

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4351048号  
(P4351048)

(45) 発行日 平成21年10月28日(2009.10.28)

(24) 登録日 平成21年7月31日(2009.7.31)

|                         |               |   |
|-------------------------|---------------|---|
| (51) Int. Cl.           | F I           |   |
| C 1 2 N 1/02 (2006.01)  | C 1 2 N 1/02  |   |
| C 1 2 Q 1/04 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/04  |   |
| G O 1 N 33/48 (2006.01) | G O 1 N 33/48 | B |
| C 1 2 M 1/34 (2006.01)  | C 1 2 M 1/34  | A |
| G O 1 N 1/28 (2006.01)  | G O 1 N 1/28  | J |

請求項の数 28 (全 25 頁)

|               |                               |           |                       |
|---------------|-------------------------------|-----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2003-529979 (P2003-529979)  | (73) 特許権者 | 504097627             |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年9月13日(2002.9.13)         |           | ヘモシステム                |
| (65) 公表番号     | 特表2005-503803 (P2005-503803A) |           | HEMOSYSTEM            |
| (43) 公表日      | 平成17年2月10日(2005.2.10)         |           | フランス国、マルセイユ エフ-1300   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/FR2002/003132             |           | 6、クール グーフ、45          |
| (87) 国際公開番号   | W02003/025207                 |           | 45, cours Gouffe, F-1 |
| (87) 国際公開日    | 平成15年3月27日(2003.3.27)         |           | 3006 Marseille, Fran  |
| 審査請求日         | 平成17年7月29日(2005.7.29)         |           | ce                    |
| (31) 優先権主張番号  | 01/11873                      | (74) 代理人  | 100092897             |
| (32) 優先日      | 平成13年9月13日(2001.9.13)         |           | 弁理士 大西 正悟             |
| (33) 優先権主張国   | フランス (FR)                     | (74) 代理人  | 100115200             |
|               |                               |           | 弁理士 山口 修之             |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液製剤及び／又はその派生物からの病原菌の濃縮及び検出装置及び方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血液細胞を含む血液製剤中に場合により存在する汚染菌の検出方法であって、次のステップ：

- (a) 前記血液製剤の試料に血液細胞の凝集処理を施す、
  - (b) 汚染菌を通すが、細胞の凝集体を通さない第1フィルタに、処理した試料を通過させることによってステップ(a)で形成した凝集体を除去する、
  - (c) ステップ(b)で得た濾液の残留細胞を選択的に溶解させる、
  - (d) 細胞片を通す第2フィルタに、ステップ(c)の溶解物を通過させることによって汚染菌を回収する、
  - (e) ステップ(a)の凝集の際か、ステップ(c)の溶解の際に汚染菌のマーキング剤を添加する、及び
  - (f) 場合により留め置かれる標識した汚染菌を検出するために第2フィルタを分析することを含み、
- ステップ(a)及び(c)において、汚染菌が濃縮される、ことを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

ステップ(a)、(c)又は(e)の少なくとも1つで、汚染菌の透過化処理剤の添加を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

透過化処理剤は、ポリエチレンイミン、二酢酸クロルヘキシジン、グルコン酸クロルヘキシジン単独であるか、或いはナイシンと組み合わせたエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、洗剤又はそれらの混合物を含む群から選択されることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】

洗剤は、N - オクチルβ - D - グルコピラノシド、SDS、ツイーン、トリトン、Br i j（登録商標）又はそれらの混合物を含む群から選択されることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】

病原菌のマーキング剤は、エステラーゼ基質ChemChrome V6（商標）、標識した抗体又は核酸マーカーを含む群から選択されるマーキング溶液であることを特徴とする請求項2から4のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項6】

マーキング剤は、蛍光マーカー、又は蛍光色素、若しくは蛍光を出す基質の分解を可能にする酵素に連結された薬剤を含むことを特徴とする請求項2から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

蛍光は、レーザー励起によって検出されることを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】

血液製剤の血液細胞は、血小板若しくは赤血球、又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項9】

血液製剤は、血小板を含むこと、及びステップ（a）の凝集処理は、

- 血小板抗原の特異性抗体、
- トロンビン、TRAP（トロンビンレセプタ活性化ペプチド）、トリプシン、コラーゲン、トロンボキサンA2、PAF（血小板活性化因子）、イオノホアA23187、免疫複合体及び補体因子から選択される強い血小板活性化作用薬、

- ADP、アドレナリン、アラキドン酸、フォン・ヴィレブラント因子、セロトニン又はエピネフリンから選択される弱い血小板活性化作用薬を含む群から選択される凝集剤の少なくとも1つを含む凝集組成物と試料を接触させることを含むことを特徴とする請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項10】

凝集組成物中のCD9タイプの抗体の濃度は、0.5 μg/ml ~ 50 μg/mlであることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】

凝集組成物中の強い作用薬の濃度は、

- トロンビンタイプの作用薬に関して0.5 UI/ml ~ 100 UI/mlであり、
- TRAPタイプの作用薬に関して5 μM ~ 200 μMであり、
- トリプシンタイプの作用薬に関して1 nM ~ 500 nMであり、
- コラーゲンタイプの作用薬に関して0.05 μg/ml ~ 50 μg/mlであり、
- トロンボキサンA2タイプの作用薬に関して0.01 μg/ml ~ 5 μg/mlであり、

40

- PAFタイプの作用薬に関して0.005 mg/ml ~ 1 mg/mlであり、又は
- イオノホアA23187タイプの作用薬に関して0.1 μM ~ 100 μMであり、であることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項12】

凝集組成物中の弱い作用薬の濃度は、

- ADPタイプ、アドレナリンタイプ又はエピネフリンタイプの作用薬に関して0.5 μM ~ 100 μMであり、
- アラキドン酸タイプの作用薬に関して0.001 mM ~ 10 mMであり、

50

- フォン・ヴィレブラント因子タイプの作用薬に関して  $0.001 \text{ mg/ml} \sim 1 \text{ mg/ml}$  であり、又は

- セロトニンタイプの作用薬に関して  $0.05 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$  であり、  
であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

抗体は、抗 CD9、抗 CD32、抗 PTA1、抗 D42、抗 GPIIb/IIIa 又は抗 GPIV 抗体から選択されることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

血液製剤は、赤血球を含むこと、及びステップ (a) の凝集処理は、レクチン、ポリエチレンイミン、ポリビニルピロリドン (PVP)、ゼラチン、デキストラン又はポリエチレングリコール (PEG) から選択される少なくとも 1 つの凝着剤を含む凝着組成物と試料を接触させることを含むことを特徴とする請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 15】

レクチンは、エリトロアグルチニン (erythroagglutinine) 活性を有することを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

レクチンは、インゲンマメ、カラスノエンドウ、ソラマメ又はエリスリナ・コラロデンドロンのレクチンから選択されることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載の方法。

【請求項 17】

凝着組成物中のインゲンマメのレクチンの濃度は、 $10 \mu\text{g/ml} \sim 200 \mu\text{g/ml}$  であることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

20

【請求項 18】

凝着組成物中のポリエチレンイミンの濃度は、 $0.1 (\text{重量/体積})\% \sim 40 (\text{重量/体積})\%$  であることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

ポリビニルピロリドン (PVP) は、PVP-40 及び PVP-360 を含む群から選択され、 $0.1 (\text{重量/体積})\% \sim 40 (\text{重量/体積})\%$  の濃度で使用されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

凝着組成物中のゼラチンは、 $0.5 (\text{重量/体積})\% \sim 40 (\text{重量/体積})\%$  の濃度で使用されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 21】

凝着組成物中のデキストランは、デキストラン 70、デキストラン 100、デキストラン 500 を含む群から選択され、 $0.1 (\text{重量/体積})\% \sim 40 (\text{重量/体積})\%$  の濃度で使用されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 22】

ポリエチレングリコールは、PEG 8、PEG 17、PEG 35 を含む群から選択され、 $0.05 (\text{重量/体積})\% \sim 40 (\text{重量/体積})\%$  の濃度で使用されることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 23】

ステップ (c) の細胞溶解は、サポニン、SDS、ツイーン 20、トリトン X100、Brj (登録商標) 96、ポリドカノール、N-β-D-オクチルグルコピラノシド、又は炭酸ナトリウムを含む群から選択される 1 つ又は幾つかの洗剤を含む溶解溶液によって行われることを特徴とする請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

汚染菌は、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、生及び/又は死細菌の孢子であることを特徴とする請求項 1 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

