粒子を分散させた。
- ・再度、マグネタイト粒子を集磁し、上清を除去した。
- ・60 μ Lの生理食塩水にマグネタイト粒子を再懸濁した。

3) 遺伝子増幅試験

基本的に、実施例2と同様のDNA抽出方法を使用した。

A. 方法1)「細胞懸濁液調製」にて調製した細胞懸濁液a~cを各30 μ Lを用いて、Loopamp PURE DNA抽出キットにてDNA抽出を実施した。

B. 方法2)「懸濁液中の細胞回収」にて調製したマグネタイト粒子懸濁液60 μ Lを用いて、Loopamp PURE DNA抽出キットにてDNA抽出を実施した。

A及びBの操作にて得られたDNA抽出液を、Loopamp DNA増幅試薬DとCYP2C19プライマーを用いたLAMP反応に供し、3重測定を行った。

4. 結果

結果を表20に示す。

細胞懸濁液bを300 μ L使用した細胞回収群と、細胞懸濁液a及びbを30 μ L使用したコントロール群では、いずれも3重測定にてすべてLAMP反応陽性となっ

た。一方、細胞懸濁液 c を 30 μ L 使用したコントロール群では 3 重測定にてすべて LAMP 反応陰性となった。

5. 考察

細胞回収実験群にて、細胞が回収されない場合、コントロール群の細胞懸濁液 c と同様に LAMP 反応陰性となることが考えられるが、細胞懸濁液 a 及び b と同等の結果が得られたことから、本方法により動物細胞が回収されたものと推察された。

[表 20]

凝集粒子量と細胞回収

実験群	凝集溶媒種	細胞懸濁液			LAMP		
		No.	細胞濃度 (cells/ μ L)	使用量			
細胞回収	PEG1,000	b	143	300 μ L	+	+	+
	PEG8,000				+	+	+
コントロール	-	a	1430	30 μ L	+	+	+
		b	143		+	+	+
		c	14.3		-	-	-

産業上の利用可能性

本発明によれば、安価且つ簡易に微生物細胞又は動物細胞を回収することができる。また、本発明に従い、微生物細胞又は動物細胞を回収及び濃縮することで、病原菌等の微生物細胞又は動物細胞に関する遺伝子検査キットの検出性能を向上させることができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項 1]

細胞と磁性粒子とをアルコール存在下で混合する工程を含む、細胞の回収方法。

[請求項 2]

細胞が微生物又は動物細胞である、請求項 1 記載の方法。

[請求項 3]

磁性粒子が表面材質としてマグネタイト及び/又はシリカを含む磁性粒子である、請求項 1 又は 2 記載の方法。

[請求項 4]

アルコールがメタノール、エタノール、1-プロパノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、2,2'-イミノジエタノール、ポリエチレングリコール及びこれらの混合物から成る群より選択される、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項 5]

ポリエチレングリコールが 20,000 以下の分子量を有するものである、請求項 4 記載の方法。

[請求項 6]

請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の細胞の回収方法を含む検査方法。

[請求項 7]

磁性粒子とアルコールとを含む、細胞回収キット。

[請求項 8]

細胞が微生物又は動物細胞である、請求項 7 記載のキット。

[請求項 9]

磁性粒子が表面材質としてマグネタイト及び/又はシリカを含む磁性粒子である、請求項 7 又は 8 記載のキット。

[請求項 10]

アルコールがメタノール、エタノール、1-プロパノール、イソプロピルアルコール、エチレングリコール、2,2'-イミノジエタノール、ポリエチレングリコール

及びこれらの混合物から成る群より選択される、請求項 7～9 のいずれか 1 項記載のキット。

[請求項 1 1]

ポリエチレングリコールが 20,000 以下の分子量を有するものである、請求項 1 0 記載のキット。

[請求項 1 2]

