JP 7016136 B2 2022.2.4

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)特　許　公　報（Ｂ２）　(11)特許番号

特許第7016136号

（Ｐ７０１６１３６）

(45)発行日　令和4年2月4日(2022.2.4)　(24)登録日　令和4年1月27日(2022.1.27)

(51)Int.Cl.			ＦＩ		
Ｃ１２Ｑ　1/04	*(2006.01)*		Ｃ１２Ｑ	1/04	
Ｃ１２Ｍ　1/34	*(2006.01)*		Ｃ１２Ｍ	1/34	Ｂ
Ｇ０１Ｎ　21/78	*(2006.01)*		Ｇ０１Ｎ	21/78	Ｃ
Ｇ０１Ｎ　21/77	*(2006.01)*		Ｇ０１Ｎ	21/77	Ｄ
			Ｃ１２Ｍ	1/34	Ｅ

請求項の数4

(21)出願番号　特願2017-99579(P2017-99579)
(22)出願日　平成29年5月19日(2017.5.19)
(65)公開番号　特開2018-038384(P2018-38384A)
(43)公開日　平成30年3月15日(2018.3.15)
審査請求日　令和2年3月17日(2020.3.17)
(31)優先権主張番号　特願2016-172515(P2016-172515)
(32)優先日　平成28年9月5日(2016.9.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　503360115
国立研究開発法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　230104019
弁護士　大野　聖二
(74)代理人　100149076
弁理士　梅田　慎介
(72)発明者　野地　博行
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内
(72)発明者　田端　和仁
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内

審査官　市島　洋介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】病原性微生物検出のための方法及びキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料中の前記病原性微生物を検出する方法であって、

前記病原性微生物を収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、前記生物試料と、前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、を含む親水性溶媒を導入する導入手順と、

前記空間に疎水性溶媒を導入して、前記収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ前記病原性微生物と前記物質を包含する、親水性溶媒の液滴を形成する封入手順と、

前記液滴中における前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物を光学的に検出する検出手順と、を含み、

前記反応は、疎水性溶媒と界面接触する親水性溶媒の液滴中において進行し、

前記親水性溶媒が、前記反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する、方法。

【請求項２】

前記病原性微生物がインフルエンザウイルスであり、前記酵素がノイラミニダーゼであり、前記物質がノイラミニダーゼによるノイラミン酸の加水分解によって光学的に検出可能となる発色団を含み、前記反応生成物が該発色団である、請求項１記載の方法。

【請求項３】
前記物質が４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃａｃｉｄ）であり、前記反応生成物が４－メチルウンベリフェロンである、請求項２記載の方法。
【請求項４】
病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料中の前記病原性微生物を検出するためのキットであって、
前記病原性微生物を収容可能な複数の収容部が疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、前記下層部における前記収容部が形成されている面に対して空間を隔てて対向している上層部とを備えるアレイと、
前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、
前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する親水性溶媒と、
疎水性溶媒と、を含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、病原性微生物検出のための方法及びキットに関する。より詳しくは、疎水性溶媒に被覆された親水性溶媒の極小容積中において、病原性微生物の表面又は内部の酵素による反応の結果生成する反応生成物を光学的に検出することによって病原性微生物の検出を行う方法等に関する。
【背景技術】
【０００２】
近年、イムノクロマトグラフィを用いた簡易なインフルエンザウイルス検査キットが開発されている（特許文献１参照）。イムノクロマトグラフィを用いる方法は、数分から数十分の間にインフルエンザウイルスを検出できるので、感染の診断や治療等に活用されている。
【０００３】
また、従来、インフルエンザウイルスが有する酵素であるノイラミニダーゼと発色基質との反応に基づいて光学的にインフルエンザウイルスを検出する技術が知られている（特許文献２、３参照）。発色基質としては、例えば、４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ　ａｃｉｄ：４ＭＵ－ＮＡＮＡ、特許文献２参照）や、４－アルコキシ－Ｎ－アセチルノイラミン酸又は４，７－ジアルコキシ－Ｎ－アセチルノイラミン酸の誘導体（特許文献３参照）などが用いられている。例えば、発色基質として４ＭＵ－ＮＡＮＡを用いた方法では、ノイラミニダーゼによる４ＭＵ－ＮＡＮＡの分解によって蛍光物質である４－メチルウンベリフェロンが生成する。生成した４－メチルウンベリフェロンの量に基づいてノイラミニダーゼの酵素活性値を算出することができ、さらに酵素活性値に基づいてインフルエンザウイルスの粒子数を定量することができる。
【０００４】
本発明に関連して、非特許文献１には、液滴がオイルで覆われており、外部から液滴に直接アクセス可能なフェムトリットルオーダーの液滴のアレイを用いて、一分子酵素アッセイを行う方法が記載されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【特許文献１】特開２００８－２７５５１１号
【特許文献２】特開２０１１－１３９６５６号
【特許文献３】特表２００２－５４１８５８号
【非特許文献】

【０００６】
【非特許文献１】S. Sakakihara et al., Lab Chip, 2010, 10, 3355-3362
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
上述のイムノクロマトグラフィに基づくインフルエンザウイルスの検出方法は、簡便ではあるものの、検出のために10^3～10^4ｐｆｕ／ｍｌ程度のウイルスが必要であり、検出感度が低いという問題がある。
【０００８】
そこで、本発明は、インフルエンザウイルス等のウイルスを高感度に検出するために利用可能な技術を提供することを主な目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
上記の課題を解決するために、本発明は、以下の［１］～［２５］を提供する。
［１］　病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料中の前記病原性微生物を検出する方法であって、
前記病原性微生物を収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、前記生物試料と、前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、を含む親水性溶媒を導入する導入手順と、
前記空間に疎水性溶媒を導入して、前記収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ前記病原性微生物と前記物質を包含する、親水性溶媒の液滴を形成する封入手順と、
前記液滴中における前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物を光学的に検出する検出手順と、を含み、
前記親水性溶媒が、前記反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する、方法。
［２］　前記反応生成物の検出強度に基づいて前記病原性微生物の数及び／又は亜種を決定する手順をさらに含む、［１］の方法。
［３］　前記病原性微生物がインフルエンザウイルスであり、前記酵素がノイラミニダーゼであり、前記物質が４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ ａｃｉｄ）であり、前記反応生成物が４－メチルウンベリフェロンである、［１］又は［２］の方法。
［４］　前記病原性微生物がコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）コロナウイルス、中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）ウイルス、ムンプウイルス、麻疹ウイルス、ニパウイルス、イヌジステンパーウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス、ヒトＴ細胞白血病ウイルス（ＨＴＬＶ）、エボラウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、狂犬病ウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス及びノロウイルスからなる群より選択される一以上であり、前記酵素がヘマグルチニンエステラーゼ、ノイラミニダーゼ、逆転写酵素及びＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼからなる群より選択される一以上である、［１］又は［２］の方法。
［５］　前記物質が４－メチルウンベリフェロン（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｏｎｅ）を含む誘導体、フルオレセイン（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ）を含む誘導体、レゾルフィン（Ｒｅｓｏｒｕｆｉｎ）を含む誘導体及びローダミン（Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）を含む誘導体からなる群より選択される一以上である、［１］又は［２］の方法。
【００１０】
［６］　病原性微生物の感染の有無を診断する方法であって、
感染した疑いがある対象から生物試料を分離する手順と、