第 1 フィルタの孔の寸法は、 $2 \mu\text{m} \sim 20 \mu\text{m}$  であることを特徴とする請求項 1 から 2

50

4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

第2フィルタの孔の寸法は、 $0.2\mu\text{m} \sim 2\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

汚染菌は、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、又は生及び/又は死細菌の孢子であること、第1フィルタの孔の寸法は、 $2\mu\text{m} \sim 20\mu\text{m}$ であること、及び第2フィルタの孔の寸法は、 $0.2\mu\text{m} \sim 2\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項1から26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

10

ステップ(f)の汚染菌の検出は、密閉した装置中で行われることを特徴とする請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液製剤又は派生製品中に場合により存在する病原菌の濃縮方法、並びに前記血液製剤の病原性検査を行うためにこのように濃縮された前記菌の検出を対象とする。

【0002】

血液製剤とは、全血、及びその分画から生じた、細胞成分を含む、又は含まないあらゆる製剤を意味し、例として、血液製剤とは、赤血球又は血小板の濃縮物を意味するが、血漿又は血清製剤も意味する。

20

【背景技術】

【0003】

細菌、ウイルス、カビ、酵母又はその他のような様々な病原菌による血液製剤及び派生製品の汚染検出は、現代において、公衆衛生に責任のある官庁、並びに輸血産業が直面する大きな問題の1つである。

【0004】

検出テストは存在するが、今日、それらは日常的に使用可能ではない。

【0005】

血液細胞の母集団又は分集団の中で、かかる病原菌を検出する大部分のテストによって示される主要な問題は、選択的に病原菌を引き出すとみなされる大部分の処理が、同時にそれらの除去を引き起こすことにある。

30

【0006】

この除去は、テストした血液製剤中の前記菌の存在の過小評価に、かつそれ故に衛生上の危険増大にほぼ体系的に行き着く。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って出願人は、かかる病原菌による、血液製剤又は派生製品の汚染を検出するための迅速かつ高精度の新規方法を考え出した。

40

【0008】

本発明による方法は、予備処理又は希釈なしに、被験者において採取された血液製剤から生じた試料に対して直接行われることにおいて注目すべきである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

出願人が発達させた病原菌の検出方法は、前記病原菌を選択的に濃縮し、次に一旦濃縮されると、当業者に公知の技術によって、それらを検出することから本質的になる。

【0010】

病原菌の選択的濃縮は、血液製剤の試料中に存在する血液細胞の様々な母集団の逐次又は同時除去によって行われる。

50

## 【 0 0 1 1 】

本発明による病原菌の濃縮方法は、血液細胞の選択的凝集により血液細胞の母集団の濃度を減少させることからなり、凝縮していない濃縮した病原菌を濾液中で採集し、かつ血液細胞の凝集体をフィルタ上に留め置くための濾過が後に続く、病原菌を濃縮する第1のステップを含む。

## 【 0 0 1 2 】

凝集とは、本発明の意味では、細胞凝縮体の形成に至らせるあらゆる作用を意味し、かつ細胞凝集体とは、2つ以上の細胞を含み、かつ寸法が単離細胞のそれよりも大きいあらゆる細胞集合を意味する。本発明の意味で、凝集体は、血小板活性化に続く血小板凝集のような凝集、赤血球が特殊な分子の存在下である際に得られる赤血球凝着のような凝着、又は細胞膜の静電荷の変化、又は2つ以上の細胞の再集合に至らせる他の細胞接着若しくは接近メカニズムによって生じた細胞接近によって得ることができる。

10

## 【 0 0 1 3 】

好ましい実施態様によれば、血液細胞の様々な母集団の凝集は、血小板の凝集をもたらす化合物を用いて、又は赤血球の特異な凝着をもたらす化合物を用いて行われ得る。

## 【 0 0 1 4 】

例えば、ある種の化合物の存在下で、血小板が、凝集する能力を有することが知られている。これらの凝集体は、濾過によって病原菌から容易に分離され得る。

## 【 0 0 1 5 】

赤血球は、幾つかの凝着性を同様に有する。

20

## 【 0 0 1 6 】

本発明による病原菌の濃縮方法は、第1の凝集ステップの際に凝集されなかった単離細胞を溶解させることからなる血液中の多数細胞、すなわち血小板及び赤血球の母集団の濃度を減少させる第2のステップを場合により含む。

## 【 0 0 1 7 】

血液細胞の母集団の濃度を減少させる、この第2のステップにより、血小板濃度に関して約4ログ( $10^9$ から $10^5$ 細胞/mlへ)の、かつ赤血球濃度に関して約5ログ( $10^{10}$ から $10^5$ へ)の減少が可能になる。

## 【 0 0 1 8 】

より正確には、本発明は、血液細胞を含む血液製剤中に場合により存在する汚染菌の濃縮方法であって、次のステップ：

30

- a) 前記血液製剤の試料に血液細胞の凝集処理を受けさせる、
- b) 汚染菌を通すが、細胞の凝集体を通さない第1フィルタに、処理した試料を通過させることによってステップ(a)で形成した凝集体を除去する、
- c) ステップ(b)で得た濾液の残留細胞を選択的に溶解させる、
- d) 細胞片を通す第2フィルタに、ステップ(c)の溶解物を通過させることによって汚染菌を回収することを含むことを特徴とする方法を対象とする。

## 【 0 0 1 9 】

好ましい実施態様によれば、本発明の方法は、場合により留め置かれる汚染菌を検出するために第2フィルタを分析する追加のステップを含む。

40

## 【 0 0 2 0 】

好適には、本発明による検出方法は、ステップ(a)の凝集の際か、ステップ(c)の溶解の際か、分析ステップ(e)の際、第2フィルタに直接、汚染菌のマーキング剤を添加することを含む。

## 【 0 0 2 1 】

本発明の方法によって検出可能な病原菌のマーキング剤の例として、ChemChrome V6のようなエステラーゼ基質を含むマーキング溶液が挙げられる。

## 【 0 0 2 2 】

同様に、本発明の方法によって検出可能な病原菌のマーキング剤として、マークした抗体又は核酸のマーカーを含むマーキング溶液を使用することができる。好ましくは、マーカー

50

は、蛍光であるか、又は蛍光色素、若しくは蛍光にされる基質の分解を可能にする酵素に連結され、場合により蛍光は、レーザー励起によって検出される。

【0023】

本発明による検出方法は、方法のステップの少なくとも1つに、ステップ(a)の凝集の際か、ステップ(c)の溶解の際か、分析ステップ(e)の際、第2フィルタに直接か、ステップの中の幾つかで、添加され得る、汚染菌の透過処理剤の添加を同様に含む。

【0024】

汚染菌の透過処理剤の例として、ポリエチレンイミン、二酢酸クロルヘキシジン、グルコン酸クロルヘキシジン、単独の、又はナイシンと組み合わせたエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、並びにN-オクチルβ-D-グルコピラノシド、SDS、ツイーン、トリトン、Br i j等のタイプの洗剤が挙げられる。

10

【0025】

本発明の方法の特殊な実施態様によれば、血液製剤の血液細胞は、血小板若しくは赤血球、又はそれらの混合物である。

【0026】

本発明の方法のもう1つの特殊な実施態様によれば、血液製剤の血液細胞は、血小板であり、かつステップ(a)の凝集処理は：

- 血小板抗原の特異性抗体、
- トロンピン、TRAP(トロンピンレセプタ活性化ペプチド)、トリプシン、コラーゲン、トロンボキサンA2、PAF(血小板活性化因子)、イオノホアA23187から選択される強い血小板活性化作用薬、
- ADP、アドレナリン、アラキドン酸、フォン・ヴィレブラント因子、セロトニン又はエピネフリンから選択される弱い血小板活性化作用薬を含む群から選択される凝集剤の少なくとも1つを含む凝集組成物と試料を接触させることを含む。

20

【0027】

好適には、凝集組成物中の血小板抗原の特異なCD9タイプの抗体の濃度は、0.5 μg/ml ~ 100 μg/mlであり、かつ好ましくは、5 μg/ml ~ 40 μg/mlである。

【0028】

更に好適には、凝集組成物中の強い作用薬の濃度は：

30

- トロンピンタイプの作用薬に関して0.5 UI/ml ~ 100 UI/mlであり、かつ好ましくは、1 UI/ml ~ 20 UI/mlであり、
- TRAPタイプの作用薬に関して5 μM ~ 200 μMであり、かつ好ましくは、10 ~ 100 μMであり、
- トリプシンタイプの作用薬に関して1 nM ~ 500 nMであり、かつ好ましくは、10 nM ~ 300 nMであり、
- コラーゲンタイプの作用薬に関して0.05 μg/ml ~ 50 μg/mlであり、かつ好ましくは、1 μg/ml ~ 20 μg/mlであり、
- トロンボキサンA2タイプの作用薬に関して0.01 μg/ml ~ 5 μg/mlであり、かつ好ましくは、0.1 ~ 1 μg/mlであり、
- PAFタイプの作用薬に関して0.005 mg/ml ~ 1 mg/mlであり、かつ好ましくは、0.05 ~ 0.5 mg/mlであり、
- イオノホアA23187タイプの作用薬に関して0.1 μM ~ 100 μMであり、かつ好ましくは、1 μM ~ 20 μMである。

