

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4683604号
(P4683604)

(45) 発行日 平成23年5月18日 (2011.5.18)

(24) 登録日 平成23年2月18日 (2011.2.18)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06
G O 1 N 21/78 (2006.01)	G O 1 N 21/78 C
G O 1 N 33/18 (2006.01)	G O 1 N 33/18 F
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 M

請求項の数 20 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2001-514075 (P2001-514075)	(73) 特許権者	502039713
(86) (22) 出願日	平成12年7月27日 (2000.7.27)		ビーティーエフ ビーティワイ リミテッ ド
(65) 公表番号	特表2003-506029 (P2003-506029A)		オーストラリア 2 1 1 3 ニュー サウ ス ウェールズ州 ノースライド ウォー タールー ロード 3 5 - 4 1 ユニット 1
(43) 公表日	平成15年2月18日 (2003.2.18)		
(86) 国際出願番号	PCT/AU2000/000896	(74) 代理人	110000774
(87) 国際公開番号	W02001/009281		特許業務法人 もえぎ特許事務所
(87) 国際公開日	平成13年2月8日 (2001.2.8)	(74) 代理人	100090941
審査請求日	平成19年5月23日 (2007.5.23)		弁理士 藤野 清也
(31) 優先権主張番号	PQ 1961	(74) 代理人	100113837
(32) 優先日	平成11年8月2日 (1999.8.2)		弁理士 吉見 京子
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100076244
			弁理士 藤野 清規

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内部精度管理法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、微生物学的試験法の精度又は効率を較正するための又は測定するための方法。

(a) ある種類の微生物を含むことが疑われる試験サンプルに対照サンプルを接種する工程、

ここで、当該対照サンプルは当該種類の微生物を改変した形の微生物を規定数含み、当該改変微生物は前記試験サンプル中の対応する無改変微生物から識別されるための検出可能なタグを含む、

(b) 当該無改変微生物及び当該改変微生物を検出し、かつ、それぞれの数を測定するように対照サンプルと試験サンプルの混合物に対して前記試験法を実施する工程、及び、

(c) 当該種類の微生物についての前記試験法の効率が示されるように、前記試験法によって検出された改変微生物の数と対照サンプルに含まれる改変微生物の規定数とを比較する工程、

ここで、検出された改変微生物の数と対照サンプルに含まれる改変微生物の規定数とを比較した場合の回収率が、当該種類の微生物についての試験法の効率を示す

【請求項 2】

当該対照サンプルが少なくとも2種類の改変微生物を含み、当該試験法がそれぞれの微生物の種類に応じて較正できるものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

10

20

微生物の種類がバクテリア、プロトゾア、酵母、菌類及びウイルスからなる群から選択されたものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

微生物の種類がクリプトスポリジウム、ギアリダ、シクロスポーラ、トキソプラズマ、アイメリア、レジオネラ、サルモネラ、レプトスピラ、エシェリヒア、酵母菌、クロストリジウム、ビブリオ、シュードモナス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ノーウォークウイルス、単純性疱疹ウイルスからなる群から選択されたものである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

微生物の種類がクリプトスポリジウムである請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

微生物の種類がギアリダである請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

当該改変微生物が生存できないように不活性化されたものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

当該改変微生物が検出可能なタグを微生物の表面の分子に付着させたものであるか又は微生物の内部に存在させたものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

当該改変微生物が当該検出可能なタグを提供するために化学処理によって又は遺伝子操作によって改変されたものである請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 10】

当該改変微生物がその外表面に検出可能なタグを付着させたものである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

当該検出可能なタグが、当該改変微生物を試験法が行われるサンプル中にある対応する無改変微生物から識別できるようにするやり方で、微生物の化学的特性を変える若しくは微生物の物理的特性を変える又は微生物の化学的特性と物理的特性の両方を変える請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

当該検出可能なタグが蛍光タグである請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 13】

当該蛍光タグが赤、青又は緑のフルオロクロムである請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

対照サンプル中の改変微生物の規定数が 1 から 100000 である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

対照サンプル中の改変微生物の規定数が約 100 である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

対照サンプル中の規定数の改変微生物が規定容量の希釈液の中にあるものである請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 17】

当該規定容量の上限が約 10 mL である請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

当該試験法が水又はその他の飲用液、食品、血液、痰、粘液、尿及び脳脊髄液からなる群から選択されたサンプル中の微生物の検出のためのものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