前記病原性微生物を収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、前記生物試料と、前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、を含む親水性溶媒を導入する導入手順と、
前記空間に疎水性溶媒を導入して、前記収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ前記病原性微生物と前記物質とを包含する、親水性溶媒の液滴を形成する封入手順と、
前記液滴中における前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物を光学的に検出する検出手順、（ここで、前記反応生成物の検出は、前記病原性微生物の感染を示す）と、
を含む、方法。
［７］　前記親水性溶媒が、前記反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する、［６］の方法。
［８］　前記反応生成物の検出強度に基づいて病原性微生物の数及び／又は亜種を決定する手順をさらに含む、［６］又は［７］の方法。
［９］　前記病原性微生物がインフルエンザウイルスであり、前記酵素がノイラミニダーゼであり、前記物質が４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ ａｃｉｄ）であり、前記反応生成物が４－メチルウンベリフェロンである、［６］～［８］のいずれかの方法。
［１０］　前記病原性微生物がコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）コロナウイルス、中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）ウイルス、ムンプウイルス、麻疹ウイルス、ニパウイルス、イヌジステンパーウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス、ヒトＴ細胞白血病ウイルス（ＨＴＬＶ）、エボラウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、狂犬病ウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス及びノロウイルスからなる群より選択される一以上であり、前記酵素がヘマグルチニンエステラーゼ、ノイラミニダーゼ、逆転写酵素及びＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼからなる群より選択される一以上である、［６］～［８］のいずれかの方法。
［１１］　前記物質が４－メチルウンベリフェロン（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｏｎｅ）を含む誘導体、フルオレセイン（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ）を含む誘導体、レゾルフィン（Ｒｅｓｏｒｕｆｉｎ）を含む誘導体及びローダミン（Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）を含む誘導体からなる群より選択される一以上である、［６］～［８］のいずれかの方法。
【００１１】
［１２］　病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料中の前記病原性微生物の薬剤感受性を検出する方法であって、
前記病原性微生物を収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、前記生物試料と、前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、前記酵素の阻害薬を含む親水性溶媒を導入する導入手順と、
前記空間に疎水性溶媒を導入して、前記収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ前記病原性微生物と前記物質と前記阻害薬とを包含する、親水性溶媒の液滴を形成する封入手順と、
前記液滴中における前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物を光学的に検出する検出手順、（ここで、前記阻害薬の存在下における前記反応生成物の検出強度が、前記阻害薬の非存在下における前記反応生成物の検出強度よりも減少する場合、前記病原性微生物が前記阻害薬に感受性を有することを示す）と、
を含む、方法。

［１３］　前記親水性溶媒が、前記反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する、［１２］の方法。

［１４］　前記病原性微生物がインフルエンザウイルスであり、前記酵素がノイラミニダーゼであり、前記物質が４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）であり、前記反応生成物が４－メチルウンベリフェロンであり、前記阻害薬がノイラミニダーゼ阻害薬である、［１２］又は［１３］の方法。

【００１２】

［１５］　抗病原性微生物薬剤をスクリーニングする方法であって、

病原性微生物を収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、前記病原性微生物と、前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、候補化合物とを含む親水性溶媒を導入する導入手順と、

前記空間に疎水性溶媒を導入して、前記収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ前記病原性微生物と前記物質と前記候補化合物とを包含する、親水性溶媒の液滴を形成する封入手順と、

前記液滴中における前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物を光学的に検出する検出手順、（ここで、前記候補化合物の存在下における前記反応生成物の検出強度が、前記候補化合物の非存在下における前記反応生成物の検出強度よりも減少する場合、前記候補化合物が抗病原性微生物活性を有することを示す）と、

を含む、方法。

［１６］　前記親水性溶媒が、前記反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する、［１５］の方法。

［１７］　前記病原性微生物がインフルエンザウイルスであり、前記酵素がノイラミニダーゼであり、前記物質が４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）であり、前記反応生成物が４－メチルウンベリフェロンであり、前記候補化合物としてノイラミニダーゼ阻害薬がスクリーニングされる、［１５］又は［１６］の方法。

【００１３】

［１８］　病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料中の前記病原性微生物を検出するためのキットであって、

前記病原性微生物を収容可能な複数の収容部が疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、前記下層部における前記収容部が形成されている面に対して空間を隔てて対向している上層部とを備えるアレイと、

前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、

前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する親水性溶媒と、

疎水性溶媒と、を含むキット。

［１９］　前記病原性微生物がインフルエンザウイルスであり、前記酵素がノイラミニダーゼであり、前記物質が４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）であり、前記反応生成物が４－メチルウンベリフェロンである、［１８］のキット。

［２０］　前記病原性微生物がコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）コロナウイルス、中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）ウイルス、ムンプウイルス、麻疹ウイルス、ニパウイルス、イヌジステンパーウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス、ヒトＴ細胞白血病ウイルス（ＨＴＬＶ）、エボラウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、狂犬病ウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス

、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス及びノロウイルスからなる群より選択される一以上であり、前記酵素がヘマグルチニンエステラーゼ、ノイラミニダーゼ、逆転写酵素及びＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼからなる群より選択される一以上である、［１８］のキット。

［２１］　前記物質が４－メチルウンベリフェロン（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｏｎｅ）を含む誘導体、フルオレセイン（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ）を含む誘導体、レゾルフィン（Ｒｅｓｏｒｕｆｉｎ）を含む誘導体及びローダミン（Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）を含む誘導体からなる群より選択される一以上である、［１８］のキット。

【００１４】

［２２］　疎水性溶媒と界面接触する親水性溶媒中において、酵素と、該酵素による反応の基質となる物質とを反応させ、反応生成物を検出する方法であって、

前記親水性溶媒が、前記反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する、方法。

［２１］　前記親水性溶媒が病原性微生物を含み、

前記酵素が前記病原性微生物の表面又は内部に存在する基質切断活性を有する酵素であり、

前記物質が発色基質であり、

前記酵素による前記発色基質の切断により生成する反応生成物を光学的に検出する、［２２］の方法。

［２２］　前記病原性微生物がインフルエンザウイルスであり、前記酵素がノイラミニダーゼであり、前記発色基質が４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）であり、前記反応生成物が４－メチルウンベリフェロンである、［２１］の方法。

［２３］　前記病原性微生物がコロナウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）コロナウイルス、中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）ウイルス、ムンプウイルス、麻疹ウイルス、ニパウイルス、イヌジステンパーウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス、ヒトＴ細胞白血病ウイルス（ＨＴＬＶ）、エボラウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、狂犬病ウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス及びノロウイルスからなる群より選択される一以上であり、前記酵素がヘマグルチニンエステラーゼ、ノイラミニダーゼ、逆転写酵素及びＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼからなる群より選択される一以上である、［２１］の方法。

［２４］　前記発色基質が４－メチルウンベリフェロン（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｏｎｅ）を含む誘導体、フルオレセイン（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ）を含む誘導体、レゾルフィン（Ｒｅｓｏｒｕｆｉｎ）を含む誘導体及びローダミン（Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）を含む誘導体からなる群より選択される一以上である、［２１］の方法。

［２５］　前記親水性溶媒が、前記病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料を含む、［２１」～［２４］のいずれかの方法。

【００１５】

本発明において、「病原性微生物」には、細菌及びウイルスが含まれるものとする。細菌としては、特に限定されないが、例えば大腸菌群や腸炎ビブリオ菌、カンピロバクター、エンテロバクター、バチルス属細菌が挙げられる。また、ウイルスとしては、特に限定されないが、例えば、コロナウイルス、SARSウイルス、MARSウイルス、インフルエンザウイルス、ムンプウイルス、麻疹ウイルス、ニパウイルス、イヌジステンパーウイルス、HIV、B型肝炎ウイルス、HTLV、エボラウイルス、C型肝炎ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、狂犬病ウイルス、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス及びノロウイルスなどが挙げられる。

【発明の効果】

【００１６】

本発明により、インフルエンザウイルス等の病原性微生物を高感度に検出するために利用可能な技術が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】本発明に係る病原性微生物検出方法の導入手順と封入手順を説明するための図である。

【図２】ウイルスの粒子表面に存在する酵素と発色基質との反応による反応生成物を説明するための図である。

【図３】親水性溶媒のｐＨが検出感度に及ぼす影響を検討した結果を示すグラフである（実施例１）。

【図４】親水性溶媒の緩衝物質濃度が検出感度に及ぼす影響を検討した結果を示すグラフである（実施例２）。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【００１９】

１．病原性微生物検出方法

本発明に係る病原性微生物検出方法は、病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料中の病原性微生物を検出するために用いられるものである。本発明に係る病原性微生物検出方法は、以下の手順を含む。

（１Ａ）病原性微生物を収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、前記生物試料と、前記病原性微生物の粒子表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、を含む親水性溶媒を導入する導入手順。

（２Ａ）前記空間に疎水性溶媒を導入して、前記収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ前記病原性微生物と前記物質を包含する、親水性溶媒の液滴を形成する封入手順。

（３Ａ）前記液滴中における前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物を光学的に検出する検出手順。

【００２０】

本発明において、生物試料とは、検出対象となる病原性微生物が含まれ得る、生体由来の材料であれば特に限定されない。生物試料としては、例えば、鼻腔吸引液、鼻腔ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、気管ぬぐい液、唾液、喀痰、血液（全血、血清及び血漿を含む）、尿、細胞や組織、臓器の抽出液等が挙げられる。