40

【0029】

好適には、凝集組成物中の弱い作用薬の濃度は：

- ADPタイプ、アドレナリンタイプ又はエピネフリンタイプの作用薬に関して0.5 μM ~ 100 μMであり、かつ好ましくは、1 μM ~ 20 μMであり、
- アラキドン酸タイプの作用薬に関して0.001 mM ~ 10 mMであり、かつ好ましくは、0.01 ~ 5であり、

50

- フォン・ヴィレブラント因子タイプの作用薬に関して  $0.001 \text{ mg/ml} \sim 1 \text{ mg/ml}$  であり、かつ好ましくは、 $0.01 \text{ mg/ml} \sim 0.5 \text{ mg/ml}$  であり、  
- セロトニンタイプの作用薬に関して  $0.05 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$  であり、かつ好ましくは、 $0.01 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$  である。

【0030】

全く好ましくは、血小板抗原の特異性抗体は：抗CD9、CD32、抗PTA1、CD42、抗GpIIb/IIIa又は抗GpIV抗体から選択される。

【0031】

本発明の方法のもう1つの特殊な実施態様によれば、血液製剤は、赤血球を含み、かつステップ(a)の凝集処理は、レクチン、ポリエチレンイミン、ポリビニルピロリドン(PVP)、ゼラチン、デキストラン又はポリエチレングリコール(PEG)から選択される少なくとも1つの凝着剤を含む凝着組成物と試料を接触させることを含む。

10

【0032】

好適には、前記レクチンは、エリトロアグルチニン(erythroagglutinine)活性を有する。

【0033】

非常に好ましくは、レクチンは、インゲンマメ、カラスノエンドウ、ソラマメ又はエリスリナ・コラロデンドロン、レンズマメ、アメリカヤマゴボウ、小麦胚芽(Triticum vulgare)のレクチンから選択される。

【0034】

好適には、凝着組成物中のインゲンマメタイプのレクチンの濃度は、 $10 \mu\text{g/ml} \sim 200 \mu\text{g/ml}$  である。

20

【0035】

好適には、凝着組成物中のポリエチレンイミンの濃度は、 $0.1$  (重量/体積) %  $\sim 40$  (重量/体積) % である。

【0036】

非常に好ましくは、前記デキストランは、デキストラン70、デキストラン100、デキストラン500等から選択される。

【0037】

好適には、凝着組成物中のデキストランの濃度は、 $0.1$  (重量/体積) %  $\sim 40$  (重量/体積) % である。

30

【0038】

非常に好ましくは、前記PEGは、PEG35、PEG等から選択される。

【0039】

好適には、凝着組成物中のPEGの濃度は、 $0.05$  (重量/体積) %  $\sim 40$  (重量/体積) % である。

【0040】

好適には、凝着組成物中のゼラチンの濃度は、 $0.5$  (重量/体積) %  $\sim 40$  (重量/体積) % である。

【0041】

非常に好ましくは、前記PVPは、PVP-40、PVP-360等から選択される。

40

【0042】

好適には、凝着組成物中のPVPの濃度は、 $0.05$  (重量/体積) %  $\sim 40$  (重量/体積) % である。

【0043】

好適には、ステップ(c)の細胞溶解は：サポニン、SDS、ツイーン20、トリトンX100、Brj96、ポリドカノール、N-オクチルβ-D-グルコピラノシド、又は炭酸ナトリウムを含む群から選択される1つ又は幾つかの洗剤を含む溶解溶液によって行われる。

【0044】

50

好ましくは、溶解溶液は、サポニン、トリトン X 100、及びツイーン 20 の混合物からなり、かつ非常に好ましくは、溶解溶液は、0.005%~0.5%の(重量/体積%で表す)濃度を有するサポニン、0.001%~0.5%の(重量/体積%で表す)濃度を有するトリトン X 100、0.01%~1%の濃度を有するツイーン 20、0.1%~0.5%の濃度を有する N - オクチル  $\beta$  - D - グルコピラノシドを含む。

【0045】

好適には、細菌の透過処理は：(グルコン酸、二酢酸)クロルヘキシジン、ポリエチレンイミン、N - オクチル  $\beta$  - D - グルコピラノシド、単独の、又は EDTA と組み合わせたナイシンを含む群から選択される 1 つ又は幾つかの反応体を含む溶液によって行われる。

10

【0046】

好ましくは、透過処理剤は、0.0001(重量/体積)%~0.1(重量/体積)%の濃度(重量/体積)を有するクロルヘキシジン、5  $\mu$ g/ml ~ 120  $\mu$ g/ml の濃度を有するポリエチレンイミン、0.1(重量/体積)%~0.5(重量/体積)%の濃度を有する N - オクチル  $\beta$  - D - グルコピラノシド、及び単独の、又は 1 mM ~ 10 mM の濃度を有する EDTA と組み合わせた、0.1  $\mu$ g/ml ~ 0.5  $\mu$ g/ml のナイシンに使用される。

【0047】

本発明の方法は、血液製剤の多数の汚染菌を濃縮及び検出するために使用され得るが、それらの中で、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、生及び/又は死細菌の胞子を挙げる

20

【0048】

好適には、本発明の方法で利用する第 1 フィルタの孔の寸法は、2  $\mu$ m ~ 20  $\mu$ m である。

【0049】

好適には、本発明の方法で利用する第 2 フィルタの孔の寸法は、0.2  $\mu$ m ~ 2  $\mu$ m である。

【0050】

好適には、本発明の方法のステップ(e)の汚染菌の検出は、密閉した装置中で行われる。

30

【0051】

非常に好ましくは、本発明の方法により濃縮され得る汚染菌は、好気性又は嫌気性細菌、カビ、酵母、又は生及び/又は死細菌の胞子の群から選択され、第 1 フィルタの孔の寸法は、2  $\mu$ m ~ 20  $\mu$ m であり、かつ第 2 フィルタの孔の寸法は、0.2  $\mu$ m ~ 2  $\mu$ m である。

【0052】

本発明は：

- 血液細胞の少なくとも 1 つの凝集剤及び場合により病原菌の少なくとも 1 つのマーキング剤を含む、密封かつ無菌の第 1 タンク(1)、

- 血液細胞の少なくとも 1 つの溶解剤及び場合により病原菌の少なくとも 1 つのマー

40

- 前記第 1 タンク中に形成された凝集体を留め置くことが可能な、第 1 及び第 2 タンク

- 間に置かれる第 1 フィルタ(3)、

- 汚染病原菌となり得るものを留め置くことが可能な、第 2 タンクの下流に置かれる第

- 2 フィルタ(4)、

- 第 1 タンク(1)及び第 1 フィルタ(3)の間、第 1 フィルタ(3)及び第 2 タンク

- (2)の間、並びに第 2 タンク(2)及び第 2 フィルタ(4)の間に置かれる密封かつ無

50

- 菌の接続手段(5)を含む、本発明の病原菌検出方法において利用され得る、血液細胞

好ましい実施態様によれば、本発明の装置は、血液製剤を含むポケットを無菌の第 1 タンク ( 1 ) に連結するために、密封かつ無菌の接続手段 ( 6 ) を含む。

【 0 0 5 4 】

好適には、血液製剤を含むポケットを無菌の第 1 タンクに連結する、密封かつ無菌の接続 ( 6 ) は、逆止め弁 ( 7 ) を備える。

【 0 0 5 5 】

もう 1 つの好ましい実施態様によれば、本発明の装置は、所定の体積の血液製剤を、前記第 1 タンク ( 1 ) に向かって前記製剤の貯蔵ポケットから直接試料採取する手段を含む。

【 0 0 5 6 】

10

好適には、本発明の装置の密封かつ無菌の第 1 タンク ( 1 ) は、試料吸入システム ( 8 ) を備え、かつ好ましくは、前記吸入システムは、ピストンである。

【 0 0 5 7 】

もう 1 つの好ましい実施態様によれば、本発明の装置の第 2 フィルタ ( 4 ) は、前記フィルタを回収することを可能にする、分離され得る 2 つの部分から構成される膜支持体中に含まれる。

