

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 506029**

(P2003 - 506029A)

(43)公表日 平成15年2月18日(2003.2.18)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コード* (参考)
C 1 2 Q 1/06		C 1 2 Q 1/06	2 G 0 4 5
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C 2 G 0 5 4
33/18		33/18	F 4 B 0 6 3
33/48		33/48	M

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 21数)

(21)出願番号	特願2001 - 514075(P2001 - 514075)	(71)出願人	ピーティーエフ ピーティワイ リミテッド オーストラリア ニュー サウス ウェールズ州 2094 フェアライト ウッズ パレード 12 ユニット 6
(86)(22)出願日	平成12年7月27日(2000.7.27)	(72)発明者	ベシィー・グラハム オーストラリア ニュー サウス ウェールズ州 2111 グレーズヴィレ メイキンソン ストリート 10
(85)翻訳文提出日	平成14年2月1日(2002.2.1)	(74)代理人	弁理士 藤野 清也 (外2名)
(86)国際出願番号	PCT/AU00/00896		
(87)国際公開番号	W001/009281		
(87)国際公開日	平成13年2月8日(2001.2.8)		
(31)優先権主張番号	PQ 1961		
(32)優先日	平成11年8月2日(1999.8.2)		
(33)優先権主張国	オーストラリア(AU)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 内部検定試験法

(57)【要約】

バイオ粒子の個体群を用意し、これらのバイオ粒子のそれぞれに恒久的かつ検出可能なタグを付けてタグ付きバイオ粒子に変化させ、規定数量のタグ付きバイオ粒子を規定容量のキャリヤに入れた内部対照(内標準)サンプルを作り、バイオ粒子を検出するために対照サンプルを試験サンプルに添加して、試験を実施し、その後に試験サンプル中に検出されたタグ付きバイオ粒子の正確な数を測定し、添加したタグ付きバイオ粒子の数と比較して分析精度の指標を得る方法、可搬性液体中のバイオ粒子の分析における内部検定試験法、ならびに内部検定標準を提供する方法。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 バイオ粒子の個体群を用意し、これらのバイオ粒子のそれぞれに恒久的かつ検出可能なタグを付けてタグ付きバイオ粒子に変化させ、規定数量の前記タグ付きバイオ粒子を規定容量のキャリアに入れた内部対照サンプルを作り、前記バイオ粒子を検出するために前記対照サンプルを試験サンプルに添加し、分析を実施して試験サンプル中に検出されたタグ付きバイオ粒子の正確な数を測定し、添加したタグ付きバイオ粒子の数と比較して分析精度を確定する手順を含むことを特徴とする、診断用内部検定試験法。

【請求項2】 前記バイオ粒子が、バクテリア、プロトゾア、酵母、菌類、ウイルスまたはプリオンである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記バイオ粒子が、検出可能なマーカーでタグ付けされた外表面を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記バイオ粒子が、各細胞の表面または内部のタンパク質を通してタグ付けされたバクテリアまたはプロトゾアである、請求項2に記載の方法。

【請求項5】 前記タグが、バイオ粒子の化学的および/または物理的特性を検出可能な形に変化させる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 タグが蛍光タグである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 試験サンプル中に2種類以上のバイオ粒子が使用される場合、それらが異なる蛍光タグでタグ付けされ、バイオ粒子に対するそれぞれのタイプのタグの数が容易に測定される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 バイオ粒子の検出のための試験が、水またはその他の可搬性液体、食品、血液、痰、粘膜、尿または脳脊髄液中のバイオ粒子の検出のための試験である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 バイオ粒子の検出のための試験が顕微鏡分析であり、バイオ粒子が蛍光タグ付けされ、それらの特異的蛍光によりバイオ粒子が同定される、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 可搬性液体中のバイオ粒子の分析における内部検定を行なうための方法であって、バイオ粒子のサンプルを用意し、前記サンプルに検出可

能なタグを付け、規定数量のタグ付きバイオ粒子を規定容量のサンプル中に含む内部対照のサンプルを作り、前記内部対照サンプルを試験サンプルに添加し、前記サンプルを分析してサンプル中のタグ付きバイオ粒子の割合を確定することを含み、試験サンプル中に検出されたタグ付きバイオ粒子の数をサンプルに添加した既知量のタグ付きバイオ粒子と比較することで、分析精度の1つの指標が得られることを特徴とする方法。

【請求項11】 前記バイオ粒子が、バクテリア、プロトゾア、酵母、菌類、ウイルスまたはプリオンである、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記バイオ粒子が、検出可能なマーカでタグ付けされた外表面を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 前記バイオ粒子が、各細胞の表面または内部のタンパク質を通してタグ付けされたバクテリアまたはプロトゾアである、請求項11に記載の方法。

【請求項14】 前記タグが、バイオ粒子の化学的および/または物理的特性を検出可能な形に変化させる、請求項10に記載の方法。

【請求項15】 前記タグが蛍光タグである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 試験サンプル中に2種類以上のバイオ粒子が使用される場合、それらが異なる蛍光タグでタグ付けされ、バイオ粒子に対するそれぞれのタイプのタグの数が容易に測定される、請求項14に記載の方法。

