

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02019/073902

発行日 令和2年11月12日 (2020.11.12)

(43) 国際公開日 平成31年4月18日 (2019.4.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6806 Z N A Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

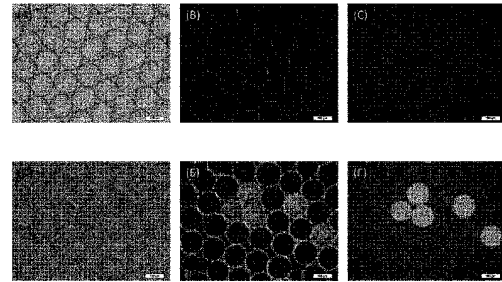
出願番号 特願2019-548165 (P2019-548165)	(71) 出願人 301021533 国立研究開発法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/037257	
(22) 国際出願日 平成30年10月4日 (2018.10.4)	
(31) 優先権主張番号 特願2017-197980 (P2017-197980)	(72) 発明者 大田 悠里 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内
(32) 優先日 平成29年10月11日 (2017.10.11)	(72) 発明者 斉藤 加奈子 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(72) 発明者 ▲高▼木 妙子 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内
	(72) 発明者 常田 聡 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 water-in-oil エマルション培養における蛍光を用いた細胞増殖検出方法

(57) 【要約】

微生物が増殖したドロップレットを非侵襲的に検出・分取を可能とする方法の提供を課題とする。

本発明は、ドロップレット内の微生物の増殖を検出する方法であって、(a) 微生物を含むドロップレットを作製する工程と、(b) ドロップレット中で微生物を培養する工程と、(c) ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、(c1) 微生物より体外に分泌または放出された物質に作用して蛍光を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定するか、または、(c2) 微生物の自家蛍光を測定する工程とを含み、蛍光が検出された前記ドロップレットは、インタクトの微生物を含む、検出方法に関する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

W/Oエマルションにおけるドロップレット内の微生物の増殖を検出する方法であって、

(a) 微生物を含むドロップレットを作製する工程と

(b) 前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と

(c) 前記ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、前記微生物より体外に分泌または放出された物質に作用して蛍光特性の変化を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定する工程とを含み、

蛍光特性の変化が検出された前記ドロップレットが、インタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットであることを示す、検出方法。

10

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の検出方法であって、

前記 (c) の検出工程における前記蛍光修飾核酸プローブが前記微生物より体外に分泌または放出されたRNaseまたはDNaseの作用により蛍光特性に変化を生じるものである、検出方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 または 2 に記載の検出方法であって、

前記 (c) の検出工程がマイクロ流路上で行われる、検出方法。

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の検出方法であって、

前記微生物が環境由来である、検出方法。

20

**【請求項 5】**

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の検出方法であって、

前記微生物が人工的に作製されたものではない、検出方法。

**【請求項 6】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の検出方法であって、

前記微生物が遺伝子組換え微生物である、検出方法。

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の検出方法であって、

前記 (a) ドロップレットを作製する工程が、二種以上の微生物を含むドロップレットを作製する工程である、検出方法。

30

**【請求項 8】**

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の検出方法であって、

前記 (a) ドロップレットを作製する工程が、微生物を一細胞単位で含むドロップレットを作製する工程であって、

前記 (c) の検出工程において蛍光特性の変化が検出された前記ドロップレットが、インタクトかつ増殖した微生物であって、単一の細胞由来の微生物を含むものである、検出方法。

40

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の検出方法であって、

前記 (c) の検出工程において前記蛍光修飾核酸プローブは、

(ア) 前記 (a) のドロップレットの作製工程において、ドロップレット中に封入されるか、または、

(イ) 前記 (c) の検出工程の前に、微生物を含むドロップレットと蛍光修飾核酸プローブを含むドロップレットとを合一させることにより、微生物を含むドロップレット中に封入される、検出方法。

**【請求項 10】**

請求項 9 に記載の検出方法であって、

前記蛍光修飾核酸プローブがFRET型蛍光修飾核酸プローブである、検出方法。

50

## 【請求項 1 1】

W/Oエマルションからインタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットを回収する方法であって、

( i ) 微生物を含むドロップレットを作製する工程と

( i i ) 前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と

( i i i ) 前記ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、

前記微生物より分泌または放出された物質に作用して蛍光特性に変化を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定するか、または、

微生物の自家蛍光を測定する工程と

( i v ) 蛍光特性の変化を検出したドロップレットを回収する工程とを含む、回収方法。

10

## 【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の回収方法であって、

前記 ( i i i ) および ( i v ) の工程をさらに 1 回または複数回繰り返す、回収方法。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 1 または 1 2 に記載の回収方法であって、前記 ( i v ) の回収工程の後に

( v ) 前記ドロップレットから微生物を回収することを含む、回収方法。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の検出方法、または、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の回収方法に使用されるキットであって、

20

W/Oエマルション水相用の培養液と

W/Oエマルション油相用の油成分と

W/Oエマルションを安定化するための界面活性剤と

蛍光修飾核酸プローブと

を含む、キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、water-in-oil(W/O)エマルションを用いた微生物の培養・検出・分取の方法に関する。特に、微生物が増殖したドロップレットを見出す手法として、微生物による自家蛍光を用いた手法およびシグナル検出用レポーター分子として蛍光修飾核酸を用いた方法に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

環境中には様々な微生物が生息しており、私たちはこれら微生物の活性や微生物が産生する物質を利用してきた。しかしながら、環境中の微生物の99%は未だ培養に成功しておらず、生物資源の多くは手付かずのままとなっている。これら未知微生物を培養することで、環境中での微生物の生理学的特性を明らかにするだけでなく、医学・産業の発展にも応用されることが期待される。

40

近年、微生物の分離・培養法の一つとして、W/Oエマルションを用いた手法が注目されつつある(非特許文献1および非特許文献2)。本手法では、油相中に水滴(微生物培養培地を使用)を分散させ、各水滴(ドロップレット)を一つの培養場として用いる。マイクロ流路を用いることにより、数分で数十万~数百万単位のドロップレットを作製することが可能となりハイスループット化が見込まれる。また、水相中に存在する微生物数とドロップレット数の調整により、一細胞が封入されたドロップレットを作ることができれば、シングルセルからの培養が可能となる(非特許文献3)。

本手法を用いて微生物を培養する場合、1つのドロップレットあたりの細胞数はポワソン分布に従う。1つのドロップレットに一細胞が入る確率を高くしていくにつれ、微生物が存在しないドロップレットが生じる確率も高くなる。この時、微生物の増殖が見られる