【００２１】

病原性微生物は、表面もしくは内部に酵素を有するものであって、該酵素による反応の結果光学的に検出し得る反応生成物を生成するものであれば特に限定されない。病原性微生物は、より具体的には、発色基質に対する基質切断活性を有する酵素を表面又は内部に有し、該酵素による発色基質の切断によって発色団としての反応生成物を遊離させるものとされる。また、病原性微生物は、基質である単量体を結合させて重合体を合成する活性を有する酵素を表面又は内部に有し、該酵素による重合体の合成に伴って発色団としての反応生成物を生成させるものであってもよい。病原性微生物とその酵素の組み合わせとして、例えば以下が例示される。

【００２２】

【表１】

コロナウイルス	ヘマグルチニンエステラーゼ
SARS	ヘマグルチニンエステラーゼ
MARS	ヘマグルチニンエステラーゼ
ムンプウイルス（おたふく風邪）	ノイラミニダーゼ
麻疹ウイルス	ノイラミニダーゼ
ニパウイルス	ノイラミニダーゼ
イヌジステンパーウイルス	ノイラミニダーゼ
HIV	逆転写酵素
B 型肝炎	逆転写酵素
HTLV	逆転写酵素
エボラウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
C 型肝炎	RNA 依存 RNApolymerase
ラッサウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
ハンタウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
狂犬病ウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
日本脳炎ウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
黄熱ウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
デング熱ウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
風疹ウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
ロタウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
ノロウイルス	RNA 依存 RNApolymerase
大腸菌群	ガラクトシダーゼ，グルクロニダーゼ
腸炎ビブリオ菌	トリプシン
カンピロバクター	ガラクトシダーゼ
エンテロバクター	ガラクトシダーゼ
バチルス・シルクランス（Bacillus circulance）	キシロシダーゼ
バチルス・サブチリス（Bacillus subtilis）	キモトリプシン

【００２３】
［導入手順（Ａ１）］
図１Ａを参照して導入手順（Ａ１）を説明する。本実施形態では、病原性微生物（以下、ウイルスを例に説明する）を収容可能な複数の収容部が疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における前記収容部が形成されている面に対して空間を隔てて対向している上層部とを備えるアレイを用いて、本発明に係る病原性微生物検出方法を実施する場合について説明する。
【００２４】
アレイ１において、下層部１０は、ウイルス粒子を収容可能な複数の収容部１３が、疎水性の上面を有する側壁１２によって互いに隔てられて形成されている。また、上層部２

０は、下層部１０における収容部１３が形成されている面に対向している。

【００２５】

本工程では、下層部１０と上層部２０との間の空間３０に、親水性溶媒４２を導入する。親水性溶媒４２には、生物試料に由来するウイルス２が含まれ得る。また、親水性溶媒４２には、ウイルス２の粒子表面（あるいは内部）に存在する酵素による反応の基質となる物質３（以下「基質３」と称する）が含まれる。親水性溶媒４２は、例えば上層部２０及び下層部１０の少なくとも一方に形成されている貫通孔（図示せず）から空間３０内に導入することができる。空間３０内に導入された親水性溶媒４２は、図に示すように、下層部１０と上層部２０とが対向する面に平行な方向に流れる。

【００２６】

親水性溶媒４２としては、水が用いられる。親水性溶媒４２は、基質３から生じる反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有するものとされる（詳しくは後述する）。

【００２７】

基質３としては、酵素との反応後に反応前とは異なる光学特性を有する反応生成物を生成するものであればよく、反応前後で吸光度や旋光度が変化する物質や、反応後に蛍光を呈するようになる物質が用いられる。基質３については詳しく後述する。

【００２８】

親水性溶媒４２は、酵素と基質３との反応の最適化に必要な緩衝物質を含んでいてもよい。さらに、親水性溶媒４２中の緩衝物質を所定の濃度以上に設定することで、検出手順（３）において反応生成物の検出をより高感度化できる（詳しくは後述する）。

【００２９】

緩衝物質としては、特に限定されないが、蛍光色素のｐＫａにあわせてＭＥＳ（2-Morpholinoethanesulfonic acid）、ＡＤＡ（N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid）、ＰＩＰＥＳ（Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)）、ＡＣＥＳ（N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid）、ＢＥＳ（N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid）、ＴＥＳ（N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid）ＨＥＰＥＳ（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid）等のいわゆるグッドバッファー（Good's Buffer）や、Ｔｒｉｓ（Tris(hydroxymethyl)aminomethane）、ＤＥＡ（Diethanolamine）等が用いられ得る。

【００３０】

また、親水性溶媒４２は、界面活性剤を含んでいてもよい。界面活性剤を含むことで、ウイルス２の内部に存在する酵素を表面に露出させられる場合がある。また、界面活性剤を含むことで、親水性溶媒４２が、空間３０及び収容部１３内へ導入され易くなる傾向がある。

【００３１】

界面活性剤としては、特に限定されないが、例えばＴＷＥＥＮ２０（ＣＡＳ番号：9005-64-5、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン）及びＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（ＣＡＳ番号：9002-93-1、一般名ポリエチレングリコールモノ－４－オクチルフェニルエーテル（ｎ　10））などが挙げられる。第一の溶媒２０への界面活性剤の添加濃度は、特に限定されないが、好ましくは０．０１～１％である。

【００３２】

さらに、界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性イオン界面活性剤、天然由来の界面活性剤などを広く用いることができる。

【００３３】

陰イオン性界面活性剤としては、例えば、カルボン酸型、硫酸エステル型、スルホン酸型、リン酸エステル型に分類される。このうち、具体的には、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、α-スルホ脂肪酸メチルエステルナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルエトキシレート硫酸ナトリウムなどが挙げられ

、中でも、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを用いることが好ましい。

【００３４】

陽イオン性界面活性剤としては、例えば、第四級アンモニウム塩型、アルキルアミン型、複素環アミン型に分類される。具体的には、例えば、ステアリルトリメチルアンモニウムクロライド、ジステアリルジメチルアンモニウムクロライド、ジデシルジメチルアンモニウムクロライド、セチルトリピリジニウムクロライド、ドデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライドなどが挙げられる。

【００３５】

非イオン界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンモノ脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、アルキルポリグリコシド、N-メチルアルキルグルカミドなどが挙げられる。中でも、ドデシルアルコールエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレート、ラウロイルジエタノールアマイドの他、Triton X（Triton X-100など）、Pluronic（登録商標）（Pluronic F-123、F-68など）、Tween (Tween 20、40、60、65、80、85など)、Brij（登録商標）（Brij 35、58、98など）、Span (Span 20、40、60、80、83、85)の名前で市販されているものが好ましい。

【００３６】

両性界面活性剤としては、例えば、ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン、ドデシルアミノメチルジメチルスルホプロピルベタイン、3-(テトラデシルジメチルアミニオ)プロパン-1-スルホナートなどがあるが、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート（CHAPS）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホナート（CHAPSO）などを用いることが好ましい。

【００３７】

天然由来の界面活性剤としては、例えば、レシチン、サポニンが好ましく、レシチンとして称される化合物のうち、具体的には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロールなどが好ましい。また、サポニンとしてはキラヤサポニンが好ましい。

【００３８】

本手順により、ウイルス２と基質３が収容部１３に入る。親水性溶媒４２中において、ウイルス２が十分に低い濃度に希釈されている場合、１つの収容部１３に入るウイルス２の数は０又は最大で１となり得る。親水性溶媒４２中において、ウイルス２の濃度がより高い場合には、１つの収容部１３には２以上のウイルス２が導入され得る。

【００３９】

［封入手順（Ａ２）］

図１Ｂを参照して封入手順（２）を説明する。本手順では、下層部１０と上層部２０との間の空間３０に疎水性溶媒４３を導入する。

【００４０】

疎水性溶媒４３は、導入手順（１）で用いた親水性溶媒４２と混ざり合いにくい溶媒（非混和性の溶媒）であればよい。疎水性溶媒４３として、例えば飽和炭化水素、不飽和炭化水素、芳香族炭化水素、シリコーンオイル、パーフルオロカーボン、ハロゲン系溶媒、及び疎水性イオン液体からなる群より選択される少なくとも１つ又はこれを含む混合物等を好適に用いることができる。飽和炭化水素としては、例えばアルカン、シクロアルカンなどが挙げられる。アルカンとしては、例えばデカン、ヘキサデカン等が挙げられる。不飽和炭化水素としては、例えばスクアレン等が挙げられる。芳香族炭化水素としては、例えばベンゼン、トルエン等が挙げられる。パーフルオロカーボンとしては、例えばフロリナート（登録商標）ＦＣ４０（SIGMA社製）等が挙げられる。ハロゲン系溶媒としては、例えばクロロホルム、塩化メチレン、クロロベンゼン等が挙げられる。疎水性イオン液体とは少なくとも水中では解離しないイオン液体をさし、例えば１－Ｂｕｔｙｌ－３－ｍｅ

