

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4363980号  
(P4363980)

(45) 発行日 平成21年11月11日(2009.11.11)

(24) 登録日 平成21年8月28日(2009.8.28)

(51) Int.Cl. F 1  
C 1 2 Q 1/04 (2006.01) C 1 2 Q 1/04

請求項の数 111 (全 60 頁)

|               |                               |           |  |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2003-527064 (P2003-527064)  | (73) 特許権者 | 501486165  |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年9月6日(2002.9.6)           |           | ジェノミック プロファイリング システムズ インコーポレイティッド                |
| (65) 公表番号     | 特表2005-502354 (P2005-502354A) |           | アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベッドフォード ワン オーク パーク ドライブ フロアー 2 |
| (43) 公表日      | 平成17年1月27日(2005.1.27)         |           |  |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2002/028506             | (74) 代理人  | 100102978  |
| (87) 国際公開番号   | W02003/022999                 |           | 弁理士 清水 初志  |
| (87) 国際公開日    | 平成15年3月20日(2003.3.20)         | (74) 代理人  | 100128048  |
| 審査請求日         | 平成17年3月24日(2005.3.24)         |           | 弁理士 新見 浩一  |
| (31) 優先権主張番号  | 60/317,658                    | (72) 発明者  | ストラウス ドン   |
| (32) 優先日      | 平成13年9月6日(2001.9.6)           |           | アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ バッキンガム ストリート 19         |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           |  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複製細胞の迅速な検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 検出域に細胞が無作為に分散されて固定される、検出領域1mm<sup>2</sup>あたり標的細胞100個未満の密度で、試料中に存在する生存標的細胞を検出領域を含む検出域に提供する段階；

(b) インサイチューにおける複製によって該標的細胞の一つまたは複数のマイクロコロニーを形成させる段階；

(c) 一つまたは複数のマイクロコロニーを検出する段階；

を含む、試料中の生存標的細胞を検出する方法であって、

該検出領域の最も長い直線寸法が1mmより大きく；一つまたは複数の該マイクロコロニーが少なくとも二つの直交寸法において50ミクロン未満の平均測定値を有する；該検出が5倍より大きい拡大を必要とせず；該検出が、シグナル伝達部分またはカテゴリー結合分子の添加に依存しない一つまたは複数のマイクロコロニーの性質を検出する；および一つまたは複数の該マイクロコロニーにおける該細胞が、検出後もなお複製コンピテントである方法。

【請求項 2】

標的細胞が、検出領域1mm<sup>2</sup>あたり標的細胞10個未満の密度で検出領域に無作為に分散される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

標的細胞が、検出領域1mm<sup>2</sup>あたり標的細胞1個未満の密度で検出領域に無作為に分散される、請求項1記載の方法。

- 【請求項4】  
検出段階が、検出領域においてマイクロコロニー1個を検出する、請求項1記載の方法。
- 【請求項5】  
検出段階が、重なり合うまたは連続したマイクロコロニーを検出する、請求項1記載の方法。
- 【請求項6】  
検出段階が、2倍より大きい拡大を必要としない、請求項1記載の方法。
- 【請求項7】  
検出段階が、1倍より大きい拡大を必要としない、請求項1記載の方法。
- 【請求項8】 10  
検出段階が、0.2倍より大きい拡大を必要としない、請求項1記載の方法。
- 【請求項9】  
一つまたは複数のマイクロコロニーにおける細胞数の平均値が細胞50,000個未満である、請求項1記載の方法。
- 【請求項10】  
一つまたは複数のマイクロコロニーが細胞10,000個未満を含む、請求項9記載の方法。
- 【請求項11】  
一つまたは複数のマイクロコロニーにおける細胞数の平均値が1000個未満である、請求項9記載の方法。
- 【請求項12】 20  
一つまたは複数のマイクロコロニーにおける細胞数の平均値が100個未満である、請求項9記載の方法。
- 【請求項13】  
一つまたは複数のマイクロコロニーにおける細胞数の平均値が10個未満である、請求項9記載の方法。
- 【請求項14】  
一つまたは複数のマイクロコロニーが、最も長い直線寸法において25ミクロン未満の平均測定値を有する、請求項9記載の方法。
- 【請求項15】 30  
一つまたは複数のマイクロコロニーが、最も長い直線寸法において10ミクロン未満の平均測定値を有する、請求項9記載の方法。
- 【請求項16】  
標的細胞が細菌である、請求項1記載の方法。
- 【請求項17】  
標的細胞が真核細胞である、請求項1記載の方法。
- 【請求項18】  
標的細胞がカビまたは真菌細胞である、請求項17記載の方法。
- 【請求項19】  
標的細胞がヒト、動物、または植物細胞である、請求項17記載の方法。
- 【請求項20】 40  
標的細胞がヒト、動物、または植物の寄生虫である、請求項1記載の方法。
- 【請求項21】  
検出段階が、一つより多い重なり合わないカテゴリーの細胞からのマイクロコロニーを検出および同定する、請求項1記載の方法。
- 【請求項22】  
試料が、多細胞生物から得た液体または組織を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項23】  
試料が、動物の体液または組織を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項24】 50  
試料がヒトに由来する、請求項1記載の方法。

## 【請求項 25】

試料がヒト以外の脊椎動物に由来する、請求項1記載の方法。

## 【請求項 26】

試料が、呼吸器、泌尿器、生殖器、中枢神経系、尿、血液、皮膚、血漿、血清、唾液、創傷組織、創傷浸出物、生検、便、および固体組織試料、ならびにその誘導体からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

## 【請求項 27】

試料が血液または尿試料である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 28】

試料が植物に由来する、請求項1記載の方法。

10

## 【請求項 29】

試料が環境の空気もしくは水、または環境に曝露された表面、物体、もしくは生物を採取することによって得られる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 30】

試料が、ヒトもしくは動物において局所もしくは内服利用のための、医薬品、化粧品、血液、または他の製剤の製造における原料、最終材料、または加工途中の材料；食品または飲料の製造における原料、加工途中材料、または最終材料；医学またはインビトロ診断装置の製造における原料、加工途中材料、または最終材料；化学物質；工業用表面；機器；および機械からなる群より選択される材料から得られる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 31】

検出域を、標的細胞の複製を促進する一つまたは複数の物質を含む液体培地に接触させる、請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 32】

細胞が固体または半固体増殖培地に直接沈着される、請求項1記載の方法。

## 【請求項 33】

段階(a)の前に、選択法を用いて、一つまたは複数の標的細胞と選択部分との複合体を検出域に沈着させ、選択法が磁気選択、遠心、沈降、および濾過からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

## 【請求項 34】

段階(a)の前に、標的細胞が標的細胞特異的磁気選択部分に接触し、一つまたは複数の該標的細胞と該選択部分との複合体がその後、磁力を用いて検出表面上に沈着される、請求項33記載の方法。

30

## 【請求項 35】

標的細胞特異的磁気選択部分が、カテゴリー結合分子に結合された磁気粒子を含む、請求項34記載の方法。

## 【請求項 36】

標的細胞が、体液中で、液体の平均密度より大きい平均密度を有する標的細胞特異的磁気選択部分に接触し、一つまたは複数の該標的細胞と該選択部分との複合体がその後、重力、遠心、または求心力を用いて検出表面上に沈着される、請求項33記載の方法。

## 【請求項 37】

標的細胞が、磁気選択、遠心、沈降、および濾過からなる群より選択される選択法を用いて検出域に沈着され、選択部分が用いられない、請求項1記載の方法。

40

## 【請求項 38】

段階(a)の前に、試料が液化されるおよび/またはホモジナイズされるように処理される、請求項1記載の方法。

## 【請求項 39】

段階(a)の前に、試料が標的細胞以外の物質または物体を除去するように処理される、請求項1記載の方法。

## 【請求項 40】

標的細胞の一つまたは複数の属性に及ぼす一つまたは複数の物質または処理の影響を決定

50

する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項41】

属性が細胞の複製を受ける能力である、請求項40記載の方法。

【請求項42】

一つまたは複数の物質が、標的細胞の複製を支持するために用いられる培地に存在する、請求項40記載の方法。

【請求項43】

属性が、滅菌処理後の標的細胞の複製能である、請求項40記載の方法。

【請求項44】

属性が、一つまたは複数の可能性がある複製阻害剤の存在下での標的細胞の複製能である、請求項40記載の方法。

10

【請求項45】

標的細胞が、細菌、真菌、寄生虫、または培養細胞であり、物質が抗菌剤、物質、抗真菌剤、または抗寄生虫剤である、請求項40記載の方法。

【請求項46】

一つまたは複数の阻害剤が抗菌化合物である、請求項44記載の方法。

【請求項47】

一つまたは複数の阻害剤が抗腫瘍化合物である、請求項44記載の方法。

【請求項48】

属性が、標的細胞の生存率、光学的性質の変化、代謝もしくは酵素活性、または生化学的構成である、請求項40記載の方法。

20

【請求項49】

以下の段階をさらに含む、請求項34記載の方法：

(d)標的細胞を一つもしくは複数の物質に接触させる、または細胞を一つもしくは複数の処理によって処理する段階；および

(e)標的細胞の一つもしくは複数の属性に及ぼす、一つもしくは複数の物質または一つもしくは複数の処理の影響を決定する段階。

【請求項50】

検出域が、ガラス、プラスチック、マイクロタイタープレートのウェル表面、水分を吸収しやすいメンブレン、プラスチック片、毛細管表面、微小流動小室の表面、および表面または微小流動チャンネルからなる群より選択される材料を含む、請求項1記載の方法。

30

【請求項51】

マイクロコロニーにおける細胞の複製が検出後も継続する、請求項1記載の方法。

【請求項52】

段階(c)が少なくとも2サイクルを含み、そのそれぞれが、細胞を複製させた後に検出段階を行う期間を含む、請求項1記載の方法。

【請求項53】

反復が自動化される、一つまたは複数のさらなる試料に段階(a)~(c)を繰り返す段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項54】

試料が、検出器を含む機器に自動的にローディングされる、請求項53記載の方法。

40

【請求項55】

試料が、物理的に会合して、検出器を含む機器に自動的かつ連続的にローディングされる一連の検出域に自動的に沈着される、請求項53記載の方法。

【請求項56】

検出段階が、一つまたは複数のマイクロコロニーに光を照射して検出可能なシグナルを生成する段階を含む、請求項1記載の方法。

【請求項57】

検出段階が、一つまたは複数のマイクロコロニーの照明の結果として、放射、散乱、反射、または吸収された光を検出する、請求項56記載の方法。

50

## 【請求項58】

検出段階が蛍光を検出する、請求項1記載の方法。

## 【請求項59】

蛍光がマイクロコロニーによって放射された自己蛍光である、請求項58記載の方法。

## 【請求項60】

照明段階が一つまたは複数のレーザーを用いる、請求項56記載の方法。

## 【請求項61】

照明段階が一つまたは複数の発光ダイオードを用いる、請求項56記載の方法。

## 【請求項62】

照明段階が、白色光源を用いる、請求項56記載の方法。

10

## 【請求項63】

照明段階が、選択された波長の光のみを通過させる一つまたは複数の光学フィルターを通して行われる、請求項56記載の方法。

## 【請求項64】

以下の段階を含む、標的細胞のマイクロコロニーを検出する方法：

(a)検出領域内で、細胞が無作為に分散および固定されている、検出域中の標的細胞を提供する段階；

(b)該マイクロコロニーの少なくとも一つが標的細胞100個未満を含む、インサイチューにおける複製によって該標的細胞の一つまたは複数のマイクロコロニーを形成させる段階、および

20

(c)5倍未満の倍率を用いて、一つまたは複数の該マイクロコロニーの一つまたは複数の天然に存在する光学的性質を検出する段階。

## 【請求項65】

光学的性質または複数の性質が自己蛍光を含む、請求項64記載の方法。

## 【請求項66】

光学的性質または複数の性質が熱放射を含む、請求項64記載の方法。

## 【請求項67】

光学的性質または複数の性質が吸光度を含む、請求項64記載の方法。

## 【請求項68】

吸光度が赤外線領域においてである、請求項67記載の方法。

30

## 【請求項69】

光学的性質または複数の性質が蛍光偏光を含む、請求項64記載の方法。

## 【請求項70】

光学的性質または複数の性質が光反射率を含む、請求項64記載の方法。

## 【請求項71】

光学的性質または複数の性質が光の散乱を含む、請求項64記載の方法。

## 【請求項72】

段階(c)の前または間に、標的細胞と直接または間接的に会合するシグナル伝達部分に試料を接触させる段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項73】

シグナル伝達部分がカテゴリー結合分子に会合している、請求項72記載の方法。

40

## 【請求項74】

段階(c)の前または間に、カテゴリー結合分子と、一つまたは複数の標的細胞上の一つまたは複数のカテゴリー特異的結合部位との一つまたは複数の複合体を形成させる条件で、試料をカテゴリー結合分子に接触させる段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項75】

カテゴリー結合分子が、抗体、アプタマー、またはリガンドを含む、請求項74記載の方法。

## 【請求項76】

カテゴリー結合分子が、一つまたは複数のシグナル伝達部分によって直接または間接的に

50

標識される、請求項74記載の方法。

【請求項77】

段階(c)の前に、一つまたは複数の複合体から任意の未結合のカテゴリー結合分子を除去する段階をさらに含む、請求項76記載の方法。

【請求項78】

カテゴリー結合分子が、カテゴリー結合分子の集合体のメンバーであり、該集合体が、検出される標的細胞のそれぞれの重なり合わないカテゴリーに対して特異的なカテゴリー結合分子の一つのファミリーを含む、請求項74記載の方法。

【請求項79】

カテゴリー結合分子のファミリーのそれぞれが、別個のシグナルクラスまたはシグナルサインのシグナルを放射するシグナル伝達部分によって標識される、請求項78記載の方法。

【請求項80】

シグナル伝達部分が粒子である、または粒子に物理的に会合している、請求項73記載の方法。

【請求項81】

シグナル伝達部分が蛍光シグナル伝達特徴を有する、請求項72記載の方法。

【請求項82】

シグナル伝達部分が、有機蛍光体、アップレギュレートされた燐、ランタノイド、量子ドット、非蛍光基質から蛍光産物を生成する酵素、および蛍光色素粒子からなる群より選択される、請求項81記載の方法。

【請求項83】

シグナル伝達部分が細胞の蛍光染色である、請求項81記載の方法。

【請求項84】

シグナル伝達部分が色素産生シグナル伝達特徴である、請求項72記載の方法。

【請求項85】

シグナル伝達部分が化学発光シグナル伝達特徴を有する、請求項72記載の方法。

【請求項86】

シグナル伝達部分が光散乱シグナル伝達特徴を有する、請求項72記載の方法。

【請求項87】

シグナル伝達部分が共鳴光散乱粒子またはプラズモン共鳴粒子である、請求項86記載の方法。

【請求項88】

シグナル伝達部分が、生存細胞の染色するための生存染料である、請求項72記載の方法。

【請求項89】

カテゴリー結合分子の集合体がファミリーの複雑度1を有する、請求項78記載の方法。

【請求項90】

カテゴリー結合分子の集合体のファミリーの複雑度が1より大きい、請求項78記載の方法。

【請求項91】

集合体のファミリーの複雑度が5である、請求項90記載の方法。

【請求項92】

シグナル伝達部分が、標的細胞と会合するまでは検出可能でない一つまたは複数の化合物を含み、シグナル伝達部分が、標的細胞の構成成分によって、または標的細胞の生理学的、物理的もしくは微小環境状態によって作用する、請求項72記載の方法。

【請求項93】

複製および検出段階が、さらに別の細胞が入らないように、または試料中の細胞が出て行かないように構成された容器において起こる、請求項1記載の方法。

【請求項94】

複製および検出段階が、試料を自動的に追跡するためのバーコードまたは同等の標識を有する容器において起こる、請求項1記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 95】

複製および検出段階が、同じ表面の多数の画像の配置を容易にするためにレジストレーションマークを有する表面上で起こる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 96】

検出段階が、検出域の特定の領域における対照マークまたは対照細胞を検出する、請求項1記載の方法。

## 【請求項 97】

検出段階が、標的細胞の照明に由来するシグナルを検出するように適合された光学フィルターを用いる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 98】

検出段階が光電検出器を用いる、請求項1記載の方法。

10

## 【請求項 99】

検出段階が、光電アレイ検出器を用いる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 100】

光電検出器がCCD検出器を含む、請求項99記載の方法。

## 【請求項 101】

検出段階が画像増幅器を用いない、請求項1記載の方法。

## 【請求項 102】

検出段階が光電子増倍管を用いる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 103】

検出段階がフォトダイオード検出器を用いる、請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 104】

検出段階が光感受性被膜を用いる、請求項1記載の方法。

## 【請求項 105】

段階(c)の間または後に、マイクロコロニーの数を定量する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 106】

段階(c)の間または後に、画像解析ソフトウェアを用いて、検出領域の画像を分析することによって、標的細胞のカテゴリーを決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 107】

段階(c)の間または後に、画像解析ソフトウェアを用いて、検出領域の画像を分析することによって一つまたは複数のマイクロコロニーの検出域での位置を決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

30

## 【請求項 108】

段階(c)の間または後に、個々のマイクロコロニーの検出域での位置をマイクロコロニーの既に決定された位置と比較する段階をさらに含む、請求項107記載の方法。

## 【請求項 109】

画像解析ソフトウェアが、経時的に大きさが変化する物体を経時的に大きさが変化しない物体と区別するためのアルゴリズムを含む、請求項108記載の方法。

## 【請求項 110】

決定する段階が、検出領域の画像を分析することを含む、請求項105記載の方法。

40

## 【請求項 111】

滅菌処理が、熱滅菌、放射線照射、毒性ガス曝露、および消毒処理からなる群より選択される、請求項43記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

発明の背景

本発明は、医学、工業、および環境試料における複製細胞、特に微生物細胞(例えば、細菌、酵母、およびカビ)の検出、計数、および同定に関する。微生物培養は、その多く

50

の魅力的な特徴のために、これらの市場において広く用いられている方法論である。本発明は、方法の有用な属性を維持しながら、微生物培養の主な欠点、すなわち結果を得るまでに必要な時間が長いことに取り組む。

#### 【0002】

微生物を検出および計数するための微生物培養

19世紀から20世紀の間に、感染症を引き起こす際の、そして食品および飲料の品質を決定する際の細菌、酵母、およびカビの役割に関する理解が進んだ。強力な方法である微生物培養は、少数の微生物を検出するために早くから開発された。微生物培養は、急速に多数に繁殖するというその性向を利用することによって微生物の単純な肉眼的検出を可能にする。例えば、細菌細胞1個は、あまりにも小さすぎて肉眼では見えないが(約100万分の1メートル)、これを栄養ブロスに入れておくと、24時間までにブロスを目で見えるように混濁させることができる。

10

#### 【0003】

微生物の計数またはコロニーの計数と呼ばれる関連する微生物培養技術は、試料中の微生物細胞数を定量する。微生物計数法は、元の位置での微生物複製に基づき、一般的に、試料中のそれぞれの微生物に関して肉眼的に検出可能な一つの「コロニー」を生じる。このように、眼に見えるコロニーを計数することによって、微生物学者は試料中の微生物細胞数を正確に決定することができる。微生物計数を行うために、細菌細胞をペトリ皿において栄養寒天(「寒天プレート」)の表面に分散させて、インサイチューにおける細菌の複製が起こる条件でインキュベートすることができる。個々の肉眼的に検出不能な微生物は、繰り返し複製して、前駆微生物細胞が沈着した物理的部位で同一の娘微生物を多数生成する。娘細胞は、当初の細胞と同時に局在したまま(本質的に連続して)であるため、娘細胞の集団(数千万から数億個まで増殖する可能性がある)は、プレート上で最終的に目に見えるコロニーを生成する。

20

#### 【0004】

微生物コロニーを計数するために電子的方法が開発されている。そのような方法のほとんどは、コロニー計数を自動化するが、肉眼による従来の計数と比較して感度は実質的に増加せず、結果を得るまでの時間も短縮しない。コロニー計数器は、微生物コロニーの固有の光学的性質の検出(例えば、米国特許第3,493,772号;米国特許第3,811,036号;米国特許第5,290,701号;Arkin, A.P.ら、(1990)Biotechnology(NY)8:746~6)およびコロニー周辺のマトリクスにおけるpH表示分子の色の变化(米国特許第5,510,246号)を含む、コロニーを検出するための多様な光学的方法を利用する。コロニーを標識するために染料またはプローブを用いる方法も同様に開発されており、これらについては下記に詳細に説明する。

30

#### 【0005】

微生物培養は、一世紀を超えた後でも、方法がなおも微生物医学および工業微生物学(例えば、医薬品、食品および飲料の製造)における品質管理試験において主に用いられているという事実によって証明されるように、極めて上出来の方法である。方法は、安価で比較的単純であり、しかも極めて感度が高い。微生物培養の感度は、牛ひき肉における食品伝染病原体に関する一般的な試験において認めることができる。微生物培養を用いると、牛ひき肉25g中に顕微鏡下で細菌病原体細胞1個を検出することができる。微生物培養のもう一つの利点は、医学および工業的に重要な広範囲の微生物を検出できることである。

40

#### 【0006】

インサイチューで細菌が複製する利点は、純粋なクローン細胞集団(純粋培養、クローン、またはコロニーと呼ばれる)を生成できることである。純粋培養は、同じ前駆細胞から伝わる同一の生存細胞の大きい集団である。純粋培養は、微生物を特定する方法にとって、そして抗生物質耐性を決定するために必要である。細菌病原体はしばしば、病原性細胞よりはるかに多数存在する可能性がある非病原性細菌と共に、非無菌性の臨床試料(例えば、糞便または創傷)から単離されることから、微生物医学は純粋培養に重度に依存している。純粋な微生物培養物の単離はまた、工業的微生物学においても重要である。例え

50





微生物培養の最も重大な欠点は、それが遅いこと、すなわち肉眼的に検出するために必要な細胞数を生成するために時間を要することである。微生物培養に必要な培養期間が長いことは、健康管理および工業の双方にとって重要な問題である。例えば、患者の血液感染症を引き起こす微生物を培養して同定するためには数日を要するため、血液の真菌感染症を有する患者は、抗真菌治療を始める前に死亡する可能性がある。結核を引き起こす細菌のような何らかの感染性細菌は一般的に、培養において増殖するために数週間を要する。結核菌(*M. tuberculosis*)を検出するために必要な期間が長いために、結核患者が他の多くの人に高感染性疾患を感染すること、または結核を有しない患者の費用のかかる隔離が起こりうる。

#### 【 0 0 1 1 】

食品の製造において、試験サイクルが長ければ、食品の腐敗を増加させ、または不適切に試験された材料がその後の加工段階に移動することが起こりうる。微生物培養が遅いことはまた、生物医薬品およびワクチンの製造にも負の影響を及ぼす。これらの応用では、製造プロセスはしばしばバッチをプールの必要がある。微生物培養試験サイクルが長いことと、材料を製造プロセスに移動するために、汚染されたバッチは時に、バッチのプール段階後まで検出されないことがある。汚染バッチが非汚染バッチと混合されたことがその後判明すれば、混合されたバッチのプール全てを廃棄しなければならない。

#### 【 0 0 1 2 】

退屈な手動技法およびいくつかの微生物を培養できないことのような微生物培養の他の短所は、必要な期間が長いことほど問題ではないと考えられる。例えば、微生物計数の手動的方法は、自動播種分析機器が導入されても主流である。環境中に認められるほとんどのタイプの微生物は、実験室で増殖できない。しかし、そのような微生物はしばしばヒトに対して無害であり、工業的製造プロセスにおいて破壊され、したがって、ほとんどの応用に関して無視される。しかし、医学的に極めて重要ないくつかの重要な例外には、性的に伝搬される疾患および肺炎を引き起こしうるクラミジア(*Chlamydia*)のような細菌の培養が困難であるかまたは不可能であることが含まれ、幸運なことに、これらの場合には代替りの培養非依存的方法が利用できる(下記を参照されたい)。

#### 【 0 0 1 3 】

##### 迅速な微生物培養計数法

より迅速に微生物を計数するための微生物培養法が多数開発されている。一つの迅速な微生物培養法は、栄養培地をコーティングした顕微鏡スライドガラス上に細菌細胞を載せる。顕微鏡による検査を用いれば、顕微鏡は少数の細胞分裂に起因するマイクロコロニーを検出できることから、裸眼よりはるかに速やかに微生物の増殖を検出することができる。しかし、この方法は、顕微鏡の視野で観察することができるのは試料のごく少量に過ぎないことから、少数の微生物細胞を含む大きい試料を調べるためには有効ではない。顕微鏡的方法は感度が低いために、一般的に、1ミリリットルあたり10000個を超える細菌細胞を含む試料にその有用性が限られており、これらの方法は、従来の微生物培養よりはるかに感度が悪い。

#### 【 0 0 1 4 】

電子撮像システムの到来によって、多数の自動「コロニー計数器」が開発された。これらの計数器のほとんどはコロニー計数プロセスを自動化することによってユーザーを助けるように設計されており、結果を得るまでの時間を短縮しないが、いくつかのシステムは、肉眼で容易に見ることができるほど十分に大きくなる前にコロニーを検出できることを証明した。例えば、コリファスト迅速マイクロコロニー計数器(Coligfast)は、それらを肉眼で見ることができる数時間前に大腸菌型細菌の小さい蛍光標識コロニーを検出することができる。コリファストシステムは、栄養寒天培地に含まれる蛍光原化合物(大腸菌型細菌によって代謝されて始めて蛍光となる物質)を用いることによって検出の増強を得る。

#### 【 0 0 1 5 】

生物発光標識を用いる微生物コロニーの迅速な計数システムが、最近商業化された。マ

10

20

30

40

50

マイクロスターシステム(ミリポア(Millipore))は、適用したルシフェラーゼ酵素および基質の作用によって光を生じるためにマイクロコロニーにおける細胞ATPを利用する。方法は、検出時間を実質的に短縮する。マイクロスター撮像システムはまた、特異的細菌を同定するために標識プローブと共に用いられている(Stender, H.ら、J. Microbiol. Methods 46: 69~75(2001))。このシステムの欠点は、検出法が微生物を殺してしまい、コロニーから純粋培養物の単離ができない点である。システムはまた高価な画像増幅モジュールを必要とする。

#### 【0016】

特定の細菌を含むマイクロコロニーを検出するためのインスタントフィルムに基づく方法が、Boston Probesによって開発されている(Perry-O-Keefe, H.ら、Journal of Applied Microbiology 90: 180~9(2001))。メンブレン上の微生物マイクロコロニーを、化学発光シグナルを生成することができる酵素のタグをつけた微生物特異的PNAプローブを用いて標識する。次に、撮像のためにメンブレンをX線またはインスタントフィルムに載せる。この方法は、1回の実験で特定の微生物に関して調べることに限定される。類似の方法は、蛍光標識PNAプローブおよびアレイスキャナを利用する(Stender, H.ら、Journal of Microbiological Methods 45: 31~9(2001))。これらのアプローチは、従来の培養法より実質的に多くの専門技術を必要とする。

#### 【0017】

微生物培養を行わない迅速な微生物計数

微生物計数のための最も迅速な方法は、微生物培養を行わずにすませることである。医学および工業的微生物学者は一般的に、生存微生物、すなわち微生物培養の際に複製することができる生きた微生物の計数のみに関心がある。したがって、最も有効であるためには、細胞の複製に依存せずに個々の細胞を検出する方法は、細胞複製の生理的代用物を用いることによって、生きていた微生物と死んだ微生物とを区別しなければならない(例えば、Nebe-von-Caron, G.ら、J. Microbiol. Methods 42: 97~114(2000); Mignon-Godefroy, K.ら、Cytometry 27: 336~44、1997)。細胞は、複製能に一般的に相関する生化学性質(例えば、エステラーゼ活性または生化学的呼吸)を測定する色素によって染色する。規制標準を満たすことが知られており、従来のプレート培養法を用いて無菌的であると評価された試料が、代用生化学活性に関して陽性であると評価される何千もの細胞を有することから、代用法を確認して制定することは問題がある。

#### 【0018】

生存細胞を直接検出するシステムの例は、スキャンRDIシステム(ケムネクス(Chemunex))である。スキャンRDIは、レーザー走査技術を用いて蛍光原エステラーゼ基質によって染色した微生物細胞を計数する(米国特許第5,663,057号; Mignon-Godefroy, K.ら、Cytometry 27: 336~44、1997)。レーザー走査システム(光電子増倍管(PMTs)を用いる集光システムを含む)は、フィルターの像を捕獲して、個々に標識した細胞を検出することができる。システムは、顕微鏡領域(一般的に4~14 $\mu$ m)を照明して調べるが、肉眼的領域(例えば、直径25mmの円)を含むようにビームを進行させてスキャンする。システムは、無傷の膜と活性なエステラーゼ酵素とを有する細胞を検出するように設計される。そのような細胞の数と増殖培地上でコロニーを形成することができる細胞数との間には相関がある。しかし、このアプローチはしばしば実質的な「過剰計数」が起こる、すなわち、従来の培養によって検出される場合より細胞数が多い(Costanzo, S.ら(2002)、PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 56: 206~219)。スキャンRDIシステムのもう一つの短所は、それが染色プロセスにおいて微生物を殺し、検出された微生物から純粋な培養物を生成できない点である。最後に、細胞計数のためのレーザー走査システムは、複雑で高価であり(何十万ドル)、日常的な微生物応用のために正当化することは難しい。他のレーザー走査システムも同様に市販されている(Miraglia, S.ら、J. Biomol Screen 4: 193~204、1999; Tibbe, A.G.ら、Nat. Biotechnol. 17: 1210~3、1999; Kamentsky, L.、2001、「Laser Scanning Cytometry」、「Cytometry」、Z. Darzynkiewicz, H.Crissman and J.Robinson編、Methods in Cell Biology、第63巻、パートA、第三版、シリーズ編、L.