【 0 0 5 8 】

好適には、本発明の装置は、密閉され、かつ無菌である。

【 0 0 5 9 】

本発明のその他の利点及び特徴は、以下に続く実施例及び添付図面を読めば、現れるであろう。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 6 0 】

#### 実験結果

【 0 0 6 1 】

#### I . 凝集ステップによる病原菌の濃縮

【 0 0 6 2 】

#### I . 1 . 血小板凝集

【 0 0 6 3 】

( 実施例 1 )

30

#### 強い作用薬：トロンビンによる凝集

【 0 0 6 4 】

トロンビンは、血小板凝集の強い作用薬である。

【 0 0 6 5 】

本発明の枠内で出願人が行った実験作業において、トロンビン溶液 ( 参照 T 8 8 8 5 S i g m a ) が : 1 0 U I / テストの割合で使用される際に、1 0 0 U I / m l の濃度で、かつ 1 U I / テストの割合で使用される際に、希釈溶液 ( 9 0 0  $\mu$  l の P B S 緩衝液を添加した 1 0 0  $\mu$  l のトロンビン原液 ) の形状で調製された。

【 0 0 6 6 】

トロンビンを介する血小板の凝集は、次のステップ :

40

- 2 0  $\mu$  l の P B S 緩衝液及び 2 0  $\mu$  l のトロンビンを添加する、1 6 0  $\mu$  l の血小板濃縮物を管中に置く、

- 5 分間、外界温度で管を手動で攪拌する、
- 8 0 0  $\mu$  l の P B S 緩衝液を前記管に添加する、
- 管の中身を空隙率 1 1  $\mu$  m のフィルタで濾過する、
- 濾液から 1 / 2 0 ~ 1 / 1 0 の一連の希釈を行う、
- 膜 C B 0 4 で濾液の 1 0 0  $\mu$  l の各希釈溶液を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 膜に場合により留め置かれる血小板を計数することを含む。

【 0 0 6 7 】

50

以下の表 1 は、得られた結果を図示し、かつ 2 つの異なる濃度で使用するトロンビンの存在下で得られる血小板凝集体数を示し、かつ添付の図 1 は、これら結果をグラフによって図示する。

【 0 0 6 8 】

【表 1】

|       | 対照      | トロンビン1UI | トロンビン10UI |
|-------|---------|----------|-----------|
| P C 6 | 1 5 8 4 | 3 7 4    |           |
|       | 1 5 3 5 | 4 9 0    |           |
| P C 6 | 2 6 2 2 | 1 3 5 8  | 4 4       |
|       | 2 7 3 7 | 1 3 9 9  | 3 0       |

10

【 0 0 6 9 】

( 実施例 2 )

病原菌の存在下でのトロンビンによる血小板凝集

【 0 0 7 0 】

トロンビンの存在下での病原菌凝集を評価するために利用した実験作業は、次のステップ：

- 低温球体 ( c r y o s p h e r e ) の大腸菌を 9 m l の大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ 3 7 で 1 8 ~ 2 4 時間インキュベートする、

20

- 1 6 0 μ l の血小板濃縮物に、2 0 μ l の大腸菌懸濁液及び 2 0 μ l のトロンビンを添加する、

- 5 分間、外界温度で管を手動で撹拌する、

- 8 0 0 μ l の P B S 緩衝液を添加する、

- 空隙率 1 1 μ m のフィルタを通して濾過する、

- 一連の希釈：1 / 2 0 及び 1 / 1 0 及び 1 / 1 0 、を行う、

- 膜 C B 0 4 で 1 0 0 μ l の試料を濾過する、

- エステラーゼマーキングを行う、

- 検出を行うことを含む。

30

【 0 0 7 1 】

以下の表 2 は、大腸菌の存在下でのトロンビンによる血小板濃縮物の凝集を示す。

【 0 0 7 2 】

【表 2】

| 病原菌 | 血小板製剤 | トロンビン   | 算出結果    |
|-----|-------|---------|---------|
| 大腸菌 | —     | —       | 1 9 2 1 |
|     | —     | —       | 1 9 9 9 |
| 大腸菌 | P C 6 | —       | 6 5 7   |
|     |       |         | 7 6 3   |
| 大腸菌 | P C 6 | 1 U I   | 1 4 0   |
|     |       |         | 1 6 7   |
| 大腸菌 | P C 6 | 1 0 U I | 1 0 9   |
|     |       |         | 1 2 2   |

40

【 0 0 7 3 】

トロンビン添加後、ほぼ即座に血塊が現れる。

【 0 0 7 4 】

50

## (実施例 3)

弱い作用薬：ADP の存在下での血小板凝集

## 【0075】

ADP (SIGMA) を、蒸留水中に 200  $\mu$ M の濃度で使用する。

## 【0076】

ADP の存在下での血小板凝集を評価するために利用した実験作業は、次のステップ：

- 50  $\mu$ l の PBS 緩衝液及び 50  $\mu$ l の ADP を添加する、400  $\mu$ l の血小板濃縮物を管中に導入する、

- 5 分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 500  $\mu$ l の PBS 緩衝液をそこに添加する、
- 1 / 20 及び 1 / 10 及び 1 / 10 の一連の希釈を行う、
- 膜 CB04 で 100  $\mu$ l の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、及び
- 検出を行うことを含む。

10

## 【0077】

図 1 に図示した結果は、ADP の存在下で、血小板濃度が、約 50 % ~ 約 90 % 減少することを示す。

## 【0078】

## (実施例 4)

病原菌の存在下での ADP による血小板凝集

20

## 【0079】

ADP の存在下での血小板凝集は、次のステップ：

- 低温玉 (cryobille) の表皮ブドウ球菌を 9 ml の大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ 37 で 18 ~ 24 時間インキュベートする、

- 400  $\mu$ l の血小板濃縮物に対し、50  $\mu$ l の表皮ブドウ球菌懸濁液及び 50  $\mu$ l の ADP を添加する、

- 5 分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 500  $\mu$ l の PBS 緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率 5  $\mu$ m のフィルタで濾過を行う、
- 1 / 20 及び 1 / 10 及び 1 / 10 の一連の希釈を行う、
- 膜 CB04 で 100  $\mu$ l の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行うことを含む。

30

## 【0080】

起こり得るトラッピング効果を増加させるように、病原菌を高濃度で植え付ける。ADP を 10  $\mu$ M の濃度で、血小板及び細菌に添加する。

## 【0081】

## 【表 3】

| 病原菌     | 血小板製剤 | 凝集             | 結果         | 細菌濃度 / ml |
|---------|-------|----------------|------------|-----------|
| 表皮ブドウ球菌 | PC6   | なし             | 590<br>605 | 6.0E+07   |
| 表皮ブドウ球菌 | PC6   | ADP 10 $\mu$ M | 492<br>441 | 4.7E+07   |

40

## 【0082】

以上の表 3 に示す、得られた結果は、74 % の細菌が、凝集ステップ後に回収されることを示している。

## 【0083】

50

## (実施例 5)

CD9 抗体の存在下での血小板凝集

## 【0084】

CD9 抗体が血小板の活性化、及び従ってその凝集をもたらすことは、公知である。記載するテストは、2つのCD9クローン、SN4クローン(Ancel、ref 156-020、濃度100 µg/ml)及び6B1クローン(Hemosystem)により行った。

## 【0085】

このCD9抗体によって利用される選択的凝集方法は、次のステップ：

- 400 µlの血小板濃縮物に対し、50 µlのPBS緩衝液及び50 µlのCD9抗体を添加する、
- 5分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 500 µlのPBS緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率5 µmのフィルタで濾過を行う、
- 1/20及び1/10及び1/10の一連の希釈を行う、
- 膜CB04で100 µlの試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行うことを含む。

## 【0086】

CD9抗体(SN4クローン)を、10 µg/mlの最終濃度で、血小板の存在下で使用した。

## 【0087】

添付の図2は、CD9抗体(SN4クローン)の存在下で得られた血小板凝集を図示する。

## 【0088】

血小板凝集に必要なCD9抗体の最適濃度を評価するために、用量反応曲線を作成した。

## 【0089】

方法：

- 管中に置かれる400 µlの血小板濃縮物に対し、CD9抗体の、0から20 µg/mlに及ぶ最終濃度を有する、抗体の様々な希釈溶液を添加する、
- 5分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 500 µlのPBS緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率5 µmのフィルタで濾過を行う、
- 一連の希釈：1/10の4回の希釈を行う、
- 膜CB04で100 µlの試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行う。