50

ドロップレットを選択的に分取することができれば各微生物の解析、スケールアップ等に活用できる。微生物が存在するドロップレットの検出には細胞内分子と反応する蛍光基質が使用されてきたが、これらは同時に細胞破砕が必要となるので、微生物を生きたまま分取することができない(非特許文献4、非特許文献5)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Kaminski T. S. et al., “Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges” Lab on a Chip, 2016; 16, 2168-2187

【非特許文献2】Jiang C. Y. et al., “High-Throughput Single-Cell Cultivation on Microfluidic Streak Plates” Applied and Environmental Microbiology, 2016; 82, 2210-2218) 10

【非特許文献3】Boedicker J. Q. et al., “Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics” Lab on a Chip, 2008; 8, 1265-1272

【非特許文献4】Kang D. K. et al., “Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection” Nature Communications, 2014; 5, 5427

【非特許文献5】Lyu F. et al., “Quantitative detection of cells expressing BlaC using droplet-based microfluidics for use in the diagnosis of tuberculosis” Biomicrofluidics, 2015; 9, 044120 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の課題は、微生物が増殖したドロップレットを非侵襲的に検出・分取を可能とする方法の提供である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、ドロップレット内の微生物を非侵襲的に検出する手法として、微生物による自家蛍光を用いた手法およびシグナル検出用レポーター分子として蛍光修飾核酸を用いた手法について着想した。自家蛍光を用いた手法では、ラベルフリーの状態で微生物細胞によって代謝されたNADHやフラビンといった自家蛍光分子の検出を試みた。一方で蛍光修飾核酸は微生物細胞を侵襲せずに、ドロップレット内で微生物の分泌・放出したヌクレアーゼによって分解を受け、生じたシグナルの検出を試みた。上記手法について鋭意検討したところ、二つの手法ともに、微生物を含むドロップレット内の微生物の増殖を検出できることを見出した。さらに微生物の増殖を検出できたドロップレットをシグナルの違いにより回収できた。本発明は上記知見により完成されたものである。 30

すなわち、本発明は以下のとおりである。

本発明は、一態様において、

〔1〕W/Oエマルションにおけるドロップレット内の微生物の増殖を検出する方法であって、 40

(a) 微生物を含むドロップレットを作製する工程と

(b) 前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と

(c) 前記ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、前記微生物より体外に分泌または放出された物質に作用して蛍光特性の変化を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定する工程とを含み、

蛍光特性の変化が検出された前記ドロップレットが、インタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットであることを示す、検出方法に関する。

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、 50

〔 2 〕 上記〔 1 〕に記載の検出方法であって、

前記（ c ）の検出工程における前記蛍光修飾核酸プローブが前記微生物より体外に分泌または放出されたRNaseまたはDNaseの作用により蛍光特性に変化を生じるものであることを特徴とする。

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

〔 3 〕 上記〔 1 〕または〔 2 〕に記載の検出方法であって、

前記（ c ）の検出工程がマイクロ流路上で行われることを特徴とする。

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

〔 4 〕 上記〔 1 〕～〔 3 〕のいずれかに記載の検出方法であって、

前記微生物が環境由来であることを特徴とする。

10

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

〔 5 〕 上記〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかに記載の検出方法であって、

前記微生物が人工的に作製されたものではないことを特徴とする。

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

〔 6 〕 上記〔 1 〕～〔 3 〕のいずれかに記載の検出方法であって、

前記微生物が遺伝子組換え微生物であることを特徴とする。

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

〔 7 〕 上記〔 1 〕～〔 6 〕のいずれかに記載の検出方法であって、

前記（ a ）ドロップレットを作製する工程が、二種以上の微生物を含むドロップレットを作製する工程であることを特徴とする。

20

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

〔 8 〕 上記〔 1 〕～〔 7 〕のいずれかに記載の検出方法であって、

前記（ a ）ドロップレットを作製する工程が、微生物を一細胞単位で含むドロップレットを作製する工程であって、

前記（ c ）の検出工程において蛍光特性の変化が検出された前記ドロップレットが、インタクトかつ増殖した微生物であって、単一の細胞由来の微生物を含むものであることを特徴とする。

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

〔 9 〕 上記〔 1 〕～〔 8 〕のいずれかに記載の検出方法であって、

前記（ c ）の検出工程において前記蛍光修飾核酸プローブは、

30

（ア）前記（ a ）のドロップレットの作製工程において、ドロップレット中に封入されるか、または、

（イ）前記（ c ）の検出工程の前に、微生物を含むドロップレットと蛍光修飾核酸プローブを含むドロップレットとを合一させることにより、微生物を含むドロップレット中に封入されることを特徴とする。

また、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

〔 10 〕 上記〔 9 〕に記載の検出方法であって、

前記蛍光修飾核酸プローブがFRET型蛍光修飾核酸プローブであることを特徴とする。

また、本発明は、別の態様において、

〔 11 〕 W/Oエマルションからインタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットを回収する方法であって、

40

（ i ）微生物を含むドロップレットを作製する工程と

（ i i ）前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と

（ i i i ）前ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、

前記微生物より分泌または放出された物質に作用して蛍光特性に変化を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定するか、または、

、

微生物の自家蛍光を測定する工程と

（ i v ）蛍光特性の変化を検出したドロップレットを回収する工程とを含む、回収方法に関する。

50

また、本発明の回収方法は、一実施の形態において、  
〔 1 2 〕 上記〔 1 1 〕 に記載の回収方法であって、  
前記 ( i i i ) および ( i v ) の工程をさらに 1 回または複数回繰り返すことを特徴とする。

また、本発明の回収方法は、一実施の形態において、  
〔 1 3 〕 上記〔 1 1 〕 または〔 1 2 〕 に記載の回収方法であって、前記 ( i v ) の回収工程の後に

( v ) 前記ドロップレットから微生物を回収することを含むことを特徴とする。

また、本発明は、別の態様において、

〔 1 4 〕 上記〔 1 〕 ~〔 1 0 〕 のいずれかに記載の検出方法、または、上記〔 1 1 〕 ~〔 1 3 〕 のいずれかに記載の回収方法に使用されるキットであって、

W/Oエマルション水相用の培養液と

W/Oエマルション油相用の油成分と

W/Oエマルションを安定化するための界面活性剤と

蛍光修飾核酸プローブと

を含む、キットに関する。

【発明の効果】

【 0 0 0 6 〕

本発明の検出方法によれば、ドロップレット内で増殖した微生物を非侵襲的に検出することが可能となる。また、検出したドロップレットに含まれる微生物は、他のドロップレットに含まれる微生物と区別して分取することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 7 〕