Wilson and P. Matsudaira(サンジエゴ、アカデミック出版))。

【0019】

フローサイトメトリーは、細胞の複製に依存せずに微生物を迅速に計数することができるもう一つの強力な方法である(Alvarez-Barrientos, A.ら、Clin. Microbiol. Rev. 13 : 167~195、2000)。個々の生物または粒子を、狭いチャンネルの中に一度に1個ずつ流れさせて、レーザービームを通過させる。計数の他に、生物によって引き起こされた蛍光放出および光の散乱を分析することによって、大きさ/形状および組成に関する情報も収集される。1分間に何千もの個々の細胞または粒子を分析することができる。病原体は、固定された生物に蛍光標識種特異的抗体または核酸プローブを結合させることによって、フローサイトメトリーを用いて同定することができる(Alvarez-Barrientos、2000、上記)。

10

【0020】

病原体は、固定された生物に蛍光標識種特異的抗体または核酸プローブを結合させることによって、フローサイトメトリーを用いて同定することができる(Alvarez-Barrientos、2000、上記)。通常、ある特定の細胞タイプの個々の細胞が標的である。フローサイトメトリー法は、標識プローブ、通常、抗体または核酸のいずれかとの結合能に基づいて、特定の細胞タイプを定量的に検出するためにより広く用いられている。例えば、フローサイトメトリーは、AIDS患者におけるリンパ球のクラスの集団の大きさを定量するために用いられる。フローサイトメトリーは、従来の培養より複雑で高価な方法である。従来の培養より迅速であるが、フローサイトメトリーは、従来の方法と同等の検出限界を有しない。従来の微生物培養は、水0.1 Lあたり細菌細胞1個を検出することができるが、フローサイトメトリーは、それより何千倍も高いレベルである場合に最も有効である。さらに、細菌標的はしばしば、検出のために用いられる染色法によって殺され、純粋な培養物を得ることができない。

20

【0021】

微生物を直接可視化して計数するために顕微鏡撮像を用いることは、実施が迅速かつ比較的容易となりうる(Amann, R.I.ら、Microbiological Reviews 59 : 143~69、1995)。蛍光標識抗体が固定試料と反応する直接蛍光アッセイ(DFA)は、臨床診断検査において一般的な方法である。例えば、細菌物質を含むことが疑われる標本は、日常的にギムザ染色によって染色される。同様に、結核菌に関して調べる場合には、試料に抗酸性染色を行う。この技術の欠点は、これが微生物培養より何千倍も感度が低い点である。感度が低いのは、高倍率で可視化される視野が小さいことによる。小さい視野が標的細胞を含む可能性があるのは、標的細胞濃度が高い場合に限られる。このように、例えば、蛍光インサイチュアハイブリダイゼーションを用いて喀痰における細菌病原体を信頼できるように同定するためには、約 $4 \times 10^5$ 個/mlまたはそれ以上の力価を必要とする。一般的な医学的に重要な感染症において得られた臨床試料は、100個/mlより少ない数を含む可能性があり、この濃度は高倍率の顕微鏡視野において細胞1個を発見すると予想できるほど十分に高くない。

30

【0022】

大領域の非拡大撮像を用いて細菌細胞1個を検出する感度を有するシステムが、ハママツコーポレーション(Hamamatsu Corporation)の研究者によって開発されている(Masuko, M.ら、FEMS Microbiol. Lett. 67 : 231~8、1991 ; Masuko, M.ら、FEMS Microbiol. Lett. 65 : 287~90、1991 ; Yasui, T.ら、Appl. Environ. Microbiol. 63 : 4528~33、1997)。個々の顕微鏡標的細胞の大領域撮像は、光ファイバーシステム、画像増幅器、および画像プロセッサにカップリングさせた超感受性光子計数CCDカメラを用いて行われる。このシステムの短所は、画像増幅器および関連する光学機器を組み入れるためにかなりの出費を被ることである。

40

【0023】

さらに、微生物培養法とは異なり、システムは、如何なる微生物でも検出できるわけではなく、生きている微生物と死んだ微生物とを区別することができず、または純粋な培養物を産生することができない。

【0024】

50

## 細胞の分子構成成分の定量による迅速な微生物の計数

その分子構成成分に基づいて微生物を検出および同定する多数の方法が、過去半世紀の間に開発されている。これらの方法のいくつかは、微生物培養より実質的に迅速であるが、いずれも微生物学者にとって重要である培養の特徴の全てを提供しない。例えば、微生物に関する多数のイムノアッセイが市販されているが、この技術は、本来定量的ではなく、微生物培養よりはるかに感度が低く、1回の試験で多くのタイプの微生物を検出することに関して培養ほど強力ではない。または、もう一つの例として、核酸増幅法は、微生物培養と同程度の感受性となりうるが、それらは生きた細胞と生きていない細胞とを区別することができず、抗生物質の感受性試験を行うための純粋な培養物を生成することができない。電気泳動、質量分析、およびクロマトグラフィーを用いる生化学分析法(例えば、脂肪酸、核酸、またはタンパク質の)は、微生物の同定にとって強力となりうるが、そのような方法は通常、微生物の計数には不適切であり、一般的に日常的な微生物診断にとって高価で複雑すぎる。

10

### 【0025】

微生物計数に関して満たされていない要求

要約すると、現在の微生物計数試験は、微生物培養が主流である。微生物培養は、単純、超感受性、安価で定量的であるという重要な利点を有するが、遅いという重要な欠点を有する。結果が出るまでの時間が長いことは、健康管理および製造において大きい損害を有する。より迅速な方法が開発されているが、それらは、結果を得るまでの時間を改善しても、微生物培養の一つまたは複数の重要な利点を犠牲にしている。

20

### 【0026】

このように、従来の微生物培養より速やかであるが、従来の方法の重要な利益を保持する試験が必要である。

### 【発明の開示】

### 【0027】

発明の概要

本発明は、大領域の撮像を用いてインサイチューにおける細胞分裂に由来する顕微鏡コロニーを検出することによって、生きている細胞の効率的で迅速かつ感度のよい計数を可能にする。本発明に基づく微生物計数試験は、微生物培養に基づく従来の方法の重要な利点を保持しながら、臨床および工業的微生物学における重要な問題、すなわち従来の試験の検出に必要な期間が長いことに取り組む。本発明の態様には、標識試薬を用いずに細胞マイクロコロニーを検出する非破壊的な無菌的方法が含まれる。これらの方法によって、微生物の同定および抗菌耐性の決定のために用いることができる純粋な培養物を作製することができる。

30

### 【0028】

本発明は、試料中に存在する生きている標的細胞を、検出領域1mm<sup>2</sup>あたり標的細胞100個未満の密度の検出領域を含む検出域に提供する段階、インサイチューにおける複製によって標的細胞の一つまたは複数のマイクロコロニーを形成させる段階、および一つまたは複数のマイクロコロニーを検出する段階を含む、試料中の生きている標的細胞を検出する方法であって；複製が一つまたは複数のマイクロコロニーを生成し；検出領域の長い方の直線寸法が1mmより大きく、検出領域において、細胞が無作為に分散および固定され、検出段階が少なくとも二つの直交寸法において50ミクロン未満の平均測定値を有する一つまたは複数のマイクロコロニーを検出し；ならびに一つまたは複数のマイクロコロニーにおける細胞が、検出段階の後も複製コンピテントである方法の特徴とする。

40

### 【0029】

本発明はさらに、検出領域内で細胞が無作為に分散して固定されている検出域に標的細胞を提供する段階；マイクロコロニーの少なくとも一つが標的細胞100個未満を含む、インサイチューにおける複製によって標的細胞の一つまたは複数のマイクロコロニーを形成させる段階；および5倍未満の倍率を用いて一つまたは複数のマイクロコロニーの一つまたは複数の天然に存在する光学的性質を検出する段階を含む、標的細胞のマイクロコロニ

50

ーを検出する方法を特徴とする。

【0030】

本発明はまた、機器が、少なくとも一つの寸法が 1cmである検出領域を照明して同時に撮像することができ、および機器が5倍より大きい倍率で光学的に拡大しない、20ミクロン未満の光学的解像度および1ピクセルあたり70%以上の周囲エネルギー値を有する光電アレイ検出器と照明源とを含む、標的細胞のマイクロコロニーを検出する機器を特徴とする。

【0031】

本発明の利点

本発明の様々な態様のいくつかの利点を表2に記載する。

10

【0032】

【表2】

| 態様  | 利点   |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>マイクロコロニーの試薬不要の蛍光検出および計数</li> </ul>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>容認される実践に対する変化が最小</li> <li>より迅速かつより低いリスク調節路</li> <li>商品の価格が低い</li> <li>システムの単純さ</li> <li>非破壊試験を行うことができる(下記)</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>生きているマイクロコロニーを検出するように最適化された集光装置</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>検出までの時間が短い</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>メンブレン上の個々の生存マイクロコロニーの非拡大領域撮像</li> </ul>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>超感度検出を可能にする</li> <li>大きい動的範囲を可能にする</li> <li>広範囲の試料容積を可能にする</li> <li>低い力価で高いシグナル:バックグラウンド比</li> </ul>                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>非破壊的計数(すなわち、微生物は殺されない)</li> </ul>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>純粋培養の生成を可能にする</li> <li>微生物の同定を可能にする</li> <li>抗菌耐性の検出を可能にする</li> <li>内部確認(下記)を可能にする</li> </ul>                         |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>従来の目に見えるコロニーとの内部比較</li> </ul>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>方法を確認するために同等性の証明を簡素化する</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>滅菌(閉鎖)使い捨てにおける生きて微生物の撮像</li> </ul>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>多数の読み取りを可能にする</li> <li>偽陽性を最小にする</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>微生物の増殖をアーチファクトと独自に識別する方法およびソフトウェア</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>検出の強さ、特異性を加える</li> <li>複雑な試料における検出を可能にする</li> </ul>   |

20

30

【0033】

本発明の結果を得るまでの時間が短いことは、従来の方法によって必要である細胞の小さい分画のみを含むマイクロコロニーを本発明が検出できることに由来する。細胞複製は時間を必要とするため、本発明を用いて小さいマイクロコロニーを検出することは、従来の計数法を用いて目に見える大きいコロニーを検出するより速く結果を提供する。小さいマイクロコロニーを検出するために、本発明は、効率的なシグナル産生およびシグナル検出法を組み合わせる。

【0034】

超感度、すなわち大きい試料において少数の顕微鏡細胞を検出できることは、大領域の撮像を用いることに一部由来する。例えば、本発明は、拡大せずに顕微鏡コロニーを検出することができる。この特徴によって、画像1個においてマイクロコロニーに関して大きい領域を調べることができる。大きい領域を撮像することは、本発明が大きい試料容積を効率よく分析できるように重要である。例えば、大きい容積の試料中の微生物混入物は、メンブレンによる濾過を用いてメンブレン上に沈着させることができる。マイクロコロニーの大領域の非拡大撮像を用いる本発明は、メンブレン全体を効率よく分析することができる。対照的に、同じフィルター上でマイクロコロニーを評価するために高倍率顕微鏡を用いると、何千個もの画像を必要とする可能性がある。

40

【0035】

50

大きい領域における少数のマイクロコロニーを計数する効力は同様に、目的とするシグナルを局所的なバックグラウンドと比較する撮像アプローチを本発明が利用できることにも由来する。この能力は、大領域におけるシグナル全体およびバックグラウンドを積分する方法より、少数の細胞を含む試料に関するシグナル対バックグラウンド比を改善する。

【0036】

少数の細胞を有する試料に関するアッセイの強さは、増殖マイクロコロニーを計数することができる本発明の固有の能力によって提供される。このように、本発明は、生体分子(例えば、ATP、抗原、または核酸)の存在を定量する方法のような、一つの積分されたシグナルを検出する方法より偽陽性を減少させることができる。積分されたシグナルのみに依存する方法を用いる場合には、シグナルを引き起こす如何なるアーチファクトも偽陽性を生じうる。そのそれぞれが100蛍光単位を生じる微生物細胞482個を含む試料を考慮されたい。積分法の結果は1個の数である(48,200蛍光単位)。類似の数の蛍光単位を生成するアーチファクト、例えば、大きい蛍光塵粒子は、区別できないかも知れない。しかし、本発明は、大きい蛍光塵粒子1個と増殖しつつある個々のマイクロコロニー482個とを容易に区別することができる。

【0037】

増殖しつつあるマイクロコロニーの検出は、無生物物体および試験条件で増殖することができない細胞からの偽陽性シグナルに対して区別する強力な方法である。例えば、ペトリ皿において固体増殖培地に載せたメンブレン上で微生物マイクロコロニーを検出する試験を考慮されたい。本発明の一つの態様において、検出領域は、検出領域における微生物がマイクロコロニーに増殖する前に撮像される。何らかの蛍光塵粒子または自己蛍光哺乳類細胞が検出領域に存在すれば、何らかの陽性シグナルがこの「ゼロ時間」画像に明らかとなるであろう。ペトリ皿をインキュベートして微生物を複製させた後、もう一つの画像を撮影する。二つの画像を面を一致させて並置すると、偽陽性は「ゼロ時間」画像とインキュベーション後の画像に存在する(通常、不変である)ことから、マイクロコロニーに対応する陽性シグナルを偽陽性から区別することができる。増殖しつつあるマイクロコロニーのみが時間と共に出現するはずである。マイクロコロニーシグナルを確認するために、インキュベーションの間の多数の時点で画像を得て比較することができる。増殖しつつあるマイクロコロニーのみが、時間と共にシグナル強度および大きさを増加させるはずである。

【0038】

本発明を用いて構成された試験は、先行技術における方法を用いて構成された試験と比較して大きい動的範囲を有しうる。このように、例えば、設計された本発明に基づく試験は、画像1個においてマイクロコロニー $1 \sim 10^6$ 個を検出することができる。対照的に、従来の微生物計数法は、コロニー約30~150個がフィルター(直径47mm)に存在する場合に最善の結果が得られる。新しい計数法(例えば、ケムネクスのスキャンRDIおよびミリポアのマイクスター)も同様に、動的範囲が限られている。

【0039】

効率的なシグナル産生を得るために、本発明は、マイクロコロニーの固有の光学的性質(例えば、自己蛍光、反射率、または高い散乱)または様々な外から適用された標識試薬のいずれかを利用することができる。幅広い光学的性質および標識法を用いることができることによって、重要な微生物学試験を作製することができる。例えば、マイクロコロニーの広く存在する性質(例えば、自己蛍光または赤外線吸収)を検出する方法を用いることは、試料の総微生物含有量を計数する試験にとって有用である。そのような試験は、腐敗の可能性を決定するために食品加工において、そして製薬工業において最終製品の放出試験を行うために重要である。本発明の一つの重要な態様は、小さい微生物マイクロコロニーを検出するために細胞の自己蛍光の検出に基づく無試薬系を利用する。本態様は、微生物計数に対する単純で非破壊的な無菌的アプローチを提供しうる。特定のタイプの細胞を検出するために、カテゴリー特異的標識試薬を用いることができる。例えば、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)に特異的に結合する蛍光標識抗体を用いて、この重要な食品病

10

20

30

40

50

原菌の細胞に由来するマイクロコロニーを検出することができる。

【0040】

従来の微生物培養と同様に、本発明は、選択的な条件で微生物増殖を測定する診断力を利用することができる。例えば、抗生物質に対する細菌の耐性を決定するために、その上に抗生物質ディスクを載せた増殖培地において細菌を増殖させることができる。ディスク近傍の非増殖域の大きさは、抗生物質耐性を決定する。この領域の大きさをより迅速に検出するために、本発明を用いることができる。同様に、本発明は、選択的な培地において特定の微生物の増殖を迅速に検出するために用いることができる。

【0041】

新しい方法が「最も標準的な」方法と同等であることが示される不可欠な試験確認サイクルを単純化することは、非破壊的計数に由来する本発明のもう一つの利点である。本発明は、新しい方法と古い方法との内部比較を可能にすることによって、「最も標準的な」培養試験との同等性を容易にする。簡単に説明すると、初期の時点で試料中の微生物に由来するマイクロコロニーを撮像した後、試料を従来のコロニーの肉眼的検出を行う場合に必要な時間再度インキュベートすることができる。このようにして、本発明のマイクロコロニー計数と従来の方法による同じコロニーの後の時点での計数との内部比較を行うことができる。

10

【0042】

他の特徴および利点は、以下の説明および特許請求の範囲から明らかとなる。

【0043】

「標的細胞」とは、試料中に存在する可能性があり、その存在が本発明によってアッセイされる細胞を意味する。

20

【0044】

標的細胞の「カテゴリー」とは、本発明を用いて構成された試験の目的に関して同一であると見なされる多数の標的細胞を意味する。

【0045】

大腸菌の任意の系統を検出するように設計された試験を考慮されたい。試験の目的に関して、「大腸菌」というカテゴリーには、このように大腸菌種における任意の細菌が含まれるであろう。そのような試験は、大腸菌種における任意の細菌を区別せずに検出するように設計されるであろう。大腸菌でない細菌および他の標的細胞は、この試験において検出されないか、または大腸菌群のメンバーではないと検出および同定されるであろう。対照的に、大腸菌種の亜群である病原性大腸菌O157:H7を検出するように設計された試験を考慮されたい。この場合、亜群大腸菌O157:H7は、標的細胞のカテゴリーである。亜群、すなわち大腸菌O157:H7に存在する細菌は、区別なく検出される。大腸菌O157:H7亜群に存在しない大腸菌は試験によって検出されず、したがって、大腸菌O157:H7カテゴリーに存在しない。

30

【0046】

カテゴリーは、先の段落に述べた通りに分類学上関連している必要はない。例えば、試験は、抗生物質バンコマイシンに対する耐性を付与するために必要なタンパク質を産生する細菌のカテゴリーを検出するように設計してもよい。このタンパク質は、近縁でない、すなわち異種のメンバーである細菌種によって産生されうる。しかし一つの種におけるバンコマイシン耐性株は、同じ種におけるバンコマイシン感受性株と非常に近縁である可能性がある。vanAタンパク質(バンコマイシン耐性を得るために重要である)を産生する細菌のカテゴリーには、例えば腸球菌属(*Enterococcus*)およびブドウ球菌属(*Staphylococcus*)におけるバンコマイシン耐性菌が含まれるが、大部分の腸球菌およびブドウ球菌はこのカテゴリーに含まれない。このように、この場合、カテゴリーは、例えば、共通の特徴、この場合は、共通の系統発生的(系統的)関係よりむしろ分子成分(カテゴリー特異的結合部位)のために試験の目的に関して同一であると見なされる標的細胞を含むことができるであろう。

40

【0047】

50



標的細胞の「重なり合わないカテゴリー」とは、その組み合わせが零集合である標的細胞の組を意味する。すなわち、全ての大腸菌のカテゴリー、シュードモナス(Pseudomonas)属における全ての細菌のカテゴリー、および全ての真菌のカテゴリーは重なり合わないカテゴリーである。すなわち、カテゴリーの如何なるメンバーも、他の如何なる組のメンバーとならない。

【0048】

試験の「カテゴリーの複雑度」とは、試験において検出される重なり合わないカテゴリーの数を意味する。

【0049】

「カテゴリー特異的結合部位」とは、特異的結合条件でカテゴリー結合分子に特異的に結合して、そして試験において同定される特定のカテゴリーのメンバーである標的分子を、そのカテゴリーのメンバーではないが試験試料に存在する可能性がある標的細胞と区別する標的細胞上の部位を意味する。すなわち、部位は、典型的に一つのカテゴリーの全てのメンバーに存在するが、重なり合わないカテゴリーの如何なるメンバーにも典型的に存在しない。カテゴリー特異的結合部位は、カテゴリー特異的結合分子に特異的に結合する。

10

【0050】

試験が、分類学的な群を構成する標的細胞のカテゴリーに関して試料を調べる場合、カテゴリー特異的結合部位は、その分類学的な群の本質的に全てのメンバーに存在するが、試験試料に存在する可能性がある他の分類学的な群では本質的に全てのメンバーに存在しない部位である。

20

【0051】

または、試験は、異なる分類学的群のメンバーによって共有されるカテゴリー特異的結合部位に関して試料を調べてもよい。このタイプのカテゴリー特異的結合部位の例には、様々な高分子(例えば、DNA)および遺伝子、mRNAs、ならびに抗生物質耐性を付与する、ピルレンスを付与する、または生存を示すタンパク質が含まれる。カテゴリー特異的結合部位はしばしば、より大きい分子または複合体の一部である。例えば、カテゴリー特異的ゲノム配列を、試験においてカテゴリー特異的結合部位として用いることができる。そのようなカテゴリー特異的結合部位は、(1)カテゴリー特異的ではない部分；(2)カテゴリー特異的結合部位であるが、試験が調べない部分；および(3)試験が調べる異なるカテゴリー特異的配列である他の部分を含む、かなり大きいゲノムの一部である。

30

【0052】

例えば、カテゴリーのメンバーである標的細胞の80%、90%、95%、または99%を超える細胞に存在するが、同じクラスの他の全てのカテゴリーのメンバーである標的細胞の例えば、80%、90%、95%、または99%を超える細胞に存在しない結合部位は、カテゴリー特異的結合部位であると見なされる。カテゴリー特異的結合部位は、カテゴリーのメンバーである標的細胞に存在しないことがわずかにまたは例外的にあり得ることに注目されたい。同様に、カテゴリー特異的結合部位は、カテゴリーのメンバーでない標的細胞に存在することが、わずかにまたは例外的にあり得る。例えば、本質的に全ての大腸菌に存在するが他の細菌種には存在しないタンパク質部位を考慮されたい。何百万個もの細菌の中から細胞1個未満の場合のように、タンパク質が産生されないように変異が起これば、マーカーは、その大腸菌株には存在しないであろう。しかし、このタンパク質部位は、それでもカテゴリー特異的結合部位であると見なされる。または、同じタンパク質の遺伝子が、組み換えDNA技術または天然の手段(例えば、ウイルス形質導入による)によって異なる細菌種の株に移入される。この場合、大腸菌のカテゴリーのメンバーではない細菌株が、大腸菌特異的結合部位であると見なされる部位を発現するであろう。

40

【0053】

「カテゴリー結合分子」とは、カテゴリー特異的結合部位に特異的に結合する分子または分子複合体を意味する。カテゴリー結合分子の例は、ゲノムDNAとハイブリダイズする核酸プローブ；タンパク質上の部位に特異的に結合するように選択されているまたはイン

50

ビトロで「進化している」核酸アプタマー；細胞抗原または血清タンパク質に結合する抗体；およびホルモン受容体またはアビジンのような結合分子に特異的に結合する上皮細胞増殖因子またはビオチンのようなリガンドである。二つのカテゴリー結合分子は、それらが異なるそして重なり合わないカテゴリー特異的結合部位に結合すれば、異なると言われる。カテゴリー結合分子は、その分子組成に従って、例えばカテゴリー結合オリゴヌクレオチド、プローブ、抗体、リガンド等と呼んでもよい。

【0054】

標的細胞のカテゴリーに「特異的に結合する」カテゴリー結合分子は、既定の結合条件で、試験によって調べられるカテゴリーのメンバーである本質的に全ての標的細胞に結合するが、カテゴリーのメンバーではないが試料に存在する可能性がある標的細胞には本質的に結合しないカテゴリー結合分子を意味する。調べるカテゴリーにおいて標的細胞によって結合されたカテゴリー結合分子の数は、そのようなカテゴリーに存在しない標的細胞によって結合された分子の数と比較して、典型的に2倍、5倍、10倍、または50倍以上である。

10

【0055】

「結合条件」とは、カテゴリー特異的結合部位に対するカテゴリー結合分子の特異的結合を得るために、試験において用いられる条件を意味する。例えば、カテゴリー結合分子がカテゴリー特異的DNAプローブである場合、特定の試験に関する結合条件は、ストリンジেন্টなDNAハイブリダイゼーション条件であってもよい。適当なストリンジেন্টなDNAハイブリダイゼーション条件は、当業者に周知であるように、プローブの性質に依存する。例えば、長さが500塩基を超える典型的なDNAプローブの場合、適当な結合条件(通常、ハイブリダイゼーションの専門語として「洗浄条件」と呼ばれる)は、 $0.2 \times \text{SSC}$ において65である。抗原に対する抗体の結合に関して、典型的な結合条件は、PBS-TBにおいて室温である。