【請求項17】 バイオ粒子の検出のための試験が、水またはその他の可搬性液体、食品、血液、痰、粘膜、尿または脳脊髄液中のバイオ粒子の検出のための試験である、請求項10に記載の方法。

【請求項18】 バイオ粒子の検出のための試験が顕微鏡分析であり、バイオ粒子が蛍光タグ付けされ、それらの特異的蛍光により、バイオ粒子が同定される、請求項10に記載の方法。

【請求項19】 所定数量のバイオ粒子を含み、前記バイオ粒子が日常分析にかけられるタイプのものであり、前記所定数量のバイオ粒子が、規定容量のキャリアヤ中に入れられた検出可能なタグが付けられたタグ付きバイオ粒子であることを特徴とする内部検定用標準。

【請求項20】 前記タグ付けされたバイオ粒子が試験のために容易に添加できる容器に入れて提供される、請求項19に記載の標準。

【請求項21】 前記バイオ粒子が、バクテリア、プロトゾア、酵母、菌類およびプリオンから選ばれる、請求項19または20に記載の標準。

【請求項22】 前記バイオ粒子が、検出可能なマーカーでタグ付けされた外表面を含む、請求項20に記載の標準。

【請求項23】 前記バイオ粒子が、各細胞の表面または内部のタンパク質を通してタグ付けされたバクテリアまたはプロトゾアである、請求項19に記載の標準。

【請求項24】 前記タグが、バイオ粒子の化学的および/または物理的特性を検出可能な形に変化させる、請求項19に記載の標準。

【請求項25】 前記タグが蛍光タグである、請求項19に記載の標準。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、診断分析における内部検定(internal quality control)に関する。特に、本発明は、水またはその他の可搬性の液体、食品、血液、尿、糞、脳脊髄液などの中のバクテリア、プロトゾア、酵母、菌類、ウイルス、プリオンなどの微生物またはその他の微粒子の解析に関する。

注：参考文献は本明細書の末尾にまとめて収録した。

**【0002】****【従来技術】**

水は、日常的に試験を行ってクリプトスポリジウム(*Cryptosporidium*)やギアリダ(*Giardia*)の存在を確認する。これらの検出は、シストやオーシストを緑色蛍光染料で染色する免疫蛍光手法に基づいて行われる。染色されたサンプルはエピ蛍光顕微鏡を用いて検査し、緑色蛍光のシストやオーシストの数が記録される。

**【0003】**

この方法には多くのプロセスが含まれ、そのプロセス中でシストやオーシストが失われることがある。したがって、厳格な検定試験を実施してこの方法の成績をモニターすることが重要である。現在は、検定試験は既知数のシストやオーシストを含む標準を分析する外部プロセスとなっている。そうした検定試験は、典型的には10～20個のサンプルを分析した後に行われる。こうした外部検定試験は理想からはほど遠い。シストやオーシストの損失はサンプルによって大きく変わることがありうる。ある種のサンプルはこの分析には不適當なことがある。さらに、もし検定試験の結果が悪い場合、10～20個のサンプルのすべての結果を破棄しなければならなくなる。

同じ状況は、外部検定試験が関連診断分析の性能/精度の1つの指標として適用されるさまざまな分野の診断分析にも当てはまる。

したがって、診断分析における正確、簡便、費用効果の高い、かつ再現可能な検定試験法の必要性があるが、これらは現在のところ先行技術では達成されてい

ない。

#### 【0004】

##### [発明の要旨]

本発明の第1の視点では、バイオ粒子の個体群を用意し、これらのバイオ粒子のそれぞれに恒久的かつ検出可能なタグを付けてタグ付きバイオ粒子に変化させ、規定数量の該タグ付きバイオ粒子を規定容量のキャリアに入れた内部対照サンプルを作り、前記バイオ粒子を検出するために前記対照サンプルを試験サンプルに添加し、分析を実施して試験サンプル中に検出されたタグ付きバイオ粒子の正確な数を測定し、添加したタグ付きバイオ粒子の数と比較して分析精度を確定することを含むことを特徴とする診断用内部検定試験法を提供する。

#### 【0005】

本発明のさらなる視点では、可搬性液体中のバイオ粒子の分析における内部検定を行うための方法を提供する。この方法は、バイオ粒子のサンプルを用意し、前記サンプルに検出可能なタグを付け、規定数量のタグ付きバイオ粒子を規定容量のサンプル中に入れた内部対照のサンプルを作り、前記内部対照サンプルを試験サンプルに添加して前記サンプルを分析し、サンプル中のタグ付きバイオ粒子の割合を測定することを含み、試験サンプル中に検出されたタグ付きバイオ粒子の数をサンプルに添加した既知量のタグ付きバイオ粒子と比較することによって、分析精度の1つの指標と実際のバイオ粒子数を得、分析実施中にバイオ粒子が失われることを容認する方法である。