【図 1】図 1 は、本発明に使用する蛍光修飾核酸の蛍光原理を示す模式図である。

【図 2】図 2 は、大腸菌培養液による蛍光強度の変化を示すグラフである。図 2 左側のグラフは混合直後を示し、図 2 右側のグラフは 37 °C でインキュベーション 4 時間行った際の蛍光強度の値を示す。

【図 3】図 3 は、ドロップレット内における蛍光修飾核酸の反応を示す。また、なお、図 3 ( A ) ~ ( F ) はそれぞれ、( A ) LB+蛍光修飾核酸区、( B ) LB+蛍光修飾核酸区、( C ) LB+蛍光修飾核酸区、( D ) LB+蛍光修飾核酸+RNaseA 区、( E ) LB+蛍光修飾核酸+RNaseA 区、( F ) LB+蛍光修飾核酸+RNaseA 区を示す。図 3 ( A ) , ( D ) は位相差観察画像、図 3 ( B ) , ( E ) は暗視野観察画像、図 3 ( C ) , ( F ) は蛍光観察画像をそれぞれ示し、図 3 ( G ) は ( A ) と ( D ) の混合位相差画像、図 3 ( H ) は ( A ) と ( D ) の混合暗視野画像、図 3 ( I ) は ( A ) と ( D ) の混合蛍光画像を示す。

【図 4】図 4 は、蛍光修飾核酸を含む大腸菌培養 W/O エマルションの画像を示す。図 4 ( A ) ~ ( F ) はそれぞれ、( A ) 作製直後の位相差画像、( B ) 作製直後の暗視野画像、( C ) 作製直後の蛍光画像、( D ) 24h 培養後の位相差画像、( E ) 24h 培養後の暗視野画像、および、( F ) 24h 培養後の蛍光画像を示す。

【図 5】図 5 は、蛍光修飾核酸を含む大腸菌培養 W/O エマルションを 24 時間培養後、On-chip Sort を用いた測定により得られたドットプロットを示す。

【図 6】図 6 は、蛍光修飾核酸を含む大腸菌培養 W/O エマルションを 24 時間培養してソーティングした後のドロップレットの画像 ( ( a ) 位相差、( b ) 暗視野、( c ) 蛍光視野 ) を示す

【図 7】図 7 は、大腸菌培養 W/O エマルションの画像を示す。図 4 ( A ) ~ ( F ) はそれぞれ、( A ) 作製直後の位相差画像、( B ) 作製直後の暗視野画像、( C ) 作製直後の蛍光画像、( D ) 24h 培養後の位相差画像、( E ) 24h 培養後の暗視野画像、および、( F ) 24h 培養後の蛍光画像を示す。

【図 8】図 8 は、大腸菌培養 W/O エマルションを 24 時間培養後、On-chip Sort を用いた測定により得られたドットプロットを示す。

【図 9】図 9 は蛍光修飾核酸を含む *Bacillus subtilis* 培養 W/O エマルションの画像を示す。図 9 ( A ) ~ ( F ) はそれぞれ、( A ) 作製直後の明視野画像、( B ) 作製直後の暗視野画像、

10

20

30

40

50

(C)作製直後の蛍光画像、(D)48h培養後の明視野画像、(E)48h培養後の暗視野画像、および、(F)48h培養後の蛍光画像を示す。

【図10】図10は、蛍光修飾核酸を含む*B.subtilis*培養W/Oエマルションを48時間培養後、On-chip Sortを用いた測定により得られた蛍光ヒストグラムを示す。

【図11】図11は、蛍光修飾核酸を含む*B.subtilis*培養W/Oエマルションを48時間培養してソーティングした後のドロップレットの画像((a)明視野、(b)暗視野、(c)蛍光視野)を示す。

【図12】図12は蛍光修飾核酸を含む*Streptomyces aureofaciens*培養W/Oエマルションの画像を示す。図12(A)~(F)はそれぞれ、(A)作製直後の明視野画像、(B)作製直後の暗視野画像、(C)作製直後の蛍光画像、(D)48h培養後の明視野画像、(E)48h培養後の暗視野画像、および、(F)48h培養後の蛍光画像を示す。

10

【図13】図13は、蛍光修飾核酸を含む*S.aureofaciens*培養W/Oエマルションを48時間培養後、On-chip Sortを用いた測定により得られた蛍光ヒストグラムを示す。

【図14】図14は、蛍光修飾核酸を含む*S.aureofaciens*培養W/Oエマルションを48時間培養してソーティングした後のドロップレットの画像((a)明視野、(b)暗視野、(c)蛍光視野)を示す。

【図15】図15は蛍光修飾核酸を含む*Bradyrhizobium japonicum*培養W/Oエマルションの画像を示す。図15(A)~(F)はそれぞれ、(A)作製直後の明視野画像、(B)作製直後の暗視野画像、(C)作製直後の蛍光画像、(D)6d培養後の明視野画像、(E)6d培養後の暗視野画像、および、(F)6d培養後の蛍光画像を示す。

20

【図16】図16は、蛍光修飾核酸を含む*B.japonicum*培養W/Oエマルションを6日間培養後、On-chip Sortを用いた測定により得られた蛍光ヒストグラムを示す。

【図17】図17は、蛍光修飾核酸を含む*B.japonicum*培養W/Oエマルションを6日間培養してソーティングした後のドロップレットの画像((a)明視野、(b)暗視野、(c)蛍光視野)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明は、一態様において、W/Oエマルションにおけるドロップレット内の微生物の増殖を検出する方法であって、

(a)微生物を含むドロップレットを作製する工程と

30

(b)前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と

(c)前記ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、

(c1)前記微生物より体外に分泌または放出された物質に作用して蛍光を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定するか、または、

(c2)微生物の自家蛍光を測定する工程と

を含み、

蛍光特性の変化が検出された前記ドロップレットが、インタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットであることを示す、検出方法に関する。

【0009】

40

ここで、本明細書において、W/Oエマルションとは連続相である油相中に、分散相として微粒子状の水滴(ドロップレット)が存在している状態をいう。

また、本明細書において「ドロップレット」とは、エマルション中の区画化された水滴をいう。

W/Oエマルションを構成する水相は、油相と混和しない親水性の液体であればよい。このような水相に用いることのできる溶液としては、以下に限定されないが、例えば、LB、R2Aなどを挙げることができる。また、湖沼水や海水をそのまま水相として用いることもできる。

W/Oエマルションを構成する油相は、水相と混和しない疎水性の液体であればよい。このような油相は公知であり、以下に限定されないが、例えば、FC40、Novec7500、ミネラ