20

【0056】

カテゴリー結合分子の「ファミリー」とは、標的細胞の特定のカテゴリーに特異的に結合するカテゴリー結合分子の組を意味する。

【0057】

ポリクローナル抗体は、一般的に、それらが一般的に標的細胞の同じカテゴリーに結合する多数の異なるカテゴリー結合分子を含むことから、カテゴリー結合分子のファミリーを構成する。アフィニティ精製を用いなければ、ポリクローナル抗体調製物は典型的に、選択された標的細胞のカテゴリーに結合しない抗体を含み、他のカテゴリーに結合する抗体も同様に含む可能性があることに注意されたい。動物の抗体の範囲は動物の感染症の既往によって決定されることから、さらなる抗体も存在する。したがって、ポリクローナル抗体は、好ましくはアフィニティ法によって精製される。ファミリーにおけるカテゴリー結合分子は、カテゴリーにおけるいくつかの標的細胞に結合するが他には結合しない。

30

【0058】

カテゴリー結合分子のファミリーのもう一つの例は、全ての大腸菌O157:H7株に存在するが、他の群の細菌メンバーには存在しないカテゴリー特異的ゲノムDNAと配列80個の組である。カテゴリー結合分子のこのファミリーは、適切に調製された大腸菌O157:H7細胞に対して群としてハイブリダイズすることができるが、他のカテゴリーの細胞とはハイブリダイズしない。ファミリーには、異なるタイプのカテゴリー結合分子が含まれる。例えば、O157抗原に対して特異的に結合するモノクローナル抗体およびインチミンタンパク質(ビルレンス因子)に結合するモノクローナル抗体も同様に、カテゴリー結合分子の上記のファミリーに含まれるであろう。カテゴリー結合分子のファミリーは、任意の数(例えば、一つまたはそれ以上)のカテゴリー結合分子を含みうる。

40

【0059】

カテゴリー結合分子の「重なり合わないファミリー」とは、それぞれのファミリーが、重なり合わないカテゴリーの組において一つのそして唯一のカテゴリーに特異的に結合するカテゴリー結合分子のファミリーを意味する。すなわち、カテゴリー結合分子の重なり

50

合わないファミリーの組は、重なり合わないカテゴリーの一致する組に対応する。例えば、米国薬局方(USP)の好ましくない微生物四つ、すなわち大腸菌、サルモネラ、シュードモナス属、および黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)を調べる試験では、四つの重なり合うカテゴリーが存在する。そのような試験は、それぞれが試験カテゴリーの一つに対して特異的である四つの異なる非交叉反応ポリクローナル抗体を組み入れてもよい。このように、試験は、カテゴリー結合分子の重なり合わない四つのファミリーを含む。試験におけるカテゴリー結合分子の重なり合わないファミリーは、カテゴリー結合分子の集合体であると呼ばれる。

【0060】

「カテゴリー結合分子の集合体」とは、特定の試験に関して混合物に混合されるカテゴリー結合分子の一つまたは複数の重なり合わないファミリーの組を意味する。標的細胞の多数の重なり合わないカテゴリーを調べる試験は、カテゴリー1個あたりカテゴリー結合分子ファミリー1個を含む。これらのファミリーを含むカテゴリー結合分子の完全な組を集合体と呼ぶ。

10

【0061】

「カテゴリー結合分子の複雑度」とは、集合体における異なるカテゴリー結合分子または部分の数を意味する。例えば、カテゴリー結合分子の集合体がオリゴヌクレオチドプローブ234個からなる場合、集合体のカテゴリー結合分子の複雑度は234であろう。

【0062】

集合体の「ファミリーの複雑度」とは、集合体におけるカテゴリー結合分子の重なり合わないファミリーの数を意味する。ファミリーの複雑度は、集合体におけるファミリーのそれぞれからのカテゴリー結合分子に結合するために必要な標的細胞の最小数と同じである。試験のファミリーの複雑度は、試験のカテゴリーの複雑度、すなわちそれについて試料を調べる異なるカテゴリーの数に対応する。一般的に、ファミリーの複雑度はまた、試験において用いられる異なるシグナルサインの数に対応する。

20

【0063】

「シグナル要素」とは、検出可能なシグナルを直接生成する分離または粒子を意味する。「直接生成する」という句は、シグナル要素が検出可能なシグナルの直接源または重要な調節物質であるという事実を指す。このように、シグナルが蛍光体から発生する光子である場合、蛍光体は、光子の直接源であり、したがってシグナル要素である。シグナルが

30

【0064】

シグナル要素の特徴は、そのような要素が、それぞれの部分が全体に対して同等である(特徴が同等、強度は必ずしも同等ではない)シグナルを生じるような部分に分けることができない点である。このように、直径2nmの量子ドットは、それを二つに分けると得られたナノ結晶の特徴(放出スペクトル)を変化させることから、シグナル要素である。フルオレセインのような蛍光色素に含浸された5 $\mu$ mの粒子は、それがそれぞれの部分が無傷の粒子の同等のシグナル伝達特徴を有するような部分に分けることができるため、シグナル伝達要素ではない。対照的に、分子フルオレセインは、シグナル伝達要素である。シグナル生成酵素(例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ)の検出可能な産物も同様に、シグナル要素であると見なされる。そのようなシグナル要素(または前駆体がシグナル要素に化学的に変換される場合にはその前駆体)は、拡散可能な物質、不溶性産物、および/または不安定な中間体であってもよい。例えば、酵素アルカリホスファターゼは、化学発光基質CDP-スター(NEN; カタログ番号NEL-601)を活性化産物に変換し、これは光子放出シグナル要素である。

40

【0065】

「シグナル伝達部分」とは、一つまたは複数のシグナル要素を含むまたは産生し(酵素の場合)、そしてカテゴリー結合分子に結合するまたは結合させることができる分子、粒

50

子、または物質を意味する。シグナル伝達部分は、共有結合または非共有結合によって、そして直接または間接的に(例えば、一つまたは複数のアダプターまたは「化学リンカー」部分によって)カテゴリー結合分子に結合させることができる。シグナル伝達部分の例には、カルボキシル化量子ドット；核酸プローブまたは抗体プローブに結合するように改変されたテキサスレッドのような蛍光体；ストレプトアビジンコーティング蛍光ポリスチレン粒子(ビオチン化カテゴリー特異的結合タンパク質に結合させることができる)；そのそれぞれが、蛍光改変ヌクレオチドのテールを有するいくつかのオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせることができる反復核酸配列を含み、5'末端でカテゴリー特異的結合オリゴヌクレオチドを含むローリングサークル複製産物が含まれる。シグナル伝達部分は、物理的に異なる要素を含みうる。例えば、いくつかの場合において、シグナル伝達部分は、カテゴリー結合分子(例えば、抗体)に結合される酵素(例えば、アルカリホスファターゼ)である。アルカリホスファターゼの基質(例えば、NENおよびロシュ(Roche)のそれぞれ、CDP-スターまたはBMパープル)がシグナル要素である産物(例えば、光子を放出する不安定な中間体、または沈殿可能な発色産物)に変換されると、シグナルが生成される。カテゴリー結合分子、酵素シグナル伝達部分、および基質を異なる時間に反応に適用することは通常ではない。

10

## 【0066】

「シグナル伝達複合体」とは、一つより多いシグナル伝達部分と一つより多いカテゴリー結合分子とを含む物理的細胞を意味する。シグナル伝達部分複合体におけるシグナル伝達部分とカテゴリー結合分子との物理的会合は、安定でなければならない(例えば、シグナル伝達部分とカテゴリー結合部分とは、複合体の解離に関する半減期の平均値が4のPBS中で少なくとも1日でなければならない)。シグナル伝達部分複合体の例として、二つのタイプ、すなわち標的細胞特異的抗体およびアルカリホスファターゼの何千個もの分子でコーティングしたポリスチレン微小粒子を考慮されたい。そのようなシグナル伝達部分複合体は、結合した抗体カテゴリー結合分子によって標的細胞に結合する。色素産生アルカリホスファターゼ基質(シグナル要素；例えば、BMパープル、ロシュ)と共にインキュベートすると、肉眼で検出することができる着色スポットが生成されうる。または、同じシグナル伝達部分複合体を化学発光または蛍光アルカリホスファターゼ基質のいずれかと共にインキュベートすると、化学発光または蛍光シグナルのいずれかを生成する。シグナル伝達部分複合体のさらなる例には、フルオレセイン標識抗体に結合したナノ金粒子、およびオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子と過酸化水素を加えると化学発光するアクリジニウムエステルとの両者に結合させたラテックス粒子が含まれる。

20

30

## 【0067】

シグナル要素またはシグナル部分の「シグナル特徴」とは、他のシグナル要素またはシグナル伝達部分と区別するために有用であるシグナル要素シグナル伝達部分によって生成されたシグナルの局面または複数の局面を意味する。例えば、フルオレセインおよびローダミンによって標識したシグナル伝達部分のシグナル特徴は、蛍光である。無線トランスポンダーの特徴は高周波である。光子シグナル伝達特徴の例は、蛍光、光散乱、燐、反射率、吸光度、化学発光および生物発光である。後者の二例を除く全ての光子シグナル伝達特徴は、外部照明(例えば、白色光源、レーザー光源、または日光)に依存する。対照的に、化学発光および生物発光は外部光源とは無関係なシグナル伝達特徴を有する。

40

## 【0068】

シグナル要素またはシグナル伝達部分の「クラス」とは、他のシグナル要素またはシグナル伝達部分と区別するために有用であるシグナルの異なる性質を意味する。例えば、赤い色素で標識されたリポソームは、異なる色のリポソームと区別される。赤色はそのクラスである。特定の高周波シグナルを放送するマイクロ電子送電器の場合、そのマイクロ電子送電器を他のマイクロ電子送電器と区別する高周波シグナルの性質が、シグナル要素クラスとなる。

## 【0069】

「シグナルのサイン」とは、試験において標的細胞のカテゴリーに結合するシグナル伝

50

達部分の組み合わせの明確なシグナル伝達性質を意味する。その一つが蛍光分子に結合し、その三つがローダミン分子に結合した四つのタイプの抗体に結合した標的細胞は、フルオレセインとローダミンの複合的な加重吸光度と放出スペクトルとによって説明されるシグナルサインを有する。

【 0 0 7 0 】

標的カテゴリー結合分子の試験または集合体の「シグナルの複雑度」とは、試験においてまたは集合体との結合によって明確に標識することができる標的分子のカテゴリーの数を意味する。または、シグナルの複雑度は、標的細胞のそれぞれのカテゴリーのメンバーが存在しなければ起こると予想されるであろう別個のシグナルサインの数として定義される。いくつかの試験に関して、カテゴリー結合分子の集合体のシグナル複雑度は、試験が調べるカテゴリーの数と同じである。多くのカテゴリーに関して調べる他の試験は、シグナル複雑度1個のみを有してもよい。

10

【 0 0 7 1 】

「選択力」とは、標的細胞を捕獲、単離、移動、または分離するために用いられる力を意味する。選択力の例には、重力、磁力、電位、遠心力、求心力、浮遊密度、および圧力が含まれる。標的細胞は、標的細胞のみに作用する選択力によって移動させることができる。または、選択力は、選択部分に会合した標的細胞に特異的に作用しうる(下記の定義を参照されたい)。

【 0 0 7 2 】

標的細胞を移動させるために選択力を適用する例には、標的細胞の遠心；磁気粒子に結合した標的細胞の磁気による選択；金属粒子によって標識した標的細胞の重力による沈降；および真空濾過による多孔性の膜上への標的細胞の沈着が含まれる。

20

【 0 0 7 3 】

「選択部分」とは、カテゴリー結合分子に結合させることができ、カテゴリー結合分子に、選択力によって選択的に捕獲、単離、移動、または分離される能力を付与する原子、分子、粒子、または細胞を意味する。カテゴリー結合分子：選択部分複合体が標的細胞に特異的に結合すると、標的細胞は同様に、一般的に選択力によって選択的に捕獲、単離、移動、または分離されうる。選択的とは、選択部分に会合していない細胞と比較して、選択部分および会合細胞に対する選択力による移動に対する感受性を選択的に付与することを意味する。

30

【 0 0 7 4 】

常磁性粒子およびフェリチンは、選択部分の例である。溶液中で沈殿する密度の濃いシリカ粒子は、もう一つのタイプの選択部分である。そのような粒子を、カテゴリー結合分子によってコーティングして、微生物標的細胞に結合させると、標的細胞を水溶液中で沈降させて、結合した標的細胞を他の試料未結合構成成分から分離することができる。

【 0 0 7 5 】

「選択的特徴」とは、選択部分を捕獲、選択、または移動させるために有用な選択部分の局面または複数の局面を意味する。例えば、常磁性粒子の選択的特徴は磁性である。水溶液中で急速に沈降するシリカ粒子の選択的特徴は質量である。

【 0 0 7 6 】

「ほぼ平面」の表面または基質とは、表面上の任意の1mm×1mm平面における点から想像平面上の最も近い点までの距離を測定した場合に、距離の平均値の絶対値が50μm未満であるように、想像上の平面に対して平行に配列させることができる表面を意味する。

40

【 0 0 7 7 】

「検出表面」とは、その上に標的細胞が沈着されるほぼ平面の基質の表面を意味する。光子シグナル伝達特徴を用いる態様において、検出表面が光学的に透明であれば、検出は、検出表面のいずれかの面を通して行うことができる。検出表面が不透明である場合、検出は、標的細胞が沈着される検出表面の表面を通して行われる。

【 0 0 7 8 】

「検出領域」とは、検出装置によって同時に採取される検出表面の面積を意味する。例

50

えば、集光レンズおよびCCDチップを含む光学的装置によって同時に撮像されるスライドガラス切片が、0.8cm×0.5cmであるとする。その場合、検出領域は0.4cm<sup>2</sup>である。

【0079】

「検出域」とは、複製しつつある標的細胞を検出装置によって検出することができる容積を意味する。検出域は、検出域と同じ大きさを有するが、複製しつつある標的細胞からのシグナルが検出され、同定されることができる深さに対応する深さを有する。したがって、検出域の深さは、陽性シグナルに関して評価するために用いられる閾値基準に依存する。光学的検出を用いる場合、検出域の深さは視野の光学的深さに依存する。

【0080】

検出領域の「最も長い寸法」は、検出領域の全周上の二つの点の間に引いた最大の長さの直線を意味する。例えば、検出領域が0.3cm×0.4cmの長方形である場合、検出領域の最も長い寸法は、その対角線の0.5cmである。検出領域が半主軸の長さが7mm、半従軸の長さが2.5cmの楕円である場合、検出領域の最長の長さは14mmである。

【0081】

「大領域の検出または大領域の撮像」とは、検出領域(検出装置によって同時に分析される領域)が標的細胞またはマイクロコロニーの寸法よりかなり大きい、顕微鏡標的細胞を検出する方法を意味する。大領域検出のための検出領域は、少なくとも一つの直線寸法が1cmである。対照的に、顕微鏡コロニーは、実質的により小さく、少なくとも二つの直交寸法において典型的に50μm未満である。大領域の検出の例には、CCDカメラによる直径9mmの検出領域の撮像；長いほうの寸法が1cmである直線アレイ検出器による走査による2cm×1cmの長方形の撮像；および写真用フィルムへの直接露出を用いる4cm×4cmフィルターの撮像が含まれる。

【0082】

いくつかの技術は、マイクロコロニーの試料を調べるが、大領域検出を利用しない。例には、固相レーザーマイクロビーム走査サイトメトリーおよび多数の高倍率顕微鏡視野のスライドガラス上の顕微鏡検査が含まれる。

【0083】

「結合または安定に会合した」とは、会合の平均半減期が4のPBS中で少なくとも1日である二つの実体間の物理的会合を意味する。例えば、ポリスチレン粒子に対する受動的タンパク質吸着の複雑な例を考慮されたい。吸着されたタンパク質にはいくつかの異なるクラスが存在する。いくつかのタンパク質は、何ヶ月もの半減期で表面に安定に会合される。吸着されたタンパク質の外層に緩く結合したタンパク質のような他のタンパク質は、粒子と安定に会合しない可能性があり、数時間以内に漏出しうる。

【0084】

粒子とは、任意の軸に沿って大きさが1mm未満の堅固なマトリクス(すなわち固体の少なくともいくつかの特徴を有する)を意味する。粒子は、シグナル要素によって処理するまたは結合させることができる。粒子はしばしば、粒子、またはその寸法または幾何学を反映する用語に関して呼ばれる。例えば、「ナノスフェア」、「ナノ粒子」、または「ナノビーズ」という用語は、任意の所定の軸に沿って大きさが1ミクロン未満の粒子を指すために用いられる。同様に、ミクロスフェア、マイクロ粒子、またはマイクロビーズという用語は、任意の所定の軸に沿って大きさが1mm未満の粒子を指すために用いられる。粒子の例には、ラテックス粒子、ポリアクリルアミド粒子、磁性マイクロ粒子、強磁性流体(磁性ナノ粒子)、量子ドット等が含まれる。

【0085】

「画像増幅器」または「画像管」とは、Inoue, Shinyaら、「Video microscopy: the fundamentals」(プレナム出版、ニューヨーク、1997、665頁)の用語集において「感度を増加させるためにビデオカメラチューブに(光ファイバーまたはレンズによって)結合させる装置」、と定義されるように、光子シグナルを増幅する装置を意味する。増幅器は、その上に焦点を合わせた画像に従って電子を放出する先端の光電陰極、後方末端の隣に電子を集める電子レンズおよび/またはマイクロチャンネルプレート(複数)、および電子のエネ

10

20

30

40

50

ルギーを増加させる高圧加速器を有する真空管である。単一または多数の段階となりうる。そのような多様な画像増幅器は、同じ参考文献の第8章に詳しく記載されている。

【0086】

検出領域の部分における「同時検出」とは、ほぼ平面の検出表面の部分からの一段階でのシグナルの検出を意味する。CCDチップ、肉眼的検出、または光ダイオードに基づくシグナル積分を用いる検出領域における標的の大領域撮像は、同時検出の例である。

【0087】

「同定」とは、標的細胞がメンバーであるカテゴリーまたは複数のカテゴリーを決定することを意味する。

【0088】

「試料」とは、標的細胞の有無に関して本発明によって調べられる材料を意味する。

【0089】

「直接的な肉眼的検出」とは、装着可能な視力矯正レンズ以外の装置の助けを借りない肉眼的な検出を意味する。

【0090】

「光電検出器」とは、光シグナルを電気シグナルに変換する人工的な装置または機器を意味する。光電検出器の例には、CCD検出器、光電子増倍管検出器、およびフォトダイオード検出器、例えばアバランシェフォトダイオードが含まれる。

【0091】

「丸で囲んだエネルギー」または「四角で囲んだエネルギー」とは、光検出器アレイのピクセル上で捕獲された無限に小さい光源からの光子の割合を意味する。

【0092】

「熱放射」とは、黒体放射を意味する。

【0093】

「細胞の自己蛍光または自己蛍光」とは、NADHおよび酸化フラボタンパク質のような天然の固有の細胞構成成分の蛍光により、細胞によって示される蛍光を意味する。緑色蛍光タンパク質のような組み換え型蛍光タンパク質により蛍光を発現する細胞は、自己蛍光とは見なされない。

【0094】

「インサイチューにおける複製」とは、娘細胞が前駆標的細胞と本質的に同時局在したままであるように、その場での標的細胞の複製を意味する。例えば、栄養寒天プレート上でのインビトロ生物学的細菌培養において、1個ずつ分散された細菌をプレートに載せて、細菌の複製を可能にする条件でインキュベートする。特定の位置における細菌は複製して、同様に複製する子孫細胞を生じる。細胞は全て、当初の細胞と同時局在したままであり(本質的に連続して)、最終的にプレート上に目に見えるコロニーを生じる。これまで細胞1個が存在した場所に、今では細胞 $10^7$ 個以上のコロニーが存在する。

【0095】

標的細胞の「マイクロコロニー」とは、互いに物理的に近位に存在する、表面に存在する(または接着している)、そして単一の先祖標的細胞のインサイチューにおけるインビトロ複製に基づく増幅によるクローン性の子孫である、標的細胞の組を意味する。マイクロコロニーは、一般的に小さすぎて裸眼では見えない(例えば、直径50ミクロン未満)。

【0096】

分裂する標的細胞の任意のタイプは、標的細胞のクローン性子孫の物理的同時局在に至る状況でマイクロコロニーを生じうる。例えば、マイクロコロニーは、動物もしくは植物細胞、真菌、または細菌を含みうるであろう。

【0097】

「照明」とは、電磁放射による放射線照射を意味する。様々な波長の電磁放射を照明に用いることができる。これには、例えば、X線、UV、可視光、または赤外領域スペクトルにおける波長による放射が含まれる。照明放射は、必ずしも可視範囲でなくてもよいことに注意されたい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 8 】

「光子シグナル伝達特徴」を有するシグナル要素もしくはシグナル伝達部分とは、光子の放射、反射、散乱、屈折、吸収、捕獲、もしくは再方向を通して、または光子の挙動の他の任意の調節もしくは組み合わせによって検出可能なシグナル要素またはシグナル伝達部分を意味する。光子シグナル伝達特徴を有するシグナル要素またはシグナル伝達部分のいくつかの例には、蛍光体テキサスレッド(蛍光シグナル伝達特徴)；CDP-スター(化学発光シグナル伝達特徴)；ルシフェラーゼ(生物発光シグナル伝達特徴)；BMパープル(光吸収または色素産生シグナル伝達特徴)；および燐のアップコンバート(二つの長い波長の光子を吸収して一つのより短い波長の光子を放出)が含まれる。

## 【 0 0 9 9 】

「数字×溶液名」は、溶液名の構成成分を溶液濃度の数の倍数含む水溶液を意味する(水を除く)。例えば、10×EEは、10mM EDTA/100mM EPPS(EE、または1×EEは、1mM EDTA/10mM EPPSを含む)を含む。

## 【 0 1 0 0 】

「EE」は、1mM EDTA/10mM EPPSである溶液である。それらを混合する前に、双方の成分の結合酸をNaOHによってpH8.0にする。

## 【 0 1 0 1 】

「PB」は、pH7.4の0.1M磷酸ナトリウム緩衝液である。

## 【 0 1 0 2 】

「PBS」は、120mM NaCl、2.7mM KCl、および10mM磷酸緩衝液(ナトリウム塩)、pH7.4を含む磷酸緩衝生理食塩液である。

## 【 0 1 0 3 】

「PBS-B」は、0.1%BSA(IgG不含、シグマ(Sigma)カタログ番号A-7638)のPBS溶液である。

## 【 0 1 0 4 】

「PBS-T」は、0.05%トライトンX-100(シグマ、カタログ番号X-100)のPBS溶液である。

## 【 0 1 0 5 】

「PBS-TB」は、PBS/0.1%BSA/0.05%トライトンX-100である。

## 【 0 1 0 6 】

「PBT」は、PBS/0.1%BSA(IgG不含、シグマカタログ番号A-7638)/0.05%ツイーン-20(シグマ、カタログ番号X-100)である。

## 【 0 1 0 7 】

「LB」は、細菌を増殖させるためのルリアブロスであり、既に記述されているとおりに調製する(Ausubel、1987、上記)。

## 【 0 1 0 8 】

「SSC」は、HClによってpH7.0に調節した150mM NaCl/15mMクエン酸ナトリウムである。

## 【 0 1 0 9 】

「EDAC」は、(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)である。

## 【 0 1 1 0 】

「TSA」は、トリプシンダイズ寒天(Becton Dickinson / Difco ; カタログ番号236950)である。

## 【 0 1 1 1 】

「TSB」は、バクト(商標)トリプシンダイズブロス(ベクトン・ディッキンソン、カタログ番号211822)である。

## 【 0 1 1 2 】

「AP」は、アルカリホスファターゼである。

## 【 0 1 1 3 】

「BSA」はウシ血清アルブミンである。

## 【 0 1 1 4 】

「CCD」は電荷結合素子である。

10

20

30

40

50



## 【0115】

「Cfu」はコロニー形成単位(生きている細菌細胞の数に対応する細菌濃度の測定値)である。

## 【0116】

「FITC」は、フルオレセインイソチオシアネートである。

## 【0117】

「PNA」はペプチド核酸である。

## 【0118】

特に明記していなければ、本明細書に記載の微生物株は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)、マナッサス、バージニア州から得た。

10

## 【0119】

発明の詳細な説明

発明の概要

本発明は、増殖しつつある細胞に関する最少に処理された試料を迅速かつ費用高価が高いように分析する。本発明と従来の細菌培養法はいずれも、細菌「コロニー」、すなわち単一の細胞から連続的な細胞分裂によって生じた関連細胞の集団の形成を検出することによって細胞増殖を測定する(図1)。しかし、本発明は、従来の微生物培養によって検出された肉眼的に観察されるマクロコロニーより早い段階で出現するマイクロコロニーを検出することから、従来の微生物培養より迅速に細胞増殖を検出する(図2、図8)。微生物培養と同じ方法原理を用いることによって、本発明は、結果を得るまでの時間をなおも有意に改善しながら従来の方法の利点を保持することができる。

20

## 【0120】

本発明がマイクロコロニーをどのように検出するかを理解するために、特定の態様および応用を調べることは有益である。例えば、注射用製剤を製造するために用いられる水中の微生物を計数する試験を考えてみよう。水試料(100ml)中の微生物を、多孔性メンブレンに液体を通過させることによって濃縮して固定する。微生物を含むメンブレンを使い捨てのペトリ皿において栄養増殖培地の上に置く。微生物を32℃でインキュベートして、それらを複製させてマイクロコロニーを形成させる。光をメンブレンの表面に向けて、マイクロコロニー中の細胞に自己蛍光を発生させる。この自己蛍光シグナルは、細胞に存在する生体分子(例えば、NADHおよび酸化フラボプロテイン)に由来する。次に、自己蛍光マイクロコロニーを電子的に撮像する。個々のマイクロコロニーから発生した光は、CCDアレイ光検出器上のピクセルまたは隣接するピクセルの小さい集団に当たる。自己蛍光マイクロコロニーの数を、画像処理ソフトウェアによって直ちに計算してユーザーに報告する。プロセスは、本発明が結果をより迅速かつ自動的に検出することを除き、従来の微生物培養と同一であることに注意されたい。