#### 【0006】

本発明のさらなる視点として、所定数量のバイオ粒子を含み、前記バイオ粒子が日常分析にかけられるタイプのものであり、前記所定数量のバイオ粒子が検出可能なタグが付けられたタグ付きバイオ粒子であって、規定容量のキャリア中に入れられたものであることを特徴とする内部検定試験用標準を提供する。

#### 【0007】

診断分析の精度は、近代的な分析のツールとしてのそれらの性能にとって極めて重要なものである。簡明に言えば、正確な結果が得られない試験法は、測定する特定の個体の存在を過小または過大に表すことになり、現実的な価値を持たな

いことになる。不正確な分析は不適切な結論を導くことがあり、重大な間違った影響をもたらすこともありうる。

#### 【0008】

本発明は内部検定試験法に関わるものであり、タグ付きバイオ粒子の内部標準を用意し、これらをサンプルに添加し、日常分析を行い、その後サンプル中のタグ付きバイオ粒子の数を、サンプルに添加した既知数のバイオ粒子と比較して試験精度の直接的な指標とするものである。

#### 【0009】

本発明の第1の視点では、バイオ粒子の個体群を用意し、これらのバイオ粒子のそれぞれに恒久的かつ検出可能なタグを付けてタグ付きバイオ粒子に変化させ、規定数量の該タグ付きバイオ粒子を規定容量のキャリアに入れた内部対照（内標準）用サンプルを作り、該バイオ粒子を検出するために該対照サンプルを試験サンプルに添加し、分析を実施し、その後に試験サンプル中に検出されたタグ付きバイオ粒子の絶対数を測定し、添加したタグ付きバイオ粒子の数と比較することで試験精度が確定されるという手順を含む診断用内部検定試験法を提供する。

#### 【0010】

これらのバイオ粒子は、微生物、たとえばバクテリア、菌類、酵母またはウイルス、あるいは単細胞または複細胞のプロトゾア、プリオンまたはその他のバイオ粒子から選択することができる。そうしたバイオ粒子の例としては、クリプトスポリジウム(Cryptosporidium)、ギアリダ(Giardia)、シクロスポーラ(Cyclospora)、トキソプラズマ(Toxoplasma)、アイメリア(Eimeria)、レジオネラ(Legionella)、サルモネラ(Salmonella)、レプトスピラ(Leptospirosis)、エシェリヒア(Escherichia)、酵母菌(Saccharomyces)、クロストリジウム(Clostridium)、ビブリオ(Vibrio)、シュードモナス(Pseudomonas)、炭疽菌(Anthrax)、血液細胞、HIV、ノーウォークウイルス(Norwalk virus)、単純性疱疹ウイルス(herpes simplex virus)などがある。

#### 【0011】

バイオ粒子検出用の試験サンプルは、水またはフルーツジュース、ワイン、ビール、ミルク、サイダーなどの可搬性液体である。また、サンプルは鶏肉、牛肉

、卵、チーズ、サラミやハムなどの保存用肉類などでもよい。サンプルは、血液、脳脊髄液、尿、組織抽出物、糞便などの形でもよい。

#### 【0012】

対照（検定用）バイオ粒子を含むバイオ粒子は、バイオ粒子の化学的および／または物理的特性を、容易に検出できるような形に変えるタグによって検出可能な形にタグ付けされる。容易に検出可能なものの1つの例は、顕微鏡分析により検出できる発蛍光団のようなタグを使用するものである。適当な波長の光を照射したときに、発蛍光団が蛍光を発し、これによって発蛍光団でタグ付けされたバイオ粒子を同定することができる。タグ付けされていないバイオ粒子は、そうした条件下では蛍光を発しない。標識バイオ粒子の密度、形状、外観などの物理的および／または化学的特性に効果をもたらして容易に検出できるその他のタグとしては、コロイド金などのコロイド状化合物、フェリチンやその他の鉄または重金属化合物／錯体などの電子稠密剤による標識などがある。その他使用できるタグとしては放射線アイソトープを用いる放射標識、たとえば細胞表面のタンパク質、脂質または炭水化物あるいはそれらの内部物質による標識、ならびにバイオ粒子の化学的および／または物理的特性を変化させるためにDNAまたはRNAを修飾するものなどがある。後者の方法は、発光を起こす遺伝子の組み込み（Cattrinら、1999）、蛍光を起こす遺伝子の組み込み（Nobuhide Doi and Hiroshi Yanagawa、1999）、または抗生物質耐性、ケミカル・トレランス、抗原発現、酵素発現または代謝活性の変更などの確立された遺伝子発現システムなどである。

#### 【0013】

検出可能タグは、細胞表面のタンパク質、脂質、糖脂質、および／または炭水化物、あるいはバイオ粒子中のそれらの内部物質に標識をつけることができる。タグが細胞表面または細胞内タンパク質、脂質および／または炭水化物に恒久的に結合する場合、さまざまな利点が出てくる。たとえば、そうした細胞は標識を付けるために過度に可動化したり物理的に変化させる必要がなく、タグ付けは恒久的なものとなって、細胞の損傷または破壊が検出可能タグから信号を消失させるようなことがない。