50

ルオイルなど、またはこれらの組み合わせを挙げることができる。

W/Oエマルジョンを安定化させるために、界面活性剤を水相あるいは油相、もしくはその両方に添加する必要がある。用いられる界面活性剤には、例えば、水相用の界面活性剤としてはSpan80、Tween20など、油相用の界面活性剤としてはPico-surf1、Krytoxなど、またはこれらの組み合わせを挙げることができる。水相または油相に添加される界面活性剤の濃度は、用いる界面活性剤の種類や所望するドロップレットの大きさ等の条件により適宜調整することができる。

本発明に用いられるW/Oエマルジョンは、エマルジョン中に区画化されたドロップレット内で微生物が増殖でき、かつ、微生物の増殖を検出可能なものであれば制限されない。また、W/Oエマルジョン中に含まれるドロップレットの大きさも、微生物が増殖でき、かつ、微生物の増殖を検出可能なものである限り特に制限されない。

上記の水相および油相からなるW/Oエマルジョンの作製方法は公知であり、例えば、QX100(Bio-RAD)などの市販の装置を用いて作成することができる。

#### 【0010】

本発明の方法を適用可能な微生物としては、ドロップレット内で増殖可能であり、かつ、分泌物を蛍光修飾核酸プローブで検出可能、または、自家蛍光を検出可能な微生物であれば特に制限されず、例えば、大腸菌、枯草菌、放線菌などを挙げることができる。微生物は、環境由来の微生物であってもよく、または遺伝子導入などが施された組換え微生物など、人工的に作製されたものであってもよい。

#### 【0011】

一実施の形態においては、微生物は環境由来のものである。本発明の方法は、例えば、土壌等の環境中に含まれる微生物群を対象とすることができる。環境中に含まれる微生物群をドロップレットに封入させることで、各ドロップレットに含まれる微生物ごとの性質に応じた増殖を検出でき、異なる増殖能を示すドロップレットごとに単離や分取することができる。特に、一細胞ごとに微生物をドロップレット中に封入することで、異なる増殖能を示す微生物を含むドロップレットごとに単離が可能となる。

#### 【0012】

また、別の実施の形態においては、微生物は人工的に作製されたものではない。すなわち、本発明の検出方法は、一実施の形態において、

W/Oエマルジョンにおけるドロップレット内の微生物の増殖を検出する方法であって、

(a) 微生物を含むドロップレットを作製する工程と

(b) 前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と

(c) 前記ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、

(c1) 前記微生物より体外に分泌または放出された物質に作用して蛍光を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定するか、または、

(c2) 微生物の自家蛍光を測定する工程と  
を含み、

蛍光特性の変化が検出された前記ドロップレットが、インタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットであることを示す、検出方法(ただし、前記微生物が人工的に作製されたものである検出方法を除く)である。

#### 【0013】

本発明の検出方法は、(a) 微生物を含むドロップレットを作製する工程を含む。

上記工程(a)において、微生物を含むドロップレットが作製される。

このとき、ドロップレット内に封入される微生物は、一つの種に由来するものであってもよく、また、二種以上の微生物が封入されていてもよい。

すなわち、本発明の検出方法は、一実施の形態において、(a) ドロップレットを作製する工程を、二種以上の微生物を含むドロップレットを作製する工程とすることができる。一つのドロップレット内に二種以上の微生物を含むことにより、一つのドロップレット内に封入された微生物間の相互作用の影響について検証することが可能となる。



## 【 0 0 1 4 】

また、ドロップレット内に封入される微生物の数は、一細胞単位で封入されてもよく、または、二細胞以上の複数の細胞単位で封入されても良い。

すなわち、本発明の検出方法は、一実施の形態において、(a)ドロップレットを作製する工程が、微生物を一細胞単位で含むドロップレットを作製する工程とすることができる。これにより、蛍光特性の変化が検出されたドロップレット内には、インタクトかつ増殖した微生物であって、単一の細胞由来の微生物が含まれることになる。特に、複数種の微生物を含む試料から特定の微生物種の単離を目的とする場合、ドロップレット内には一細胞単位で微生物を含むことが好ましい。なお、1つのドロップレット内に微生物が一細胞ずつ含まれるように、W/Oエマルションを作製する方法は公知である(例えば、非特許文献3)。ドロップレット内に微生物が一細胞単位で含まれる限り製造方法は制限されないが、例えば、ポワソン分布に従い、水相中に存在する微生物数とドロップレット数の調整をすることで、一細胞が封入されたドロップレットを作製することができる。このようなドロップレット内に含まれる微生物は、単一の細胞由来の微生物である。よって、複数の微生物種を含む微生物群を試料とした場合、異なる増殖能を示すドロップレットごとに選択的に分取することで、各微生物の解析、スケールアップに寄与することができる。また、ドロップレット内に二種以上の微生物を封入する際にも、各種ごとに一細胞単位でドロップレット内に微生物を封入させることもできる。

10

また、上述のように、本発明の検出方法は、一実施の形態において、(a)ドロップレットを作製する工程が、微生物を二細胞以上で含むドロップレットを作製する工程とすることができる。各ドロップレット中に複数の細胞を封入することで、検出可能な微生物数までの増殖に必要な培養時間を抑えることができ好ましい。また、共生関係を持つ微生物同士が同一ドロップレットに封入された場合、微生物相互間作用等によって増殖が促進されるという効果も期待される。

20

## 【 0 0 1 5 】

本発明の検出方法は、(b)上記工程(a)において作製されたドロップレット中で微生物を培養する工程を含む。

W/Oエマルション中のドロップレットを用いて微生物を培養する方法は公知であり、マイクロ流路上など当業者であれば適宜培養に必要な装置を選択して培養することができる。培養条件についても、ドロップレットに含まれる微生物が増殖できる条件であれば特に制限されず、当業者であれば、培養の目的や培養の対象となる微生物に応じて適宜好ましい培養条件を設定することができる。以下に限定されないが、例えば、温度条件は4~95とすることができ、培養時間は最大85日間行うことができる。

30

## 【 0 0 1 6 】

本発明の検出方法は、(c)ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程を含む。また、工程(c)の検出工程は、(c1)微生物より体外に分泌または放出された物質に作用して蛍光を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定するか、または、(c2)微生物の自家蛍光を測定することにより行われる。

ここで、本明細書における「微生物より体外に分泌または放出された物質」とは、核酸関連酵素などを意味し、具体的にはRNase、DNaseなどを挙げるることができる。

40

また、「上記微生物より体外に分泌または放出された物質に作用して蛍光を生じる蛍光修飾核酸プローブ」とは蛍光修飾核酸であり、以下に制限されないが、例えば、FRET型蛍光修飾核酸プローブ、PET型蛍光修飾核酸プローブなどを挙げるることができる。