30

## 【0121】

本発明のこの態様は、非破壊的(すなわち、微生物を殺さない、または障害しない)であるため、検出されたマイクロコロニーは純粋な培養物に増殖させることができる。これらの純粋培養物は微生物を同定するために用いることができ、臨床試料の場合、抗菌耐性および感受性を決定するために用いることができる。非破壊的に検出することによって、従来の微生物計数に対する方法の同等性を確認することも単純となる。本発明を用いてマイクロコロニーを検出した後、ペトリ皿を単に再度インキュベートしてマイクロコロニーを、従来の微生物培養検出によって検出される肉眼で見えるマクロコロニーを生成するために必要な期間増殖させることができる。本発明によって検出されたマイクロコロニーの数および位置を、マイクロコロニーのさらなる増殖に由来する肉眼で見えるコロニーと比較すれば、本発明と従来の方法との同等性を容易に決定することができる。

40

## 【0122】

本発明を用いて、多くのフォーマット、標識法、カテゴリー結合分子、および検出法を用いて試験を構成することができる。しかし、試験はいくつかの重要な特徴を共通に有する。本発明の多くの態様に共通する段階およびプロセスを下記に示す。

50

【 0 1 2 3 】

本発明の適用の一般的な構成には以下の段階が含まれる：

段階1：試験の疑問の作製、試料、検出すべき細胞のカテゴリー、増殖条件、およびシグナル伝達特徴の選択

段階2：細胞標的を検出領域に沈着させる

段階3：細胞を複製させてマイクロコロニーを形成させる

段階4：マイクロコロニーを選択的に標識する

段階5：マイクロコロニーを計数する

【 0 1 2 4 】

試験によって回答を得るべき疑問の作製は、本発明に基づく新しい応用を作製するための第一段階である。工業および臨床微生物学者が取り組まなければならないいくつかの重要な疑問の例を表3に記載する。試験すべき疑問を表現することによって、調べなければならない試料のタイプが一般的に明確となる(例えば、牛ひき肉、臨床尿試料、または薬学的最終製剤)。試料のタイプおよび容積は、検出領域に標的細胞を配置する方法を選択するために重要なパラメータである(段階2を参照)。試験疑問の表現はまた、その応用において検出しなければならない細胞のタイプ、またはカテゴリーを明確にする(例えば、好気性菌、酵母もしくはカビ、シュードモナス、大腸菌0157:H7、または無名の脊髄液単離物)。

10

【 0 1 2 5 】

【表 3】

20

|   |  |
|---|--|
| <p>本発明に基づく試験によって答えが得られる疑問の例</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 尿試験中の細菌数は、尿路感染症を示すか。</li> <li>● 患者の血液試料は生きた感染性微生物を含むか。</li> <li>● 細胞性髄膜炎の特定の患者を治療するためにはどの抗生物質が最善か。</li> <li>● 肉 25g に存在する好気性菌の数は何個であるか。</li> <li>● 牛ひき肉試料中に、食品伝染病原体大腸菌 017:H7 の細胞は存在するか。</li> <li>● 環境中の空気試料に存在する酵母およびカビ細胞の数は何個であるか。</li> <li>● 大衆薬錠剤 10g 中に存在するシュードモナス菌細胞の数は何個あるか。</li> <li>● 注射用医療品の最終製剤バッチは無菌性であるか。</li> <li>● ビールの製造試料中に存在する酵母細胞の数は何個あるか。</li> </ul> |  |
|---|--|

30

【 0 1 2 6 】

検出または計数すべき細胞のタイプを定義した後、検出領域における細胞の増殖を促進するための条件を選択する。細胞を複製させる重要なパラメータには：増殖培地の組成、抗生物質のような選択的な試薬の存在、温度、ならびに酸素および他の気体レベルが含まれる。可能であれば、検出される細胞の増殖を促進するが他のタイプの細胞の増殖に対しては不応性である増殖条件が選択される。例えば、酵母およびカビを検出するための培地はしばしば、そうでなければより迅速に増殖する細菌微生物の増殖を阻害する成分を含む。

40

【 0 1 2 7 】

検出すべき細胞から検出可能なシグナルを産生する方法も同様に選択しなければならない

50

い。シグナルの選択は、検出されるマイクロコロニー中の細胞のタイプ、マイクロコロニーを形成する可能性がある他の細胞のタイプ、および試料中に予想されるバックグラウンドのタイプに依存する。医薬品の製造において、最終製剤、例えばコンタクトレンズの洗浄液における好気性菌の総数を決定する試験を考慮されたい。何千もの環境微生物の広いスペクトルがそのような試料に存在しうるため、シグナル生成法は、非常に一般的でなければならない。そのようないくつかの方法は、マイクロコロニー自己蛍光、反射率、または赤外線吸収のようなマイクロコロニーの固有の光学的性質に依存する。そのような方法によって、本発明の重要な利点である、試薬を用いることなくマイクロコロニーを迅速に検出することができる。例えばマイクロコロニー自己蛍光を用いる無試薬のシグナル産生によって、試験法は実質的に単純化され、無菌的な試料の処理が可能となり、「最も標準的」方法において用いられるものと同じ培地および使い捨て製品とを利用する迅速な試験を行うことができる。または、標的細胞によって産生されたマイクロコロニーは、染料を用いて標識することができる。

10

#### 【0128】

標的細胞の特異的カテゴリーを計数するための染料および特異的プローブの使用

標的細胞の分子構成成分に結合する染料またはプローブを用いることは、幅広い診断上の疑問を問う応用において用いることができる。広範囲の標的細胞(例えば、全ての好気性菌)を検出するために用いることができる染料の例には、核酸染料(例えば、ヨウ化プロピジウムまたはサイバークリーン(Molecular Probes)、および酵素活性の染料(例えば、蛍光原エステラーゼ染料)が含まれる。標的細胞のより狭いカテゴリーを標識するために、標的的特異的分子成分に結合する標識プローブを用いることができる。例えば、食品病原菌大腸菌O157:H7の表面に限って存在する分子に特異的に結合する蛍光標識抗体を用いて、食品試料中の病原性マイクロコロニーを検出することができる。

20

#### 【0129】

このように、標的細胞のカテゴリーの有無を検出するために、本発明は、カテゴリー特異的分子成分に特異的に結合する分子を用いることができる。標的細胞上に存在するカテゴリー特異的分子成分は、カテゴリー特異的結合部位と呼ばれ、それらに特異的に結合する分子は、カテゴリー結合分子と呼ばれる。カテゴリー結合分子の結合を検出するために、検出可能な標識またはシグナル伝達部分を一般的に、カテゴリー結合分子に結合させる。カテゴリー特異的結合部位は、調べる試料中におそらく存在する標的細胞の性質であることに注目されたい。対照的に、カテゴリー結合分子は、診断試験キットにおいて提供される試薬である。

30

#### 【0130】

本発明の利点は、カテゴリー結合分子の広いスペクトルを用いることができる点である。異なるタイプの診断上の疑問を問うためには、異なるタイプのカテゴリー結合分子が用いられることから、この特徴は重要である(例えば、広い界レベルのスクリーニング対狭い亜種レベルの同定)。カテゴリー結合分子のクラス(同様に、時にプローブとも呼ばれる)は、核酸(オリゴヌクレオチド、アプタマー、クローン配列、ゲノムDNA、RNA等)、ペプチド核酸(PNA)のような核酸に関連した化学変種、抗体、酵素(標的基質に結合することができる)、アビジンのような非酵素タンパク質(標的分子ビオチンに結合する)、細胞構成成分に特異的に結合する分子(例えば、アクチンに結合するファロイジンまたはアビジンに結合するビオチン)、色素および染料(例えば、ヨウ化プロピジウム、オーラミン-ローダミン、SYTO 17)、リガンド(例えば、上皮細胞増殖因子受容体に特異的に結合する上皮細胞増殖因子)、およびインビトロ進化技法を用いて選択されたポリペプチドまたは核酸結合試薬(例えば、Zhangら、Nat. Biotech. 18:71~74、2000)を含む。

40

#### 【0131】

カテゴリー結合分子は、他の機能的ドメインまたは改変を組み入れることができる。例えば、カテゴリー結合分子は、しばしばシグナル伝達部分(すなわち、蛍光体もしくは染色された微小粒子のような標識ドメイン)、または選択部分(例えば、磁性粒子もしくは固体表面)に共有結合または非共有結合によって会合する。または、カテゴリー結合分子は

50

、これがもう一つの機能的部分との結合を促進するアダプター部分に結合させてもよい。時に、カテゴリー結合分子は二重の分離できない機能を有する。例えば、核酸染料であるヨウ化プロピジウムは、カテゴリー結合分子として用いることができる(例えば、カテゴリー特異的結合部位は酵母における細胞の核酸であってもよい)が、同時に、結合した色素は、シグナル伝達部分として機能する(すなわち、カテゴリー特異的結合部位に結合すると蛍光を発することができる)。本発明に基づく試験は、一つより多いクラスのカテゴリー結合分子を組み入れることができる(例えば、抗体と核酸染料、または抗体とオリゴヌクレオチド)。

#### 【0132】

最も単純な試験は、標的細胞の単一のカテゴリーに関して調べるべき一つのタイプのカテゴリー結合分子を組み入れる。例えば、結核菌に関する試験は、結核菌表面上のカテゴリー特異的結合部位に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いてもよい。もう一つの例において、尿路感染症に関してスクリーニングする場合、一つのカテゴリーは「全ての細胞」である、またはヒトの細胞を溶解する場合、「ヒト以外の全ての細胞」であり、一つのタイプのカテゴリー結合分子は核酸染料(例えば、ヨウ化プロピジウム)となりうる。

#### 【0133】

カテゴリー結合分子のファミリーは、標的細胞の同じカテゴリーのメンバーに結合する別個のカテゴリー結合分子の組である。例えば、C型肝炎ウイルスに対するポリクローナル抗体は、それが標的細胞の同じカテゴリー、この場合はHCVに特異的に結合する多数のカテゴリー結合分子を含むことから、抗体ファミリーである。カテゴリー結合分子のファミリーのもう一つの例は、大腸菌O157:H7株に存在するが、細菌の他の群のメンバーには存在しないカテゴリー特異的ゲノムDNA配列80個の組である。このファミリーのカテゴリー結合分子は、適切に調製された大腸菌O157:H7細胞に対して群としてハイブリダイズすることができるが、他のタイプの細胞にはハイブリダイズしない。

#### 【0134】

標的細胞の多数のカテゴリーを検出するために、試験には、それぞれのカテゴリーに関してカテゴリー結合分子の一つのファミリーが含まれる。一組のカテゴリー結合分子のファミリーは、カテゴリー結合分子の集合体であると呼ばれる。例えば、肺炎に関する試験または薬物乱用に関する試験は、標的細胞の多数のカテゴリーを互いに区別しなければならない。標的細胞のそれぞれのカテゴリーに関して、一つのカテゴリー結合分子のファミリーが用いられる。肺炎に関する試験の場合、肺炎を引き起こす微生物表面上でカテゴリー特異的抗原に反応する抗体の集合体を用いてもよい。このカテゴリー結合分子集合体における一つのファミリーは、ウサギ宿主において肺炎球菌(*Streptococcus pneumonia*)に対して産生された抗血清の免疫グロブリン分画からのポリクローナル抗体を含んでもよい。もう一つのファミリーは、アデノウイルス外皮タンパク質に対する組み換え型抗体またはモノクローナル抗体を含みうる。

#### 【0135】

集合体によって調べられる標的細胞の別個の群またはカテゴリーの数、すなわちカテゴリーの複雑度は、集合体におけるカテゴリー結合分子のファミリーの数によって反映される。集合体におけるファミリーの数は、今度は、集合体の「最少カテゴリー偏差」と呼ばれる量によって正確に定義されうる。ファミリーの複雑度は、試験集合体におけるカテゴリー結合分子のファミリーのそれぞれからのメンバーに結合するために必要な別個の標的分子の最小数である。例えば、結核菌、レジオネラ亜種(*Legionella*)、およびコクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)の有無に関して喀痰試料を同時に試験するために用いられるカテゴリー特異的抗体の集合体を考慮されたい。集合体のファミリーの複雑度は、集合体におけるカテゴリー結合分子のそれぞれのファミリーメンバーに結合するためには、それぞれの病原体カテゴリーに由来する少なくとも三つの標的細胞が必要であることから、3個であろう。本発明が1回の試験で標的細胞カテゴリーの広いスペクトルを同定できることは、大きいファミリー複雑度を有するカテゴリー結合分子の集合体を用いて試料を調べることができる結果である。

10

20

30

40

50

## 【0136】

本発明と共に用いられるカテゴリー結合分子は、それらがアッセイ条件で所望の標的細胞に対して結合するが、アッセイにおいて区別されることを意味する他のタイプの標的細胞、または試料もしくは試験の他の可能性がある構成成分には結合しないはずであるという点において特異的でなければならない。このように、上部呼吸器細菌感染症に関する試験において、上部呼吸器官の正常な(共生)微生物成分と交叉反応するものを除去するために、可能性があるカテゴリー結合分子をスクリーニングする。

## 【0137】

カテゴリー結合分子を得て特徴を調べる代表的な方法は、下記の実施例に含まれる。

## 【0138】

本発明が標的細胞の多数の別個のカテゴリーの試料を同時に分析できることは、標的細胞の異なるカテゴリーに由来するシグナルを区別できることに由来する。本発明は、それが独自のシグナルサインを有するように、シグナル伝達部分によってカテゴリー結合分子のそれぞれのカテゴリー特異的ファミリーを標識することによって、カテゴリーを区別する。多数の別個のシグナルサイン(すなわち、高いシグナル複雑度)を生成して検出できることから、標的細胞の多数のカテゴリーに関して分析する試験(すなわち高度な多重試験)を構成することができる。

## 【0139】

本発明は、蛍光、散乱光、偏光、化学発光、および放射活性を含む、様々なタイプのシグナルサインを利用することができる。様々なシグナル特徴を用いるシグナル伝達部分と検出スキームの例を下記に示す。シグナル特徴内で多数のシグナルクラスが存在しうる。例えば、シグナル特徴が蛍光である場合、様々な特徴的な放出スペクトルがシグナルクラス(例えば、赤色蛍光、緑色蛍光、および青色蛍光)に含まれる。もう一つの例において、同じ蛍光体の異なる濃度によって染色した赤色蛍光微粒子を考慮されたい。この場合、蛍光は、シグナル特徴であるが、粒子の異なる強度はシグナル特徴のクラスとなる、すなわち蛍光強度は、ある群の粒子を他の群と区別するシグナル特徴の量である。

## 【0140】

非常に多様なシグナル伝達部分を、下記の実施例に照明するように本発明と共に用いることができる。シグナル伝達部分には、単純な蛍光体、アップレギュレートされた燐、天然の蛍光タンパク質(緑色蛍光タンパク質およびその近縁物質のような)、色素、酵素：基質系(色の变化または化学発光を生成する)、蛍光微粒子、光散乱粒子、磁性粒子、または無線送信微小装置が含まれうる。

## 【0141】

高いシグナル複雑度を達成することは、多数のタイプの標的細胞に関して調べる特定の試験(すなわち、高いカテゴリー複雑度を有する試験)を開発するために重要である。

## 【0142】

高いシグナル複雑度を得る

混合物における区別可能な標識(またはシグナル伝達部分)の数は、シグナル複雑度と呼ばれる。高度な多重試験の場合、時に高いシグナル複雑度を有するシグナル伝達部分を用いることが都合がよい。高いシグナル複雑度を得るために本発明について用いることができる三つの一般的アプローチは、(1)別個の標識、(2)組み合わせ標識、および(3)比の標識である。

## 【0143】

1. 別個の標識に関して、異なるプローブファミリーにおけるプローブに、実験における他の全てのシグナル伝達部分の存在下で容易に検出することができる一つのシグナル伝達部分によってタグをつける。これまで、高いシグナル複雑度で別個の標識を得ることは難しかった。この難しさは、ほとんどの標識法が、光学シグナルまたは放射活性標識を利用するために存在し、そして光学シグナルのスペクトルのバンド幅のために、そして現在の装置によって検出されるシグナルの範囲が限られているために、光学シグナルを用いる分解可能なシグナル複雑度はやや小さい。例えば、異なる放射スペクトルを有する1ダー

10

20

30

40

50

スの蛍光体の分解は、スペクトルが重なり合うために現在のところ不可能である。

#### 【0144】

2. 本発明において用いられる高いシグナル複雑度を得るためのもう一つの方法は、組み合わせ標識アプローチを適用することである。組み合わせ標識は、比較的少数の別個のシグナル伝達部分を用いて高いシグナル複雑度を得る技術である。このアプローチによって、シグナル伝達部分の別個の組み合わせが異なる標的に結合される。現在、蛍光体は、分子診断に関するシグナル部分の好ましいクラスである。しかし、多数の別個の蛍光体を分析する場合に伴う複雑さを考慮すると(大部分が励起および放射スペクトルの重なりから生じる)、約7個またはそれより少ない通常の蛍光体を組み入れることが現在では実際的である。しかし、組み合わせる場合、蛍光体7個を用いて別個のシグナル127個を生成することができる(蛍光体N個は、組み合わせ $2^N-1$ 個を生じる)。高いシグナル複雑度はまた、他のタイプのシグナル伝達部分を用いる組み合わせ標識によって得ることができる。例えば、異なる染料に含浸した粒子、異なる別々の大きさのクラスに分類される粒子、または異なる放射シグナルを放出するトランスポンダーをこのアプローチによって用いることができるであろう。蛍光体を用いる組み合わせ標識は、最近ヒトの核型分類に適用されて成功している(Speicherら、1996、上記; Schrockら、1996、上記)。組み合わせ標識実験を分析するための機器およびソフトウェアは市販されている。

10

#### 【0145】

3. 高いシグナル複雑度はまた、比標識アプローチを用いても得ることができる(Fultonら、1997、上記)。比標識の場合も、組み合わせ標識の場合と同様に、比較的少数の別個のシグナル伝達要素を用いて、多くの別個のタイプのシグナル伝達部分が生成される。しかし、組み合わせ標識とは対照的に、比の標識におけるシグナル伝達部分は、シグナル伝達要素の比とは区別される。例えば異なる励起/放射特徴を有する二つの蛍光体、XおよびYを用いて、ポリスチレン粒子を染色することができる。異なる相対濃度の蛍光体([X]、[Y])を異なる組の粒子に適用する。例えば、Xの異なる濃度8個およびYの異なる濃度8個を用いて、全ての組み合わせ( $X_1Y_1$ 、 $X_1Y_2$ 、 $X_8Y_7$ 、 $X_8Y_8$ )で粒子を染色ことができ、区別可能な粒子64クラスが得られる。比の標識は、用いる必要があるシグナルタイプがごく少数であることから、機器を単純にする。蛍光体以外で非光学シグナル要素を含むシグナル要素も同様に、非標識アプローチを用いて高いシグナル複雑度を生成するために用いることができる。

20

30

#### 【0146】

マイクロコロニーの検出を促進するための強いシグナルの産生

必要なシグナル強度のレベルは、当然、シグナル特徴および検出法/機器のタイプに依存する(下記参照)。

#### 【0147】

カテゴリー結合分子を標識する様々なアプローチを用いて必要な感度を得ることができる。シグナル強度を最適にする一つの方法は、高度蛍光シグナル伝達部分によって標識分子を標識することである。例えば、量子ドット、蛍光染色ナノスフェア、および重合化蛍光体分子は、強い蛍光シグナルを生成する。多数のシグナル要素を組み入れることは、シグナル伝達部分の蛍光強度を増加させることができる。例えば、蛍光ナノスフェア(直径~20nm)は、フルオレセイン分子約180個と同等のシグナルを生成することができる。蛍光染色ポリスチレン微小粒子(例えば、直径1 $\mu$ m)は、何百万もの蛍光体シグナル伝達要素を組み入れることができる。核酸カテゴリー結合分子とのシグナル部分会合体において多数の蛍光体を組み入れる方法は、クローン化カテゴリー特異的配列のPCR増幅の際に蛍光体-dNTP結合体を組み入れることである。多数の蛍光体を核酸カテゴリー結合分子に組み入れるもう一つの方法には、以下を含むアプローチが含まれる: デンドリマー、分岐DNA、または多数のシグナル部分に結合したもしくは多数の重合化蛍光体標識ヌクレオチドのテールをつけたローリングサークル鋳型。カテゴリー結合分子を多数のシグナル伝達部分に結合させても、シグナル強度は増加する。例えば、シグナルの増幅はまた、多数のシグナル伝達酵素(例えば、アルカリホスファターゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼ)をナノ

40

50

粒子に結合させることによって得ることができる。

【0148】

強いシグナルを得るためのもう一つのアプローチは、それぞれの細胞に多数の標識カテゴリー結合分子を結合させることである。この結合は、以下を含む様々な手段によって得ることができる：多数のカテゴリー結合分子(同じ標的細胞において多数のカテゴリー特異的結合部位を認識する)を用いること、または標的細胞において高度に発現される標的分子に結合するカテゴリー結合分子を選択すること。例えば、標識された微生物特異的ポリクローナル抗体は、微生物標的細胞上で多数の別個のエピトープに結合することによって高いシグナル強度を得ることができる。それぞれの標的細胞に多数存在するカテゴリー特異的結合部位を選択する戦略は、これまでもしばしば用いられている。この戦略の例には、リボソームRNAの核酸プローブ(標的生物および細胞タイプに応じて、細胞あたり数千コピー存在しうる)を用いることが含まれる。同様に、いくつかの抗原性標的分子は、標的生物のそれぞれの細胞において数百から数千コピーで存在する。本発明は、これらの戦略の双方を利用することができる。もう一つの例として、細菌において存在する多数のカテゴリー特異的結合部位は、カテゴリー結合分子/シグナル伝達部分として核酸結合蛍光染料であるサイバークリーンIを用いた場合に強いシグナル強度を生じる。

10

【0149】

標的細胞に対して多数のシグナル部分が結合すると、シグナル強度を増加するのみならず、標的細胞の非存在下で予想される複合的なシグナルサインを有する多数のシグナル伝達部分の多数の集団を観察する可能性は低いため、これは本発明に強さを与える。

20

【0150】

カテゴリー結合分子に対するシグナル伝達部分の結合

本発明は、当業者に既知である様々な方法を用いて、カテゴリー結合分子に直接結合させることができる多数のタイプのシグナル伝達部分を組み入れることができる(例えば、Hermanson, G., Bioconjugate Techniques(アカデミック出版)、1996、および下記の実施例を参照されたい)。例えば、抗体またはオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子は、蛍光体または量子ドットシグナル伝達部分に直接結合させることができる。または、抗体またはオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子を用いて、蛍光微粒子に基づくまたは光散乱ナノ粒子に基づくシグナル伝達部分をコーティングすることができる。シグナル伝達部分はカテゴリー結合分子に間接的に結合させることができる。例えば、アビジンを多数のシグナル要素に直接結合させて、シグナル伝達部分を構成することができる。次に、標識されたアビジン分子をビオチン化カテゴリー特異的抗体に結合させることができる。シグナル伝達部分は、結合段階の前、間、または後にカテゴリー結合分子に結合させることができる。例えば、本発明の一つの態様において、ジゴキシゲニン標識核酸プローブをカテゴリー結合分子として用いる。試料中の標的細胞におけるカテゴリー特異的結合部位にカテゴリー結合分子を結合させた後、未結合のプローブを洗浄して除去する。次に、抗ジゴキシゲニン抗体：アルカリホスファターゼ結合体(シグナル伝達部分)を、結合したジゴキシゲニン標識プローブに結合させる。次に、アルカリホスファターゼ基質(例えば、化学発光基質CDP-スター；NEN)を結合したアルカリホスファターゼに加えてシグナルを生成する。

30

40

【0151】

段階2：検出領域における細胞標的の沈着

一般的に、本発明に基づく応用において次の段階は、検出域に試料中の標的細胞を載せることである。本質的に平面の検出域がしばしば用いられるが、その理由の一部は、例えば、マイクロコロニーが栄養寒天の表面上または栄養寒天プレートの表面上に存在する膜において増殖すると、光学撮像システムが薄い検出域から効率よく集光できるためである。これらの場合、検出域の深さは、検出域の側方寸法と比較すると無視することができる。この段階はまた、特定の標的細胞を選択的に沈着させるために、細胞増殖を阻害する可能性がある物質を除去するために、または標的細胞を標識試薬に接触させるために用いることができる。

50

## 【0152】

ほぼ平面のメンブレン検出表面上に細胞を沈着させるために膜の濾過を用いることはいくつかの利点を有する。大きい試料容積から標的細胞の少数を回収できることは、メンブレン濾過を用いる一つの重要な利点である。例えば、水1L中の細菌細胞1個を、標準的な濾過メンブレンの表面上に迅速かつ効率よく沈着させることができる。水は膜を自由に通過できるが、細胞は膜の孔の大きさのために通過できない。水試料をその基部が膜を形成する容器に注いで、メンブレンの底表面に真空を適用する。メンブレンを通して水を吸引すると、細胞はメンブレン表面に保持される。膜は選択的に、増殖阻害剤のような物質を効率よく除去するため、または標識試薬に細胞を曝露するために、液体によって洗浄することができる。次に、メンブレンを増殖培地に載せる。

10

## 【0153】

標的細胞を表面上に沈着させる他の方法には、遠心、重力による沈降、磁気分離、または表面結合カテゴリー結合分子(例えば、捕獲抗体)への結合が含まれる。場合によっては(例えば、磁気分離)、別個の部分、選択部分を用いる。カテゴリー特異的抗体によってコーティングした磁気微粒子は、選択部分の例である。標的細胞を抗体コーティング磁気粒子に結合させた後、磁場を適用して、検出表面上に磁気標識細胞を沈着させる。同様に、標的特異的抗体によってコーティングした密度の濃い微小粒子も、選択部分として用いることができる。この場合、標識細胞は、密度の濃い粒子に対する重力の作用によって検出表面に移動する。

## 【0154】

段階3：細胞を複製させてマイクロコロニーを形成する

この段階において、標的細胞は、検出域においてその場で分裂することによってマイクロコロニーを形成する。マイクロコロニーの増殖は、栄養を含む増殖培地に細胞を曝露して、それらを細胞増殖および分裂を促進する条件でインキュベートすることによって支持される(これらのパラメータは上記の段階1において選択される)。典型的な態様において、細胞を多孔性のメンブレンフィルターに沈着させる。フィルターをペトリ皿において固化栄養寒天増殖培地の表面上に置き、次にこれに蓋をして、適当な温度に設定したインキュベータ内に入れる。この方法は、栄養は、前駆細胞から娘細胞の移動を引き起こさずにメンブレンの中を自由に拡散できるために、従来の微生物培養を用いるコロニー増殖を支持するために現在広く用いられている。または、マイクロコロニーは、栄養寒天培地または同等物の表面上で直接増殖させることができる。