#### 【0014】

バイオ粒子中のDNAまたはRNAは、たとえば、DNAまたはRNAと永久結合する核酸反応性フルオロクロムを用いたり、DNAまたはRNAと恒久的結合を作らないDNA/RNA内部校合フルオロクロムを用いて、恒久的または非恒久的にタグ付けすることができる。DNA/RNAタグ付けは、タグの検出可能信号の消失または衰弱を引き起こすDNA/RNAの代謝回転(turnover)/劣化により、前述の他のタグ付け方法ほど利点がないかもしれない。

#### 【0015】

微生物、酵母細胞、ウイルスなどのバイオ粒子に検出可能なタグ付けまたは標識する方法は、たとえば [Grondahlら、1997] および [Chakaら、1995] にあるように、十分に確立されている。蛍光染色酵母やバクテリアは、Molecular Probes Inc. (米国ユージーン) などさまざまな会社から販売されている一般市販商品である。一例として、蛍光マーカーで標識を付ける細胞は、発蛍光団の溶液に、細胞表面または細胞内のタンパク質またはその他の物質が蛍光標識されるように、単純に添加するだけでよい。フルオロクロムは通常1以上の官能基を備えており、これがリシンの - アミノ基などのタンパク質官能基へのカップリングを可能にする。

#### 【0016】

同様に、コロイド剤、電子稠密剤なども、一般的に1以上の反応基を含むか、または1以上の反応基を含むように誘導され、たとえばリシンの - アミノ基やグルタミン酸のカルボン酸官能基などのタンパク質官能基で標識を可能とする。

微生物のDNAまたはRNAは、当分野で公知の確立された分子生物学手法(たとえば、Cartinら、1999; Nobuhide DoiとHiroshi Yamagawa、1999参照)を用いて、たとえば形状、密度、形態学的状態などで検出できるように、微生物中に物理的または化学的变化を起こすDNA配列を含むように変化させる。

#### 【0017】

異なる種類のバイオ粒子を分析する日常分析においては、対照サンプルは各タイプのバイオ粒子を所定数含み、バイオ粒子のそれぞれのタイプは、タグ付けされたバイオ粒子の各タイプが簡単に同定できるような方法でタグ付けされる。一例としては、バイオ粒子の各タイプに異なる蛍光活性剤を用いてタグ付けする。

たとえば、フルオレセインまたはローダミンなど、緑色、赤色、黄色、橙色または青色の蛍光を発するさまざまな種類の染料が市販されている（たとえば、Haugland、1998参照）。

#### 【0018】

生物的性質はタグ付けする前または後で、X線不活性化、急速凍結、化学的不活性化などの確立された方法により不活性化して安定化する。この不活性化は、バイオ粒子の化学的または物理的特性には影響を与えず、試験においてバイオ粒子は試験条件でテストされるバイオ粒子と同様に挙動する。

#### 【0019】

タグ付けされたバイオ粒子は、対照が内部対照になっているから、分析プロセスの中で検出される。日常分析のタイプは、実施する特定の診断分析に用いる分析システムにより決まる。一例として、水質は水サンプルの微生物やプロトゾアなどの異なるタイプのバイオ粒子を同定することができる高倍率の顕微鏡分析により測定される。

#### 【0020】

その他の診断分析では、細胞をそれぞれの物理特性に応じて容易に分類することができるフローサイトメトリーを用いることもできる（Shapiro、1995）。食品分析、および血液、痰、脳脊髄液、糞便などの生物学的液体の分析における水またはその他の可搬性液体中の微生物などのバイオ粒子の分析は、顕微鏡分析、フローサイトメトリー、サイトメトリー、レーザー走査サイトメトリー、共焦点顕微鏡、あるいは水および食品分析、医療診断テスト、細胞培養、組織培養伝染性および動物伝染性分析などで通常用いられている確立された分析技法などの方法を用いて行われる。また、酵素結合免疫吸収分析（ELISA）、比色検出および免疫蛍光法などの免疫検出法、あるいはDNAまたはRNAプローブハイブリダイゼーション、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの核酸検出法も用いることができる。

#### 【0021】

バイオ粒子の検出をどのような種類の分析法で行なうとしても、サンプルに所定容量のバイオ粒子の対照サンプルを加え、分析を実施し、分析サンプル中に検

出されるタグ付きバイオ粒子の割合を確定し、それを添加したタグ付きバイオ粒子の所定数と比較し、試験精度の指標とする。これを本発明の特徴である数値化(enumeration)と呼ぶ。この方法では、対照サンプル中のタグ付きバイオ粒子の正確な数は既知/所定のものであり、試験で対照サンプルを添加した後、正確な数、または絶対数を測定して分析効率の指標とする。分析効率の指標は、次にサンプル中に存在するテスト微生物の数を計算するために利用される。具体的には、検出されたタグ付きバイオ粒子の数を試験用に添加した数量と比較することによって、回収率が得られる。たとえば、もし10個のタグ付きバイオ粒子を添加し、該粒子の分析に供した場合に、8個のタグ付きバイオ粒子が分析で検出されれば、回収率は80%となる。これはこの試験におけるタグ付けされていない粒子の回収率/検出率の直接的な指標となる。