FRET型蛍光修飾核酸プローブを蛍光修飾核酸プローブとして用いる際には、市販のものをを用いることができ、例えば、下記表1に記載のものを使用することができる。

## 【表 1】

表 1

名前	配列 (5'→3')※
DR-Ale-UACAU	aaaaaUACAUaaaa (配列番号 1)
R-Ale-UCUCG	UCUCGGUGCGUUG (配列番号 2)

※(小文字: DNA, 大文字: RNA)

10

## 【 0 0 1 7 】

表 1 に記載の FRET 型蛍光修飾核酸プローブは、5' 末端および 3' 末端にそれぞれ蛍光基および消光基を有する。例えば、一実施の形態において、表 1 に記載の FRET 型蛍光修飾核酸プローブは 5' 末端に Alexa488、3' 末端に BHQ1 の修飾を有する。その他、FRET 型蛍光修飾核酸プローブに用いることのできる蛍光基、消光基、および、それらの組み合わせは公知のものを使用することができる。以下に限定されないが、蛍光基としては FAM、TET、HEX など、消光基としては Dabcyl、Eclipse、BHQ2 などを挙げることができ、代表的な組み合わせの使用例としては、FAM / Dabcyl (蛍光基 / 消光基) などを挙げることができる。通常は FRET により消光状態が維持されているが、微生物により体外に放出された酵素により核酸の切断が生じると FRET が解消され、蛍光強度が上昇する(図 1)(Kelemen B. R. et al., “Hypersensitive substrate for ribonucleases” *Nucleic Acids Research*, 1999; 27, 3696-3701, Sato S. and Takenaka S., “Highly Sensitive Nuclease Assays Based on Chemically Modified DNA or RNA” *Sensors*, 2014; 14, 12437-12450)。また、FRET 型蛍光修飾核酸プローブの塩基配列部分は、FRET による消光状態を維持することが可能な配列であって、検出対象酵素が認識して切断あるいは結合するような内部配列を含むようにして設計することができる。微生物が産生する RNase または DNase を標的とする際、当業者であればドロップレット内に封入する微生物に応じて標的とする具体的な RNase または DNase を選択し、当該 RNase または DNase が認識して切断あるいは結合する内部配列を含むように FRET 型蛍光修飾核酸プローブを設計することができる。

20

30

なお、大腸菌、枯草菌、放線菌などの微生物は RNaseI、RNaseY、RNaseE などの RNase を複数種有していることが知られており、各微生物により保有する RNase のパターンが異なる。また RNase はその種類ごとに配列特異性が異なり、例えば、大腸菌が保有する RNaseI は配列特異性を有さず、パチルス属 (*Bacillus*) が保有する RNaseY は ssRNA の A/U 部分を優先的に分解し、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) が保有する RNaseE は ssRNA の A/U 部分を優先的に分解する。このように微生物が体外に放出する RNase を標的とする場合、ドロップレット内に封入する微生物ごとに標的とする RNase を選択し、FRET 型蛍光修飾核酸プローブが RNaseI の非存在下では FRET による消光状態を維持し、標的とし選択した RNase 存在下では当該 RNase によって切断されることが可能な任意のリボヌクレオチド配列を含むように設計すればよい。FRET 型蛍光修飾核酸プローブは、複数種の RNase の認識配列を含んでいてもよいし、特定の RNase の認識配列のみを含むように設計してもよい。当業者であれば、標的とする RNase およびその認識配列の選択と FRET 型蛍光修飾核酸プローブの設計は公知の情報に基づいて適宜行うことができる。

40

本発明の好ましい一実施の形態において、蛍光修飾核酸プローブは微生物由来 RNase による RNA 切断が生じると蛍光強度が増大するものである。本発明で微生物が産生する RNase を標的とする利点は 5 つあげられる。まず、RNase はあらゆる生物に保存されており、検出できる微生物種を限定しない。2 つ目として、RNA を切断する際に特殊な環境(温度、pH、塩濃度等)やバッファーを必要としない RNase も存在するため、通常培養環境下で検出可能である。3 つ目として、RNase は非常に安定した酵素であり、一度反応系に含まれれば

50

高感度に活性を検出することが可能である。4つ目として、蛍光修飾核酸プローブの切断反応は細胞外で生じるため、細胞非侵襲的な検出が可能となる。最後に5つ目として、本発明で使用する核酸プローブは水溶性であり、オイルに溶け出すことや近傍のドロップレットに移動することなく、封入されたドロップレット内に維持されるため長期間の検出が可能である。

蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定する方法は、当業者であれば市販の装置を用いて適宜行うことができる。本発明の検出方法においては、微生物より体外に分泌または放出された物質に作用して蛍光を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定することにより、ドロップレット内の微生物の増殖を検出することができる。

10

#### 【0018】

(c)の検出工程において蛍光修飾核酸プローブを使用する場合、蛍光の測定前に、ドロップレット内に蛍光修飾核酸プローブを封入する。蛍光修飾核酸プローブの封入のタイミングは、ドロップレット内の微生物の増殖を検出できる限り制限されず、具体的には、下記(ア)または(イ)のタイミングで封入することができる：

(ア)(a)のドロップレットの作製工程において、蛍光修飾核酸プローブをドロップレット中に封入する、または、

(イ)(c)の検出工程の前に、微生物を含むドロップレットと蛍光修飾核酸プローブを含むドロップレットとを合一させることにより、蛍光修飾核酸プローブを、微生物を含むドロップレット中に封入する。

20

(ア)ドロップレットの作製工程において、蛍光修飾核酸プローブをドロップレット中に封入する場合には、ドロップレット作製直前に、水相として使用する溶液に蛍光修飾核酸プローブを混合するようによい。

また、(イ)微生物を含むドロップレットと蛍光修飾核酸プローブを含むドロップレットとを合一させる手法は、例えば、W/Oエマルションディスタビリザー存在下でこれら2つのドロップレット同士を会合させるようにして行うことができる。

#### 【0019】

また、本明細書において「微生物の自家蛍光」とは微生物および培地が特定の蛍光色素で標識されていない状態で励起光を照射した時に検出できる蛍光をいう。微生物の自家蛍光は公知であり、以下に制限されないが、例えば、NADH、フラビン、アミノ酸からの蛍光をいう。本発明の検出方法においては、微生物の自家蛍光を測定することにより、ドロップレット内の微生物の増殖を検出することができる。また、当業者であれば適宜対象とする微生物の自家蛍光を測定することができる。

30

#### 【0020】

本発明の検出方法により蛍光が検出されたドロップレットは、非侵襲的な手法により微生物の増殖を検出するため、インタクトかつ増殖した状態の微生物を含むドロップレットを検出することができる。