ｔｈｙｌｉｍｉｄａｚｏｌｉｕｍ Ｈｅｘａｆｌｕｏｒｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ等が挙げられる。イオン液体とは、室温において液体で存在する塩をさす。

【００４１】

疎水性溶媒４３も、親水性溶媒４２と同様に、上層部２０及び下層部１０の少なくとも一方に形成されている貫通孔（図示せず）から空間３０内に導入すればよい。空間３０内に導入された疎水性溶媒４３は、図に示すように、下層部１０と上層部２０とが対向する面に平行な方向に流れ、空間３０内の親水性溶媒４２が疎水性溶媒４３によって置換される。これにより、収容部１３内に、疎水性溶媒４３で被覆されかつウイルス２と基質３を包含する、親水性溶媒４２の液滴が形成される。

【００４２】

そして、親水性溶媒４２の液滴の極小容積中で共存する、ウイルス２の粒子表面又は内部に存在する酵素と基質３との反応が進行し、反応生成物４が生成する。図２を参照して詳しく説明する。ウイルス２の粒子表面又は内部には酵素５が存在している（図には酵素５がウイルス表面に存在する場合を示した）。基質３が、酵素５と接触し反応すると、反応生成物４が生成する。発色生成物４は、基質３と異なる光学特性を示し、例えば吸光度や旋光度のシフトや、発光（蛍光）を示す。

【００４３】

本手順により、ウイルス２と基質３が、極小容積の液滴中に封入されるため、酵素５と基質３との反応によって該液滴中に反応生成物４が極小容積中に生成される。これによって、反応生成物４の光学検出が可能とされる。収容部１３の容積（すなわち、親水性溶媒４２の液滴の容積）は、特に限定されないが、例えば１０ａＬ～１００ｎＬ、好ましくは１ｆＬ～１ｐＬである。

【００４４】

ウイルス２がインフルエンザウイルスであり（表１参照）、基質３に４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ ａｃｉｄ：４ＭＵ－ＮＡＮＡ）を用いる場合を例により具体的に説明する。

【００４５】

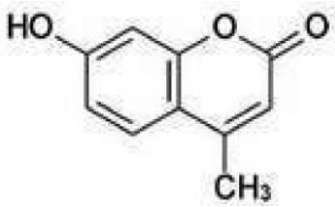
インフルエンザウイルスの粒子表面にはノイラミニダーゼ（酵素５）が存在している。４ＭＵ－ＮＡＮＡ（基質３）が、ノイラミニダーゼと接触し反応すると、蛍光物質である４－メチルウンベリフェロン（反応生成物４）が生成する。

【００４６】

４ＭＵ－ＮＡＮＡのノイラミニダーゼによる加水分解に由来して、下記式で示される、蛍光を呈する発色団として４－メチルウンベリフェロン（４ＭＵ）が生成する。基質３は、ノイラミニダーゼによるノイラミン酸の加水分化によって光学的に検出可能な発色団を遊離させるものであれば、４ＭＵ－ＮＡＮＡに限られず、従来公知のものを用いることができる。反応生成物４の４ＭＵは、下記式で示されるように水酸基を有する。

【００４７】

【化１】



【００４８】

本発明に係る検出方法では、この４ＭＵの水酸基から水素を脱離させ、４ＭＵを電荷を有する状態とするため、親水性溶媒４２のｐＨ値を４ＭＵの酸解離定数（ｐＫａ）７．７９よりも大きく設定する。４ＭＵの水酸基から水素を脱離させることにより、疎水性溶媒４３で被覆された、親水性溶媒４２の液滴に含まれる４ＭＵが、その電荷のために疎水性

溶媒４３へ移行できず、結果として親水性溶媒４２の液滴中に高濃度に蓄積することとなる。

【００４９】

仮に、親水性溶媒４２のｐＨ値が４ＭＵの酸解離定数（ｐＫａ）よりも小さい場合、４ＭＵは水酸基を有する状態となるため、電荷を有さないかあるいは水酸基から水素が脱離している場合に比して電荷が小さくなる。親水性溶媒４２の液滴に含まれる４ＭＵが電荷を有さない場合あるいは電荷が小さい場合には、親水性溶媒４２と界面接触する疎水性溶媒４３へ４ＭＵが移行しやすくなるため、４ＭＵが親水性溶媒４２の液滴中から失われたり、液滴中の４ＭＵ濃度が低下したりする。

【００５０】

従来、ノイラミニダーゼと４ＭＵ－ＮＡＮＡとの反応は、ノイラミニダーゼによる酵素反応の至適ｐＨである５付近のｐＨ条件下で行い、遊離した４ＭＵの検出を、４ＭＵの蛍光効率（量子効率）が最大化されるｐＨである１０付近のｐＨ条件下で行っていた。これに対して、本発明は、ノイラミニダーゼと４ＭＵ－ＮＡＮＡとの反応及び４ＭＵの検出を、いずれも、４ＭＵのｐＫａ７．７９よりも大きいｐＨ条件下で行う点を技術的特徴の１つとするものである。

【００５１】

なお、基質３と酵素５の反応は、本手順前においても、基質３と酵素５が接触すれば進行し得るものであるが、本手順においてウイルス２と基質３を包含する親水性溶媒４２の液滴が形成される前には、生成した反応生成物４が極小容積中に蓄積されることがない。このため、反応生成物４の光学検出において、封入手順（２）前に生成した反応生成物４の影響は無視できる程度に小さい。

【００５２】

４ＭＵを含む４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸の他に、同様に、親水性溶媒４２の液滴中から、当該液滴を被覆する疎水性溶媒４３への反応生成物４の移行の問題を生じ得る発色基質として以下が挙げられる。

【００５３】

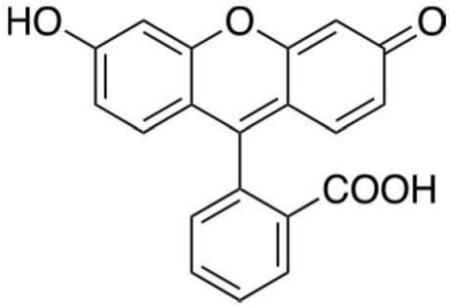
４－メチルウンベリフェロン（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｏｎｅ）を含む誘導体であって、４ＭＵ－ＮＡＮＡ以外のもの。ここで、「誘導体」とは、構造中に、「発色団」としての４ＭＵと、酵素５との反応によって切断される「基質」とを有する化合物を意味する。

【００５４】

フルオレセイン（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ）を発色団として含む誘導体。酵素５と接触し反応すると、酵素５により基質が切断され、蛍光物質であるフルオレセイン（ｐＫａ：６．４）が反応生成物４として遊離する。フルオレセインの構造を以下に示す。

【００５５】

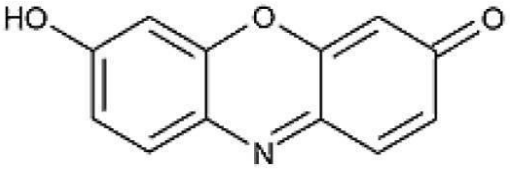
【化２】



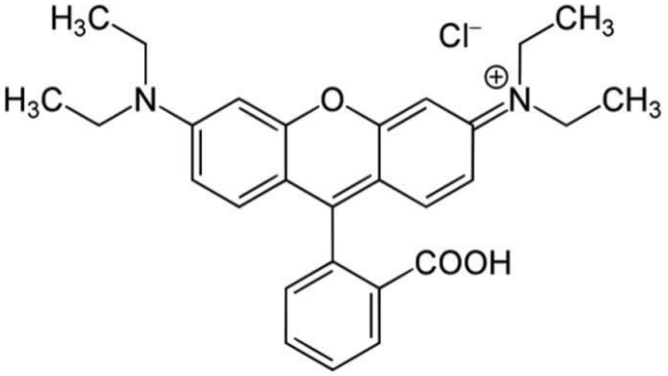
【００５６】

レゾルフィン（Ｒｅｓｏｒｕｆｉｎ）を発色団として含む誘導体。酵素５と接触し反応すると、酵素５により基質が切断され、蛍光物質であるレゾルフィン（ｐＫａ：６．０）が反応生成物４として遊離する。レゾルフィンの構造を以下に示す。