#### 【0022】

本発明のさらなる視点では、可搬性液体中のバイオ粒子の分析における内部検定を行うための方法を提供するが、この方法は、バイオ粒子のサンプルを用意し、該サンプルに検出可能なタグを付け、規定数量のタグ付きバイオ粒子を規定容量のサンプル中に含む内部対照のサンプルを作り、前記内部対照サンプルを試験サンプルに添加し、該サンプルを分析し、サンプル中のタグ付きバイオ粒子の割合を確定する手順を包含し、テストサンプル中に検出されたタグ付きバイオ粒子の数をサンプルに添加した既知量のタグ付きバイオ粒子と比較することによって分析精度の1つの指標が得られるものである。

好ましくは、可搬性液体は水であり、検出されるバイオ粒子はクリプトスポリジウム(Cryptosporidium)やギアリダ(Giardia)などである。\_\_\_\_\_

#### 【0023】

本発明のさらなる視点として、所定数量のバイオ粒子を包含し、該バイオ粒子が日常分析にかけられるタイプのものであり、該所定数量のバイオ粒子が検出可能なタグが付けられたタグ付きバイオ粒子であって、規定容量のキャリア中に入れられたものであることを含む内部検定用標準を提供する。

前述のようにタグ付けされたバイオ粒子は、たとえばフローサイトメトリーにより細胞をそれらの物理的特性に基づいて分離する方法(Shapiro, 1995; Vesey

ら、1994)、または当分野の標準的なその他の技法により、所定容量のキャリア中に所定数を入れた形にする。

規定数量のタグ付きバイオ粒子は容器中に入れられ、これにより当該タグ付きバイオ粒子を試験サンプル中に容易に添加できるようにする。

#### 【0024】

本発明は、たとえば微生物などのバイオ粒子のサンプル中の存在をテストするのに広い応用範囲を持っている。具体的な重要な1つの分野は、水質テストに関わる検定試(quality control)である。可搬性の水は通常、微生物の存在、特にクリプトスポリジウム(*Cryptosporidium*)やギアリアダ(*Giardia*)の存在をテストする。検出は、緑色蛍光染料を用いてシストやオーシストを染色する免疫蛍光技法による。染色されたサンプルはエピ蛍光顕微鏡を用いて測定され、緑色蛍光シストとオーシストの数を記録する。前述のように、この方法の性能をモニターするためには厳格な検定試験手順で行うことが重要である。本発明は分析されたあらゆるサンプルの分析の質をモニターすることができる。水サンプルには、たとえば青色蛍光染料でタグ付けされた既知数のタグ付きシストとオーシストを加える。サンプルは緑色蛍光を発するシストとオーシストについて検査し、さらにこれらのシストまたはオーシストが内部標準であるかどうか確認するための試験が行われる。これらのシストとオーシストは、単純にそれらが青色の蛍光を発しているかおよび緑色の蛍光を発しているかを調べる。青色ではなくて緑色蛍光が検出されたシストまたはオーシストは内部標準のものではない。この方法においては、標識を付した微生物を識別するさまざまな蛍光染料を使用することができる。前述のようにその他の標識技法ももちろん利用することができる。

#### 【0025】

水質の分野では、蛍光染料またはその他の標識化剤と結合させる前に、シストおよびオーシストをガンマ線照射で不活性化するのが便利である。タグ付けされた微生物は、前述のように通常不活性化される。既知数の標識されたシストとオーシストを試験管に正確に入れるために、フローサイトメトリーが通常用いられる。試験管は密封され、かつサンプルを滅菌し、保存寿命を延ばすために、たとえばガンマ線を照射する。サンプルは、水質の標準試験で使用するまで低温、た

例えば4、で保存される。

#### 【0026】

本明細書に記述した発明により、内部対照バイオ粒子、たとえば対照細胞の正確な数値化が可能となる。先行技術とは明らかに一線を画すものであるこの数値化は、分析精度の検定を可能とするためにはサンプル中のテスト微生物の正確な数または絶対数を測定することが極めて重要なことであり、必要不可欠のものである。

前述のように、本発明は、たとえば、食品、水またはその他の可搬性液体、血液、尿、糞便、食品などに含まれるバクテリア、プロトゾア、酵母、菌類またはウイルスなどの微生物またはその他のバイオ粒子の検出に広い応用範囲を持っている。