ここで、本明細書において「インタクトの微生物」というとき、本微生物の細胞膜が維持されており、増殖が可能であり、生理活性を示す状態にある微生物をいう。すなわち、「インタクトの微生物」からは、細胞溶解液等の処理により細胞膜が溶解した状態の微生物は除かれる。また、本明細書において「増殖した微生物」とは、上記(c)の検出工程における検出限界を超えて増殖した微生物をいう。ドロップレット作製時に封入される微生物数は検出限界未満であり、培養工程によりドロップレット内の微生物が増殖することで検出限界を超える。

40

#### 【0021】

また、(c)ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程は、一実施の形態において、マイクロ流路上で行うことができる。これにより市販のセルソーターなどと組み合わせることで、ハイスループットに蛍光の検出と検出結果に応じた分取が可能になる。

#### 【0022】

また、本発明は、別の態様において、

50

W/Oエマルジョンからインタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットを回収する方法であって、

- ( i ) 微生物を含むドロップレットを作製する工程と
  - ( i i ) 前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と
  - ( i i i ) 前記ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、  
前記微生物より分泌または放出された物質に作用して蛍光を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定するか、または、  
微生物の自家蛍光を測定する工程と
  - ( i v ) 蛍光を検出したドロップレットを回収する工程と
- を含む、回収方法を提供する。

本発明の回収方法において、工程( i ) ~ ( i i i ) は、上記検出方法の工程( a ) ~ ( c ) に準じて行うことができる。

#### 【 0 0 2 3 】

また、本発明の回収方法は、微生物の増殖を示す蛍光を検出した後、( i v ) 蛍光を検出したドロップレットを回収する工程を含む。

ドロップレット群より、蛍光が検出された、または、蛍光が検出されなかったドロップレットを分取または回収する手法は公知である。当業者であれば、ドロップレット群を培養および蛍光検出に供している器具(マイクロ流路や培養ディッシュなど)に応じて、適宜好ましい回収方法を選択することができる。以下に制限されないが、例えば、市販のチップ式セルソーターを利用して、蛍光強度が上昇したドロップレットをソーティングすることができる。

#### 【 0 0 2 4 】

また、本発明は、別の態様において、上記検出方法または上記回収方法に使用されるキットを提供する。

本発明のキットは、W/Oエマルジョン水相用の培養液と、W/Oエマルジョン油相用の油成分と、W/Oエマルジョン安定化のための界面活性剤と蛍光修飾核酸プローブとを含むことを特徴とする。本発明のキットには、上記の構成以外のものも含まれてよく、培養等に用いるマイクロ流路、培養皿などが含まれていても良い。

#### 【 0 0 2 5 】

以下に、具体的な実施例を示すが、本発明の核酸アプタマーは以下に開示するものに限定されない。また、本明細書中で引用する文献の内容は、本明細書に参照として組み込まれる。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 2 6 】

( 試験例 1 : 大腸菌培養液による蛍光修飾核酸への影響評価 )

蛍光修飾核酸(DR-A1e-UACAU)(日本バイオサービス)1 $\mu$ Mと、( i ) 大腸菌を含まないLB培養液、( i i ) 大腸菌を含むLB培養液(OD<sub>600</sub>=2.77)、または、( i i i ) 大腸菌を含まないLB培養液にRNaseA 2.5ng/ $\mu$ Lを添加したものをそれぞれ混合しトータル20 $\mu$ Lとした。混合直後および37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベーション後の蛍光強度をLight Cycler480(Roche)を用いて測定した。( i ) LBと蛍光修飾核酸(DR-A1e-UACAU)を混合した時には蛍光強度は低いまま維持されていた。一方、( i i ) 大腸菌培養液と蛍光修飾核酸(DR-A1e-UACAU)を混合した場合には時間が経つと蛍光強度の上昇が見られた。( i i i ) RNaseAを添加した時には高い蛍光強度が維持されていた(図2)。このことから大腸菌培養液によって蛍光修飾核酸の切断、続く蛍光強度の上昇が生じることが明らかとなった。

#### 【 0 0 2 7 】

( 試験例 2 : ドロップレット内における蛍光修飾核酸の反応 )

ドロップレット内において蛍光修飾核酸(R-A1e-UCUCG)(日本バイオサービス)の切断による蛍光強度の変化を調べた。( i ) LB培養液に蛍光修飾核酸(R-A1e-UCUCG)1 $\mu$ Mのみを添加した溶液、または、( i i ) LB培養液に蛍光修飾核酸(R-A1e-UCUCG)1 $\mu$ MとRNaseA 5ng/ $\mu$ Lをそれぞれ添加した溶液を水相として、DG oil(Bio-RAD)とFC-40(3M)を油相として、Pico-s

10

20

30

40

50

urf1(Dolomite, final 1%)を界面活性剤として使用してW/Oエマルションを作製した。W/Oエマルション作製装置QX100(Bio-RAD)を使用したところ、直径130 $\mu$ m程度の大きさのドロップレットが作製できた。それぞれのW/Oエマルションを顕微鏡によって蛍光観察をしたところ、蛍光修飾核酸のみの系において蛍光強度は上昇せず、RNaseAを添加した系において蛍光強度の上昇が見られ、これら2系のW/Oエマルションを蛍光の強さで区別することができた(図3)。

#### 【0028】

(試験例3：蛍光修飾核酸を用いた微生物増殖の検出および分取)

蛍光修飾核酸の蛍光を測定することによりドロップレット内における微生物増殖の検出を試みた。W/Oエマルションの水相には蛍光修飾核酸(R-Ale-UCUCG)1 $\mu$ Mを混入した大腸菌培養液(LB培養液)を用いた。また、油相にはDG oil(Bio-RAD)とFC-40(3M)を使用した。界面活性剤としてPico-surf1(Dolomite, final 1%)を使用した。大腸菌培養液は、ポワソン分布で90%以上のドロップレットに大腸菌が0細胞、残りのドロップレットに一細胞以上が含まれるように濃度調整を行った。W/Oエマルション作製装置QX100(Bio-RAD)を使用したところ、直径130 $\mu$ m程度の大きさのドロップレットが作製できた。作製したW/Oエマルションは1.5mLチューブに回収し、37 $^{\circ}$ Cで24時間静置培養した。W/Oエマルション作製直後および24時間培養後に顕微鏡観察を行なったところ、一部のドロップレットにて大腸菌の増殖および蛍光強度の上昇が確認できた(図4)。On-chip Sort(株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ)を用いた蛍光検出を行なったところ、一部蛍光強度の高いドロップレット集団が生じていた(図5)。蛍光強度の高いドロップレット集団を分取し、顕微鏡観察を行なった結果、大腸菌が増殖したドロップレットが濃縮された(図6)。

#### 【0029】

(試験例4：自家蛍光を用いた微生物増殖の検出および分取)