## 【0090】

図3及び5は、漸増分量のCD9抗体(SN4クローン)の存在下で凝集した血小板の算出結果及びこのようにして得られる用量反応曲線をそれぞれ示す。

## 【0091】

残留血小板の算出は、アナライザによって行う。

## 【0092】

凝集は、用量依存性である。凝集効果を増大させるために、CD9濃度をできるだけ増加させた。しかしながら、細菌検出のために妥協点が定められ、約10 µg/mlのCD9抗体の濃度を使用して、血小板濃度が、1から2ログに減少され得ることを決定した。

## 【0093】

## (実施例 5の2)

血小板凝集に必要なCD9抗体(6B1クローン)の最適濃度を評価するために、用量

反応タイプの実験を確立した。

【 0 0 9 4 】

方法：

- 管中に置かれる 3 m L の血小板濃縮物に対し、C D 9 抗体の、2 . 5  $\mu$  g / m L から 4 0  $\mu$  g / m L に及ぶ最終濃度を有する、抗体の様々な希釈溶液を添加する、
- 1 5 分間、外界温度で管を撹拌する、
- 空隙率 5  $\mu$  m のフィルタで濾過を行う、
- 上記のような血小板の計算を行う。

【 0 0 9 5 】

添付の図 4 は、漸増分量の C D 9 抗体 ( 6 B 1 クローン ) の存在下で凝集した血小板の算出結果を示す。

【 0 0 9 6 】

( 実施例 6 )

細菌の存在下での C D 9 抗体による血小板凝集

【 0 0 9 7 】

方法：

- 低温玉の表皮ブドウ球菌を大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ 3 7 で 1 8 ~ 2 4 時間インキュベートする、
- 管中に置かれる 4 0 0  $\mu$  l の血小板濃縮物に対し、5 0  $\mu$  l の表皮ブドウ球菌懸濁液及び 5 0  $\mu$  l の C D 9 を添加する、
- 5 分間、外界温度で管を手動で撹拌する、
- 5 0 0  $\mu$  l の P B S 緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率 5  $\mu$  m のフィルタで濾過を行う、
- 一連の希釈：1 / 1 0 の 4 回の希釈を行う、
- 膜 C B 0 4 で 1 0 0  $\mu$  l の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行う。

【 0 0 9 8 】

以下の表 4 は、細菌の存在下での C D 9 による血小板凝集を図示する。

【 0 0 9 9 】

【 表 4 】

| 細菌      |         | C D 9      | 結果             | 回収率% |
|---------|---------|------------|----------------|------|
| 表皮ブドウ球菌 | P C 1 0 | —          | 4 6<br>4 4     | 9 3  |
| 表皮ブドウ球菌 | P C 1 0 | +撹拌        | 4 3<br>4 8     |      |
| 大腸菌     | P C 1 0 |            | 2 1 8<br>2 4 3 | 6 4  |
| 大腸菌     | P C 1 0 | C D 9 + 撹拌 | 1 6 6<br>1 4 8 |      |

【 0 1 0 0 】

これらの結果は、表皮ブドウ球菌の細菌が、大いに回収されたことを示す。大腸菌に関し、算出は 3 6 % 減少する。

【 0 1 0 1 】

I . 2 . 赤血球凝着

【 0 1 0 2 】

レクチンは、細胞を凝着させ、かつ / 又は炭水化物複合体を沈殿させる、非免疫由来の

糖タンパク質である。これらの分子は、一般に特異な炭水化物に結合される。

【0103】

これらの実験作業の枠内で、次の2つのレクチンを使用した：

- P H A - E インゲンマメ
- カラスノエンドウ。

【0104】

(実施例1)

レクチンによる赤血球凝着

【0105】

P H A - E インゲンマメレクチン ( S i g m a ) を、P B S 中で 2 m g / m l の濃度で 10  
使用した。

【0106】

V i c i a A c t i v a レクチン ( S i g m a ) を、1 m g / m l の濃度で使用した。

【0107】

2つのレクチンの迅速な評価により、カラスノエンドウによる赤血球凝着がないことを確認することが可能になった。他方、インゲンマメは、急速かつ有効な凝着をもたらす。

【0108】

方法：

- 4 0 0  $\mu$  l の赤血球を、5 0  $\mu$  l の P B S 及び 5 0  $\mu$  l のインゲンマメを添加する、 20  
管中に置く、
- 5 分間、外界温度で管を手動で攪拌する、
- 5 0 0  $\mu$  l の P B S 緩衝液をそこに添加する、
- 空隙率 5  $\mu$  m のフィルタで濾過を行う、
- 一連の希釈：1 / 1 0 の 4 回の希釈を行う、
- 抗グリコホリン P E 抗体によりマーキングを行う、
- 検出を行う。

【0109】

添付の図6は、インゲンマメの存在下で得られる赤血球凝着を示す。

【0110】

このテストにおいて、インゲンマメは、2 0 0  $\mu$  g / m l の濃度で使用した。 30

【0111】

インゲンマメの存在下で、赤血球濃度の2ログの再現可能な減少が観察される。

【0112】

(実施例2)

細菌の存在下での赤血球凝着

【0113】

予備テストは、インゲンマメレクチン及び細菌の間に相互作用がないことを示している。

【0114】

方法

低温玉の大腸菌を 9 m l の大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ 3 7 で 1 8 ~ 2 4 時間インキュベートする、

- 管中で、4 0 0  $\mu$  l の P B S、5 0  $\mu$  l の大腸菌 ( 純粋培養 ) 及び 5 0  $\mu$  l のインゲンマメを混合する、
- 5 分間、外界温度で管を手動で攪拌する、
- 5 0 0  $\mu$  l の P B S 緩衝液をそこに添加する、
- 5  $\mu$  m のフィルタで濾過を行う、
- 一連の希釈：1 / 1 0 の 4 回の希釈を行う、
- 膜 C B 0 4 で 1 0 0  $\mu$  l の試料を濾過する、 50

- エステラーゼマーキングを行う、
- 検出を行う。

【 0 1 1 5 】

200  $\mu$ g / ml のインゲンマメの濃度を使用して得られた結果を、以下の表 5 に図示する。

【 0 1 1 6 】

【表 5】

| 細菌              | 赤血球  | レクチン<br>(濃度)               | 算出         | 回収率% |
|-----------------|------|----------------------------|------------|------|
| 大腸菌<br>NCTC9001 | RBC9 |                            | 662<br>604 |      |
| 大腸菌<br>NCTC9001 | RBC9 | インゲンマメ<br>200 $\mu$ g / ml | 544<br>579 | 91   |

10

【 0 1 1 7 】

これらの結果は、91%の細菌が凝着ステップ後に検出されること、及びこの凝着ステップ後に、赤血球濃度が2ログ減少し、他方大腸菌株がなおも良く回収されることを示す。

20

【 0 1 1 8 】

II . 溶解ステップによる病原菌濃縮

【 0 1 1 9 】

本発明の枠内で、出願人は、分析する試料中に場合により存在する細菌の濃度に影響を及ぼすことなく血液細胞の除去を可能にする様々な選択的溶解技術の開発を行った。

【 0 1 2 0 】

幾つかの予めの調査に続き、出願人は、幾つかの細菌がトリトン X 100 のような洗剤の存在下で耐性を有することを確認し、かつ細菌回収率が最適である、最適洗剤濃度を決定した。

【 0 1 2 1 】

(実施例 1)

純粋細菌培養に対する溶解溶液の配合の効果

【 0 1 2 2 】

方法：

- 株は、9 ml の大豆トリプトンブイヨンの管中で保存され、かつ 37 で 18 ~ 24 時間インキュベートする、
- 一連の希釈 ( 1 / 10 ) を 10<sup>-5</sup> まで PBS 緩衝液中で行った、
- 1 ミリリットルの最終希釈溶液を、9 ml の溶解溶液 ( 0 . 0 1 ( 重量 / 体積 ) % のサポニン、0 . 1 ( 重量 / 体積 ) % のツイーン及び 0 . 0 0 1 ( 重量 / 体積 ) % のトリトン X 100 によって 15 分間処理する、
- 膜 CB04 で 100  $\mu$ l の試料を濾過する、
- エステラーゼマーキングを添付書類 1 に掲載される情報により行う、
- 検出を行う。