【００５７】
【化３】



【００５８】
ローダミン（Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）を発色団として含む誘導体。酵素５と接触し反応すると、酵素５により基質が切断され、蛍光物質であるローダミン（ｐＫａ：６．０）が反応生成物４として遊離する。ローダミンの構造を以下に示す。
【００５９】
【化４】



【００６０】
これらの誘導体を基質３として用いる場合には、親水性溶媒４２のｐＨ値を、誘導体から生じる反応生成物４の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きく設定する。これにより、各反応生成物４を電荷を有する状態とし、疎水性溶媒４３への移行（漏れ出し）を防止して、親水性溶媒４２の液滴中に反応生成物４を高濃度に蓄積させることができる（実施例１参照）。
【００６１】
さらに、親水性溶媒４２の液滴中から疎水性溶媒４３への反応生成物４の漏れ出しは、親水性溶媒４２中の緩衝物質を所定の濃度以上に設定することで、さらに効果的に防止できる（実施例２参照）。緩衝物質の濃度は、例えば５０ｍＭ以上、好ましくは１００ｍＭ以上、より好ましくは５００ｍＭ以上、さらに好ましくは１Ｍ以上とされる。
【００６２】
［検出手順（Ａ３）］
本手順では、親水性溶媒４２の液滴中に生成した反応生成物４の光学検出を行う。
【００６３】
反応生成物４の光学検出は、基質３と反応生成物４との光学特性の差を検出することが可能な公知の手段を用いて行うことができる。例えば、イメージセンサや吸光度計、旋光度計を用いて特定の吸光度や旋光度のシフトを検出すること、イメージセンサや蛍光顕微鏡、蛍光測定器を用いて特定の蛍光波長を検出することにより、反応生成物４を光学的に検出できる。
【００６４】
ウイルス２がインフルエンザウイルスであり、基質３に４ＭＵ－ＮＡＮＡを用いる場合においては、生成する４ＭＵ（反応生成物４）の蛍光検出を行う。
【００６５】
検出された反応生成物４（例えば４ＭＵ）の検出強度（例えば蛍光強度）に基づけばウイルスの粒子数及び／又は亜種（サブタイプ）を決定することができる。
【００６６】

具体的には、インフルエンザウイルスの場合、まず、検出された蛍光強度と、予め作成した蛍光強度とノイラミニダーゼ活性との関係を規定した標準曲線とを用いてノイラミニダーゼの酵素活性値を算出する。次に、算出された酵素活性値と、予め作成した酵素活性値とウイルス粒子数との関係を規定した標準曲線を用いてインフルエンザウイルスの粒子数を定量する。これにより、対象から分離された生物試料中にウイルスが含まれているかの判定に加えて、ウイルス量を定量的に決定することもでき（アナログ定量）、対象におけるインフルエンザウイルスの感染の有無及び感染の強度を診断できる。標準曲線には、蛍光強度とウイルス粒子数との関係を直接規定したものを用いてもよい。

【００６７】

また、例えばインフルエンザウイルスではＢ型ウイルスに比してＡ型ウイルスのほうが高いノイラミニダーゼ活性を有することが知られている。そして、本発明者らは、本発明に係る検出方法を用いてＡ型ウイルスとＢ型ウイルスがノイラミニダーゼ活性において２倍程度相違し、両者を活性値の大小に基づいて有効に区別して検出できることを見出している。このような場合、まず、検出された蛍光強度と、予め作成した蛍光強度とノイラミニダーゼ活性との関係を規定した標準曲線とを用いてノイラミニダーゼの酵素活性値を算出する。次に、算出された酵素活性値と、予め作成した酵素活性値とサブタイプとの関係式を用いてインフルエンザウイルスのサブタイプを決定できる。例えばインフルエンザウイルスであれば、算出された酵素活性値が基準値以上であればＡ型と判定し、基準値未満であればＢ型と判定できる。これにより、対象から分離された生物試料中にウイルスが含まれているかの判定に加えて、ウイルスサブタイプを決定することもでき、対象における感染インフルエンザウイルスのサブタイプを診断できる。関係式には、蛍光強度とサブタイプとの関係を直接規定したものを用いてもよい。

【００６８】

さらに、上述の通り、親水性溶媒４２中において、ウイルス２が十分に低い濃度に希釈されている場合、１つの収容部１３に入るウイルス２の数は０又は最大で１となり得る。この場合、反応生成物４が検出された収容部１３の数と、反応生成物４が検出されない収容部１３の数との比率を用いて、予め作成した当該比率とウイルス粒子数との関係を規定した標準曲線に基づいて、ウイルス量を定量的に決定することもできる（デジタル定量）。

封入手順（２）においては、親水性溶媒４２の液滴中に反応生成物４を高濃度に蓄積させることができるため、ウイルス２が１粒子のみ収容部１３に入っている場合であっても、反応生成物４の検出を高感度に行うことができる。従って、本発明に係る検出方法によれば、生物試料中にごく微量に含まれるウイルスであっても高感度に検出でき、病原性微生物の量を高精度に決定することが可能となる。

【００６９】

また、親水性溶媒４２の液滴中に反応生成物４を高濃度に蓄積させられることにより高い蛍光強度が得られるため、光学検出において比較的感度の低い簡易な撮像装置を用いることができ、例えばスマートフォンに搭載されたカメラなどでの光学検出が可能と期待される。スマートフォンに搭載されたカメラなどの簡易な撮像装置による光学検出は、比較的規模の小さな病院や診療所、個人における本発明に係る病原性微生物の検出方法の実施を容易にし得る。さらに、スマートフォンが備える通信手段を利用すれば、病原性微生物の検出情報をサーバに送信し、蓄積された情報（ビックデータ）を解析することで、流行の地域、時期及びサブタイプなどの把握や予測に供することが可能と期待される。

【００７０】

上記では、ウイルス２がインフルエンザウイルスであり、基質３に４ＭＵ－ＮＡＮＡを用いる場合を例に説明した。本発明において、例えば、コロナウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）コロナウイルスあるいは中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）ウイルスを検出対象とする場合、基質３には、これらのウイルスが表面に有するヘマグルチニンエステラーゼ（酵素５）によって加水分解を受け、上述のような発色団（反応生成物４）を遊離させるものを用いればよい。

【００７１】
　また、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、Ｂ型肝炎ウイルスあるいはヒトＴ細胞白血病ウイルス（ＨＴＬＶ）を検出対象とする場合、基質３には、これらのウイルスが表面又は内部に有する逆転写酵素（酵素５）によって重合化される核酸モノマーであってよい。核酸モノマーに蛍光色素をラベルしておくことで、重合による反応生成物である核酸鎖において、核酸モノマーに比して増加した蛍光強度が検出される。同様に、例えば、エボラウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、狂犬病ウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルスあるいはノロウイルスを検出対象とする場合、基質３には、これらのウイルスが表面又は内部に有するＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼ（酵素５）によって重合化される核酸モノマーに蛍光色素をラベルしたものを用いることができる。なお、核酸モノマーの核酸鎖への重合に伴って、蛍光強度が増加する構成に限らず、反応後に反応前とは異なる光学特性（吸光度、旋光度及び蛍光等）が現れる構成であれば広く採用可能である。
【００７２】
　このように、本発明に係る検出方法において、基質は、検出対象とする病原性微生物が表面又は内部に有する酵素によって適宜選択され得るものである。この際、選択された反応生成物のｐＫａに応じて、導入手順（１）で用いられる親水性溶媒のｐＨ値を当該ｐＫａよりも大きくなるように設計すればよい。
【００７３】
　また、基質は、例えば、インフルエンザウイルスとムンプウイルスのように同一酵素（ノイラミニダーゼ）を有する病原性微生物であっても、それぞれの病原性微生物の酵素の基質特異性に応じて異なる設計にされ得る。例えば、インフルエンザウイルスの検出するための発色基質として４ＭＵ－ＮＡＮＡを用い、ムンプウイルスを検出するための発色基質としての４ＭＵ－ＮＡＮＡにおいてその加水分解により生成する発色団を４ＭＵからフルオレセインなどの他の蛍光物質に変更したものを用いる。このように、基質の一部を変更することで、それぞれの発色基質のノイラミニダーゼに対する親和性が、同一種の酵素であっても、対インフルエンザウイルス酵素と対ムンプウイルスの酵素との間で変化し得る。これによって、本発明に係る検出方法では、両者を区別して検出することも可能である。
【００７４】
２．病原性微生物の薬剤感受性の検出方法
　本発明に係る病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料中の病原性微生物の薬剤感受性を検出する方法は、以下の手順を含む。
（Ｂ１）病原性微生物を収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、前記生物試料と、前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、前記酵素の阻害薬を含む親水性溶媒を導入する導入手順。
（Ｂ２）前記空間に疎水性溶媒を導入して、前記収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ前記病原性微生物と前記物質と前記阻害薬とを包含する、親水性溶媒の液滴を形成する封入手順。
（Ｂ３）前記液滴中における前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物を光学的に検出する検出手順、（ここで、前記阻害薬の存在下における前記反応生成物の検出強度が、前記阻害薬の非存在下における前記反応生成物の検出強度よりも減少する場合、前記病原性微生物が前記阻害薬に感受性を有することを示す）。
【００７５】
［導入手順（Ｂ１）］
　本発明に係る病原性微生物の薬剤感受性の検出方法の導入手順（Ｂ１）は、薬剤感受性の評価対象となる酵素阻害薬が親水性溶媒に含まれる点でのみ、上述の病原性微生物検出方法の導入手順（Ａ１）と異なる。導入手順（Ｂ１）では、病原性微生物及び基質に加え