ドロップレット内の微生物の自家蛍光を測定することで微生物の増殖を検出可能か検証した。W/Oエマルションの水相には、ポワソン分布で90%以上のドロップレットに大腸菌が0細胞、残りのドロップレットに一細胞以上が含まれるように濃度調整を行った大腸菌培養液を用いた。油相にはDG oil(Bio-RAD)とFC-40(3M)を使用した。界面活性剤としてPico-surf1(Dolomite, final 1%)を使用した。W/Oエマルション作製装置QX100(Bio-RAD)を使用したところ、直径130 $\mu$ m程度の大きさのドロップレットが作製できた。作製したW/Oエマルションは1.5mLチューブに回収し、37 $^{\circ}$ Cで24時間静置培養した。W/Oエマルション作製直後および24時間培養後に顕微鏡観察を行なったところ、一部のドロップレットにて大腸菌の増殖および蛍光強度の上昇が確認できた(図7)。On-chip Sort(株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ)を用いた蛍光測定を行なったところ、一部蛍光強度の高いドロップレット集団が生じていた(図8)ことから蛍光強度の差による分取が可能であると示唆される。

#### 【0030】

(試験例5：蛍光修飾核酸を用いた微生物増殖の検出および分取)

蛍光修飾核酸の蛍光を測定することによりドロップレット内における微生物増殖の検出を試みた。W/Oエマルションの水相には蛍光修飾核酸(R-Ale-UCUCG)200nMを混入したBacillus subtilis培養液(LB培養液)を用いた。また、油相にはNovec7500を使用した。界面活性剤としてPico-surf1(Dolomite, final 1%)を使用した。B.subtilis培養液は、ポワソン分布で50%程度のドロップレットにB.subtilisが0細胞、残りのドロップレットに一細胞以上が含まれるように濃度調整を行った。W/Oエマルション作製装置QX100(Bio-RAD)を使用したところ、直径130 $\mu$ m程度の大きさのドロップレットが作製できた。作製したW/Oエマルションは1.5mLチューブに回収し、30 $^{\circ}$ Cで48時間静置培養した。W/Oエマルション作製直後および48時間培養後に顕微鏡観察を行ったところ、一部のドロップレットにてB.subtilisの増殖および蛍光強度の上昇が確認できた(図9)。48時間培養後にOn-chip Sortを用いた蛍光検出を行なったところ、一部蛍光強度の高いドロップレット集団が生じていた(図10)。蛍光強度の高いドロップレット集団を分取し、顕微鏡観察を行なった結果、B.subtilisが増殖したドロップレットが濃縮された(図11)。

## 【0031】

(試験例6：蛍光修飾核酸を用いた微生物増殖の検出および分取)

蛍光修飾核酸の蛍光を測定することによりドロップレット内における微生物増殖の検出を試みた。W/Oエマルションの水相には蛍光修飾核酸(R-Ale-UCUCG) 200nMを混入した*Streptomyces aureofaciens*培養液(LB培養液)を用いた。また、油相にはNovac7500を使用した。界面活性剤としてPico-surf1(Dolomite, final 1%)を使用した。*S.aureofaciens*培養液は、ポワソン分布で80%程度のドロップレットに*S.aureofaciens*が0細胞、残りのドロップレットに一細胞以上が含まれるように濃度調整を行った。W/Oエマルション作製装置QX100を使用したところ、直径130 μm程度の大きさのドロップレットが作製できた。作製したW/Oエマルションは1.5mLチューブに回収し、28℃で48時間静置培養した。W/Oエマルション作製直後および48時間培養後に顕微鏡観察を行なったところ、一部のドロップレットにて*S.aureofaciens*の増殖および蛍光強度の上昇が確認できた(図12)。48時間培養後にOn-chip Sort(株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ)を用いた蛍光検出を行なったところ、一部蛍光強度の高いドロップレット集団が生じていた(図13)。蛍光強度の高いドロップレット集団を分取し、顕微鏡観察を行なった結果、*S.aureofaciens*が増殖したドロップレットが濃縮された(図14)。

10

## 【0032】

(試験例7：蛍光修飾核酸を用いた微生物増殖の検出および分取)

蛍光修飾核酸の蛍光を測定することによりドロップレット内における微生物増殖の検出を試みた。W/Oエマルションの水相には蛍光修飾核酸(R-Ale-UCUCG)200nMを混入した*Bradyrhizobium japonicum*培養液(NBRC805培養液)を用いた。また、油相にはNovac7500を使用した。界面活性剤としてPico-surf1(Dolomite, final 1%)を使用した。*B.japonicum*培養液は、ポワソン分布で95%程度のドロップレットに*B.japonicum*が0細胞、残りのドロップレットに一細胞以上が含まれるように濃度調整を行った。W/Oエマルション作製装置QX100(Bio-RAD)を使用したところ、直径130 μm程度の大きさのドロップレットが作製できた。作製したW/Oエマルションは1.5mLチューブに回収し、28℃で6日間静置培養した。W/Oエマルション作製直後および6日間培養後に顕微鏡観察を行なったところ、一部のドロップレットにて*B.japonicum*の増殖および蛍光強度の上昇が確認できた(図15)。On-chip Sortを用いた蛍光検出を行なったところ、一部蛍光強度の高いドロップレット集団が生じていた(図16)。蛍光強度の高いドロップレット集団を分取し、顕微鏡観察を行なった結果、*B.japonicum*が増殖したドロップレットが濃縮された(図17)。

20

30

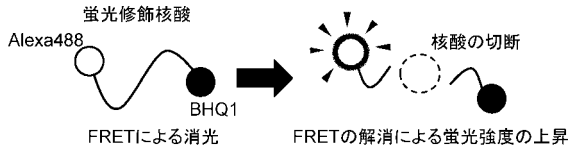
【産業上の利用可能性】

## 【0033】

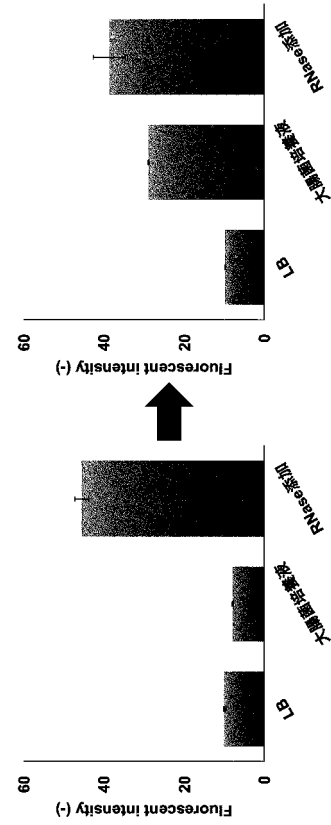
本技術を環境サンプルに応用できれば、環境微生物を増殖速度ごとに分離培養することが可能になる。環境微生物中で同一の基質を使用し、増殖速度の異なる微生物群においては、増殖速度の遅い微生物は増殖速度が速い微生物に淘汰される。本手法の一応用例としては、同一基質を使用する微生物間の競合を緩和させ、これまで淘汰されてきた微生物を分離培養するアプローチを提供する。また環境中には異種微生物間相互作用を利用した増殖制御を行う微生物も数多く存在する。同一ドロップレット内に複数種の微生物が封入され、微生物間相互作用が働くことによって、それぞれの微生物の増殖が促進されることが期待される。