30

40

【 0 1 2 3 】

これら様々な試験の結果を、以下の表 6 に図示する。表 6 に、得られた様々な細菌回収率を表す。

【 0 1 2 4 】

【表 6】

| 株                                 | 対照                     | 溶解した試料               | 回収率%  |
|-----------------------------------|------------------------|----------------------|-------|
| 大腸菌                               | 1 3 2<br>1 4 5         | 1 5 3<br>1 1 9       | 9 8   |
| セレウス菌                             | 4 6 5<br>5 7 2         | 6 1<br>5 4           | 1 1   |
| 大腸菌                               | 5 2<br>5 4             | 4 4<br>4 4           | 8 3   |
| 表皮ブドウ球菌                           | 2 9 5 2<br>3 0 6 9     | 3 0 3 4<br>3 0 2 0   | 1 0 1 |
| エンテロバクター<br>アエロゲネス                | 8 4 1<br>8 0 2         | 8 8 0<br>9 2 5       | 1 1 0 |
| 緑膿菌                               | 2 6 1<br>2 1 5         | 8 2<br>6 6           | 3 1   |
| 黄色ブドウ球菌                           | 1 0 5<br>9 4           | 1 2 6<br>1 2 2       | 1 2 5 |
| プロテウス菌<br>( <i>P. mirabilis</i> ) | 7 2 9<br>9 0 6         | 1 1 2 9<br>1 1 5 1   | 1 3 9 |
| ネズミチフス菌                           | 6 0 8<br>6 0 0         | 8 2 0<br>7 8 7       | 1 3 3 |
| 霊菌                                | 1 8 4 8<br>1 7 7 5     | 1 8 2 6<br>1 8 6 0   | 1 0 2 |
| <i>C. amycolatum</i>              | 1 1 0 3<br>1 1 6 7     | 1 5 1 2<br>2 0 3 5   | 1 5 6 |
| 肺炎桿菌                              | 7 2<br>8 2             | 7 9<br>7 3           | 9 9   |
| 蛍光菌                               | 4 0 3 9<br>3 9 5 1     | 4 8 7 3<br>5 1 0 5   | 1 2 5 |
| ウシ連鎖球菌                            | 3 0 7 4<br>2 9 3 9     | 1 8 4 8<br>1 9 7 8   | 6 4   |
| エンテロコリチカ菌                         | 1 0 2 1 8<br>1 0 3 2 1 | 9 8 8 8<br>1 0 5 2 6 | 9 9   |

## 【 0 1 2 5 】

これらの結果は、添付の図 7 に図示する。

## 【 0 1 2 6 】

大部分の株は、溶解溶液によって影響を及ぼされない：回収率は、緑膿菌及びセレウス菌を除き、所定の予測と一貫性があり、95～115%である。

## 【 0 1 2 7 】

(実施例 2)

血小板中に植え付けた細菌に対する溶解溶液の配合の効果

## 【 0 1 2 8 】

汚染のシミュレーションを行うように、2つの株を血小板濃縮物中で増加するようにした。

## 【 0 1 2 9 】

方法

- セレウス菌及び黄色ブドウ球菌株を、20mlの血小板中の $10^5$ の細胞の濃度を使

10

20

30

40

50

用して、50 ml の管中の血小板中に植え付けた、

- これらの50 ml の管は、血小板インキュベータ中に22 で数日間、保存する、
- 1ミリリットルの植え付けた血小板を、9 ml の溶解溶液によって希釈する、
- 15分間、外界温度で溶解を行う、
- 膜CB047で100  $\mu$  l の試料を濾過する、
- 添付書類1に示すように、細菌をステアリン基質によってマークする、
- 膜をアナライザで走査する。

#### 【0130】

溶解後の細菌の算出結果を以下の表7に図示する。

#### 【0131】

#### 【表7】

|         | 対照            | 溶解      |
|---------|---------------|---------|
| セレウス菌   | 16            | 14      |
|         | 24            | 27      |
|         | 細菌/ml 2.0E+06 | 2.1E+06 |
| 黄色ブドウ球菌 | 1966          | 1885    |
|         | 2046          | 1901    |
|         | 細菌/ml 2.0E+08 | 1.9E+08 |

#### 【0132】

細菌は、 $5 \times 10^3$  細胞/ml の最初の濃度で植え付け、かつ約  $10^6 \sim 10^9$  細胞/ml の濃度で数日後に検出する。

#### 【0133】

これらの実験の結果、血小板中で発育した細菌は、溶解溶液によって影響を及ぼされなかったということになる。

#### 【0134】

(実施例2b)

純粋細菌培養に対する溶解溶液の配合の効果

#### 【0135】

方法

- 株は、9 ml の大豆トリプトンブイヨンの管中で保存され、かつ37 で18~24時間インキュベートする、
- エステラーゼマーキングによる細菌数の決定後に、3000の細菌を3 ml のPBS中に接種する、
- 3 ml を、溶解溶液 (NOG 0.25% ~ 2%) で20分間処理する、
- 膜CB04で試料全体を濾過する、
- 固相血球計算法で算出を行う。

#### 【0136】

得られた結果を添付の図11に図示する。

#### 【0137】

(実施例3)

赤血球に対する溶解組成物の配合の効果

#### 【0138】

方法：

- 1ミリリットルの赤血球を、9 ml の溶解溶液、又は9 ml のPBS中で希釈する (対照)、
- 15分間、外界温度で溶解を行う、
- 細胞カウンタを用いて溶解した又は溶解しない試料を分析する。

#### 【0139】

図 9 は、溶解しない赤血球製剤に対する溶解した赤血球製剤で得られた結果を示す。

【 0 1 4 0 】

( 実施例 4 )

血小板に対する溶解組成物の配合の効果

【 0 1 4 1 】

溶解溶液の効率の再現性をテストした。血小板の異なる試料を溶解し、かつ分析した。

【 0 1 4 2 】

方法：

- 1 ミリリットルの血小板を、9 m l の溶解溶液中で希釈する、
- 1 5 分間、外界温度で溶解を行う、
- 一連の希釈 ( 1 / 1 0 ) を  $10^{-5}$  まで P B S 緩衝液中で行った、
- 膜 C B 0 4 で 1 0 0  $\mu$  l の試料を濾過する、
- エステラーゼ基質によって微生物をマークする、
- 膜をアナライザで走査する。

10

【 0 1 4 3 】

添付の図 8 は、様々な血小板試料によって得られた溶解の結果を図示する。

【 0 1 4 4 】

I I I . 2 つの凝集及び溶解ステップによる病原菌濃縮

【 0 1 4 5 】

2 つのステップでの病原菌濃縮による試料調製は：

- 1 ) 血液製剤の特異な細胞凝集又は凝着、
- 2 ) 血液製剤の特異な細胞溶解を含む。

20

【 0 1 4 6 】

( 実施例 1 )

特異な血小板分離

【 0 1 4 7 】

方法：

- 低温玉の大腸菌を 9 m l の大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ 3 7 °C で 1 8 ~ 2 4 時間インキュベートする。

【 0 1 4 8 】

第 1 凝集ステップは、次のように行われる：

- 1 m l の血小板濃縮物、5 0  $\mu$  l の大腸菌 ( 純粋培養 ) 及び 1 0 0  $\mu$  l の C D 9 を管中で混合する、
- 5 分間、外界温度で管を手動で攪拌する。

30

【 0 1 4 9 】

第 2 溶解ステップが、その次に行われる：

- 9 0 0  $\mu$  l の溶解緩衝液を、凝集後に 1 0 0  $\mu$  l の濾液に添加する、
- 1 5 分間、外界温度で全体を維持する、
- 一連の希釈：1 / 1 0 の 4 回の希釈を行う、
- 膜 C B 0 4 でこのようにして得た 1 0 0  $\mu$  l の試料を濾過する、
- エステラーゼ基質によって細菌及び血小板のマーキングを行う ( 添付書類 1 ) 、
- アナライザによって細菌及び血小板を算出する。

40

【 0 1 5 0 】

細菌濃縮方法を 2 つのステップで行って得られる結果を以下の表 8 に図示する。

【 0 1 5 1 】

【表 8】

| 細菌              | 血小板濃縮物<br>(PC) | 凝集剤 |    | 細菌算出       | 細菌回収率<br>% |
|-----------------|----------------|-----|----|------------|------------|
| 大腸菌<br>NCTC9001 | PC             |     |    | 337<br>313 |            |
| 大腸菌<br>NCTC9001 | PC             |     | 溶解 | 302<br>256 | 86%        |
| 大腸菌<br>NCTC9001 | PC             | CD9 |    | 266<br>161 | 66%        |
| 大腸菌<br>NCTC9001 | PC             | CD9 | 溶解 | 157<br>138 | 45%        |

10

## 【0152】

(実施例2)