て、病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素の阻害薬が収容部に入ることとなる。

【００７６】

［封入手順（Ｂ２）］

本発明に係る病原性微生物の薬剤感受性の検出方法の封入手順（Ｂ２）の操作は、上述の病原性微生物検出方法の封入手順（Ａ２）に同じである。封入手順（Ｂ２）では、収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ病原性微生物、基質及び阻害薬を包含する、親水性溶媒の液滴が形成されることとなる。

【００７７】

［検出手順（Ｂ３）］

本発明に係る病原性微生物の薬剤感受性の検出方法の検出手順（Ｂ３）では、上述の病原性微生物検出方法の検出手順（Ａ３）と同様にして、親水性溶媒の液滴中に生成した反応生成物の光学検出を行う。

【００７８】

阻害薬の存在下における前記反応生成物の検出強度を、阻害薬の非存在下における前記反応生成物の検出強度と比較し、前者が後者よりも減少する場合、阻害薬によって親水性溶媒の液滴中における反応生成物の生成が抑制されていることが示される。すなわち、病原性微生物が有する酵素が阻害されていることから、病原性微生物が阻害薬に感受性を有することが示される。

一方、阻害薬の非存在下における前記反応生成物の検出強度が、阻害薬の非存在下における前記反応生成物の検出強度と比較して同等である場合、親水性溶媒の液滴中における反応生成物の生成は阻害剤によって抑制されていないことが示される。すなわち、病原性微生物が有する酵素は阻害されていないことから、病原性微生物が阻害薬に耐性を有することが示される。

【００７９】

具体的には、病原性微生物がインフルエンザウイルスである場合には、例えば、基質として４ＭＵ－ＮＡＮＡ、阻害薬としてノイラミニダーゼ阻害剤（オセタミビル、ザナミビル等）を用いて、ノイラミニダーゼ阻害剤の存在下と非存在下の条件以外を同一とした２試験群について、生成する４ＭＵの蛍光検出を行う。ノイラミニダーゼ阻害剤の存在下における４ＭＵの検出強度を、ノイラミニダーゼ阻害剤の非存在下における４ＭＵの検出強度と比較し、前者が後者よりも減少する場合、ノイラミニダーゼ阻害剤によって親水性溶媒の液滴中における４ＭＵの生成が抑制されていることが示される。すなわち、インフルエンザウイルスが有するノイラミニダーゼが阻害されていることから、インフルエンザウイルスがノイラミニダーゼ阻害剤に感受性を有することが示される。

一方、ノイラミニダーゼ阻害剤の非存在下における４ＭＵの検出強度が、ノイラミニダーゼ阻害剤の非存在下における４ＭＵの検出強度と比較して同等である場合、親水性溶媒の液滴中における４ＭＵの生成はノイラミニダーゼ阻害剤によって抑制されていないことが示される。すなわち、インフルエンザウイルスが有するノイラミニダーゼは阻害されていないことから、インフルエンザウイルスがノイラミニダーゼ阻害剤に耐性を有することが示される。

【００８０】

このような薬剤感受性の検出を行い得る病原微生物と酵素阻害薬の組合わせとしては、例えば、コロナウイルス、重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）コロナウイルスあるいは中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）ウイルスを検出対象とする場合、これらのウイルスが表面に有するヘマグルチニンエステラーゼ（HE）の阻害薬（HE抗体，3,4-dichloroisocoumarin, 9-0-Acetylated Polysialoside等）が挙げられる。

【００８１】

また、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、Ｂ型肝炎ウイルスあるいはヒトＴ細胞白血病ウイルス（ＨＴＬＶ）を検出対象とする場合、これらのウイルスが表面又は内部に有する逆転写酵素の阻害薬（レトロビル（グラクソ・スミスクライン・Ｉｎｃ．、ジドブジン／ＡＺＴ）、ヴァイデックス（ブリストル・マイヤーズスクイブ・Ｉｎｃ．、ジダ

ノシン／ｄｄＩ）、ハイビッド（ホフマン－ラ・ロシュ社）（ザルシタビン／ｄｄＣ）、ゼリット（ブリストル・マイヤーズスクイブ社、スタブジン／ｄ４Ｔ）、エピビル（グラクソ・スミスクライン社、ラミブジン／３ＴＣ）およびコンビビル（グラクソ・スミスクライン社、ジドブジン／ラミブジン）ビラミューン（ベーリンガーインゲルハイム・ファーマシューティカルズ・Ｉｎｃ．、ネビラピン）、レスクリプター（ファルマシア／アップジョン社、デラビルジン）およびサスティバ（デュポン・ファーマ・Ｃｏ．、エファビレンズ）等）が挙げられる。

同様に、例えば、エボラウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、狂犬病ウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルスあるいはノロウイルスを検出対象とする場合、これらのウイルスが表面又は内部に有するＲＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼの阻害薬（ファビピラビル、リバビリン等）が挙げられる。

【００８２】

さらに、例えば、大腸菌群、腸炎ビブリオ菌、カンピロバクター、エンテロバクターあるいはバチルス属菌を検出対象とする場合、これらの細菌が表面又は内部に有するガラクトシダーゼの阻害薬（Castanospermine、Conduritol B Epoxide、Bromoconduritol、2-Deoxy-D-Galactose等）、グルクロニダーゼの阻害薬（アセトグラトン、D-glucaro-1,4-lactone、リゾリン脂質類等）、キモトリプシン、トリプシンの阻害薬（大豆、鶏卵等由来トリプシンインヒビター、Arg^4-Met^5-マリノスタチン、Phenylmethylsulfonyl fluoride、Aminoethyl benzylsulfonyl fluoride、Aprotinin、Tosyl lysine chloromethyl ketone、tosyl phenylalanine chloromethyl ketone等）、キシロシダーゼの阻害薬（Castanospermine、Xyl-amidine等）が挙げられる。

【００８３】

このように、本発明に係る病原性微生物の薬剤感受性の検出方法において、阻害薬は、検出対象とする病原性微生物が表面又は内部に有する酵素によって適宜選択され得るものである。

【００８４】

３．抗病原性微生物薬剤のスクリーニング方法

本発明に係る抗病原性微生物薬剤をスクリーニングする方法は、以下の手順を含む。

（Ｃ１）病原性微生物を収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、前記病原性微生物と、前記病原性微生物の表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、候補化合物とを含む親水性溶媒を導入する導入手順。

（Ｃ２）前記空間に疎水性溶媒を導入して、前記収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ前記病原性微生物と前記物質と前記候補化合物とを包含する、親水性溶媒の液滴を形成する封入手順。

（Ｃ３）前記液滴中における前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物を光学的に検出する検出手順、（ここで、前記候補化合物の存在下における前記反応生成物の検出強度が、前記候補化合物の非存在下における前記反応生成物の検出強度よりも減少する場合、前記候補化合物が抗病原性微生物活性を有することを示す）。

【００８５】

［導入手順（Ｃ１）］

本発明に係る抗病原性微生物薬剤のスクリーニング方法の導入手順（Ｃ１）は、抗病原性微生物活性の評価対象となる候補化合物が親水性溶媒に含まれる点でのみ、上述の病原性微生物検出方法の導入手順（Ａ１）と異なる。導入手順（Ｃ１）では、病原性微生物及び基質に加えて、候補化合物が収容部に入ることとなる。

【００８６】

［封入手順（Ｃ２）］

本発明に係る抗病原性微生物薬剤のスクリーニング方法の封入手順（Ｃ２）の操作は、

上述の病原性微生物検出方法の封入手順（Ａ２）に同じである。封入手順（Ｃ２）では、収容部内に、疎水性溶媒で被覆されかつ病原性微生物、基質及び候補化合物を包含する、親水性溶媒の液滴が形成される。