請求項 7～1 1 のいずれか 1 項記載の細胞回収キットを含む検査キット。

図 1

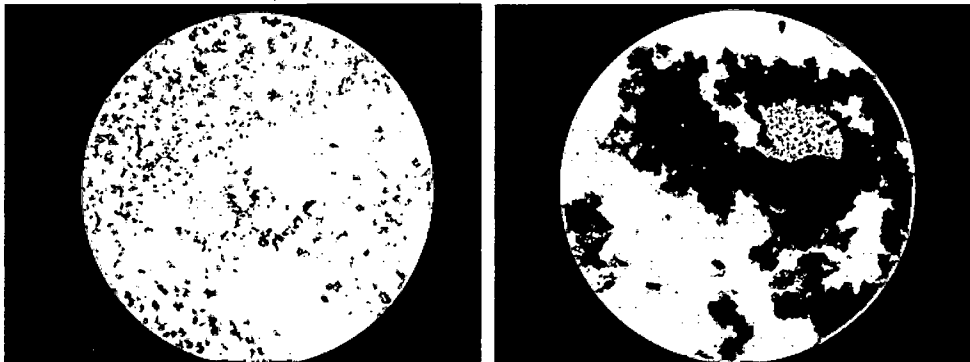


図 2

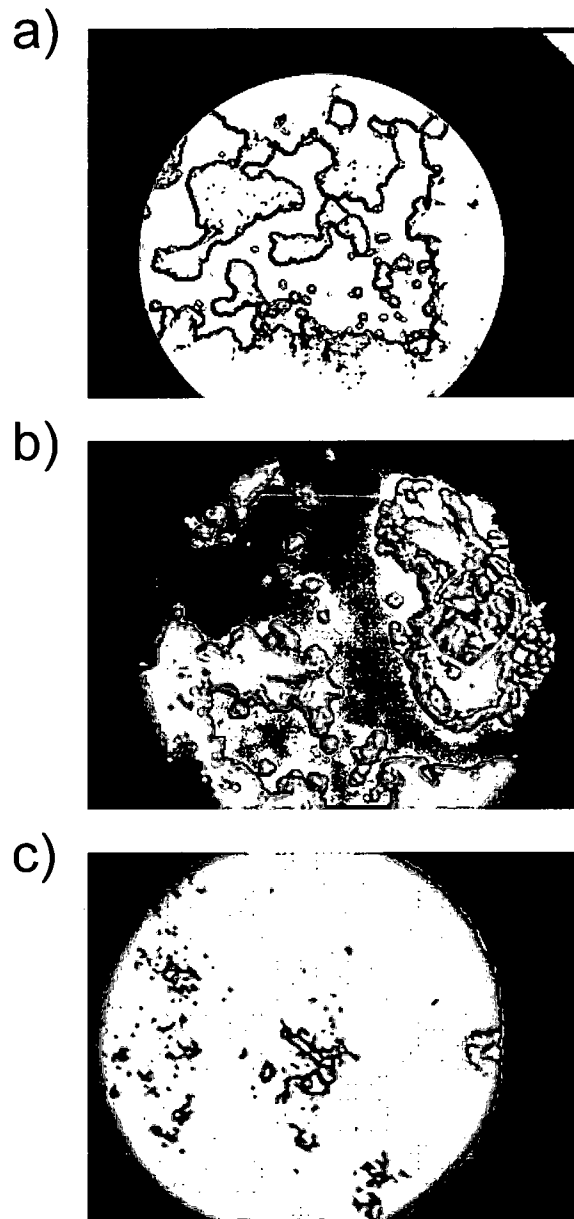
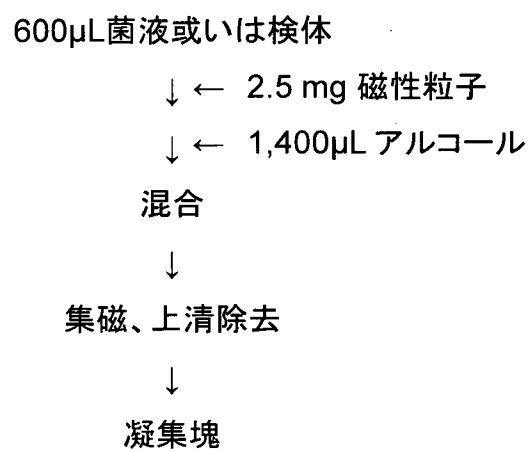


図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/036399

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N1/02 (2006.01) i, C12N7/02 (2006.01) i, C12Q1/02 (2006.01) i, C12Q1/70 (2006.01) i, C12Q1/68 (2006.01) n