#### 【0027】

##### 【実施例】

次に本発明を以下の実施例を参照して説明する。

##### 実施例1

Cryptosporidium及び Giardia \_\_\_\_\_

Cryptosporidium parvumオーシストを、自然汚染されたシドニーの新生子牛の集合糞便から精製する。糞便サンプルを遠心分離（2000g、10分間）し、水の中に2回再懸濁させ、次に5倍量の1%（w/w）NaHCO<sub>3</sub>中に再懸濁させる。次に脂肪性物質を1容量のエーテルで2回抽出し、次いで遠心分離（2000g、10分間）する。ペレットを水に再懸濁させ、予め湿潤した非吸着性脱脂綿の層を通して濾過する。濾過液を次に10容量の55%（w/v）蔗糖溶液の上に入れ、遠心分離（2000g、20分間）する。オーシストを蔗糖の界面から回収し、目に見える汚染物質が検出されなくなるまで蔗糖浮選工程を繰り返す。精製されたオーシストを氷冷70%（v/v）エタノールで30分間表面滅菌し、リン酸緩衝生理食塩水（150mmol/l NaCl、15mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、20mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、27mmol/l KCl、pH7.4：PBS）中で1回洗浄し、約1×10<sup>7</sup>オーシスト/mlの濃度にPBSで希釈し、4で保存した。

Giardia lambliaシストはWaterborne Inc. (米国ニューオリンズ) から購入した。

#### 【0028】

シストおよびオーシストへのフルオロクロムの結合

結合させる前に、シストおよびオーシストのサンプルを冷凍(-80)してシストとオーシストの壁を破壊した。

約 $1 \times 10^7$ のシストとオーシストを含むアリコート(200  $\mu$ l)を、12000 gで2分間遠心分離し、上澄み液を取り除いて廃棄した。シストとオーシストを0.1 M重炭酸ナトリウム(pH 8.3)の中に再懸濁させた。この洗浄手順を2回繰り返した。

#### 【0029】

青色フルオロクロムAlexa 350カルボン酸、サクシニミジルエステル(Alexa 350-Molecular Probes、米国ユージーン)を、ジメチルスルホキシド(DMSO)に濃度1 mg/mlで溶解させた。

フルオロクロム/DMSO混合液のアリコート(10  $\mu$ l)を、200  $\mu$ lのシストとオーシストの懸濁液に加えた。サンプルを完全に混合し、室温で30分間インキュベートした。次にサンプルを12000 gで2分間遠心し、上澄み液を取り除いて廃棄した。シストとオーシストを0.1 M重炭酸ナトリウム中に再懸濁させた。この洗浄手順を2回繰り返した。

#### 【0030】

アリコートの調製

標識されたシストとオーシストをフローサイトメトリーを用いて6 mlプラスチック試験管に正確に取り分けた。標識シストとオーシストを分析するためにBeckon Dickinson FACScaliburフローサイトメーターを用いた。シストまたはオーシストの蛍光および/または光散乱特性を定義し、これらの性質を用いて、標識シストおよびオーシストのサンプルから100個の標識シストとオーシストを分別した。分別したシストとオーシストを試験管中に取り分けた。

分別されたシストとオーシストはすべて標識されていることが重要である。もし無標識シストまたはオーシストがサンプル中に残っていると、間違った陽性の

結果が出ることになる。

正確な数のシストとオーシストが確実に取り分けられているように検定試験を実施した。ここで、シストとオーシストを数値化するためにマイクロ顕微鏡またはフローサイトメトリーを用いて試験管の比率を分析した。試験管を秤量し、範囲外の重量のものは処分した。

#### 【0031】

##### 水サンプルへの対照物質の接種

水サンプルを容器に集め、濃縮するために研究所に送るか、サンプル採集場所でサンプルを濃縮した。濃縮のために研究所に送られるサンプルは通常10ないし100リットルの範囲である。これらのサンプルに以下の接種方法を用いて対照サンプルを接種した：

- 1) 2 mlの0.05% (v/v) トウイーン80を対照物質の試験管に添加し、
- 2) キャップを戻して、激しく攪拌する。
- 3) キャップを取り、対照物質をサンプル中に注入する。
- 4) 3 mlの0.05% (v/v) トウイーン80を対照物質の試験管に添加する。
- 5) キャップを戻して、激しく攪拌する。
- 6) キャップを取り、対照物質をサンプル中に注入する。

工程4、5および6を繰り返す。

サンプルを、通常の方法、例えば膜濾過、カートリッジ濾過、プリーツ膜カートリッジ濾過、凝集または渦流濾過などを用いて濃縮した (Avon、1999; Veseyら、1994)。

もしサンプルを採集場所で濃縮する場合は、カートリッジ濾過装置など可搬式の濃縮方法を用いる。フィルタカートリッジにはサンプルの濃縮前に対照物質を接種しておかなければならない。フィルタカートリッジの接種には前述の接種方法が適当である。

カートリッジフィルタのメーカーは、製造プロセス中にフィルタに接種することができる。水サンプルを濃縮するために使用したフィルタを分析研究所に送り

返し、フィルタに集められた粒子状物質を溶出させ、さらに濃縮する。

### 【0032】

分析

濃縮サンプルから、藻類および鉱物粒子などの夾雑物粒子を除去する処理をする。濃縮水からシストおよびオーシストを精製するためには、浮遊分離、免疫磁気分離 (IMS) およびフローサイトメトリーなどの方法が通常用いられる (Veseyら、1994; 著者不明、1999)。