【００８７】

［検出手順（Ｃ３）］

本発明に係る抗病原性微生物薬剤のスクリーニング方法の検出手順（Ｃ３）では、上述の病原性微生物検出方法の検出手順（Ａ３）と同様にして、親水性溶媒の液滴中に生成した反応生成物の光学検出を行う。

【００８８】

候補化合物の存在下における前記反応生成物の検出強度を、候補化合物の非存在下における前記反応生成物の検出強度と比較し、前者が後者よりも減少する場合、候補化合物によって親水性溶媒の液滴中における反応生成物の生成が抑制されていることが示される。すなわち、病原性微生物が有する酵素が阻害されていることから、候補化合物が抗病原性微生物活性を有することが示される。

一方、候補化合物の非存在下における前記反応生成物の検出強度が、候補化合物の非存在下における前記反応生成物の検出強度と比較して同等である場合、親水性溶媒の液滴中における反応生成物の生成は阻害剤によって抑制されていないことが示される。すなわち、病原性微生物が有する酵素は阻害されていないことから、候補化合物が抗病原性微生物活性を有しないことが示される。

【００８９】

４．病原性微生物検出キット

本発明に係るキットは、病原性微生物に感染した対象又は感染した疑いがある対象から分離された生物試料中の病原性微生物を検出するためのキットであって、

前記病原性微生物を収容可能な複数の収容部が疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、前記下層部における前記収容部が形成されている面に対して空間を隔てて対向している上層部とを備えるアレイと、

前記病原性微生物の粒子表面又は内部に存在する酵素による反応の基質となる物質と、

前記酵素と前記物質との反応により生成する反応生成物の酸解離定数（ｐＫａ）よりも大きいｐＨ値を有する親水性溶媒と、

疎水性溶媒と、を含む。

【００９０】

本発明に係るキットは、上述したアレイ１と、基質３、親水性溶媒４２及び疎水性溶媒４３を含むものである。基質３、親水性溶媒４２及び疎水性溶媒４３については既に説明した通りであるので、以下にはアレイ１の構成をさらに詳しく説明する。

【００９１】

アレイ１の下層部１０は、板状部材１１と疎水性の上面を有する側壁１２とを備えている。下層部１０には、複数の収容部１３が側壁１２によって互いに隔てられて形成されている。

【００９２】

板状部材１１は親水性表面を有していることが好ましい。「親水性表面」とは、親水性溶媒との親和性が疎水性溶媒との親和性よりも高い表面を指す。板状部材１１としては、固体材料であればよいが、例えばガラス、シリコン、高分子樹脂等を用いることができる。

【００９３】

側壁１２は、板状部材１１の表面上、好ましくは親水性表面上に設けられている、複数の収容部１３の各々を隔てる構造物である。側壁１２は、疎水性の上面を有している。「疎水性」とは、ここでは「親油性」と同じ意味で用いられ、疎水性溶媒との親和性が親水性溶媒との親和性よりも高いことをいう。

【００９４】

なお、側壁１２は、その上面、すなわち上層部２０と対向する面が疎水性であればよく

、側面、すなわち収容部１３内の内壁は、疎水性であっても親水性であってもよい。

【００９５】

例えば、側壁１２は、親水性の構造物と、その上面に形成されている疎水性層とにより構成されていてもよい。親水性の構造物には、例えばガラス、シリコン、高分子樹脂等を用いることができる。疎水性層には、例えば撥水性の樹脂、フッ素系高分子樹脂等を用いることができる。フッ素系高分子樹脂としては、例えばアモルファスフッ素樹脂等が挙げられる。アモルファスフッ素樹脂は、高い疎水性を有し、かつ、生体試料に対する毒性が低いという理由で、好ましく用いられる。

【００９６】

上記アモルファスフッ素樹脂としては、例えば、ＣＹＴＯＰ（登録商標）、ＴＥＦＬＯＮ（登録商標）ＡＦ２４００、およびＴＥＦＬＯＮ（登録商標）ＡＦ１６００から選択した少なくとも１つを好適に用いることができる。中でも、微細加工が容易であるという理由で、ＣＹＴＯＰ（登録商標）が最も好ましい。

【００９７】

また例えば、側壁１２は、疎水性の材料により構成されていてもよい。側壁１２として、例えばフッ素系高分子樹脂、パラキシリレン系高分子樹脂等を用いることができる。フッ素系高分子樹脂としては、例えばアモルファスフッ素樹脂等が挙げられる。アモルファスフッ素樹脂としては上述の樹脂を好適に用いることができる。

【００９８】

側壁１２は、板状部材１１上に複数の収容部１３が形成されるように構成されていればよく、例えば収容部１３が形成される位置に孔が形成されている板形状の構造物であってもよい。

【００９９】

収容部１３は、板状部材１１の表面の一部を底面としており、底面が親水性である。収容部１３の底面及び側面によって囲まれた領域の形状は、例えば円柱形状、角柱形状等であってもよい。

【０１００】

本実施形態では、収容部１３の底面が親水性であり、かつ側壁１２の上面が疎水性である。これにより、導入手順（１）において、親水性溶媒４２を効率よく収容部１３の中に導入することができるとともに、封入手順（２）において疎水性溶媒４３が収容部１３に入り込むことを防止することができる。

【０１０１】

上層部２０は、例えばガラス、シリコン、高分子樹脂等を用いることができる。上層部２０は、下層部１０における収容部１３が形成されている面に対して空間３０を隔てて対向している。すなわち、側壁１２と疎水性層２２との間に空間３０があいている。この空間３０は、流路を構成する。この構成により、アレイ１はフローセル構造となっている。

【０１０２】

空間３０は、下層部１０と上層部２０との間に、下層部１０と上層部２０とが互いに対向する面と平行な方向に流体を流すための流路として用いられうる。

【０１０３】

下層部１０又は上層部２０には、空間３０に流体を導入するための貫通孔（図示せず）が形成されていてもよい。例えば、下層部１０は、収容部１３が形成されている領域と、収容部１３が形成されていない領域とを有していてもよい。そして、下層部１０における収容部１３が形成されていない領域、又は上層部２０におけるこの領域と対向する部分に、貫通孔が形成されていてもよい。

【０１０４】

本実施形態においては、空間３０の上面を構成する上層部２０の表面が疎水性であり、空間３０の下面が側壁１２の疎水性上面及び収容部１３である。したがって、空間３０のうち、収容部１３の底面以外の部分は全て疎水性となっている。これにより、導入手順（１）において、親水性溶媒４２を効率よく各収容部１３内に導入することができる。また

、封入手順（２）において、各収容部１３内に疎水性溶媒４３を入り込ませることがない。したがって、疎水性溶媒４３を空間３０内に導入することにより、各収容部１３に液滴を効率よく形成させることができる。

【実施例】

【０１０５】

［試験例１：親水性溶媒のｐＨ値の検討］

以下の手順によって、親水性溶媒のｐＨ値が検出感度に及ぼす影響を検討した。

まず、金らの報告（" Quantifying genetically inserted fluorescent protein in single iPS cells to monitor Nanog expression using electroactive microchamber arrays", Lab on Chip, 2014, Issue 4, Vol.14, p.730-736）に従って、Ｄｒｏｐｌｅｔ ａｒｒａｙ ｄｅｖｉｃｅ（ＤＡＤ）を作成した。カバーガラス（２４ｍｍ×３２ｍｍ）を洗浄、乾燥した後、アモルファスフッ素樹脂（CYTOP 816AP、旭硝子）をスピンコートし、１８０℃で１時間焼成した。アモルファスフッ素樹脂がコートされたカバーガラスに、ポジ型フォトレジスト（AZ-4903、AZ Electronic Materials）をスピンコートして、５５℃で３分間焼成した後、さらに１１０℃で５分間焼成した。直径３μｍの穴を５μｍ間隔で有するフォトマスクを用いてフォトリソグラフィーを行った。酸素プラズマでドライエッチング後、洗浄したカバーガラスをＤＡＤとして得た。ＤＡＤは、直径４μｍ、深さ３μｍのウェル（収容部）を有し（約１００万個／１０ｍｍ^2）、ウェルの底面はカバーガラスが露出している。得られたＤＡＤを用いて図１に示すようなフローセル構造のアレイを作成した。