20

30

## 【0155】

標的細胞の特異的増殖の選択は、マイクロコロニーの増殖段階において起こりうる。例えば、試験は試料中の好気性菌を検出するように設計してもよい(そのような試験は、一般的に例えば注射可能な薬学的最終製剤にとって必要である)。この場合、増殖段階は、ガラス鐘における好気性大気下で行うことができるであろう。選択的な増殖培地も同様に、この段階において微生物の選択的な増殖を得るために用いることができる。例えば、抗生物質に対する細菌の耐性を検出するために、細胞は一般的に、いくつかの濃度の様々な抗生物質の存在下でインキュベートされる。細菌株がその濃度の抗生物質の存在下および非存在下で同等に増殖すれば、抗生物質の特定の濃度に対する耐性が付与される。

40

## 【0156】

本発明は、様々なコロニー形態を検出することができる。多くのタイプの増殖細胞が、共通の基質(栄養寒天培地およびメンブレン)上で単純な別個のドーム形状のコロニーを形成する。他は、不規則な形状のコロニーまたは線維様コロニーを形成する。さらに、コロニーの形態は、増殖条件(例えば、栄養、温度、および基質)に依存しうる。いくつかのタイプの細胞は移動性であり、分離したコロニーを全く形成しない。そのような生物の増殖を検出することが重要である場合、運動阻害剤を培地に加えることができる。このように、増殖条件を選択して、標的細胞が検出可能なマイクロコロニーを形成することを保証するために対照実験を行わなければならない。必要であれば、増殖条件を改変するか、または同時の試験において多数の条件を用いてもよい。

50



## 【0157】

## 段階4：マイクロコロニーの選択的標識

この選択的段階において、カテゴリー結合分子および会合するシグナル伝達部分(同様にプローブ、標識または染色とも呼ばれる)を、特異的結合を促進する条件で試料中の標的細胞に接触させる。例えば、カテゴリー特異的核酸配列の集合体をこの段階において試料中の相補的標的配列にハイブリダイズさせる。同様に、試料中のカテゴリー特異的抗原を、対応するカテゴリー特異的抗体に結合させる。

## 【0158】

結合段階に関していくつかの物理的形狀が考えられ、結合は、試験技法において様々な時点で行うことができる。例えば、標的細胞は、標的細胞を検出域に沈着させる前に液体試料中で標識することができる。未結合のプローブは、沈着段階の際に、または洗浄によって有効に除去することができる。このアプローチの短所は、シグナルが一般的に微生物の増殖と共に増加しない点である。微生物増殖の際、または後にマイクロコロニーを標識することによって、より強いシグナルが一般的に得られる。標識試薬は、増殖の際に微生物が試薬に絶えず曝露されるように栄養培地に加えることができる。または、マイクロコロニーを、増殖後プローブに曝露することができる。例えば、メンブレン上のマイクロコロニーを一般的に固定して、関連するカテゴリー特異的結合部位を、乾燥、加熱に曝露する、および/または化学物質(例えば、NaOHまたはクロロホルム蒸気)に曝露する。次に、標識試薬と共にマイクロコロニーを重層することによって、または試薬によって飽和したパッド上にメンブレンを載せることによって、標識を行うことができる。一般的に、洗浄段階は、未結合の試薬を除去するために用いられる。カテゴリー結合分子の濃度は、迅速な結合速度論を得るために最適化される。特異的結合のために選択される選択条件は、カテゴリー結合分子の特徴と標的分子とのその相互作用に依存する。特定の条件および技法を、下記の実施例に記述する。

## 【0159】

## 段階5：マイクロコロニーの計数

試料中の標的細胞の計数は、本発明に基づいて試験応用の最終段階において行う。計数段階そのものは、撮像、画像解析、および報告書作成段階を含む。

## 【0160】

本発明は、拡大せずにマイクロコロニーを検出することができる。低倍率で撮像することによって、大領域の撮像が容易となり、これによって大きい試料の走査が容易となる。本発明のいくつかの態様は、部分的に、マイクロコロニーから放射された光子を光検出器アレイの小数のピクセルに向けるために高い効率の光学を用いることによって、拡大せずにマイクロコロニーを検出する。

## 【0161】

用いた撮像法は、段階1において選択されたシグナル生成のタイプに依存する。例えば、撮像プロセスは、光学的性質またはシグナル生成のために用いられるシグナル伝達特徴に応じて異なる。いくつかのシグナル特徴(例えば、反射率、蛍光、光散乱、吸光度)では、検出域における複合体を光源によって照射しなければならない。他(例えば、化学発光、熱放射)の場合、照明は必要ではない。電子光検出器、フィルム、および直接可視化を含む様々な検出器を用いることができる。

## 【0162】

個々のマイクロコロニーの検出は、本来定量的で超感受性である。定量は、写真もしくはデジタル画像における個々の細胞を計数することによって手動で、またはデジタル化した画像の自動画像解析を用いることによって、行うことができる。試料に対するシグナル強度の積分も同様に、標的細胞を定量するために用いることができる。シグナルの積分は、標的細胞の高濃度を含む試料について特に有用である。これらの場合、一致したシグナルの分解は必ずしも可能でなくてもよい。

## 【0163】

標識したプローブファミリーのサインを解読することによって、標的細胞の多数のカテ

10

20

30

40

50

ゴリーを同定することができる。この段階の重要な目標は、試料に接着した標識カテゴリー結合分子のサインを決定することによって、試料中の標的細胞のカテゴリーを同定することである。

#### 【0164】

図3に示されるCCDカメラに基づく撮像装置は、シグナル特徴として蛍光を用いる場合に用いる大領域撮像のための有用な装置である。この装置は、下記の実施例の多くに関するデータを収集するために用いた。励起光は、高輝度白色光源(1000Wキセノンアーク燈、モデルA-6000、フotonテクノロジーインコーポレイテッド、モンマスジャンクション、ニュージャージー州)からの光を液体光ガイド(コア直径5mm、モデル380、フotonテクノロジーインコーポレイテッド、モンマスジャンクション、ニュージャージー州)に導入することによって提供してもよい。液体光ガイドは、励起フィルターホイール(バイオポイントFW、ルドルエレクトロニクス、ホーソン、ニューヨーク州)に光を運び、フィルターを通過した光線(例えば、直径9mmまたはそれ以上)をマイクロコロニーを含む検出表面に向ける。装置は、様々な形状のマイクロコロニーを検出することができる(例えば、栄養寒天、顕微鏡スライドガラス、カバーガラス、または平坦で光学的に透明な底を有するチューブもしくはウェルの表面;または栄養寒天もしくは他の物質に固定)。入射光は検出表面に当たり、標的細胞において蛍光を誘導する。放射された蛍光の一部は、高い集光率のレンズ系によって集められ、放射フィルターホイールを通して(バイオポイントFW、ルドルエレクトロニクス)CCDカメラ(オルカII、ハママツ、ブリッジウォーター、ニュージャージー州)に伝達される。光の列の設計および構築は、当業者に既知の原理および実践に基づく。

10

20

#### 【0165】

本発明はまた、光検出器の他のタイプおよび他の構造を組み入れることができる。撮像システムの感度は、より感度のよいカメラ(例えば、より低い温度に冷却したカメラ、または背面が薄いチップを用いるカメラ)を選択することによって増加させることができる。または、検出の感度および分解は、ライン走査システム(例えば、BT画像アレイ、ハママツ)を実行することによって増加させることができる。ライン走査に関して、線形CCDまたはフォトダイオードアレイ(例えば、1×500または1×1000ピクセル)を用いて画像を捕獲する。一つの次元における解像度は、アレイ要素の数に対応するが、第二の次元は一般的に、線形アレイの下で試料スライドガラスを垂直に移動させることによって捕獲される。存在する要素がより少ないことから、類似の感受性線形アレイは、領域フォーマットCCDカメラより典型的に安価である。

30

#### 【0166】

図3において示した機器は、試料容器(例えば、マイクロタイタープレート)を励起および集光光学装置に対して移動させるために、X-Y配置ステージ(バイオポイントXY、ルドルエレクトロニクス)を用いることによって、多数の試料からのシグナル測定を容易にする。イメージプロおよびイメージプロアドイン(add-in)は、全ての機器成分と画像の獲得を制御する。フィルターホイールは、スコーププロアドイン(Media Cybernetics、ボルチモア、メリーランド州)によって管理し、およびステージプロアドイン(メディアサイバネティクス、ボルチモア、メリーランド州)はステージの位置を扱うが、カメラの制御はハママツオルカIIDライバー(ハママツ、ブリッジウォーター、ニュージャージー州)を通して行う。イメージプロプラスも同様に、下記のように画像の処理および分析のために用いられる。

40

#### 【0167】

白色光源照明を利用する本発明の態様は、蛍光体のそれぞれのピークに関して最適な励起ピークを提供するためにスペクトルフィルターを利用する。白色光スペクトルは大きく、それによって多様な蛍光体を、放出スペクトルの重なりが消失するように選択することができる。典型的に、白色光源照明器によって得ることができるスポットの大きさ、例えば2mm~5mmは、大領域の撮像にとって適当である。フィルターの変化は比較的単純で、自動化することができるため、白色光システムは非常に適合性があり、それによって同じ装

50

置を、別個の組の蛍光体を用いる試験のために用いることができる。

【0168】

図3に示すシステムの集光率は、二つの成分からなる注文製の集光装置を組み入れることによって最大限となる：集光対物レンズと焦点要素。集光対物レンズは高い集光率( $f\#1.2$ )を有し、比較的平行なビームを産生する。焦点レンズは集光対物レンズからの光の出力を捕獲して、これをCCDの検出表面に焦点を合わせる。光学装置は、フィルターホイールを集光レンズの光路に挿入する二つの部分で設計される。本発明の特定の態様に関して、例えばフィルターの変更を必要としないいくつかの態様において、高い集光率を得るために光ファイバーの先細りの束を含むことが望ましいかも知れない。光ファイバーの束は、試料に対して近位に光を集める繊維を含み、光をCCDチップに直接誘導する。または、本発明は、試料がCCDチップに直接または非常に近位に適用される直接の近位検出器を用いて、シグナルを非常に感度よく検出することができる(背面が薄いCCDチップの背面に対して最高の感受性を示す)。

10

【0169】

上記の白色光多スペクトル系の他に、本発明者らはまた、非拡大領域撮像のためにより単純な単色蛍光撮像システムを開発した。図4に示したシステムにおいて、励起光は532 nmの周波数倍加ダイオードレーザー(50mW、モデル#BWT-50E、B&Wテク(B&W Tek)、ネットワーク、デラウェア州)によって提供される。この検出は単色を用いるため、フィルターホイールは必要ではない。一つの励起フィルターは、レーザー出力から調和関数を除去し(モデルHQ532/10x、Chroma Technology、プラトルボロ、バーモント州)、一つの放射フィルター(モデルHQ620/60m、クロマテクノロジー、プラトルボロ、バーモント州)は、特異的蛍光シグナルのみをCCDカメラまで通過させる。システムはまた、画像を捕獲するために先に記述されたカメラほど高価でないCCDカメラ(モデルKX-2E、遠地点CCD、オバーン、カリフォルニア州)を利用する。機器は多数のレーザーおよびフィルターの組を組み入れることによって、多色分析に容易に適合させることができる。

20

【0170】

本発明において組み入れられるCCDカメラは、一般的に、カメラのノイズ構築が最少である、10秒~約2分間までの積分時間にとって十分な-5~-50の温度まで冷却される(カメラの感度に応じて)。積分時間が長ければ一般的に、蛍光体から放射された光子をより長い時間収集できることから、感度はより高くなる。長い積分時間はライン走査にとって不適當である；しかし、感度を増加させる非常に高い量子効率を有する背面の薄い線形アレイが利用可能である。

30

【0171】

本発明はまた、シグナルの検出および解読のために干渉計に基づくスペクトル撮像を利用することができる(Schrock, E., 1997、上記)。この技術を用いて、シグナル伝達部分から放射または散乱された光を二つの経路に分けて、プリズムを通過させて(異なる波長が異なる距離を移動するように)、それらを再度組み合わせることで干渉パターンを形成する。干渉パターンのフーリエ分析によって、画像におけるそれぞれの点に関してスペクトログラムを生成する。

【0172】

または、試料中の標的細胞の画像を安価に記録するために、写真フィルムを用いることができる。シグナル伝達特徴が化学発光である場合、このアプローチは最も容易に実行される。フィルム上で収集した画像は、データ保存およびデジタル画像解析のために市販のスキャナにおいてデジタル化することができる。

40

【0173】

デジタル画像を生成する本発明の態様に関して、コンピューターソフトウェアは、標的マイクロコロニーを同定して定量する。異なるクラスの蛍光シグナル伝達部分を用いる典型的なアッセイにおいて、ソフトウェアは、適当な蛍光体特異的画像を重ね合わせて、どのサインまたはシグナルの組み合わせがそれぞれの標的マイクロコロニーから放射されたかを決定することによって標的細胞を同定し、試料中に存在する標的マイクロコロニーの

50

それぞれのカテゴリーを計数する。ソフトウェアはまた、以下を行ってもよい；(1)照明の不均一性を補正する；(2)逆重畳マトリクスを通しての蛍光漏話を補正する；(3)基質上に印刷されたレジストレーションマークを用いて画像を配列させる；(4)異なる時点からの画像を比較する；(5)増殖しつつあるマイクロコロニーを非増殖物体と区別するためにアルゴリズムを適用する；(6)ルックアップ表との比較に基づいて試料中のそれぞれの撮像されたマイクロコロニーにIDコードを割付する；(7)試料の同定のために撮像された試料のバーコードを記録する；および(8)出力データ、画像、およびバーコードを、例えばウェブブラウザインターフェースを通して問い合わせることができるデータベースに自動的に保存する。これらの機能を提供するために、市販の画像解析パッケージを用いることができる。多色画像解析用のソフトウェアパッケージを用いることができる(例えば、イメージプロ、メディアサイバネティクス；メタモルフ、Universal Imaging；マトラブ、The MathWorks)。

10

**【 0 1 7 4 】**

本明細書において、下記の実施例の多くにおいて収集された蛍光データを分析するために用いたソフトウェアパッケージおよび方法について概要することは有用である。蛍光物体の数および/または総蛍光シグナルを決定するために、検出表面を撮像した。蛍光は、CCDカメラによってメンブレンから捕獲して、ピクセルの位置および強度の記録を含むTIFF(タグ付き画像ファイルフォーマット)画像ファイルとして保存した。三つのアプローチを用いてアッセイ結果を定量した。撮像した検出域の総積分シグナルは、全てのピクセルからの蛍光シグナルを総和することによって決定した。試料からの積分シグナルを陰性対照のシグナルと比較した。総積分シグナルの測定は、多数の標的細胞を含む試料にとって特に有用である。第二のアプローチは、検出域における蛍光物体を計数することであった。第三のアプローチは、蛍光物体内に含まれる全てのピクセルの強度を積分することであった(画像における全てのピクセルの強度の総和に対して)。画像解析は全て、イメージプロバージョン4.0(メディアサイバネティクス、シルバースプリング、メリーランド州)を用いて行った。

20

**【 0 1 7 5 】**

総積分シグナルを得ることは、メンブレン上の領域(対象領域)をまず定義することによって得た。イメージプロによって、対象となる領域を単一の物体に変換することができ、他のイメージプロツールは、この物体において代表されるピクセルの総シグナルを総和することができる。標的細胞を加えていないメンブレンからの同様の画像を同じように分析して、陰性対照として用いた。陰性対照値は、試料を含む標的の値から差し引いた。このように差し引くことによって、アッセイノイズと電子ノイズの双方が除去された。

30

**【 0 1 7 6 】**

第二および第三の定量法は、イメージプロの物体発見ユーティリティを利用した。このユーティリティは、自動またはユーザーが規定した閾値を超える値(シグナル)を有する連続シグナルを結合させる。これによって、物体の周囲の輪郭線を確認する。周囲のピクセルおよび中に含まれるピクセルが、物体として定義され、これらのピクセル値の合計が、物体の積分値となる。次に、分析ソフトウェアは、試料容器の底を表す対象領域における全ての物体を計数して、さらに、発見された全ての物体の積分シグナル強度を計算するために用いることができるであろう。

40

**【 0 1 7 7 】**

IPPイメージプロのマクロ言語を用いて、上記のユーティリティを自動化して一度に数個の画像のバッチ処理を行うことができる。さらに、他のユーザーが規定したIPPスクリプトによってデータを操作することができる。例えば、特定の大きさ(領域)または強度より下または上の物体を含めるまたは除外することができ、これは塵を除外するために有用なツールとなりうる。物体の定義を決定する画像解析に関する他の重要なパラメータ(例えば、許容および拒絶基準)は、アプリケーションによって異なり、したがって最適にしなければならない。

**【 0 1 7 8 】**

50

先に概要した段階を連結することを含む本発明の様々な局面は、自動化することができる。薬学的注射用水または臨床の尿試料のような液体試料を分析する応用を考慮されたい。収集ビーカーにおける試料から始まる自動化システムは、標的細胞を濾過によってメンブレンに収集して、これを増殖培地に載せて、増殖条件で標的細胞をインキュベートして、一定の間隔でメンブレンを撮像して、結果を報告することができるであろう。または、本発明の個々の機能を自動化することができる。例えば、ペトリ皿(または、増殖しつつある微生物に関して用いられる代用の使い捨て用品)の撮像機器への自動ローディングおよび脱ローディングモジュール、ならびに自動焦点合わせモジュールを、システムに組み入れることができる。

【0179】

10

実施例 以下の実施例は、用いられる本発明の様々な態様を実行するための技術的な詳細を、制限的に解釈してはならない多様な応用と共に提供する。

【0180】

実施例1. 非拡大領域撮像を用いる細菌マイクロコロニーの検出および同定

背景および目的: 微生物増殖の検出は、臨床微生物学(例えば細菌の同定および抗菌感受性試験)と工業微生物学(例えば、委任滅菌試験)の双方の中心部分であるが、共通して用いられる方法は遅い。その結果、分析の遅れは、臨床状況では不必要な死および疾患状態を引き起こし、工業では大きい出費となる。

【0181】

個々のマイクロコロニーを検出するために非拡大領域撮像を用いることは、従来の方法と新しい方法の実質的な短所を回避しながら微生物培養の利点を利用する。本発明を用いるインサイチューにおける複製分析の利点は、速度、多重分析の容易さ(一つより多い微生物の走査)、ならびにマイクロコロニーの生存率を犠牲にせずに出検および同定できること(効率的な抗菌感受性試験にとって必須である)である。

20

【0182】

実験の目的 本実施例は、細菌マイクロコロニーのインサイチューにおける複製を検出できることを証明する。方法の原理を図7に示す。細菌をフィルターに載せてその場所で複製させる。得られたマイクロコロニーを二つの方法で標識する: 核酸染料サイバグリーンIおよびFITCによって標識した群特異的抗体との結合によって。次に、標識したマイクロコロニーをCCDに基づく非拡大領域撮像を用いて検出した。

30

【0183】

実験法 大腸菌MG1655細胞を、密度約 $10^9$ 個/mlとなるまでLB培地において一晚増殖させた。細胞のおおよその数は、血球計算盤において一晚培養物の希釈液を計数することによって決定した。次に、一晚培養物を約 $10^3$ 個/mlとなるように希釈した。真空濾過装置およびプラスチック製の漏斗カップ(ミリポアマイクロフィルVユーザーガイド、PF07114、Rev A 3/00)を用いて、希釈液1mlを黒色のポリカーボネートフィルター(Osmonics; カタログ番号K02BP04700)に載せた。細胞1000個までを有する異なるフィルター16枚をこのようにして調製し、四つの時点(0、1.5、3、および24時間)のそれぞれに関してフィルター4枚とした。濾過後、それぞれのフィルターを、予め37°Cに加熱したLB増殖培地を含む異なる寒天プレートに載せて、37°Cのインキュベータに入れた。定期的(0、1.5、3、および24時間)に、フィルター4枚をインキュベータから取り出した。これらのフィルター2枚を、フィルターの細菌面を上にして、パラフィルム(商標)片上に滴下したホルムアルデヒド500 $\mu$ lのスポットの上に加えることによって、3.0%ホルムアルデヒドにおいて10分間固定した。固定後、フィルターを吸収パッドの上に乗せて過剰量のホルムアルデヒドを除去した。次に、サイバグリーンI(200 $\mu$ l、モレキュラーブローブス)の10倍液をフィルターの上に加えた。細胞を10分間染色させた。核酸染色に用いなかった他の2枚のフィルターをPBS-Bにおいて15分間ブロックした後、FITC標識抗大腸菌抗体(Fitzgerald)をフィルターに加えた。30分間インキュベータした後、フィルターを吸収パッドに載せて、残っている液体を除去した。メンブレンは全て、細菌が照明源およびCCDチップに面するようにフィルターをCCDに基づく撮像器(詳細な説明の章の段階5に記載して、図3に示す)に載せること

40

50

によって撮像した。

【0184】

結果 本実施例において、マイクロコロニーを形成するために単細胞を数世代複製させた。マイクロコロニーは、サイバグリーンIまたはFITC標識抗体のいずれかによって標識した。図6において、上の列のパネルは、単細胞を含む0時間の時点を示す。下の列のパネルは、3時間インキュベート後のマイクロコロニーを示す。CCD撮像によって検出された物体の大きさおよびシグナルは、コロニー形成細胞が当初沈着した部位での細胞数の増加により、時間と共に実質的に増加した。増殖の検出は、微生物医学および工業医学の実践において重要である。本実施例は、微生物の増殖を検出するために必要な時間を劇的に短縮することができる。

10

【0185】

実施例2. 非拡大領域撮像を用いる細菌マイクロコロニーの自己蛍光に基づく検出

背景および目的：微生物増殖を検出する方法の重要性と、現行の問題の限界は、背景の章において考察する。本実施例は、細菌マイクロコロニーの増殖を迅速に検出する、本発明に基づく非常に単純でなお強力な方法を証明する。方法は、検出可能なシグナルを産生するために標的細胞の内因性の蛍光(自己蛍光)に依存する。このように、本発明の方法は、顕微鏡的標的細胞の非拡大領域撮像を得るためにカテゴリー結合分子または外因性のシグナル伝達部分を利用しない。無試薬の非破壊的計数の利点には、純粋培養の作製(微生物の同定および抗生物質感受性試験のため、方法の改善の確認、および微生物増殖を経時的に追跡できること(物体の識別および増殖動態に関して))が含まれる。

20

【0186】

実験法 大腸菌MG1655細胞を実施例1に記載のように増殖させた。細菌細胞を滅菌PBSによって連続(10倍希釈)希釈した。細菌細胞( $10^{-7}$ 倍希釈液の50ml)を、真空濾過装置およびプラスチック漏斗カップ(ミリポアマイクロフィルVユーザーガイド、PF07114、Rev A 3/00)を用いて、黒色ポリカーボネートフィルター(オスモニクス; カタログ番号K02BP04700)に載せた。陰性対照は、滅菌PBSを濾過することによって調製した。濾過後、それぞれのフィルターを、予め37℃に加熱したLB増殖培地を含む異なる寒天プレートに載せて、37℃のインキュベータに入れた。同じ試料を濾過して、LB寒天上でフィルターをインキュベートすることによって、 $10^{-7}$ 倍希釈液の生存細胞数を決定した。このプロセスから、 $10^{-7}$ 倍希釈液が50mlあたり細胞約1000個を含むことが示された。5.25時間後、顕微鏡スライドガラス上に載せたフィルターを、細菌が照明源およびCCDチップに面するようにCCDに基づく撮像器に載せることによって(詳細な説明の章の段階5に記載して、図3に示す)、メンブレンを撮像した。FITC光学フィルターセット(クロマ; 励起470/40nm、放射522/40nm)を用い、ソフトウェアの制御を用いて1秒間の曝露を捕獲した(イメージプロプラス、バージョン4.1; メディアサイバネティクス)。

30

【0187】

結果 図7は、5.25時間の増殖後の細菌マイクロコロニーの自己蛍光に基づく検出を示す。マイクロコロニーを含むフィルターは、1秒間の曝露後強いシグナルを示したのに対し(図7、左のパネル)、マイクロコロニーを含まないが、それ以外は同一に処理して撮像したフィルターは、そのようなシグナルを示さなかった(図7、右のパネル)。

40

【0188】

本実施例は、本発明のこの非常に単純な態様が、微生物の増殖を検出するための強力なアプローチであることを証明している。技術は、滅菌試験、環境および水試験、微生物の同定、ならびに微生物の感受性を含む、多くの重要な微生物診断応用をより効率的にするために用いることができるであろう。

【0189】

実施例3. 従来の培養法との内部比較を用いる迅速な無試薬微生物計数の単純な確認法

背景および目的：新しい微生物試験が「最も標準的な」方法と同等であることを証明することは、新規方法の開発者およびその顧客の双方にとって必須の作業である。公式の確認必要条件は、一般的に工業および健康管理における新しい微生物学的方法の導入の指針

50

となる政府の規則に成文化されている。製薬業における微生物学試験の新しい方法は、許容された方法に対する同等性の証明が難しいことから時に難しい。本実施例の目標は、従来の微生物培養試験に対する本発明に基づく試験の同等性を提供する単純な方法を証明することである。

#### 【0190】

実験法 大腸菌MG1655細胞を実施例2に記載のように増殖および分析した。マイクロコロニーの撮像後、フィルターを37℃で約15時間再度インキュベートした。得られたマイクロコロニーを、プレート上に斜めに照射した顕微鏡白熱電球によって供給された反射白色光を用いて撮像した。それ以外は、同じ撮像システムを用いてマイクロコロニー自己蛍光を検出するために用いたものと同じ反射光を収集した。

10

#### 【0191】

結果 本発明のこの態様が微生物に害を及ぼさないことは、図8の左右のパネルを比較することによって明らかである。内部比較によって「先祖」のマイクロコロニー(左のパネル)とその「子孫」のマイクロコロニー(右のパネル)とが正確に一致することは、従来の微生物培養計数試験との同等性の証明を促進するはずである。

#### 【0192】

実施例4. 非拡大領域撮像を用いる自己蛍光マイクロコロニー検出の正確度と検出限界  
背景および目的: 少数の微生物の正確な検出は、健康管理および工業微生物学の双方において重要である。例えば、おそらく致死的な血液感染症患者に存在する細菌細胞は、血液試料10ml中に1個のみであるかも知れない。同様に、医薬品の製造における注射用薬剤の滅菌試験は、試料中に生存微生物細胞1個を検出しなければならない。いずれの場合においても、偽陰性結果および偽陽性結果は重度の結末となりうる。偽陽性および偽陰性である試験結果の分画は、試験法の正確度を定義する。

20

#### 【0193】

本実施例の目標は、最低レベルの標的細胞での本発明の正確度を示すことである。

#### 【0194】

実験法 大腸菌MG1655細胞は、実施例3に記載するように増殖および分析した。しかし、本実施例に関して、フィルター5枚中約1枚での検出域が単一の標的細胞を含むと予想されるように、細胞の希釈液を多数のフィルター(n=101)に適用した。5時間インキュベーション後、それぞれのフィルターを撮像して、マイクロコロニーの有無に関して評価した。次に、フィルターを一晩再インキュベートして、マクロコロニーの有無に関して評価した。次に、本発明を用いて得られた結果を従来の肉眼的方法を用いて得られた結果と比較した。