当該飲用液がフルーツジュース、ワイン、ビール、ミルク又はサイダーであり、また、当該食品が鶏肉、牛肉、卵、チーズ又は保存用肉類である請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

50

当該水サンプル中の微生物を検出するための試験法が顕微鏡観察によるものである請求項 18 に記載の方法。

【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精度管理法(internal quality control)に関する。特に、本発明は、水またはその他の飲用液、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、プリオンなどの検出のような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。

10

【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観察を用いて検査し、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、厳格な精度管理法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、精度管理法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。そうした精度管理法は、典型的には10~20個のサンプルを分析した後に行われる。こうした外部精度管理法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当なことがある。さらに、もし精度管理法の結果が悪い場合、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い。

20

同じ状況は、外部精度管理法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、かつ再現可能な精度管理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】

30

[発明の要旨]

本発明の第1の視点では、生体粒子の個体群を用意し、これらの生体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生体粒子に改変させ、規定数量の該タグ付き生体粒子を規定容量のキャリアヤに入れた内部対照サンプルを作り、前記生体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生体粒子の正確な数を測定し、添加したタグ付き生体粒子の数と比較して分析精度を測定することを含むことを特徴とする診断用内部精度管理法を提供する。

【0005】

本発明のさらなる視点では、飲用液中の生体粒子の分析における内部精度管理法を行うための方法を提供する。この方法は、生体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生体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生体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生体粒子の数をサンプルに添加した既知量のタグ付き生体粒子と比較することによって、分析精度の1つの指標と実際の生体粒子数を得、分析実施中に生体粒子が失われることを容認する方法である。

40

【0006】

本発明のさらなる視点として、予め決めた数量の生体粒子を含み、前記生体粒子が日常分析にかけられるタイプのものであり、前記予め決めた数量の生体粒子が検出可能なタグが付けられたタグ付き生体粒子であって、規定容量のキャリアヤ中に入れられたものである

50

ことを特徴とする内部精度管理法用標準を提供する。

【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】

本発明は内部精度管理法に関わるものであり、タグ付き生体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生体粒子の数を、サンプルに添加した既知数の生体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。

10

【0009】

本発明の第1の視点では、生体粒子の個体群を用意し、これらの生体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生体粒子に変化させ、規定数量の該タグ付き生体粒子を規定容量のキャリヤに入れた内部精度管理法用サンプルを作り、該生体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、その後試験サンプル中に検出されたタグ付き生体粒子の絶対数を測定し、添加したタグ付き生体粒子の数と比較することで試験精度が測定されるという手順を含む診断用内部精度管理法を提供する。

【0010】

20

これらの生体粒子は、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生体粒子から選択することができる。そうした生体粒子の例としては、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】

30

生体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、サイダーなどの飲用液である。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の食品でもよい。サンプルは、血液、脳脊髄液、尿、組織抽出物、糞便などの形でよい。

【0012】

対照生体粒子を含む生体粒子は、生体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フルオロフォア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、フルオロフォアが蛍光を発し、これによってフルオロフォアでタグ付けされた生体粒子を同定することができる。タグ付けされていない生体粒子は、そうした条件下では蛍光を発しない。標識生体粒子の密度、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、ならびに生体粒子の化学的および/または物理的特性を改変させるために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(Catrin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

40

50

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、あるいは生体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】

生体粒子中の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にインターカレートする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、ウイルスなどの生体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、フルオロフォアの溶液に、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 ϵ -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 ϵ -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】

異なる種類の生体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生体粒子を予め決めた数含み、生体粒子のそれぞれのタイプは、タグ付けされた生体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、生体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】

生物学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、生体粒子の化学的または物理的特性には影響を与えず、試験において生体粒子は試験条件でテストされる生体粒子と同様に挙動する。

【0019】

タグ付けされた生体粒子は、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生体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

10

20

30

40

50

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飲用液中の微生物などの生体粒子の分析は、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、共焦点顕微鏡観察、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、酵素結合免疫吸着検定法(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ブ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】