【０１０６】

ｐＨ６．５～９．０に調整したバッファー溶液（33mM DEA-HCl, 4mM $CaCl_2$）に４－ＭＵを５０μＭになるように溶解した。

４－ＭＵを溶解したバッファー溶液３０μＬをアレイに導入し各ウェルにバッファー溶液を充填した（図１Ａ参照）。続いて、アレイに疎水性溶媒（ＦＣ４０）を２００μＬ導入し、各ウェルに疎水性溶媒で被覆された親水性溶媒の液滴を形成させた。

蛍光顕微鏡（IX8, OLYMPUS）に接続されたＣＭＯＳカメラ（Neo sCMOS, Andor）で、各液滴の蛍光画像を撮影し、蛍光強度を測定した。各ウェルにつき１０ｍｍ^{2}の領域を１２０分割して撮影を行った。１枚の画像には約８，６００個のウェルが含まれる。蛍光画像を画像解析ソフト（Meta-Morph, Molecular Devices)で解析し、蛍光強度を算出した。

【０１０７】

結果を図３に示す。バッファー溶液のｐＨ値を、４ＭＵのｐＫａ（７．７９）よりも大きく設定することで、４ＭＵの蛍光をより高感度に検出できた。ｐＨ値８以上では、４ＭＵが電荷を有する状態となり、４ＭＵのＦＣ４０への移行（漏れ出し）が抑制されたためと考えられる。

【０１０８】

［試験例２：親水性溶媒の緩衝物質濃度の検討］

以下の手順によって、親水性溶媒の緩衝物質濃度が検出感度に及ぼす影響を検討した。

【０１０９】

ＤＥＡの濃度を２５ｍＭ～１Ｍに調整したバッファー溶液（4mM $CaCl_2$、ｐＨ６．５）に４－ＭＵを５０μＭになるように溶解した。

４－ＭＵを溶解したバッファー溶液３０μＬをアレイに導入し各ウェルにバッファー溶液を充填した（図１Ａ参照）。続いて、アレイに疎水性溶媒（ＦＣ４０）を２００μＬ導入し、各ウェルに疎水性溶媒で被覆された親水性溶媒の液滴を形成させた。

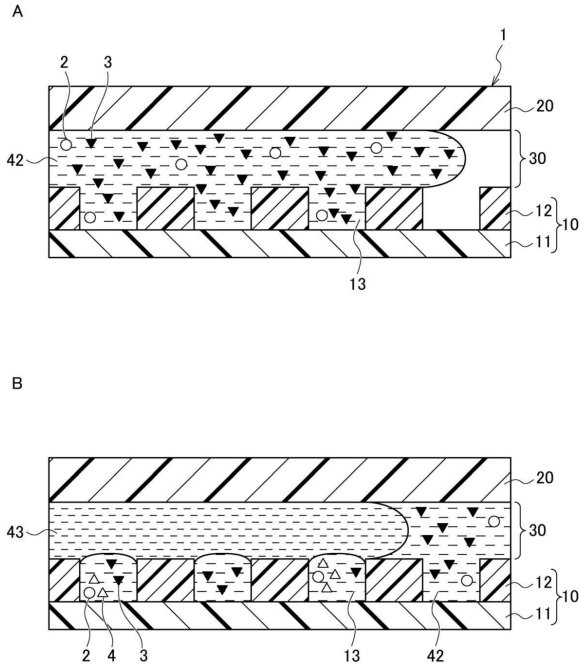
蛍光顕微鏡下でタイムラプス撮影を行い、各液滴の蛍光強度を測定した。

【０１１０】

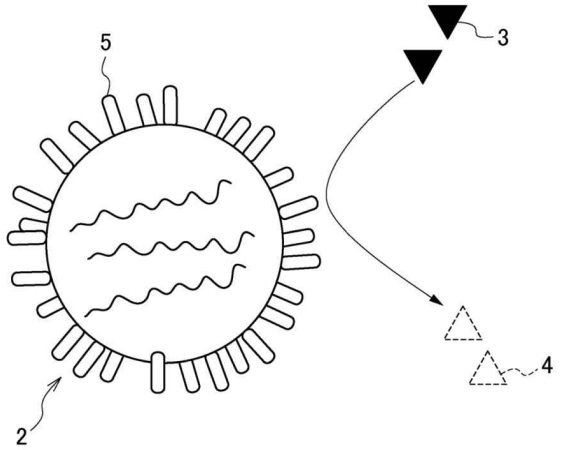
結果を図４に示す。ＤＥＡ濃度１Ｍでは、露光による退色の影響を差し引くと、蛍光強度の経時的な減少はみられなかった。ＤＥＡ濃度５００ｍＭ，１００ｍＭでも、蛍光強度の減少は、観察後３０分まで顕著に抑制された。ＤＥＡ濃度５０ｍＭでは観察後１０分で蛍光強度が維持されていたが、２５ｍＭでは蛍光強度の減少がみられた。

【０１１１】
本発明に係る検出方法において検出に要する時間は数分程度であることを考慮すると、バッファー溶液中の緩衝物質の濃度を５０ｍＭ以上に設定することで、４ＭＵの蛍光をより高感度に検出できることが示された。バッファー溶液中の緩衝物質を所定の濃度以上に設定することで、４ＭＵのＦＣ４０の移行（漏れ出し）を抑制できたと考えられる。
【符号の説明】
【０１１２】
１：アレイ、２：ウイルス、３：基質、４：反応生成物、５：酵素、１０：下層部、１１：板状部材、１２：側壁、１３：収容部、２０：上層部、３０：空間、４２：親水性溶媒、４３：疎水性溶媒

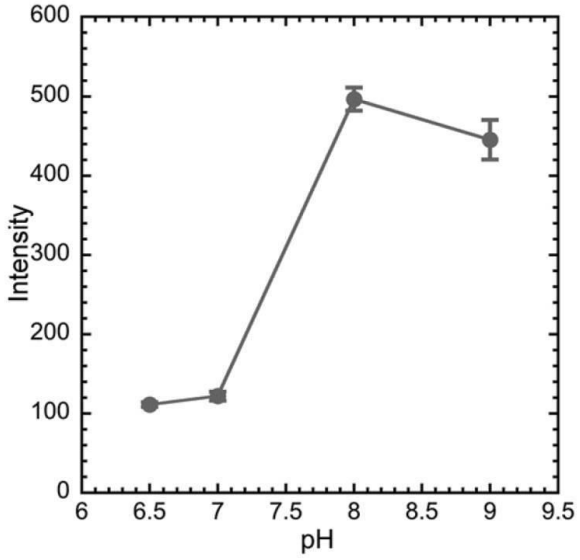
【図１】



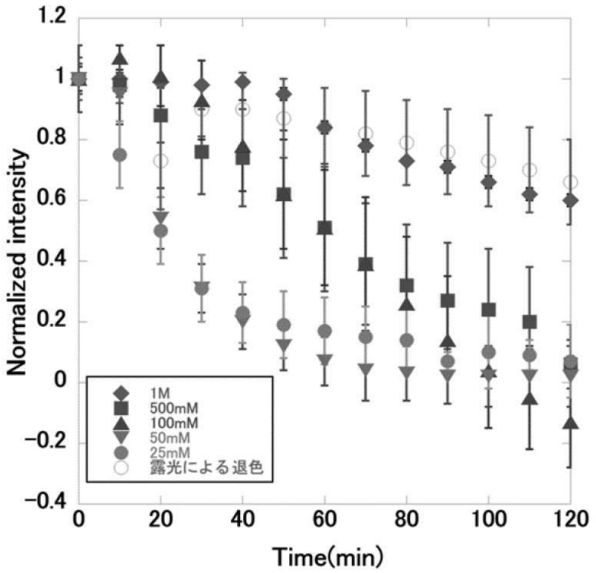
【図２】



【図３】


Intensity
pH
0
100
200
300
400
500
600
6
6.5
7
7.5
8
8.5
9
9.5

【図４】


Normalized intensity
Time(min)
1M
500mM
100mM
50mM
25mM
露光による退色
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
−0.2
−0.4
0
20
40
60
80
100
120

フロントページの続き

(56)参考文献　国際公開第２０１６／００６２０８（WO，Ａ１）
特表２００６－５００９４０（ＪＰ，Ａ）
特開２０１３－１０１１１０（ＪＰ，Ａ）
特開昭６０－２５２４６４（ＪＰ，Ａ）
特開２０１５－０３４８０９（ＪＰ，Ａ）
FEMS Microbiol. Lett., 1999年, Vol.179, pp.317-325
Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2012年, Vol.74, p.263-266
Chem. Biol., 2012年, Vol.19, pp.1001-1009

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ　　１／００－３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）