30

#### 【0195】

結果 図9は、試料が極めて低レベルの標的細胞を含む場合の本発明の正確度を測定するために、本実施例において用いた方法を示す。フィルター101枚のそれぞれに関して、マイクロコロニーの評価によって得られた結果は、従来の方法によって得られた結果と同じであった。マイクロコロニーまたはマクロコロニーの存在のいずれかによって判断すると、ほとんどのフィルター(n=80)が沈着標的細胞を有しなかった。さらに、沈着標的細胞を含むフィルター(n=21)では、マイクロコロニーは同数に起こり(いくつかのフィルターは、統計学的に予想されたように多数の標的細胞を有した)、フィルター上の同一の位置は、マクロコロニーとフィルター上の同じ位置に存在し、結果にさらなる強さを加えた。本発明および「最も標準的な」は100%一致して、偽陽性または偽陰性を検出しなかった。このように、結果は、本発明が非常に低い標的細胞レベルで正確であることを示している。

40

#### 【0196】

実施例5. 無試薬非拡大撮像を用いて検出された自己蛍光細菌マイクロコロニーにおける微生物細胞数の決定

背景および目的: 本実施例の目標は、大領域撮像を用いてマイクロコロニーの自己蛍光の無試薬検出の感度および速度を証明することである。微生物増殖の迅速な検出は、本発

50

明が、細胞数が少ない初期段階でマイクロコロニーを検出できる結果である。実施例における実験は、非拡大CCD撮像によって検出されたマイクロコロニーにおける細菌細胞数を決定する。

#### 【0197】

実験法 新たに増殖した大腸菌(ATCC、カタログ番号8739)のコロニー1個を、増殖培地(TSB; 10ml)を含む遠心管(50ml)に接種して、インキュベートした(16時間、37℃、150rpm)。静止期細胞( $2.4 \times 10^9$ 個/ml)を含むこの培養物を用いて、予め加温したTSB(37℃、100ml)を含むアーレンマイヤーフラスコ(500ml)に接種して、検出までの最適な時間を得るために対数期培養物を生成した。このようにして確立した培養物は、混釈培養プレートの滴定によって細菌 $\sim 5 \times 10^7$ 個/mlを含むことが判明した。対数期培養物をPBSにおいて希釈した( $10^{-6}$ )。この希釈液の容積(10ml)を、濾過装置(ミリポアインク、1225、サンプリング多様体、カタログ番号XX27025 50)を用いて、吸収パッド(Whatman Inc.、カタログ番号1441325)上に支持したメンブレン(ケムネクスインク、ケムフィルターCB0.4、ブラック、PET-23、25mm)を通して濾過した。細菌をメンブレン上に回収した後、メンブレンを予め加温したTSAプレート(32.5mm)に載せた。ソフトウェア(イメージプロプラス、メディアサイバネティクス)の制御を用いて、FITC光学フィルターセット(クロマ; 励起470/40nm、放射522/40nm)による非拡大領域撮像を用いて、プレートの画像を捕獲した。この最初の画像の捕獲後、プレートを増殖のためにインキュベータ(32.5mm)に入れた。増殖の2.5時間後、プレートをインキュベータから取り出して、先に適用した画像捕獲設定を用いて同じ視野を再度撮像した。画像の捕獲後、メンブレンを直ちに固定(1.5%ホルムアルデヒドの濾過1型水溶液を5分間)した後、表記のように固定液または洗浄液のいずれかに含浸した3Mホワットマン濾紙にメンブレンを載せることによって2回洗浄(PBS、それぞれ5分)した。メンブレンをサンプリング多様体に載せて、一つを除く全ての位置をストッパーによって遮断した。真空濾過を15秒間行った。個々のマイクロコロニーにおける細菌数を計数するためにメンブレンを染色するために、真空圧を適用しながらヨウ化プロピジウム(1ml、5 $\mu$ g/ml)をカップの壁に加えて、1型水(1ml)を加えた。真空圧をさらに15秒間適用した後、メンブレンを除去してスライドガラスに載せて、乾燥させ、プロロング抗退色試薬(モレキュラー・プローブス、ユージーン、オレゴン州、カタログ番号P-4781)を用いてカバーガラスを載せた。染色したマイクロコロニーは、SPOT RTカメラ(Diagnostic Instruments、スターリングハイツ、ミシガン州、モデル2.3.1、2秒、赤いスペクトルのみを選択した)を備えた蛍光顕微鏡(アキシオプランII蛍光顕微鏡、Carl Zeiss Inc.、ソーンウッド、ニューヨーク州; Cy3.5フィルターセット、クロマId、SP-103、励起波長581/10nm、放射617/40nm、400倍)を用いて撮像した後、これらが大領域撮像を用いて同定された対応する非染色マイクロコロニーと共に空間的に登録した。

#### 【0198】

結果 図10は、本実施例において得られた結果を示す。本発明を用いて32.5mmで2.5時間増殖させた後に検出されたマイクロコロニー3個を染色して、高倍率顕微鏡を用いて分析した。マイクロコロニー3個はそれぞれ、細胞45、48、および50個を含んだ。マイクロコロニーの近傍には単細胞細菌を認めず、このことは、マイクロコロニーが染色技法を通して無傷のままであったことを証明している。肉眼で見える大腸菌(直径 $\sim 1$ mm)は、この細胞数の約100万倍の細胞を含む。このように、非拡大無試薬検出を用いて、本発明は、細胞分裂のわずかに数世代後でマイクロコロニーを検出することができる。

#### 【0199】

実施例6. 環境水試料における細菌マイクロコロニーのCCDに基づく非拡大領域撮像による検出および同定

背景および目的: 本実施例は、栄養的にストレスを受けている可能性がある無名の環境微生物に適用した場合の、微生物増殖の迅速な検出に関する本発明の効力を示すことをねらいとする。

#### 【0200】

水は、多くの薬剤の製造、加工、および製剤における共通成分である。薬学的水にお



ける細菌の検出は、細菌そのものまたはその代謝産物が最終製品に存在すれば有害な結末を引き起こしうることから、製造プロセスにおける基礎段階である。細菌の増殖は、この物質の製造、保存、および流通段階で起こる可能性がある。飲料水は薬学的な水の原料水であり、これは主要な外部微生物汚染源である。便大腸菌型および主にグラム陰性菌である広く多様な微生物が、飲料水に存在する可能性がある。水中の細菌を検出するために一般的に用いられている方法は遅く、このように、時宜を得たシステムの制御の妨害となる。

#### 【0201】

個々の細菌マイクロコロニーを検出するために非拡大領域撮像を用いることは、従来の方法および新しい方法の実質的な短所を回避しながらインビトロ複製分析の利点を利用する。本発明を用いるインサイチューにおける複製分析の利点は、その速さと、マイクロコロニーの生存率を犠牲にすることなく検出および同定できることである(製品またはプロセスにおける微生物汚染源を同定するため、または水を用いる製品またはプロセスによって特定の微生物が有害であるか否かを決定するために有用である)。

#### 【0202】

環境の概要 本実施例は、細菌マイクロコロニーがマクロコロニーに増殖する前に、本発明がこれらのコロニーのインサイチューにおける複製を検出できることを証明する。細菌をフィルターに載せて、その場所で複製させる。得られたマイクロコロニーおよびマクロコロニーを、自己蛍光(FITC励起および放射フィルター)および白色光の反射率を用いるCCDに基づく非拡大領域撮像を用いて検出した。

#### 【0203】

実験法 水はチャールス川(ケンブリッジ、マサチューセッツ州)から無菌的に採取して、採取した1時間以内に実験に用いた。チャールス川の水を、エッペンドルフ遠心管5415Cにおいて14,000rpmの設定で1~2秒間遠心した。遠心したチャールス川の水を滅菌I型水で10倍希釈して、この1.0mlを、真空濾過装置および滅菌プラスチック漏斗(ミリポアマイクロフィル(登録商標)、100ml漏斗、カタログ番号MIHABG072)を用いて、黒色混合セルローズエステルフィルター(ミリポア;カタログ番号HABP04700)に載せた。濾過後、それぞれのフィルターを、R2A増殖培地(ベクトン・ディッキンソン/ディフコ;カタログ番号218263)を含む異なる寒天プレートに載せた。異なるフィルター10枚を調製して、寒天プレートを32.5 で74時間までインキュベートした。定期的に(17、24、42、50、68、および74時間)、寒天プレートをインキュベータから取り出して、細菌コロニーが照明源およびCCDチップに面するように、フィルターをCCDに基づく撮像器のプレートに載せて撮像した。反射率のための照明源は、ファイバーライト(登録商標)モデル190対流冷却30ワット水晶ハロゲン照明装置(Dolan-Jenner Industries, Inc.、ローレンス、マサチューセッツ州)によって提供され、照明は、フィルターに対して斜めの角度で向けた。裸眼は、直径が0.5mmまたはそれより大きい細菌コロニーを見ることができることから、この大きさの基準を、細菌コロニーの識別特徴として用いた。直径が0.5mmまたはそれより大きいコロニーを、反射率画像において同定して計数した。マクロコロニーを生じる自己蛍光マイクロコロニーが検出できた時期も決定した。自己蛍光画像を分析して、74時間マクロコロニーの前駆体が出現する時間を決定した。様々な時点で、自己蛍光マイクロコロニーとして検出可能な74時間マクロコロニーの割合をプロットした。

#### 【0204】

結果 本実施例において、水試料からの細菌細胞を、マイクロコロニーおよびマクロコロニーを形成するように複製させた。いずれのタイプのコロニーも本発明を用いて検出して、自己蛍光および反射率によって同定した。図11に示すデータは、肉眼的に観察することができるコロニー数が17時間での11%(コロニー6個)から74時間での100%(コロニー53個)まで増加したことを示している。74時間で検出されたマクロコロニーの94%(コロニー50個)が24時間で自己蛍光マイクロコロニーとして検出された。本実施例は、本発明が細菌増殖の検出のために必要な時間を劇的に短縮でき、このように、水に関する細菌試験にとって必要な時間を短縮できることを示している。

10

20

30

40

50

## 【0205】

実施例7. 細菌マイクロコロニーのCCDに基づく非拡大領域撮像による検出と細菌を計数する従来の方法との相関

背景および目的：本実施例の目的は、マイクロコロニーの迅速な検出に関して、本発明を用いて得られた結果と、より遅い従来の微生物培養を用いて得られた結果との数値的相関を決定することである。

## 【0206】

実験目的：本実施例は、本発明によるマイクロコロニーの計数と、古典的な「混釈」培養法とを比較する。細菌をフィルターに載せて、その場所で増殖させる。得られたマイクロコロニーを、自己蛍光(FITC励起および放射フィルター)を用いるCCDに基づく非拡大領域撮像を用いて検出した。本発明に従って得られたマイクロコロニーの数を、混釈培養法によって得られたマイクロコロニーの数と比較した。

## 【0207】

実験法：大腸菌8739細胞をTSBにおいて、密度約 $10^9$ 個/mlとなるまで一晩増殖させた。約 $10^7$ 個/mlから始めて約 $10^2$ 個/mlで終わる一晩培養物の10倍連続希釈液を、PBSにおいて作製した。それぞれの連続希釈液の少量を、1.0mlに細菌約50個が含まれるようにPBSにおいてさらに希釈した。融解した(47 )トリプシンダイズ寒天(TSA)(Becton Dickinson/Difco; カタログ番号236950)35mlと共に、1mlをペトリ皿に載せた。寒天プレートを室温まで冷却してから、プレートを32.5 で一晩インキュベートした。それぞれの連続希釈液に関して寒天プレート10枚を調製した。寒天プレートにおけるマイクロコロニーは、プレートを肉眼で調べることによって計数した。細菌の希釈液(11.3ml)を真空濾過装置および滅菌プラスチック漏斗(ミリポアマイクロフィル(登録商標)100ml漏斗、カタログ番号MIHABG072)を用いて、黒色混合セルロースエステルフィルター(ミリポア; カタログ番号HBAP04700)に載せた。それぞれのフィルターをTSAを含む異なる寒天プレートに載せた。それぞれの連続希釈液に関して異なるフィルター10枚を調製して、寒天プレートを32.5 で7時間インキュベートした。次にプレートをインキュベータから取り出して、細菌コロニーが照明源およびCCDチップに面するように、フィルターをCCDに基づく撮像器のプレートに載せた。それぞれのマイクロコロニーからの自己蛍光は、FITC励起および放射フィルターを用いて検出した。それぞれの画像が完全なフィルター表面の約11分の1となるために、フィルターに関して11倍多い容積を用いた。このように、それぞれの画像は、それぞれの混釈培養に加えられた細菌数とほぼ同じ数を含むはずである。それぞれの画像におけるマイクロコロニーの数は、画像を肉眼で調べることによって決定した。それぞれの連続希釈液における細菌数は、マイクロコロニーまたはマクロコロニーの数に希釈倍数を乗じることによって計算した。

## 【0208】

結果：本実施例において、細菌細胞を複製させて、フィルター上でマイクロコロニーおよび寒天プレート上でマクロコロニーを形成させた。マイクロコロニーは、本発明によって検出し、マクロコロニーは、古典的な培養法を用いて、寒天プレートを肉眼で調べることによって検出した。それぞれの連続希釈に関してそれぞれの方法によって決定された細菌濃度をプロットして、結果を図12に示す。それぞれの点は、異なる測定10回の平均値を表す。本発明によって得られた結果と古典的な混釈培養法によって得られた結果との間に正の相関を認めた。相関係数0.9996は、本発明のマイクロコロニーの計数と、古典的な混釈培養法によるマクロコロニーの計数との間に強い比例関係が存在することを示している。

## 【0209】

実施例8. 無試薬計数試験の動的範囲と直線性

背景および目的：新しい微生物試験法の二つの確認基準は、新しい方法の範囲と直線性である。範囲は、新しい試験法を用いる精度、正確度、および直線性で決定されることが証明された微生物の上のレベルおよび下のレベルの間の間隔である。微生物試験法の直線性は、所定の範囲内の試料に存在する微生物濃度に比例する結果の誘発能である。

## 【0210】

本実施例は、一定範囲の細菌レベルに対する本発明の直線性を証明する。本発明は、CCDに基づく非拡大領域撮像を用いて、フィルター表面上のマイクロコロニーの存在を検出して、マイクロコロニーの自己蛍光シグナルを定量する。

## 【0211】

実験法 大腸菌8739細胞をTSBにおいて、密度約 $10^9$ 個/mlとなるまで一晩増殖させた。約 $10^{-4}$ 希釈から始めて約 $10^{-9}$ 希釈で終わる一晩培養物の10倍連続希釈をPBSにおいて作製した。それぞれの連続希釈液の5mlを、真空濾過装置および滅菌プラスチック漏斗(ミリポアマイクロフィル(登録商標)100ml漏斗、カタログ番号MIHABG072)とを用いて、黒色混合セルロースエステルフィルター(Pall Gelman Laboratory; カタログ番号66585)に載せた。濾過後のそれぞれのフィルターを、レシチンおよびポリソルベート80を含むトリプチカゼダイズ寒天(ベクトン・ディッキンソンBBL; カタログ番号211764)を含む異なる寒天プレートに載せた。それぞれの連続希釈液に関してフィルター1枚を調製して、寒天プレートを32.5°Cで6.5時間インキュベートした後、32.5°Cで一晩インキュベートした。6.5時間の時点で、寒天プレートをインキュベータから取り出して、細菌コロニーが照明源およびCCDチップに面するように、フィルターをCCDに基づく撮像器のプレートに載せた。それぞれのマイクロコロニーからの自己蛍光は、GFP励起およびGFP-LP放射フィルターを用いて検出した。それぞれの画像におけるマイクロコロニーからの自己蛍光シグナルは、イメージプロソフトウェア(メディアサイバネティクスインク、バージョン4.5.0.19)を用いて定量した。一晩インキュベートした後、寒天プレートを肉眼で調べて、 $10^{-8}$ および $10^{-9}$ 希釈によって調製したフィルター上に存在するマクロコロニーの数を計数した。これらの2枚のフィルター上でのマクロコロニー数を用いて、それぞれのメンブレンに加えた細菌数を計算して最初の一晩培養物における細菌濃度を計算した。

## 【0212】

結果 本実施例において、細菌細胞を複製させて、寒天プレートにおけるフィルター上でマイクロコロニーを形成させた。マイクロコロニーは、本発明を用いて検出して、GFP-LP自己蛍光によって同定した。それぞれの画像におけるマイクロコロニーからの自己蛍光シグナルは、イメージプロソフトウェアを用いて定量した。それぞれの画像における自己蛍光シグナルを、それぞれのフィルターに加えた細菌数に対してプロットして、結果を図13に示す。データは、細菌レベルの5対数範囲に対して直線である。この範囲は、いくつかの古典的な培養法、すなわち混釈培養の範囲が2対数に過ぎないことから有意である。結果はまた、 $R^2$ 値0.9929を有する非常に強い直線性も示す。この値は、新しい微生物試験法に関して許容される $R^2$ 値の範囲内(0.8~1.2)である(Evaluation, Validation, and Implementation of New Microbiological Testing Methods, 2000; PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 54(補則TR33)、1~41)。

## 【0213】

実施例9. 試料の希釈を行わない迅速な抗菌保存剤の有効性

背景および目的: 抗菌保存剤は、製造プロセスによって導入される可能性がある、または個々の投与をやめた際に消費者によって導入される可能性がある微生物の増殖に対して保護するために、多用量容器において包装された製品に添加される。抗菌有効性は、内因性の抗菌活性を含む薬学的製剤または抗菌保存剤を含む製品に関して証明しなければならない。分析しなければならない試料希釈液が多数であるために、試験は、実施するために非常に労力と費用がかかる。典型的に、抗菌保存剤の有効性試験は、何百もの微生物培養プレートの分析を必要とする。本実施例の重要な目標は、試料の希釈の必要性を回避することによって、本発明が試験の労力のほとんどをなくす可能性があることを証明することである。

## 【0214】

実験法 大腸菌8739細胞を、TSBにおいて約 $10^9$ 個/mlの密度まで一晩増殖させた。細菌(全体で $8.48 \times 10^6$ 個、または $2.12 \times 10^5$ 個/ml)を滅菌PBS 40mlまたはオスコ商標の滅菌保存生理食塩液(販売、American Procurement and Logistics Company、ロット番号、1T016、

有効期限03年6月)40 mlに加えた。これらの二つの溶液を室温で168時間インキュベートした。0、24、96、および168時間後、細菌を含むPBS 5mlおよび細菌を含むオスコ生理食塩液5mlを採取して、滅菌D/E中和プロス(ベクトン・ディッキンソン/ディフコ、カタログ番号281910)45mlを含む異なるチューブに加えた。次に、希釈試料を真空濾過装置および滅菌プラスチック漏斗(ミリポアマイクロフィル(登録商標)100ml漏斗、カタログ番号MIHABG 072)を用いて、黒色混合セルロースエステルフィルター(Pall Gelman Laboratory; カタログ番号66585)に載せた。それぞれのフィルターを、レシチンおよびポリソルベート80を含むトリプチカーゼダイズ寒天(ベクトン・ディッキンソンBBL; カタログ番号211764)を含む異なる寒天プレートに載せた。それぞれの時点についてそれぞれの溶液に関してフィルター1枚を調製して、寒天プレートを32.5 °Cで6.5時間インキュベートした。寒天プレートをインキュベータから取り出して、細菌コロニーが照明源およびCCDチップに面するように、フィルターをCCDに基づく撮像器のプレートに載せることによってフィルターを撮像した。自己蛍光は、GFP励起およびGFP-LP放射フィルターを用いて検出した。それぞれの画像におけるマイクロコロニーからの自己蛍光シグナルは、イメージプロソフトウェア(メディアサイバネティクスインク、バージョン4.5.0.19)を用いて定量した。実施例8に示す標準曲線を用いて、イメージプロ分析によって得られた自己蛍光シグナルを、メンブレンあたりに加えた細菌数に変換して、それぞれの時点に関して溶液(PBSまたはオスコ生理食塩液)1mlあたりの細菌濃度に変換した。0時間インキュベーション後の細菌濃度から開始すると仮定して、細菌濃度の対数的減少を24、96、および168時間の時点について計算した。0、24、96、および168時間後、PBSおよび細菌を含むオスコ生理食塩液から100  $\mu$ lを採取して、D/E中和プロス(10倍希釈)900  $\mu$ lに加えた。次に、滅菌PBS 1.0mlにおいて $10^{-1}$ から始めて $10^{-6}$ で終わる連続10倍希釈液を作製した。 $10^{-1}$ から $10^{-6}$ 倍希釈液の容量全体を、レシチンおよびポリソルベート80を含む融解(45 °C)トリプチカーゼダイズ寒天30mlに加えた。寒天プレートを室温まで冷却した後、プレートを32.5 °Cで一晩インキュベートした。プレートあたりコロニー300個未満を含む二つの最低希釈倍数のプレートにおいて細菌コロニーを肉眼によって計数した。これらの数(適当な希釈倍数を乗じる)を用いてPBSおよびオスコ生理食塩液における細菌濃度を計算した。0時間インキュベーション後の細菌濃度から開始すると仮定して、細菌濃度の対数的減少を24、96、および168時間の時点について計算した。本発明によって決定した細菌濃度の対数的減少を、混釈培養法(古典的な増殖に基づく微生物計数法)によって決定した細菌濃度の対数的減少に対してプロットした。結果を図14においてグラフで示す。

#### 【0215】

結果 図14の結果は、オスコ生理食塩液における抗菌保存剤(0.1%ソルビン酸)が、細菌濃度の減少に有効であることを示している。PBSでは細菌濃度の減少を認めなかった。データは、本発明では希釈を必要としなかったが、二つの計数法の間には比例相関( $R^2 = 0.9633$ )が存在することを示している。結果は、本発明が、従来の方法の面倒な試料希釈をなくすことによって労力および材料のほとんどを節約する可能性を示している。

#### 【0216】

実施例10. 非拡大領域撮像を用いる熱ストレス生物学的指標の自己蛍光に基づく検出

背景および目的: 本実施例の目標は、生物学的指標としての熱耐性胞子を用いる応用に関して本発明を応用できる可能性を示すことである。一つの重要な応用は、薬学および医学装置の製造ならびに臨床検査における滅菌技法の有効性を保証するための滅菌剤定量法である。

#### 【0217】

さらなる目標は、必要な試料数を減少させることによって、本発明が生物学的指標物質の計数を単純にする可能性を示すことである。従来の混釈培養法では、試料を正確に定量するために、可能性がある完全な範囲を含む連続10倍希釈が必要である。本実施例では、生物学的指標物質ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス(*Geobacillus stearothermophilus*)の自己蛍光の非拡大領域撮像を用いて、生存胞子濃度を定量する。定量は、約3回数に関して直線的であり、熱ストレス後に残っている生存胞子数を正確に決定するために

必要な希釈数を減少させる。自己蛍光画像を短期間の増殖後に採取して、これを分析して、生存熱ストレスG.ステアロサーモフィルス孢子の最初の濃度の推定値を得る。

【0218】

実験法：G.ステアロサーモフィルス孢子ATCC 7953(Raven Biological Laboratories Inc.)を、滅菌水において $\sim 2 \times 10^5$ 個/mlの濃度に希釈して、110 で5分から121 で15分間までの多様な熱ストレスを与えた。熱処理孢子および無処理対照を水において、1000倍希釈まで連続10倍希釈した。比較のために、それぞれの試料を、自己蛍光の非拡大領域撮像の他に従来の混釈培養法によって分析した。混釈培養プレートは、それぞれの試料のそれぞれの希釈液(非希釈保存液を含む)1mlをペトリ皿に入れて、溶融トリプチカーゼダイズ寒天(TSA、BDカタログ番号236950)20mlを加えることによって調製した。固化した後、

10

【0219】

大領域撮像のためにマイクロコロニーを調製するために、未希釈保存液1mlおよび100倍希釈液1mlを滅菌水15mlと混合して、真空濾過装置およびプラスチック漏斗カップ(ミリポアマイクロフィルVユーザーガイド、PF07114、Rev A 3/00)を用いて、黒色HABPフィルター(ミリポア；カタログ番号、HABP04700)を通して濾過した。濾過後、それぞれのフィルターをTSAの異なるプレートに載せた。非拡大CCDに基づく撮像器を用いて(詳細な説明の章の段階5に記載し、図3に示す)、画像を0時間で撮像した。FITC光学フィルターセット(クロマ；励起470/40nm、放射522/40nm)を用いて5秒間の曝露によって自己蛍光を捕獲した。プレート

20

【0220】

結果：混釈培養から計算した熱ストレス孢子力価対自己蛍光大領域撮像を用いた孢子力価のプロットは、図15に認められうる。双方の方法の値には良好な相関を認めるが、それぞれの二つの自己蛍光画像に関して混釈培養プレート4枚が必要であった。さらに、混釈培養プレートは、読み取るまで48~72時間を必要としたが、自己蛍光画像は、増殖8~20時間で撮像して分析することができる。

30

【0221】

変法 自己蛍光の非拡大領域撮像はまた、枯草菌(*Bacillus subtilis*)およびクロストリジウム・スポロゲネス(*Clostridium sporogenes*)のような他の生物学的指標生物の生存細胞濃度を定量するためにも用いることができるであろう。

40

【0222】

自己蛍光画像の多様な分析を用いて、細胞濃度を定量することができる。例えば、物体のピクセル強度の合計の代わりに、マイクロコロニーの物体数を用いることができる。物体(マイクロコロニー)は、完全に増殖したマクロコロニー(肉眼で計数することができる)よりはるかに小さいため、物体の重なり合いにより失われうる正確度を犠牲にすることなく、同じ領域により多くを適合させることができる。さらに、局所蛍光バックグラウンド、触れる物体、および混入蛍光分子に対処するために、より洗練された物体発見アルゴリズムを画像に適用することができる。

【0223】

実施例11．牛ひき肉における細菌マイクロコロニーの自己蛍光に基づく検出

50

背景および目的：本実施例は、本発明が、コンペンディアル(compendial)方法と比較して牛ひき肉における細菌マイクロコロニーの検出までの時間を短縮できることを示す。生肉における総生存細菌数の決定は、初期食物腐敗を予防するために必須である。現在の方法は2日を要し、試験結果を得る前にしばしば生産者は肉を輸送する。微生物を検出するまでの時間を短縮することは、食物伝染疾患の発生、非効率製造、および費用のかかる回収の発生を予防する。