精製したサンプルは、次に顕微鏡ガラス・スライドまたは小さな膜フィルタ (13mm) に移す。このスライドまたは膜をイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) で染色したモノクローナル抗体で染色し、インキュベートおよび洗浄し、エピ蛍光顕微鏡を用いて測定する (Veseyら、1993; 著者不明、1999)。たとえば、12倍接眼レンズおよび20倍対物レンズ (Fluor 20) を備えたニコンOptiphot 2エピ蛍光顕微鏡でサンプルを試験する (Veseyら、1993; 著者不明、1999)。フルオロクロムイソチオシアン酸フルオレセインFITC標識サンプルの試験にはDM510フィルタブロックを用いる。膜またはスライドを注意深く走査して、シストとオーシストを検出する。

### 【0033】

緑色蛍光シストまたはオーシストが検出された場合、異なる光学フィルタを用いて青色に蛍光発色するかどうかを確認することにより、対照シストとオーシストであることを同定する。Alexs 350標識対照シストおよびオーシストからの青色蛍光を検出するためにDM450フィルタブロックを用いる。

膜全体を走査した後、サンプル中に検出されたシストとオーシストの合計数を、青色蛍光が検出されたシストとオーシストの数と比較する。次に、これらの数字を回収効率ならびに水サンプル中に存在するシストとオーシストの実際の数に計算するために用いる。ある実施例では、サンプルに100個の青色対照シストと100個の青色対照オーシストを接種した。このサンプルの分析の結果、50個の青色シストと30個の非青色シストならびに50個の青色オーシストと10個の非青色オーシストが検出された。この分析の回収効率は、シストおよびオーシストの両方とも50%である (100個接種し、50個だけが検出された)。

したがって、このサンプルは60個のシストと20個のオーシストを含んでいた。

#### 【0034】

本明細書およびそれに続く請求項においては、文脈上他の解釈を必要としない限り、“含む(comprise)”という用語ならびに“含む(comprises)”または“含んでいる(comprising)”などの変形語は、表示した数字または工程あるいは数字群または工程群を含むが、その他の数字または工程あるいは数字群や工程群を除外するものではないと理解するものとする。

#### 【0035】

##### 参考文献

著者不明. 試験法1623:濾過/IMS/FA法による水中のクリプトスポリジウムとギアリダ(Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA)、米国水質管理局EPA-821-R-99-006、環境保護庁、ワシントンD.C.20460、1999年4月。

Yeomans, C.; Porteous, F.; Paterson, E.; Meharg, A and Killham, K., 1999年、有機炭素化合物報告のためのルクス標識シュードモナス蛍光分析の評価(Assessment of Lux-marked Pseudomonas fluorescens for reporting on organic carbon compounds)、FEMS Microbiology Letters、176巻、1号、79-83頁。

Grondahl, G.; Johannisson, A. and Jensen-Waern, M.; 1997年、異なる献体からのウマ血漿のオプソニン効果(Opsonic effect of equine plasma from different donors)、Veterinary Microbiology、56巻、3-4号、227-235頁。

Doi, N. and Yanagawa, H., 1999年、誘導進化によるアロステリック部位を有する緑色蛍光タンパク質をベースとした汎用バイオセンサの設計(Design of generic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution)、FEBS Letters、453巻、3号、305-307頁。

Chaka, W.; Schrringa, J.; Verheul, A.F.M.; Verhoef, J.; Van Strijp

, A. G. ; Hoepelman, I. M.、1995年、フローサイトメトリーを用いたヒト末梢血液単核細胞による食細胞活動とクリプトコックス新生阻止の定量分析 (Quantitative analysis of phagocytosis and killing of cryptococcus neoformans by human peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry)、Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology、2巻、6号、753 - 759頁。

Haugland and, R. P. 1998、年、蛍光プローブハンドブック (Handbook of fluorescent probes)、Molecular Probes、米国ユージーン (www.probes.com)。

Shapiro, H. M.、1995年、フローサイトメトリーの実践的ガイド (A practical guide to flow cytometry)、3版、A. R. Liss、ニューヨーク。

Vesey, G. , Hutton, P. E. , Champion, A. C. , Ashbolt, N. J. , Williams, K. L. , Warton, A. , and Veal, D. A.、1994年、水中のクリプトスポリジウムとギアリダの日常検出のためのフローサイトメトリー法の応用 (Application of flow cytometric methods for the routine detection of Cryptosporidium and Giardia in Water)、Cytometry、16号、1 - 6頁。

Vesey, G. ; Narai, J ; Ashbolt, N. , Williams, K. L. and Veal, D. A.、1994年、フローサイトメトリーを利用した環境サンプル中の特定微生物の検出 (Detection of specific microorganisms in environmental samples using flow cytometry)、Methods in Cell Biology、42巻 - Flow Cytometry 第2版、Darzynkiewicz, Z. , Robinson ; J. P. and Crissaman, H. A. 編、489 - 522頁、Academic Press Inc.、ニューヨーク。

## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU00/00896															
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>																	
Int. Cl. <sup>7</sup> : C12M 1/34, C12Q 1/06, C12Q 1/24, G01N 033/52, G01N 033/53, G01N033/533, G01N 33/569, G01N 33/58, G01N 33/96, G01N 37/00																	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>																	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M 1/34, C12Q 1/06, C12Q 1/24, G01N 033/52, G01N 033/53, G01N033/533, G01N 33/569, G01N 33/58, G01N 33/96, G01N 37/00																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, WPAT, JAPIO, esp@ce, PubMed, Delphion																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	US 5741662 by Madsen et al, date of patent 21 April 1998 which relates to a diagnostic internal control method comprising one or more labelled bacteria or protozoa as a sample, in a defined volume of carrier, adding the dye tagged or fluorescent tagged sample to an assay sample, and relating the accumulation of the tagged bioparticle to the assay sample. See columns 4 to 8, 13	Claims 1 to 25															
A	GB 2057685 by Int Diagnostic Tech (WO 80/02076 published 2 October 1980) relating to the use of independent tagging for quality control and internal calibration (standardization) of the assay.	1-25															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex																	
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="width: 33%;">"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family																
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 15 November 2000		Date of mailing of international search report 21 DEC 2000															
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer <b>A. HARVIE</b> Telephone No : (02) 6283 2552															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/AU00/00896

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
GB	2057685	CA	1137410	JP	55126856	WO	8002076
		EP	26176	US	4385126		
US	5741662	WO	9722714				

END OF ANNEX

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA28 CA25 CA26 CB03 CB08  
CB21 CB30 FA16 FB07 FB12  
GC15 JA02  
2G054 AA06 CA20 CD04 CE02 EA03  
JA08  
4B063 QA19 QQ03 QQ05 QQ16 QQ18  
QQ20 QQ79 QR48 QR56 QR58  
QR74 QS03 QS40 QX01

专利名称(译)	内部认证测试方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003506029A</a>	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2001514075	申请日	2000-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	比蒂Efupi三通怀有限公司		
申请(专利权)人(译)	比蒂°FPitiwai有限公司		
[标]发明人	ベシィーグラハム		
发明人	ベシィーグラハム		
IPC分类号	G01N33/48 C12Q1/06 G01N21/78 G01N33/18 G01N33/533 G01N33/96		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/96		
FI分类号	C12Q1/06 G01N21/78.C G01N33/18.F G01N33/48.M		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB08 2G045/CB21 2G045/CB30 2G045/FA16 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA02 2G054/AA06 2G054/CA20 2G054/CD04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/JA08 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ05 4B063/QQ16 4B063/QQ18 4B063/QQ20 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QR74 4B063/QS03 4B063/QS40 4B063/QX01		
优先权	1999PQ1961 1999-08-02 AU		
其他公开文献	JP2003506029A5 JP4683604B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

准备一组生物颗粒，将永久性和可检测的标签附着到这些生物颗粒中的每一个上，以将其转化为标记的生物颗粒，然后将一定数量的标记的生物颗粒放入内部定义体积的载体中 制作一个对照（内标）样品，将对照样品添加到测试样品中以检测生物颗粒，执行测试，然后确定在测试样品中检测到的标记生物颗粒的确切数量 然后，提供一种通过与添加的带标签生物颗粒的数量进行比较来获得分析准确度指标的方法，用于分析便携式液体中生物颗粒的内部测试方法以及提供内部测试标准的方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/AU/00/00896</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl. <sup>7</sup> : C12N 1/24, C12Q 1/06, C12Q 1/24, G01N 033/52, G01N 033/53, G01N033/533, G01N 33/569, G01N 33/58, G01N 33/96, G01N 33/96		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/24, C12Q 1/06, C12Q 1/24, G01N 033/52, G01N 033/53, G01N033/533, G01N 33/569, G01N 33/58, G01N 33/96, G01N 33/96		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, WPAI, JAPIC, esp@nce, PubMed, Delphion		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>b</sup>	Relevant to claim No.
X	US 5741662 by Madocou et al, date of patent 21 April 1998 which relates to a diagnostic internal control method comprising one or more labeled bacteria or protozoa as a sample, in a defined volume of carrier, adding the dye tagged or fluorescent tagged sample to an assay sample, and relating the accumulation of the tagged bioparticle to the assay sample. See columns 4 to 8, 13	Claims 1 to 25
A	GB 2057685 by Inc Diagnostic Tech (VO) 80/02076 published 2 October 1980 relating to the use of independent tagging for quality control and internal calibration (standardization) of the assay.	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
<b>* Special categories of cited documents:</b>		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but called to understand the preamble or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or obvious in combination with or over the document in question	
"R" document which may have double or priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special basis of novelty	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"R" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search I.S. No. 2000/0000	Date of mailing of the international search report 2000/0000	
Name and mailing address of the ISA/O AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 996, WOOLLEN, ACT 2206, AUSTRALIA E-mail address: ipa@pvt.gov.au Facsimile No. (02) 6382 3929	Authorized officer <b>A. HARVEY</b> Telephone No. (02) 6283 2552	