## 特異な赤血球分離

## 【0153】

方法：

- 低温玉の大腸菌を9mlの大豆トリプトンブイヨンの管中に導入し、かつ37℃で18～24時間インキュベートする。

## 【0154】

凝着ステップは、次のように行われる：

- 1mlの赤血球、50μlの大腸菌（純粋培養）及び125μlのレクチンを管中で混合する、  
 - 5分間、外界温度で管を手動で撈拌する、  
 - 空隙率5μmのフィルタで濾過を行う。

## 【0155】

第2溶解ステップが、その次に行われる：

- 900μlの溶解緩衝液を、凝着後、100μlの濾液に添加する、  
 - 15分間、外界温度で全体を維持する、  
 - 一連の希釈：1/10の4回の希釈を行う、  
 - 膜CB04でこのようにして得た100μlの試料を濾過する、  
 - エステラーゼ基質によって細菌の、かつ抗グリコホリンPE抗体によって赤血球のマーキングを行う（添付書類2）、  
 - アナライザによって細菌及び血小板を算出する。

30

## 【0156】

以下の表9は、溶解ステップが後に続く、レクチンによる赤血球の凝着ステップ後に行われる細菌算出によって得られる結果を示す。

## 【0157】

【表 9】

|                     |       |      |    | 細菌算出       | 細菌回収率<br>(%) | 赤血球算出        |
|---------------------|-------|------|----|------------|--------------|--------------|
| 大腸菌<br>NCTC<br>9001 | 赤血球10 |      |    | 441<br>449 |              | 3582<br>4188 |
| 大腸菌<br>NCTC<br>9001 | 赤血球10 | レクチン | 溶解 | 261<br>348 | 68           | 161<br>180   |

40

50

## 【 0 1 5 8 】

凝着後、赤血球濃度は、1 . 5 ログ減少した。

## 【 0 1 5 9 】

この2つのステップの後に、68%の細菌を回収した。

## 【 0 1 6 0 】

I V . マーキング剤

## 【 0 1 6 1 】

(実施例1)

エステラーゼ基質 C h e m C h r o m e V 6

## 【 0 1 6 2 】

マーキング溶液は、次の手順に従い、エステラーゼ基質から調製され、かつ本発明の検出方法において使用され得る。

a) 調製

- 緩衝液 C h e m S o l B 1 6、1ミリリットル当たり10  $\mu$  lのエステラーゼ基質 C h e m C h r o m e V 6 (膜当り500  $\mu$  lのマーキング溶液)

- この溶液は、4 で光を避けて最大4時間、保存する。

b) 使用

マーキング緩衝液を直径33mmのペトリ皿に導入する。

緩衝液に対し、500  $\mu$  lのマーキング溶液を配分する。

濾過斜面に膜 C B 0 4 を置く。分析する100  $\mu$  lの試料で濾過する。

緩衝液上に膜を置く。

15分間37 でインキュベートする。

## 【 0 1 6 3 】

(実施例2)

マークされた抗体

## 【 0 1 6 4 】

同様に、マークされた抗体を含むマーキング溶液は、次の手順に従い、本発明の検出方法において使用され得る

- 90  $\mu$  lの試料の希釈溶液を採取する、

- 10  $\mu$  lの抗グリコホリン P E 抗体を添加する、

- 15分間、外界温度で光を避けて渦を作り、かつインキュベートする、

- 900  $\mu$  mの P B S 緩衝液を添加する、

- 濾過斜面中に膜 C B 0 4 を置く、

- 分析する100  $\mu$  lの溶液を真空濾過する、

- アナライザの1次及び3次ケーブルを逆にしてアナライザ中で膜を分析する。

## 【 0 1 6 5 】

(実施例3)

マーカの浸透を改良するための細菌透過処理剤の添加の重要性

## 【 0 1 6 6 】

方法：

- 株は、9mlの大豆トリプトンブイヨンの管中で保存され、かつ37 で18~24時間インキュベートする、

- エステラーゼマーキングによる細菌数の決定後に、3000の細菌を3mLの血小板濃縮物中に接種する、

- 3mLを、1mlの凝集溶液 ( C D 9 : 6 B 1 クローン : 30  $\mu$  g / m L、P i c o g r e e n 1 / 2000、P E I 40  $\mu$  g / m L ~ 80  $\mu$  g / m L ) で40分間処理する、

- 試料を空隙率5  $\mu$  mのフィルタを通して濾過する、

- 試料は、溶解溶液 ( クロルヘキシジン  $5 \times 10^{-3}$  %、N O G 0 . 5 %、ナイシン 0 . 2  $\mu$  g / m L、E D T A 5 m M ) 中で20分間インキュベートする、

10

20

30

40

50

- 膜 C B 0 4 で試料全体を濾過する、
- 固相血球計算アナライザで算出を行う。

【 0 1 6 7 】

V . 結論

【 0 1 6 8 】

最良の病原菌調製条件に到達するための技術的選択が、実験作業により定義された。

【 0 1 6 9 】

血小板濃縮物に関して、これらの技術的選択は：

- 1 ) 例えば C D 9 のような血小板活性化抗体による凝集ステップ、
- 2 ) サボニン、ツイーン 2 0 及びトリトン X 1 0 0 のような洗剤の組み合わせによる細胞溶解ステップを含む。

【 0 1 7 0 】

赤血球濃縮物に関して：

- 1 ) 例えばインゲンマメのようなレクチンによる凝着ステップ、
- 2 ) サボニン、ツイーン 2 0 及びトリトン X 1 0 0 のような洗剤の組み合わせによる細胞溶解ステップを含む。

【 0 1 7 1 】

病原菌のマーキング及び透過化処理は、凝集ステップの際、溶解ステップの際、又は直接、分析前に最終フィルタ上に濃縮された菌に対して、一様に介在し得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 7 2 】

【図 1】血小板濃縮物を様々な濃度のトロンビンと接触させた後の血小板の算出を図示する。

【図 2】2つの血小板試料に関し、A D P の存在下での凝集後の血小板の算出を図示する。

【図 3】4つの血小板試料に関し、C D 9 抗体 ( S N 4 クローン ) の存在下での血小板の算出を示す。

【図 4】3 m L の血小板濃縮物に対して使用する、漸増分量の C D 9 抗体 ( 6 B 1 クローン ) の存在下での血小板の算出結果を示す。

【図 5】増加する濃度の C D 9 抗体 ( S N 4 クローン ) の存在下で得られる用量反応曲線を示す。

【図 6】3つの赤血球濃縮物試料に関し、2 0 0  $\mu$  g / m l の濃度で使用するインゲンマメレクチンの存在下での赤血球の凝着を図示する。

【図 7】純粋培養中の様々な病原菌の回収に対する溶解溶液の効果を示す。

【図 8】2つの血小板試料の血小板計算に対する溶解溶液の効果を示す。

【図 9】赤血球濃縮物の異なる2つの試料の赤血球計算に対する溶解の効果を図示する。

【図 1 0】マーカの浸透を増加させるための透過化処理剤としてポリエチレンイミン ( P E I ) を使用した、血小板試料中の大腸菌細菌の算出を図示する。

【図 1 1】純粋細菌培養に対する溶解溶液中の N - オクチル  $\beta$  - D - グルコピラノシドの濃度の効果を図示する。

【図 1 2】- 密封かつ無菌の第 1 タンク ( 1 )、- 密封かつ無菌の第 2 タンク ( 2 )、- 第 1 タンク ( 1 ) 及び第 2 タンク ( 2 ) の間に置かれる無菌の第 1 フィルタ ( 3 )、- 第 2 タンク ( 2 ) の下流に置かれる無菌の第 2 フィルタ ( 4 )、- 第 1 タンク ( 1 ) 及び第 1 フィルタ ( 3 ) の間、第 1 フィルタ ( 3 ) 及び第 2 タンク ( 2 ) の間、並びに第 2 タンク ( 2 ) 及び第 2 フィルタ ( 4 ) の間に置かれる密封かつ無菌の接続手段 ( 5 )、- 血液製剤を含むポケットを第 1 タンク ( 1 ) に連結するための、密封かつ無菌の接続手段 ( 6 )、- 血液製剤を含むポケットを第 1 タンク 1 に連結する、接続 ( 6 ) 中に置かれる逆止め弁 ( 7 )、- 試料吸入システム ( 8 ) を含む本発明の病原菌の濃縮装置の特殊な実施を図示する。