生体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、サンプルに予め決めた数量の生体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生体粒子の割合を測定し、それを添加したタグ付き生体粒子の予め決めた数と比較し、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生体粒子の正確な数は既知/予め決めたものであり、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生体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個のタグ付き生体粒子を添加し、該粒子の分析に供した場合に、8個のタグ付き生体粒子が分析で検出されれば、回収率は80%となる。これはこの試験法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、飲用液中の生体粒子の分析における内部精度管理法を行うための方法を提供するが、この方法は、生体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生体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生体粒子の割合を測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生体粒子の数をサンプルに添加した既知量のタグ付き生体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、飲用液は水であり、検出される生体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、予め決めた数量の生体粒子を包含し、該生体粒子が日常分析にかけられるタイプのものであり、該予め決めた数量の生体粒子が検出可能なタグが付けられたタグ付き生体粒子であって、規定容量のキャリヤ中に入れられたものであることを含む内部精度管理法用標準を提供する。

前述のようにタグ付けされた生体粒子は、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、予め決めた容量のキャリヤ中に予め決めた数を入れた形にする。

規定数量のタグ付き生体粒子は容器中に入れられ、これにより当該タグ付き生体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生体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精度管理法(quality control)である。飲用水は通常、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観察を用いて測定され、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精度管理法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。

10

【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、たとえば4℃で保存される。

【0026】

本明細書に記述した発明により、内部対照生体粒子、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、分析精度の評価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。

20

前述のように、本発明は、たとえば、食品、水またはその他の飲用液、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生体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

30

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)NaHCO₃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 KH₂PO₄、20 mmol/l Na₂HPO₄、27mmol/l KCl、pH7.4:PBS)中で1回洗浄し、約1x10⁷オーシスト/mlの濃度にPBSで希釈し、4℃で保存した。

40

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1x10⁷のシストとオーシストを含むアリコート(200 µl)を、12000g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0.1M重炭酸ナトリウム(pH8.3)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Alexa350カルボン酸、サクシニミジルエステル(Alexa 350-Molecul

50

ar Probes、米国ユージーン)を、ジメチルスルホキシド(DMNSO)に濃度1mg/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 μ l)を、200 μ 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12000g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0.1M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6ml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Becton Dickinson FAC Scalibur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精度管理法を実施した。ここで、シストとオーシストを数値化するために顕微鏡観察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)2ml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)3ml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、ブ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;Anon、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、エピ蛍光顕微鏡観察を用いて測定する(Veseyら、1993;Anon、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Optiphot2エピ蛍光顕微鏡でサンプルを試験する(Veseyら、1993;Anon、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。Alexs350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

Anon. 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 andKillham,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)、FEB S 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、米国ユーグーン(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 f

10

20

30

40

50

low 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。

フロントページの続き

(72)発明者 ベシー・グラハム
オーストラリア ニュー サウス ウェールズ州 2 1 1 1 グレーズヴィレ メイキンソン ス
トリート 1 0

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 特開平 1 1 - 0 1 8 7 6 7 (J P , A)
特開平 1 1 - 0 0 0 1 9 3 (J P , A)
特表 2 0 0 1 - 5 2 1 1 7 2 (J P , A)
特表 2 0 0 0 - 5 0 7 1 7 1 (J P , A)
国際公開第 9 7 / 0 0 8 2 0 4 (W O , A 1)
Cytometry, 16 (1994) p.1-6
Wat Sci Tech., 38[12] (1998) p.61-65
Proc AWWA Water Qual Technol Conf., (1997) p.1558-1576
Methods in Cell Biol., 42 (1994) p.489-522
Appl Environ Microbiol., 61[11] (1995) p.3849-3855
Appl Environ Microbiol., 63[10] (1997) p.3946-3949

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12Q 1/06
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	内部精度管理法		
公开(公告)号	JP4683604B2	公开(公告)日	2011-05-18
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		
当前申请(专利权)人(译)	比蒂°FPitiwai有限公司		
[标]发明人	ベシイーグラハム		
发明人	ベシイー・グラハム		
IPC分类号	C12Q1/06 G01N21/78 G01N33/18 G01N33/48 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		
优先权	1999PQ1961 1999-08-02 AU		
其他公开文献	JP2003506029A5 JP2003506029A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一群生物颗粒的方法，修改生物颗粒以永久地和可检测地标记每个生物颗粒以给出标记的生物颗粒，在限定体积的载体中形成标记的生物颗粒的限定量的内部质量控制样品，将对照样品加入到测定中用于检测相同生物颗粒的样品，进行所述测定，然后测定在测定样品中检测到的标记的生物颗粒的比例作为测定准确度的量度。还描述了用于在饮用流体中的生物颗粒的分析中提供内部质量控制的方法，以及内部质量控制标准。