#### 【0224】

実験法：赤みの牛ひき肉(25g)を0.1%ペプトン水225mlに希釈して、ストマツチャーにおいて処理して試料をホモジナイズした。この試料を0.1%ペプトン水で連続希釈した。 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、および $10^{-5}$ 希釈液の適当な容量をPBSに加えて、真空濾過装置を用いて、二つのタイプのフィルターメンブレン(ミリポア、HABP、カタログ番号HABP04700 0.45  $\mu\text{m}$ およびケムネクスCD0.4、0.4  $\mu\text{m}$ 、参照番号200-C20010-01)に注いだ。それぞれの希釈液およびフィルタータイプに関して同じ試料を作製して、TSAプレートにおいて35で48時間インキュベートした。CCDに基づく撮像器を用いて0、6、16、24、および48時間に画像を捕獲した。FITC光学フィルターセット(クロマ；励起470/40nm、放射522/40nm)を用いて、ソフトウェア(イメージプロプラス)の制御下でHDyn分解下で10秒間の画像を捕獲した。画像はまた、白色光の反射によって10秒間捕獲した。

#### 【0225】

結果：データは、双方のメンブレンフィルタータイプについて $10^{-4}$ および $10^{-5}$ 倍希釈液から回収した。データは、反射率画像において直径が0.5mmまたはそれより大きい48時間でのマクロコロニーを計数することによって分析した。次に、これらのマクロコロニー(0.5mm)を、反射率および自己蛍光画像において24、16、および6時間の時点までさかのぼって追跡した。図16は、自己蛍光マイクロコロニーおよびマクロコロニーの検出時間を示す。48時間マクロコロニーを生じるマイクロコロニーの出現を経時的に追跡すると、マクロコロニーの100%が16時間までに本発明によって検出されたことが示された。これらの結果は、本発明が、従来の方法と比較して結果を得るまでの時間を有意に短縮できることを示している。

#### 【0226】

変法 本実施例における試験は、他の食肉、野菜、飲料、および酪農製品を含む多様な食品を調べるために拡張することができる。

#### 【0227】

実施例12. 非特異的磁気選択後の非拡大領域撮像を用いるマイクロコロニーの検出による複合試料中の細菌の検出

目的：本実施例は、複合試料から個々の細菌細胞を非特異的に選択した後に、非拡大領域撮像を用いて増殖しつつあるマイクロコロニーの迅速な検出を行うイムノアッセイ法を示す。より詳しくは、本実施例は、食物から効率よく広範囲の細菌を選択して、その後増殖直接法を用いて細菌の増殖を検出できることを証明する。本実施例は、結合物質の混合物によってコーティングした磁気ビーズが、複合試料から多様な細菌種を選択できることを示す。

#### 【0228】

実験法：図17は、複合試料中の細菌を検出するために本実施例が従うプロセスを示す。第一に、細菌細胞および磁気ビーズを試料に加えてインキュベートする。磁気ビーズを細菌細胞に結合させて、磁力を用いて複合体を分離する。磁気ビーズを再浮遊させて(PBS)、濾過し、増殖培地に播種する。得られた磁気選択上清も同様に播種する。インキュベーション期間の後、マイクロコロニーを検出するために、非拡大領域撮像を用いてフィルターを様々な時点で撮像する。

#### 【0229】

磁気粒子のアレイは、活性なトシル基(Dynal、オスロ、ノルウェー、カタログ番号140.03)を有する磁気粒子を、いくつかの非特異的と共に特異的結合物質にカップリングさせることによって作製した。物質には、硫酸ポリミキシンB(Sigma；カタログ番号P1004)、

ポリミキシンBナノタンパク質(シグマ; カタログ番号P2076)、エンドトキシン中和タンパク質(セイカガクアメリカ(Seikagaku America); 天然由来および組み換え型、カタログ番号910140-1、910130-1、および910120-1)、エンドトキシン阻害剤タンパク質(Bachem; カタログ番号H-1382)、エンドトキシン基質(Bachem; カタログ番号L-1195)、抗リポテイコ酸抗体(QED; カタログ番号15711)、抗エンドトキシン抗体(QED; カタログ番号15306および15301)が含まれる。コーティングした磁気ビーズ( $1 \times 10^8$ 個/10  $\mu$ l)を超音波処理した(1分間; 設定8; フィッシャーサイエンティフィック(Fisher Scientific 550)超音波ディスクメンブレイタ)。コーティングした磁気ビーズの組み合わせを、黄色ブドウ球菌(ATCC #27694)約1、10または100個を添加した1.5ml採血管(1ml; Biochemed; ヒト血液、抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム、カタログ番号10762WB)に加えた。血液、細菌、および磁石をインキュベートさせた(室温で1時間)。インキュベーション後、ビーズを磁気分離装置(Poly sciences Inc.、ワリントン、ペンシルバニア州、カタログ番号8MB4111S)を用いて磁気的に分離して、磁気粒子を捕獲および確保した。血液をデカントして、最初の黄色ブドウ球菌の1、10および100個接種物の場合と同様にTSA(Difco、カタログ番号236950)に播種した(対照として用いる)。磁気粒子を再浮遊させて(PBS 1ml)、磁気粒子-細菌複合体を含む得られた液体をメンブレン(オスモニクス、直径47mm、孔径0.22  $\mu$ m、ポリカーボネート黒色フィルター、カタログ番号1213889)に濾過し、メンブレンをTSAプレートに載せた。ゼロ時点および短期間のインキュベーション後の双方において、非拡大領域撮像を用いてフィルターを撮像して自己蛍光マイクロコロニーを検出した。接種数を磁気捕獲数と比較して、以下の式を用いて%回収率を決定した:(平均磁気捕獲/平均接種数)  $\times$  100。

10

20

## 【0230】

結果: 図18は、磁気分離後のマイクロコロニー検出を証明する実験結果を示す。図は、ゼロおよび6時間増殖後に撮像した二つの画像を示す。6時間画像は推定のマイクロコロニーを有する。これらはゼロ時間では認められない明るい点である。これらが実際に増殖しつつあるマイクロコロニーであることを確認するために、フィルターを一晩インキュベートして、再度撮像した。推定のマイクロコロニーの位置にマクロコロニーが検出され、迅速な結果を確認した。細胞1個の試料から黄色ブドウ球菌の90%を超える回収率が得られた。細胞10および100個の試料は、50%より大きい回収率を有した。

## 【0231】

変法(広い結合物質): コムギ胚芽凝集素、抗腸内細菌共通抗原、抗プロテインA、抗プロテインG、LPS結合タンパク質、ムチン(細菌結合物質)、CD14(LPSおよびLPS細菌複合体の双方に結合する)、コレクチン(これらは貪食または補体カスケードの際に細菌に結合する)、C3bおよびC4bのような補体自身のサブユニット、ヒトスキャベンジャー受容体(細菌成分に結合する細胞受容体)、およびテクトニクス(糖質結合タンパク質)を含む、多数の広い反応性結合物質を用いることができる。

30

## 【0232】

変法(特異的結合物質): 抗体、アプタマー、およびリガンドを含む多様なタイプのカテゴリー結合分子を用いて、複合試料から広範囲の細胞タイプを特異的に選択することができる。本実施例の変法において、大腸菌O157:H7の選択は、大腸菌O157:H7特異的抗体を用いることによって得られる。

40

## 【0233】

実験法の変法: この変法において、複合試料における細菌の検出は、検体特異的磁気選択によって得られる。選択の後に、非拡大領域撮像を用いてマイクロコロニーの検出を行う。図17は、本実施例に関して用いられる方法を示す。大腸菌O157:H7を含む試料を磁気粒子と混合する。次に、試料を磁気によって選択して濾過し、非拡大領域撮像を用いて一連の時点で撮像する。抗大腸菌O157:H7磁気粒子は、トシル改変磁気粒子(ダイナル、オスロ、ノルウェー、カタログ番号140.03; カップリングは、製造元の説明書に従って行った)を、大腸菌O157:H7に対するポリクローナル抗体(バイオトレースアフィニティ精製; Kirkegaard and Perry Laboratories、ガイサースバーグ、メリーランド州、カタログ番号01-95-90)にカップリングさせることによって作製した。大腸菌O157:H7磁気粒子(

50

1 × 10<sup>8</sup>個/10 μl)を超音波処理した(1分間；設定8、フィッシャーサイエンティフィック550超音波ディスメンプレータ)。次に、磁気ビーズを、大腸菌O157：H7(株DEC 3B、Tom Whittam博士、ペンシルバニア州立大学)を添加した血液(1ml；バイオケムド、ヒト血液、抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを添加、カタログ番号10762WB)に加える。大腸菌O157：H7のマイクロコロニーの増殖および検出は、本実施例において先に用いた同じ段階に従って得られる。

#### 【0234】

実施例13．インサイチューにおける複製および非拡大領域撮像を用いる抗菌感受性試験

背景および目的：適当な治療を決定するための抗菌感受性試験の重要性は、背景の章において考察する。固体媒体における微生物増殖のモニタリングは一般的であり、液体培養での増殖と比較していくつかの有意な利点を有する。これは、機器を用いることなく(例えば、ディスク拡散アッセイ法)、いくつかの抗体に対する細菌株の感受性を安価に、同時に、そして定量的に決定することができるが、現行の方法は、精製したコロニーを必要とし、このように、通常、患者の試料を処理した後1~2日で行うことができない。そのような遅れは生命を脅かす。さらに、抗菌感受性試験の結果を検出および分析するために、一般的にさらに1~2日を必要とする。

#### 【0235】

目的 本実施例は、細菌株の抗菌感受性を迅速に決定するために本発明を用いることを証明する。方法の原理を図19に示す。下記の実験において、耐性および感受性株を、抗生物質を含む培地および含まない培地において増殖させて、先の実施例の場合と同様にマイクロコロニーを検出した。アプローチは、現在、適当な抗菌治療の実行を遅らせるより長い増殖段階(コロニーの精製および抗生物質の存在下での増殖)を有意に短縮する可能性を提供する。

#### 【0236】

方法 細菌の感受性(大腸菌MG1655)および耐性(大腸菌MG1655/pLaf r 1)株を、先の実施例(実施例1)の場合と同様にフィルターに載せた。耐性菌約1000個を含むフィルターを、抗生物質(テトラサイクリン；64 μg/ml)を含むまたは抗生物質を含まないLBプレート(LB寒天、Difco)に載せた。37 (3時間)でインキュベートした後、フィルターを染色して撮像した(実施例1)。

#### 【0237】

結果 図21は、CCDに基づく非拡大領域撮像を用いる抗菌感受性試験の結果を示す。CCD撮像は、耐性菌を含むメンブレン上でマイクロコロニーを検出したが、感受性細菌を含むメンブレン上では検出しなかった(「3時間 + tet、CCD」と表示した最も左のカラムにおいて、「耐性株」と表示した列と「感受性株」と表示した列を比較)。画像解析から得た強度データは、この知見を定量した(棒グラフ)。高倍率蛍光顕微鏡によって、耐性菌が3時間インキュベーション後にマイクロコロニーを形成したが、感受性株は形成しなかったことを確認した(顕微鏡分析から、抗生物質の存在下での感受性株のインキュベーションによって異常な細菌の形態を認めることが示された[「感受性株」と表示した下の列における二つの顕微鏡画像を比較])。

#### 【0238】

この実験の結果は、非拡大領域撮像を用いるマイクロコロニーの検出が、抗菌感受性試験の迅速かつ感受性の高い方法であることを示している。

#### 【0239】

変法：抗菌感受性試験に関する何らかの変法には、異なるシグナル部分を用いることが含まれる。Syto9もしくは他のSytoファミリーメンバー(モレキュラープローブス)、フルオレセイン二酢酸もしくはケモクロムV6(ケムネクス)のようなエステルゼ基質、標識抗体、または蛍光産物を生じる代謝物のような多様な染料をこのアッセイにおける核酸染料の代わりに用いることができる。細胞標的細胞の天然の自己蛍光も同様に、マイクロコロニーを検出するために用いることができるであろう。マイクロコロニーの増殖はまた、抗菌感受性試験ディスク拡散法またはEテスト法(ABバイオディスクNAインク；Eテスト片)の

10

20

30

40

50



場合と同様に、地理的な増殖の制限をモニターするためにも用いることができるであろう。抗菌感受性アッセイはまた、異なる蛍光標識抗体によって様々な微生物を同時に同定することを含むように拡大することができる。

#### 【0240】

実施例14．ディスク拡散法と非拡大領域撮像を用いた迅速な抗菌感受性試験

目的：ディスク拡散法を用いて細菌株の抗生物質感受性を迅速に決定するために本発明を用いることを証明する。既知濃度の抗生物質に含浸したディスクを、精製微生物培養物からの多数の細胞を含むプレートに載せる。抗生物質はディスクから拡散して、ディスクを中心とする放射状の抗生物質濃度勾配を作製する(すなわち、ディスクにより近ければ、抗生物質の濃度がより高い)。高度耐性菌は、ディスクの存在下で抗生物質濃度が最も高い端部近傍でも増殖することができる。より弱い耐性菌は、ディスク周辺の阻害域の外側で増殖する。阻害域の幅は、株の抗生物質耐性レベルと相関する。

10

#### 【0241】

阻害域は従来、一晚培養後に肉眼で測定する。本実施例は、非拡大領域撮像を用いてマイクロコロニーの増殖を検出することによって数時間で阻害域を決定できることを証明する。

#### 【0242】

実験法：実施例において用い、実施例13に記載の株を $10^6$ CFU/mlに希釈してTSA培地に播種した。テトラサイクリン拡散ディスク(Hardy Diagnostics ; 30  $\mu$ gテトラサイクリン、カタログ番号Z9121)をプレートに載せた。プレートを37 °Cで5時間インキュベートさせた。先の実施例と同様に、マイクロコロニー自己蛍光および非拡大領域撮像を用いて、マイクロコロニーを撮像した。

20

#### 【0243】

結果：図21は、非拡大領域撮像を用いる迅速な抗菌感受性試験の結果を示す。CCDに基づく撮像は、わずか5時間後に抗生物質拡散ディスク近傍で増殖する自己蛍光耐性コロニーを検出した。阻害域は、一晚増殖後に肉眼で調べて得た結果と同等であった。この実験結果は、マイクロコロニーの増殖に基づいて阻害域を検出することは、従来のディスク拡散法より迅速であり、同等の結果を生じうることを示している。

#### 【0244】

変法：この技術は、ほとんどの抗生物質拡散ディスクおよびほとんどの微生物について用いることができる。

30

#### 【0245】

実施例15．E-テスト(商標)および非拡大領域撮像を用いる迅速な抗菌感受性試験

目的：本実施例は、E-テスト(商標)抗生物質試験片を用いて細菌の抗生物質感受性を迅速に決定するために本発明を用いることを証明する。E-テスト(商標)片を、多様な濃度範囲のテトラサイクリンに含浸させ、ユーザーは、試験細菌の増殖を阻害するために必要な抗生物質の最低濃度を決定することができる。最少阻止濃度は、阻害域と呼ばれる増殖を示さない域の可視化に基づく。阻害域は、従来、一晚増殖後の裸眼によって測定する。本実施例は、非拡大領域撮像を用いてマイクロコロニーの増殖を検出することによって、数時間で阻害域を決定できることを証明する。

40

#### 【0246】

実験法：本実施例において用い、実施例13に記述した株を $10^6$ CFU/mlに希釈してTSA培地に播種した。E-テスト(商標)片(ハーディディアグノスティクス ; 0.016 ~ 256  $\mu$ gテトラサイクリン、カタログ番号51002258)をプレートに載せて、これを37 °Cで5時間インキュベートさせた。先の実施例と同様に、マイクロコロニー自己蛍光および非拡大領域撮像を用いて、試験片上またはその周囲のマイクロコロニーの増殖を撮像した。撮像後、プレートを一晚インキュベートさせた。

#### 【0247】

結果：図22は、非拡大領域撮像を用いる迅速な抗菌感受性E-テスト(商標)の結果を示す。非拡大領域撮像は、E-テスト(商標)抗生物質試験片近傍で増殖する自己蛍光耐性マ

50

イクロコロニーの増殖を検出した。一晚増殖後に認められたものと同等の阻害域を、増殖5時間後に決定することができた。この実験結果は、非拡大領域撮像を用いるマイクロコロニーの検出は、E-テスト(商標)の結果を得るまでの時間を大きく短縮する迅速かつ感受性の高い方法である。

【0248】

変法：この技術は、多様な抗生物質に含浸したE-テスト(商標)片に応用可能である。

【0249】

他の態様

本出願において参照した全ての特許、特許出願、および出版物は、参照として本明細書に組み入れられる。本発明の他の態様は、本明細書に開示の本発明の明細書および実践の検討によって当業者には明らかであると思われる。本明細書および実施例は、例として見なされるに過ぎず、本発明の真の範囲および趣旨は、特許請求の範囲によって示されるものである。本明細書に記述の方法に適合させてもよい他の態様の例は、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、2002年9月6日に提出された「RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF CELLS AND VIRUSES」と題する米国特許出願第\_\_\_\_\_号および2002年9月6日に提出された「RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF MOLECULES」に認められる。

【0250】

他の態様は特許請求の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0251】

【図1】従来の微生物培養は多くの世代の細胞分裂を必要とする。従来の微生物培養の結果が出るまで長い時間は、裸眼で見えるために十分な顕微鏡標的細胞を生成するために必要な時間に起因する。

【図2】マイクロコロニーの検出によって微生物増殖を迅速に検出する考え方 本発明は、従来の方法を用いて肉眼で検出されるマクロコロニーより少ない細胞を含むマイクロコロニーを撮像することによって増殖細胞の迅速な計数を得る。本発明は、必要な世代数が少ないことから従来の方法より迅速である。

【図3】大領域撮像のためのCCD撮像装置 図に示すCCDに基づく撮像装置を用いて、実施例に記載するデータのほとんどを収集した(同様に、詳細な説明の章の段階5を参照されたい)。一つの例において、励起光は、高輝度白色光源(1000ワット、キセノンアーク燈、モデルA-6000、(Photon Technology Incorporated、モンマスジャンクション、ニュージャージー州)からの光を液体光ガイド(コア直径5mm、モデル380、Photon Technology Incorporated、モンマスジャンクション、ニュージャージー州)に導入することによって提供される。液体光ガイドは光を励起フィルターホイールに運び(バイオポイントFW、Ludl Electronics、ホーソン、ニューヨーク州)、フィルターを通過したビーム(典型的に直径9mm)を、標識した標的細胞を含む検出表面に向ける。検出表面は、マイクロタイターディッシュウエルの光学的に透明な底である。しかし、同じ装置が、様々な検出表面(例えば、顕微鏡スライドガラス、カバーガラス、および平坦な光学的に透明な底を有する試験管)上で標識標的細胞を検出することができる。入射光は検出表面に当たり、カテゴリー結合分子を通して標的細胞に結合し、光学的に透明な表面に存在するシグナル伝達部分において蛍光を誘導する。放射された蛍光の光の一部を、集光率の高いレンズシステムによって収集して、放射フィルターホイール(バイオポイントFW、Ludl Electronics、ホーソン、ニュージャージー州)を通してCCDカメラ(オルカII、ハママツ、ブリッジウォーター、ニュージャージー州)に伝播する。

【図4】非拡大領域撮像のためのCCD撮像システム 図は、光が集光装置の側面からある角度で検出表面(本明細書においてマイクロタイターウェルの底として示される)に導入される角度のある照明形態を有するCCD撮像器を示す。角度は、集光率を最適にして、集光レンズによる入射光線の妨害を回避するように選択される。この形態の利点は、試料ホルダーの底表面からの反射光が集光レンズによって収集されず、したがって、蛍光バックグラウンドノイズに寄与しない点である。

10

20

30

40

50

【図5】非拡大領域撮像を用いるマイクロコロニーの無試薬検出 図は、標識試薬を用いないで細菌の増殖を計数する迅速な方法を示す。マイクロコロニーにおける標的細胞の固有の自己蛍光を、CCDに基づく非拡大領域撮像を用いて検出する。この無試薬アプローチの利点には、その単純性、非破壊性、および広い応用性が含まれる。または、標的細胞特異的結合部位(例えば、蛍光抗体または核酸プローブ)に結合する標識試薬は、標的細胞を含むマイクロコロニーを検出するために用いることができる。

【図6】非拡大領域撮像を用いる細菌マイクロコロニーの検出および同定(実施例1) 図は、CCDに基づく非拡大領域撮像を用いた標識マイクロコロニーの撮像による、マイクロコロニーの迅速、単純かつ感度のよい検出法を示す。本実施例において、単細胞を、マイクロコロニーを形成させるためにいくつかの複製世代増殖させた。マイクロコロニーは、サイバグリーンIまたはFITC標識抗体のいずれかによって標識した。図7において、パネルの上の列は、単細胞を含む0時間の時点を示す。パネルの下の列は、3時間インキュベーション後のマイクロコロニーを示す。コロニー形成細胞が当初沈着した部位での細胞数の増加により、時間と共に、CCD撮像によって検出された物体の大きさおよびシグナルに実質的な増加を認める。

10

【図7】非拡大領域撮像を用いる細菌マイクロコロニーの自己蛍光に基づく検出(実施例2) 図は、CCDに基づく非拡大領域撮像を用いて細胞の自己蛍光シグナルを撮像することによる、マイクロコロニーの迅速、単純かつ感度のよい検出法を示す。分散した単細胞をフィルターに載せて、これを増殖培地において37℃で5.25時間インキュベートした。マイクロコロニー(分散した単細胞のクローン性増殖に由来する)は、細菌を載せなかった(右のパネル)がそれ以外は同一に調製して撮像したフィルターと比較して、実質的な自己蛍光シグナル(左のパネル)を生成した。

20

【図8】従来の培養法との内部比較を用いて迅速な無試薬微生物計数を確認する単純な方法(実施例3) 図は、マイクロコロニー計数が従来の方法と同等であることを示す単純な方法を示す。マイクロコロニー自己蛍光の非破壊的検出を用いて、本発明によって検出されるマイクロコロニーを、それらが従来の肉眼的コロニー計数によって検出されるマイクロコロニーに成熟するまで再度インキュベートする。マイクロコロニーによって形成されたスポットのパターン(左のパネル)は、肉眼で見えるコロニーによって形成されたパターン(右のパネル)と合致して、二つの方法が同等であることを示していることに注意されたい。

30

【図9】非拡大領域撮像を用いて自己蛍光マイクロコロニー検出の精度と検出限界(実施例4) 図は、試料が極めて低レベルの標的細胞を含む場合、本発明の精度を測定するために用いられる方法を示す。フィルター101個のそれぞれに関して、自己蛍光マイクロコロニーを評価することによって得られた結果は、従来の方法によって得られる結果と同じであった。

【図10】無試薬非拡大撮像を用いて迅速に検出された自己蛍光細菌マイクロコロニーにおける微生物細胞数の決定(実施例5) 図は、大腸菌マイクロコロニーの大領域撮像を用いて、大腸菌のマイクロコロニーから生成されたシグナルを示す(上のパネル)。下のパネルにおいて高倍率顕微鏡によって撮像した三つのマイクロコロニーは、上のパネルにおける本発明を用いて撮像された三つのマイクロコロニーに対応する。それぞれのマイクロコロニーにおける細菌数を、それぞれの枠の下に示す(細胞45、48、および50個)。図は、無試薬非拡大領域撮像を用いて少数の大腸菌細胞を含むマイクロコロニーを検出できることを示している。

40

【図11】環境の水試料における細菌マイクロコロニーのCCDに基づく非拡大領域撮像による検出および同定(実施例6) 図は、チャールス川(Charles River)の水中の細菌コロニーを検出するために、本発明を用いることによる細菌増殖の分析を示す。細菌細胞を混合セルロースエステルフィルターに採取した。フィルターをR2A寒天プレート上に載せて、32.5℃で74時間インキュベートした。様々な時点で、白色光の反射率および自己蛍光を用いてフィルターを撮像した。直径が0.55mmまたはそれより大きいマイクロコロニーを、反射率画像において同定して計数した。マイクロコロニーを形成する自己蛍光マイクロコロニ

50

ーが検出できる時点も同様に決定した。様々な時点で、自己蛍光マイクロコロニーとして検出可能な74時間マクロコロニーの割合をプロットした。

【図12】細菌マイクロコロニーのCCDに基づく非拡大領域撮像による検出と試料中の細菌を計数する古典的な混釈培養法との相関(実施例7) 図は、本発明を用いて得られた自己蛍光マイクロコロニーと従来の混釈微生物培養法との計数を比較する。

【図13】無試薬計数試験の動的範囲と直線性(実施例8) 図は、自己蛍光マイクロコロニーを検出するために本発明を用いることによる動的範囲および直線性の分析を示す。

【図14】試料の希釈を行わない抗菌保存剤試験の有効性(実施例9) 図は、本発明および従来の方法を用いて、同等の抗菌保存剤の有効性の結果が得られることを示している。比較は、何百本もの試料の希釈液を分析する必要がなくなることによって、本発明ではこの試験の労力と出費のほとんどがなくなることを示している。

【図15】非拡大領域撮像を用いる熱ストレス生物の自己蛍光に基づく検出(実施例10) 図は、本発明と従来の混釈法とを用いた熱ストレス生物学的指標細胞の計数の相関を示す。生物学的指標物質である*G. ステアロサーモフィルス*(*G. stearothermophilus*)に多様な熱ストレスレジメを行った。CCDに基づく大領域撮像を用いてマイクロコロニー自己蛍光を測定して、肉眼で見えるマクロコロニーを肉眼的に計数した。二つの方法の結果を互いにプロットすると、良好な相関を示す。しかし、本発明は、従来の方法より必要な希釈が実質的に少なかった。

【図16】牛ひき肉における細菌マイクロコロニーの自己蛍光に基づく検出(実施例11) 図は、牛ひき肉中の微生物に由来する自己蛍光マイクロコロニーおよびマクロコロニーの検出時間を示す。48時間でマクロコロニーを形成したマイクロコロニーの出現の経時的な追跡により、マクロコロニーの100%が本発明によって16時間で検出されたことが示された。このことは、従来の方法と比較して、本発明が、結果を得るために必要な時間を有意に短縮する可能性を示している。

【図17】磁気選択後のマイクロコロニー検出(誤り、参考文献が存在しない; および実施例12) 標的細胞を磁気によって選択した後、インサイチューで増殖させ、そして本発明を用いてマイクロコロニー自己蛍光を検出するスキームを示す。

【図18】非特異的磁気選択後の非拡大領域撮像を用いるマイクロコロニー検出による複合試料中の細菌の検出(図12) 図は、黄色ブドウ球菌を全血から磁気によって捕獲した実験の結果を示す。細菌は、細菌に結合する反応性の広い物質の混合物によってコーティングした磁性粒子を用いて全血から選択した。濾過、播種、およびインキュベーション(6時間)の後、自己蛍光マイクロコロニーを非拡大領域撮像を用いて検出した。フィルターを一晚インキュベートさせた。その後、フィルターを再度撮像して(画像は示していない)、6時間マイクロコロニーの位置がマクロコロニーに増殖したことを確認し、マイクロコロニーを塵または他の微粒子と間違える可能性をなくした。