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. C12N1/02, C12N7/02, C12Q1/02, C12Q1/70, C12Q1/68

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	1971-2017
Registered utility model specifications of Japan	1996-2017
Published registered utility model applications of Japan	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 05-504095 A (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC) 01 July 1993, claims 1, 8, page 3, lower left column, line 27 to lower right column, line 29, page 4, lower left column, lines 4-18, page 5, lower right column, lines 13-15, examples 3-5 & US 5523231 A, claims 1, 8, column 6, lines 4-51, column 8, lines 15-38, column 11, lines 46-50, examples 3-5 & WO 1991/012079 A1 & EP 515484 A1	1-12

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 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
20 December 2017

Date of mailing of the international search report
09 January 2018

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/036399

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1621618 A1 (PROMEGA CORPORATION) 01 February 2006, paragraph [0027], examples 3B, 8A, 8C & US 6284470 B1 & WO 2000/070040 A1 & JP 2002-543835 A	1-4, 6-10, 12
X	WO 2006/123781 A1 (ARKRAY INC.) 23 November 2006, claims 5, 7, 11-12, 18-20, paragraphs [0020], [0022] & US 2009/0311770 A1, claims 5, 7, 11-12, 18-20, paragraphs [0029], [0031] & EP 1882738 A1 & CN 101180392 A	1-4, 6-10, 12
A	JP 2010-178750 A (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 19 August 2010 & US 2006/0234379 A1 & EP 1712284 A1 & KR 10-2006-0109254 A	1-12
A	JP 2006-508668 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 16 March 2006 & US 2006/0141450 A1 & WO 2004/053115 A1 & EP 1578960 A4 & CN 1506460 A	1-12
A	JP 2007-252240 A (HITACHI METALS LTD.) 04 October 2007 (Family: none)	1-12
A	WO 2007/114758 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 11 October 2007 & US 2009/0092837 A1	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/02(2006.01)i, C12N7/02(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/70(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)n

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. C12N1/02, C12N7/02, C12Q1/02, C12Q1/70, C12Q1/68

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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 05-504095 A (アマーシャム・インターナショナル・ピーエルシー) 1993.07.01, 請求の範囲 1, 8, 第 3 頁左下欄第 27 行~同頁右下欄 29 行, 第 4 頁左下欄第 4 行~第 18 行, 第 5 頁右下欄第 13 行~第 15 行, 実施例 3-5 & US 5523231 A, Claims 1, 8, column 6, line 4-51, column 8, line 15-38, column 11, line 46-50, examples 3-5 & WO 1991/012079 A1 & EP 515484 A1	1-12

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、一般的技術水準を示すもの | 「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 |
| 「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 | 「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 |
| 「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) | 「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 |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

国際調査を完了した日

20.12.2017

国際調査報告の発送日

09.01.2018

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

伊藤 良子

4 B

3 6 4 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 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	EP 1621618 A1 (PROMEGA CORPORATION) 2006. 02. 01, [0027], Examples 3B, 8A, 8C & US 6284470 B1 & WO 2000/070040 A1 & JP 2002-543835 A	1-4, 6-10, 12
X	WO 2006/123781 A1 (アークレイ株式会社) 2006. 11. 23, 請求項 5, 7, 11-12, 18-20, [0020], [0022] & US 2009/0311770 A1, Claims 5, 7, 11-12, 18-20, [0029], [0031] & EP 1882738 A1 & CN 101180392 A	1-4, 6-10, 12
A	JP 2010-178750 A (三星電子株式会社) 2010. 08. 19, & US 2006/0234379 A1 & EP 1712284 A1 & KR 10-2006-0109254 A	1-12
A	JP 2006-508668 A (ツインファ・ユニバーシティ) 2006. 03. 16, & US 2006/0141450 A1 & WO 2004/053115 A1 & EP 1578960 A4 & CN 1506460 A	1-12
A	JP 2007-252240 A (日立金属株式会社) 2007. 10. 04, (ファミリーなし)	1-12
A	WO 2007/114758 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 2007. 10. 11, & US 2009/0092837 A1	1-12