【符号の説明】

10

20

30

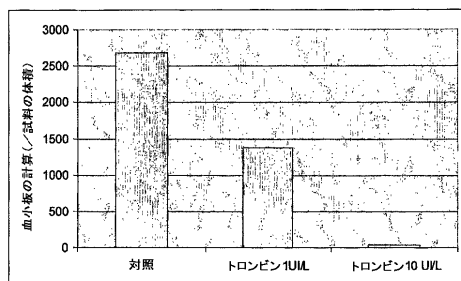
40

50

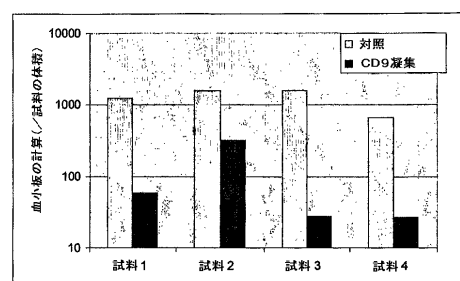
## 【 0 1 7 3 】

- 1 第 1 タンク
- 2 第 2 タンク
- 3 第 1 フィルタ
- 4 第 2 フィルタ
- 5 接続手段
- 6 接続手段
- 7 逆止め弁
- 8 試料吸入システム

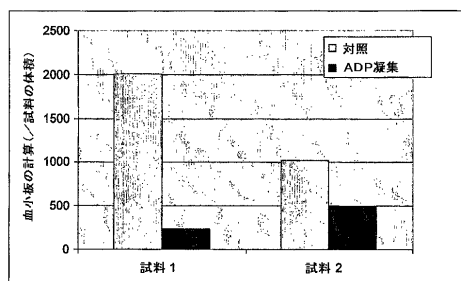
【 図 1 】



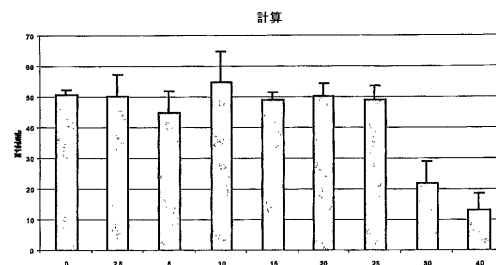
【 図 3 】



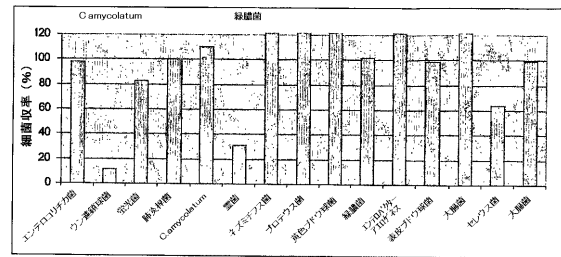
【 図 2 】



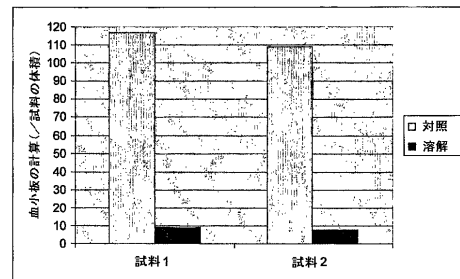
【 図 4 】



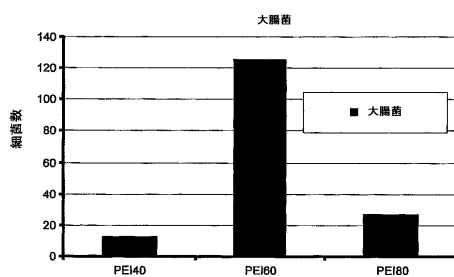
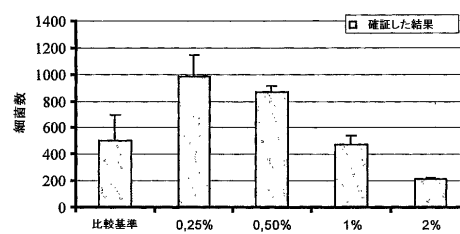
【圖 7】



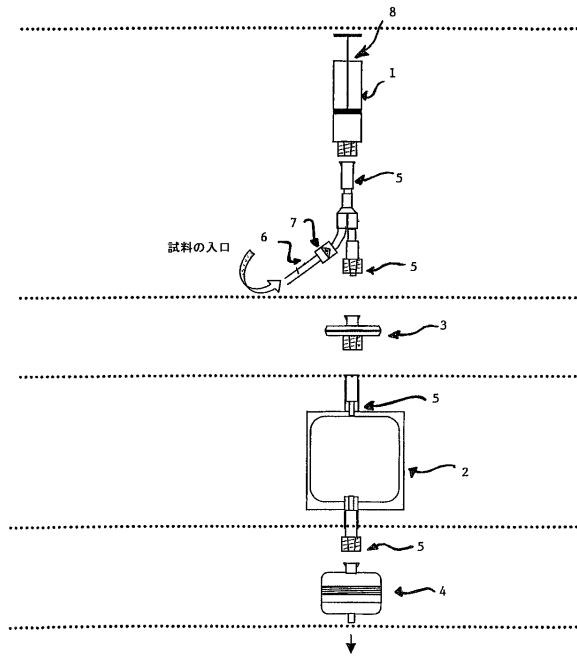
【 図 8 】



【 図 1 1 】



## 【図 12】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 ジャン - ピエール エルメ  
フランス国、プーローニュ エフ - 9 2 1 0 0、アヴニユ チャールス ドゥ ゴール、4テール
- (72)発明者 イサベル ベッソン - フォール  
フランス国、オーバニユ エフ - 1 3 4 0 0、プロムナード ピエール ブランカルド、ヴィラ  
レ トローネ
- (72)発明者 セバスチャン リボールト  
フランス国、プラン ドゥ キュクエス エフ - 1 3 3 8 0、アヴニユ デュ ジェネラル ドゥ  
ゴール、レジデンス シャンテコート
- (72)発明者 ヤン ゴフリン  
フランス国、リヨン エフ - 6 9 0 0 9、リュ エミル デュボー、5
- (72)発明者 アン モノト デ アングル  
フランス国、サン レミー エフ - 7 1 1 0 0、ケ ベルヴュ、6

審査官 中野 あい

- (56)参考文献 米国特許第03635798 (US, A)  
特開昭59 - 192084 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-1/38

C12Q 1/00-1/70

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

|               |                                                                                                                                  |         |            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)       | 用于浓缩和检测来自血液制品和/或其衍生物的病原菌的装置和方法                                                                                                   |         |            |
| 公开(公告)号       | <a href="#">JP4351048B2</a>                                                                                                      | 公开(公告)日 | 2009-10-28 |
| 申请号           | JP2003529979                                                                                                                     | 申请日     | 2002-09-13 |
| 申请(专利权)人(译)   | 嗜血系统                                                                                                                             |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译) | 嗜血系统                                                                                                                             |         |            |
| [标]发明人        | ジャンピエールエルメ<br>イサベルベッソンフォール<br>セバスチャンリポルト<br>ヤンゴフリン<br>アンモントデアングル                                                                 |         |            |
| 发明人           | ジャン-ピエール エルメ<br>イサベル ベッソン-フォール<br>セバスチャン リポルト<br>ヤン ゴフリン<br>アン モント デ アングル                                                        |         |            |
| IPC分类号        | C12N1/02 C12Q1/04 G01N33/48 C12M1/34 G01N1/28 C12M1/12 C12Q C12Q1/22 C12Q1/24 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/86 |         |            |
| CPC分类号        | G01N1/4077 G01N33/569 G01N33/86                                                                                                  |         |            |
| FI分类号         | C12N1/02 C12Q1/04 G01N33/48.B C12M1/34.A G01N1/28.J                                                                              |         |            |
| 代理人(译)        | 大西省吾<br>山口 修之                                                                                                                    |         |            |
| 优先权           | 2001011873 2001-09-13 FR                                                                                                         |         |            |
| 其他公开文献        | JP2005503803A                                                                                                                    |         |            |
| 外部链接          | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                        |         |            |

# 摘要(译)

浓缩 ( M ) 可能存在于含有血细胞 ( BC ) 的产品中的污染细菌 ( A ) , 包括 : ( a ) 聚集BC; ( b ) 在允许 ( A ) 通过的第一过滤器上移除聚集  
体; ( c ) 滤液中残留细胞的选择性裂解; ( d ) 在允许细胞碎片通过的第二个过滤器上从裂解物中除去 ( A ) 是新的。还包括用于执行M.的设备的  
独立权利要求。

|     | 对照   | トロンビン10U | トロンビン100U |
|-----|------|----------|-----------|
| PC6 | 1584 | 374      |           |
|     | 1535 | 490      |           |
| PC6 | 2622 | 1358     | 44        |
|     | 2737 | 1399     | 30        |