【図19】迅速な抗菌感受性試験のスキーム(実施例13) 図は、CCDに基づく非拡大領域撮像を用いてマイクロコロニーの出現を検出することによって、抗生物質に対する細菌株の感受性を調べる迅速な方法を示す。示した細菌株に関して、細菌を抗生物質の存在下(右のカラム)で増殖させた場合、マイクロコロニーを形成することができず、抗生物質に対する感受性を示す。同様に、細菌は、増殖条件でインキュベートしなければ増殖しない(左のカラム)。予想されるように、株を抗生物質の非存在下で(中央のカラム)増殖条件でインキュベートすると、増殖が検出される。

【図20】迅速な抗菌感受性試験(実施例13) 図は、抗生物質を含む寒天プレート上のマイクロコロニーとして細菌株(一つは抗生物質であるテトラサイクリンに対して感受性で、もう一つは耐性)の増殖を比較する抗菌感受性試験の結果を示す。それぞれの株の細菌細胞をポリカーボネートメンブレン上に濾過して、テトラサイクリンを含むLB寒天プレートに載せて、37℃で3時間インキュベートした(「3時間」と表示されるカラム)。同様に調製した他のフィルターを、テトラサイクリンを含むLB寒天プレートに室温で5分未満載せた(「0時間」のパネルカラム)。フィルターを固定して、核酸染色によって染色した。3時間インキュベートした細菌を含む膜(「3時間CCD」と表示されるカラム)のCCD撮像は、耐

10

20

30

40

50

性株を含むが感受性株を含まない膜上でマイクロコロニーの増殖を検出した。耐性株を含むが感受性株を含まないフィルター上でのマイクロコロニーの増殖は、高倍率蛍光顕微鏡によって確認した(「3時間顕微鏡」と表示されるカラム)。予想されるように、増殖条件でインキュベートしなかったフィルターのCCD画像にはマイクロコロニーを検出せず(「0時間CCD」と表示されるカラム)、高倍率蛍光顕微鏡によってごくまばらに存在する細胞が検出されたに過ぎなかった。コンピューター画像解析を用いて、膜のCCD撮像結果を定量した(棒グラフ)。耐性菌によって形成されたマイクロコロニーを含むメンブレンは、感受性株を含む膜より約25倍の強度を示した。この実験の結果は、非拡大領域撮像を用いてマイクロコロニーを検出することが抗菌感受性試験にとって迅速かつ感度のよい方法であることを示している。

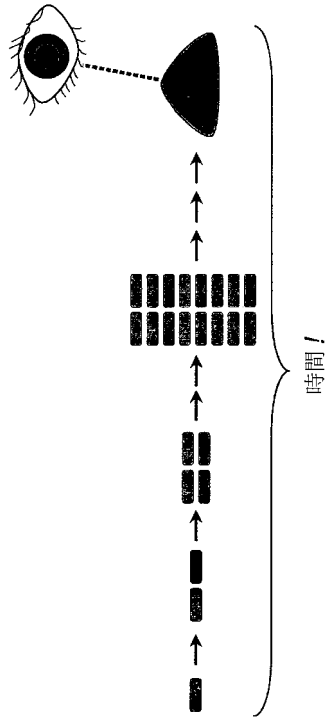
10

【図21】ディスク拡散法および非拡大領域撮像を用いる迅速な抗菌感受性試験(実施例14) 図は、細菌株(一つは感受性および一つは耐性)の増殖と比較した抗菌感受性ディスク拡散法の結果を示す。拡散ディスク上またはその近傍で増殖した自己蛍光マイクロコロニーは、増殖の5時間後に検出可能であり、これは標準的な一晚培養より検出時間を大きく短縮した。左のパネルは、Tet耐性菌が拡散ディスクの近くまで増殖していることを示しているが、右のパネルは、Tet感受性株が増殖しないことを示している。ディスク拡散プレートを一晩インキュベートした。24時間の阻害域を5時間阻害域と比較した。24時間阻害域は、5時間のマイクロコロニーの結果と同じであったことは、本発明が従来の方法と比較して同等の結果をより迅速に生じうることを示している。

【図22】E-テスト(商標)および非拡大領域撮像を用いる迅速な抗菌感受性試験(実施例15) 図は、抗生物質であるテトラサイクリンを含むEテスト(商標)片を用いて細菌株(一つは感受性および一つは耐性)の増殖を比較する抗菌感受性試験の結果を示す。細菌細胞をTSAプレート上に播種した。Eテスト(商標)片をプレートに直接加えて、これを37℃でインキュベートした。Eテスト(商標)片上またはその近傍で増殖した自己蛍光マイクロコロニーは、増殖5時間後に検出可能であった。左のパネルは、小片の256 µg/ml部分の近傍で増殖した5時間での耐性菌を示す。右のパネルは、小片の2 µg/ml部分近傍の阻害域を有する5時間での感受性株を示す。Eテスト(商標)プレートを一晩インキュベートした。24時間阻害域は5時間阻害域と同等であり、本発明によって得られたより迅速な結果は、より遅い従来の方法と同等であることを示している。

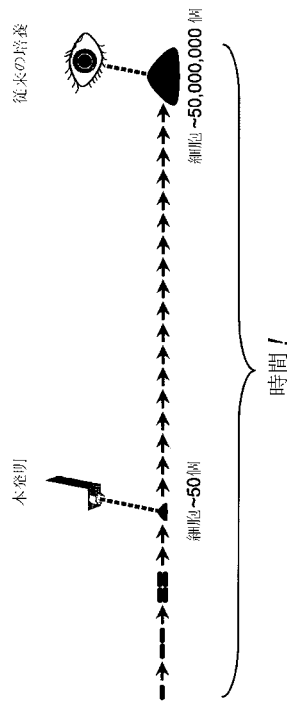
20

【図1】



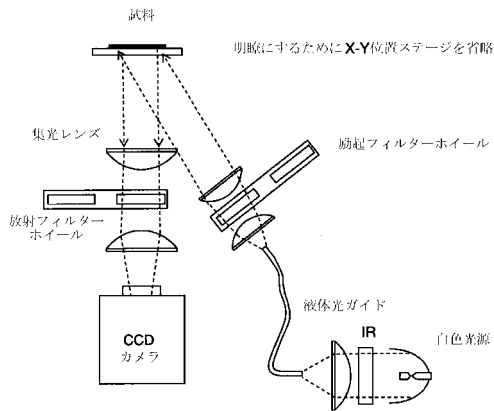
従来の微生物培養は多くの世代の細胞分裂を必要とする

【図2】



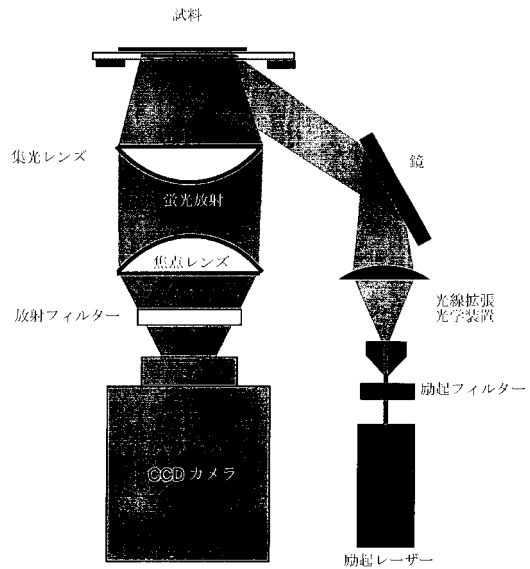
マイクロコロニーの検出によって微生物増殖を迅速に検出する構想

【図3】



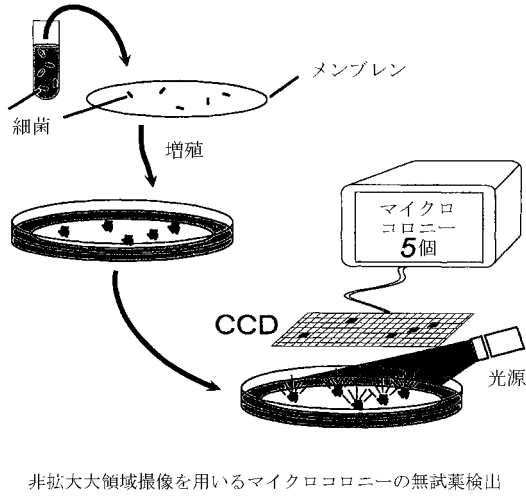
大領域撮像のためのCCD撮像装置

【図4】

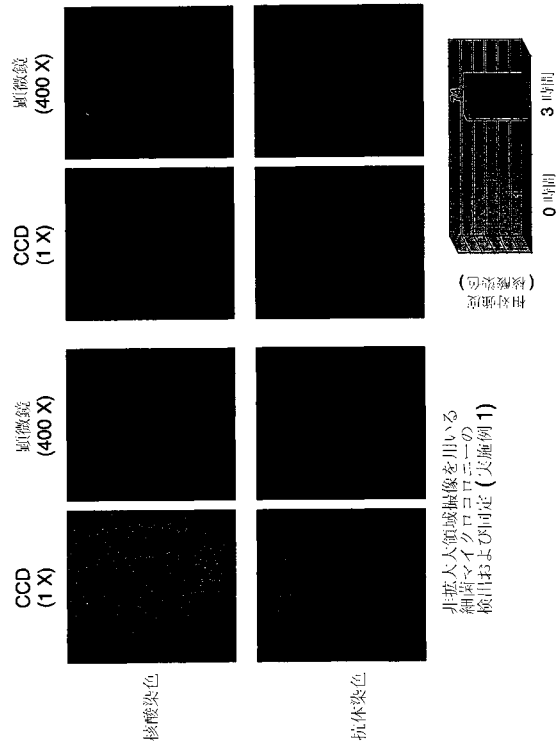


非拡大領域撮像のためのCCD撮像システム

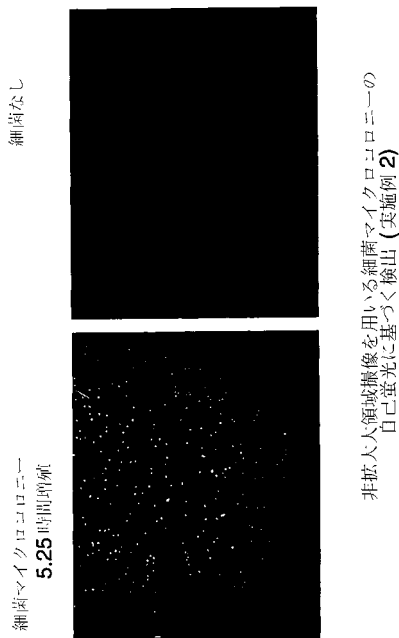
【図5】



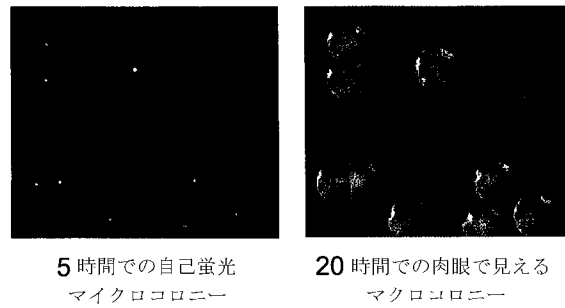
【図6】



【図7】

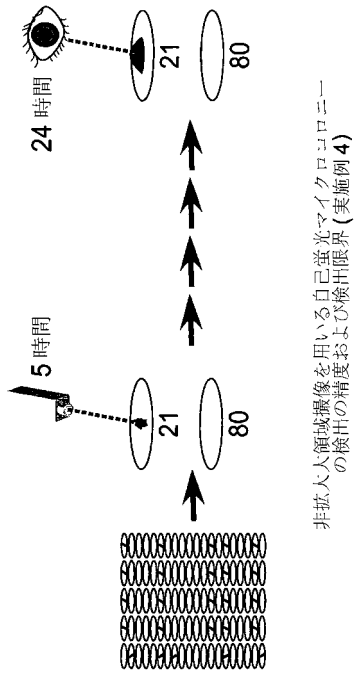


【図8】

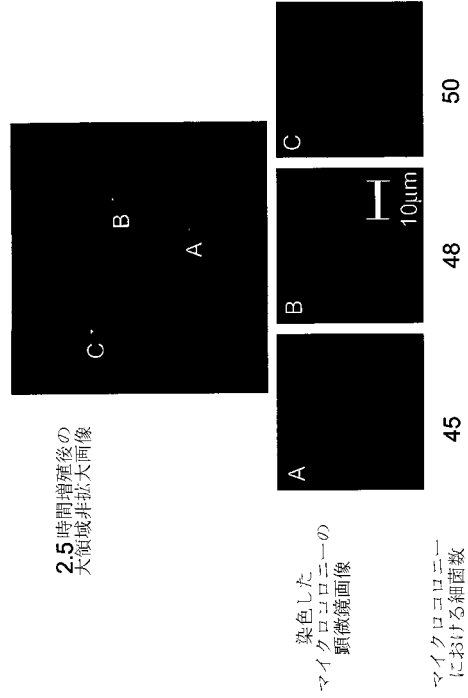


従来の培養法との内部比較を用いて迅速な無試薬微生物計数試験を確認する単純な方法 (実施例3)

【 図 9 】

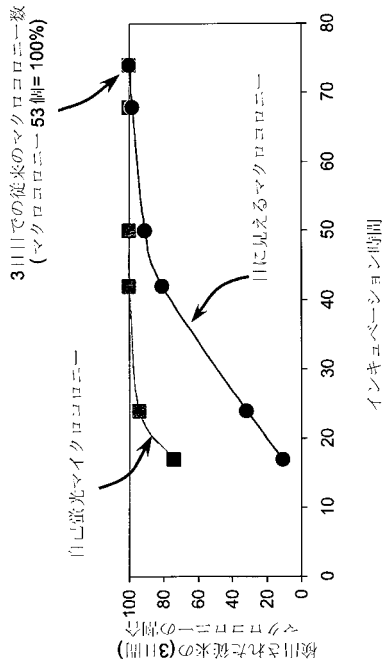


【 図 10 】



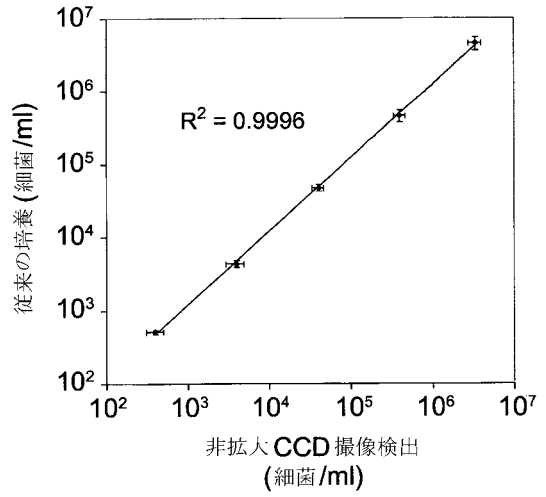
無試薬非拡大撮像を用いて迅速に検出された自己蛍光細菌マイクロロニーにおける微生物細胞数の定量 (実施例 5)

【 図 11 】



環境水試験における細菌の計数 (実施例 6)

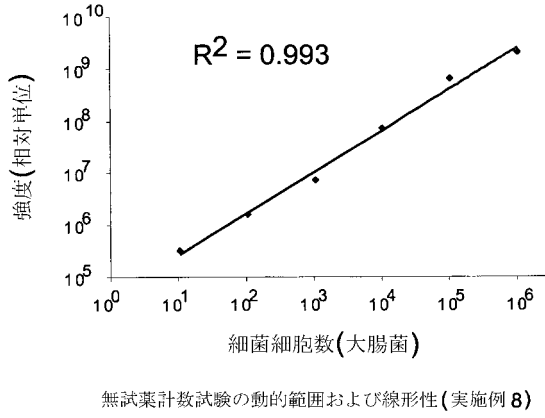
【 図 12 】



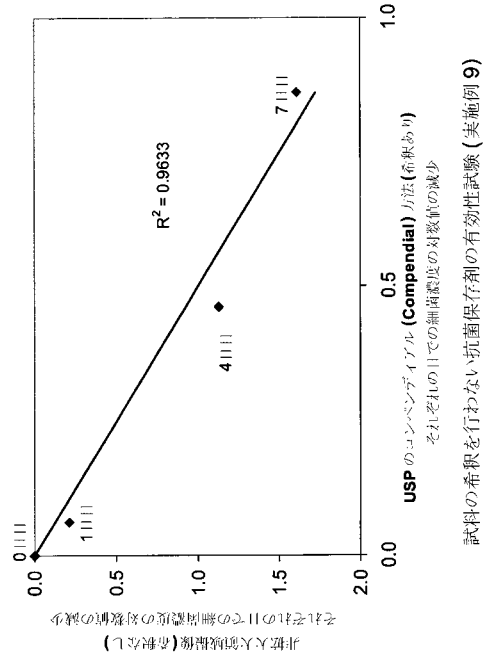
本発明を用いる計数試験と従来の培養を用いる計数試験との相関 (実施例 7)



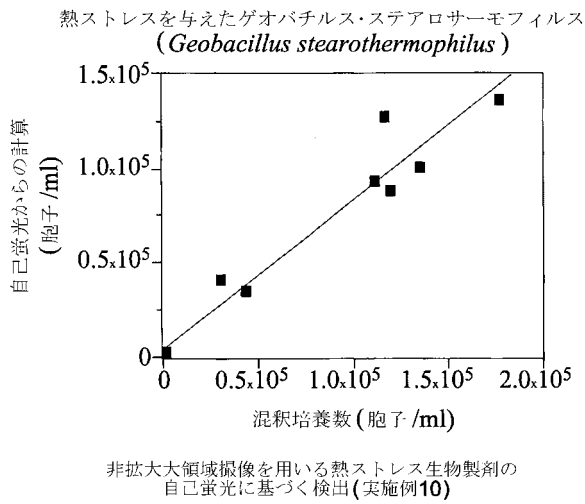
【 図 1 3 】



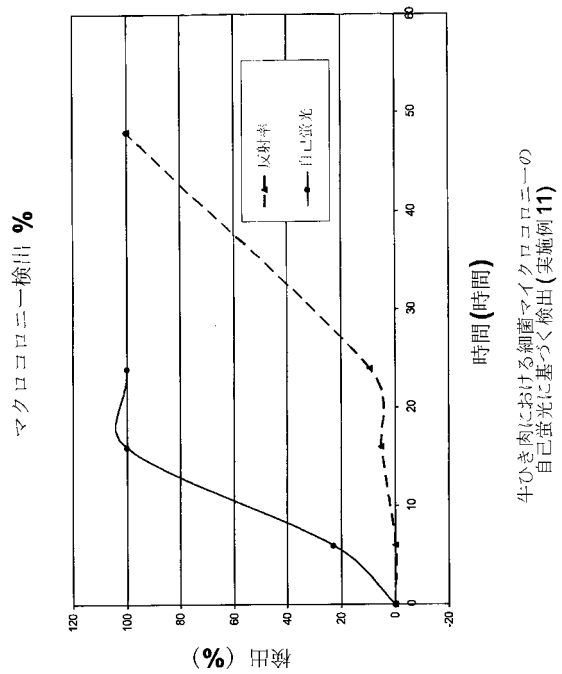
【 図 1 4 】



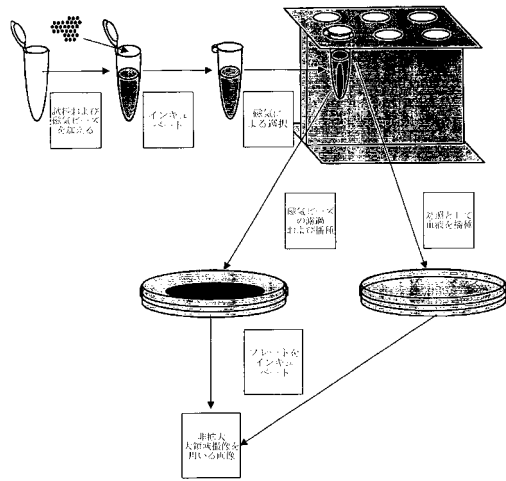
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

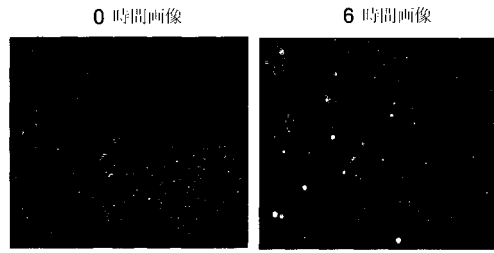


【図17】



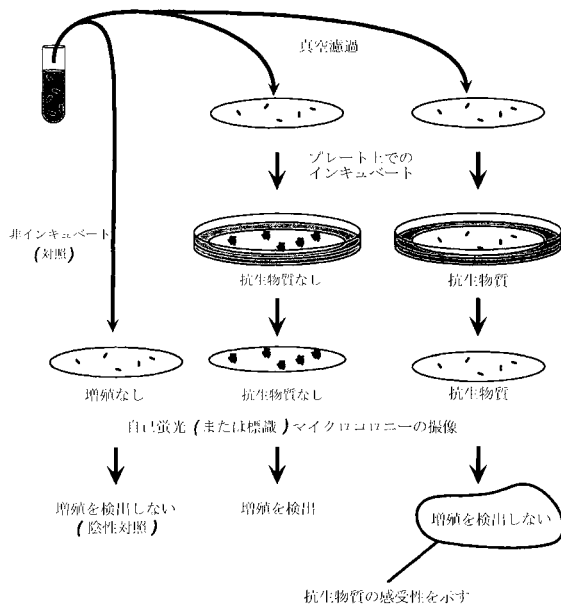
磁気選択後のマイクロコロニー検出 (実施例12)

【図18】



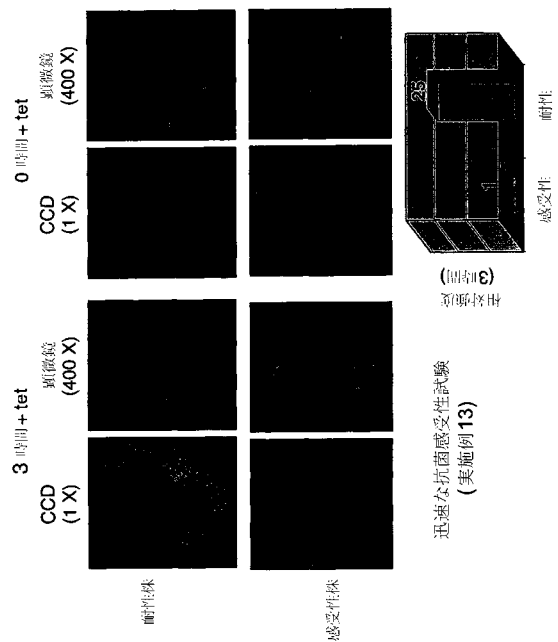
非特異的磁気選択後に非拡大領域撮像を用いるマイクロコロニーの検出による複合試料中の最近の検出(実施例12)

【図19】

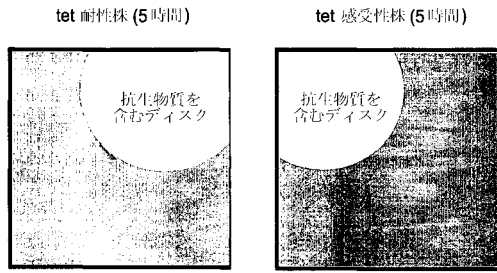


迅速な抗菌感受性試験のスキーム(実施例13)

【図20】

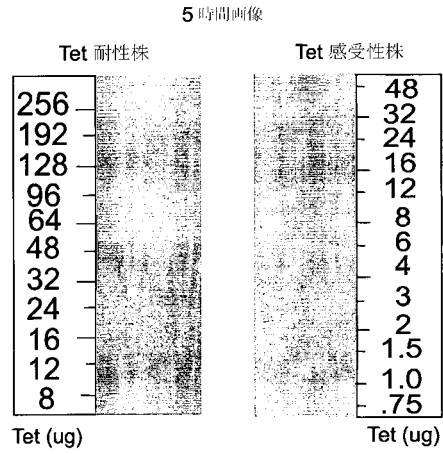


【 図 2 1 】



ディスク拡散法と非拡大領域撮像とを用いる迅速な抗菌感受性試験(実施例14)

【 図 2 2 】



E-テスト(商標)と非拡大領域撮像とを用いる迅速な抗菌感受性試験(実施例15)

---

フロントページの続き

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 特表2001-511654(JP,A)  
米国特許第05981180(US,A)  
米国特許第06268222(US,B1)  
特開2003-135095(JP,A)  
Appl. Environ. Microbiol., vol. 63, pages 4528-4533 (1997)  
クリーンテクノロジー, 第5巻, 第60-61頁(1995年)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12Q 1/04  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 快速检测复制细胞   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP4363980B2</a>  | 公开(公告)日 | 2009-11-11 |
| 申请号            | JP2003527064   | 申请日     | 2002-09-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 基因组PROFILING SYST  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 基因组分析系统公司  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 基因组分析系统公司  |         |            |
| [标]发明人         | ストラウズドン  |         |            |
| 发明人            | ストラウス ドン   |         |            |
| IPC分类号         | C12Q1/04 C12M1/34 C12Q1/00 C12Q1/06 C12Q1/18 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N1/30 G01N15/14 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/554 G01N33/567 G01N33/569 G01N33/58   |         |            |
| CPC分类号         | C12Q1/06 B82Y5/00 B82Y10/00 B82Y20/00 C12Q1/04 C12Q1/18 G01N15/1429 G01N15/1475 G01N21/6428 G01N33/5005 G01N33/5008 G01N33/56916 G01N33/56938 G01N33/56966 G01N33/56983 G01N33/58 G01N33/582 G01N2015/1486 G01N2015/1488 G01N2021/6439 G01N2021/6471 G01N2333/195 G01N2333/245 G01N2333/31 G01N2333/32 G01N2333/33 |         |            |
| FI分类号          | C12Q1/04   |         |            |
| 代理人(译)         | 清水初衷   |         |            |
| 审查员(译)         | 石丸聡  |         |            |
| 优先权            | 60/317658 2001-09-06 US  |         |            |
| 其他公开文献         | JP2005502354A  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

本发明通过使用大面积成像检测源自原位细胞分裂的微观菌落，提供有效，快速和灵敏的活细胞计数。基于本发明的微生物计数测试解决了临床和工业微生物学中的重要问题 - 使用传统方法检测所需的长时间 - 同时保留了基于微生物培养的传统方法的关键优势。本发明的实施方案包括用于检测细胞微菌落而无需标记试剂的非破坏性无菌方法。这些方法允许产生纯培养物，其可用于微生物鉴定和抗微生物剂抗性的测定。

微生物培養を用いる微生物の計数

**長所**

- 感度が極めて良好
- 定量的
- 純粋培養物を生成する
- 1回の試験で多くのタイプの微生物を検出および計数することができる
- 微生物を選択的に増殖させることができる
- 複製する細胞のみを検出する
- 安価である
- 単純かつ実行が容易

**短所**

- 遅い
- 技法および分析が手動で行われる
- 必ずしも全ての微生物が培養可能でない