40

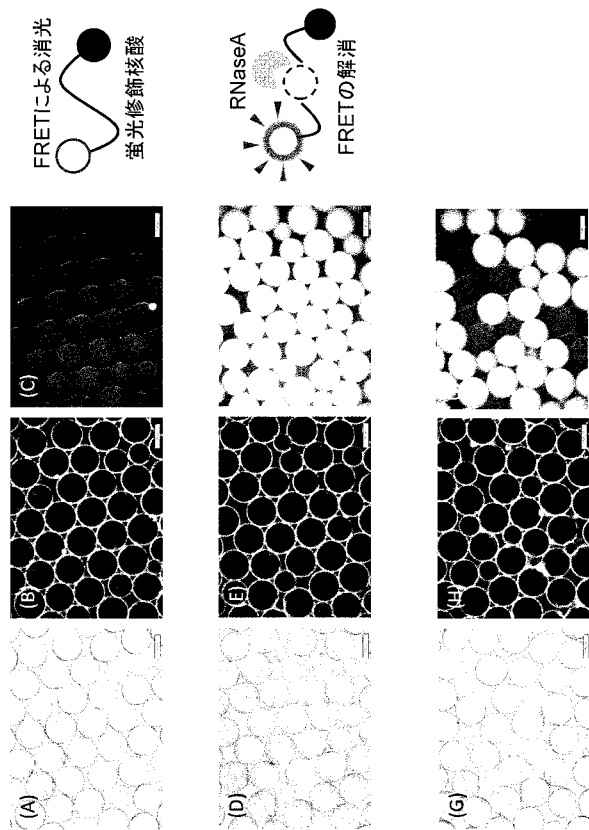
【 図 1 】



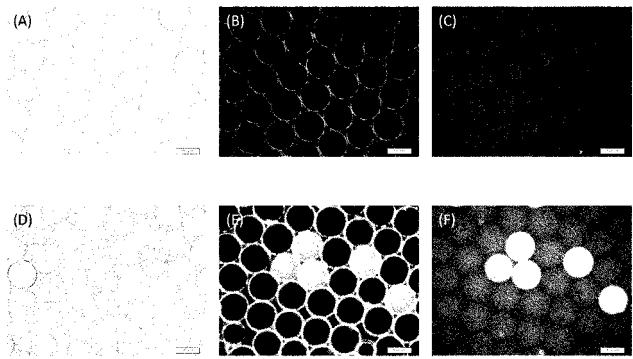
【 図 2 】



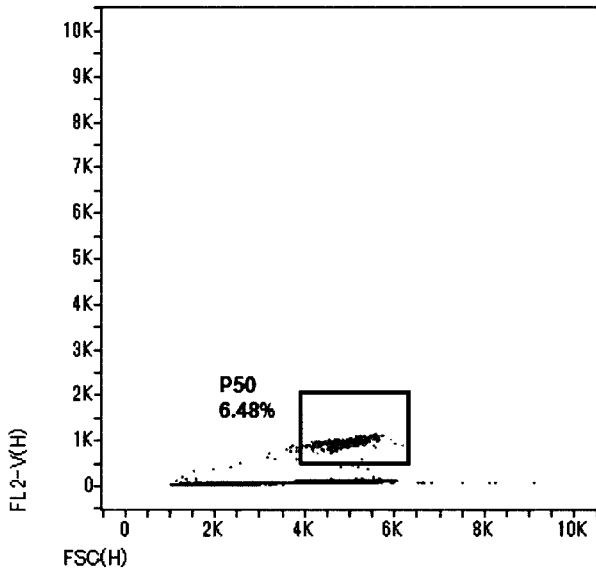
【 図 3 】



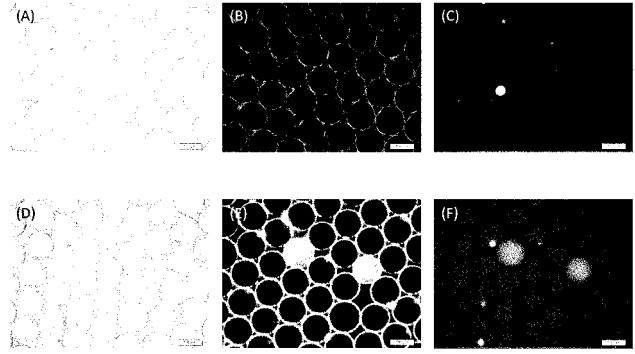
【 図 4 】



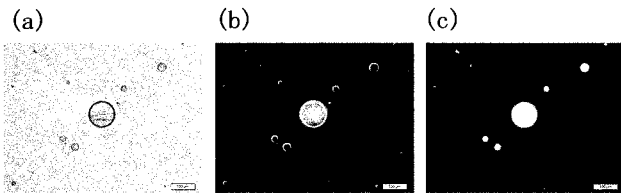
【 図 5 】



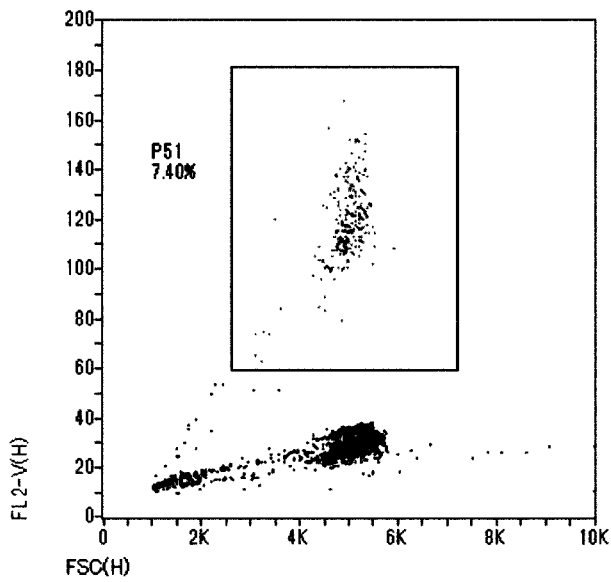
【 図 7 】



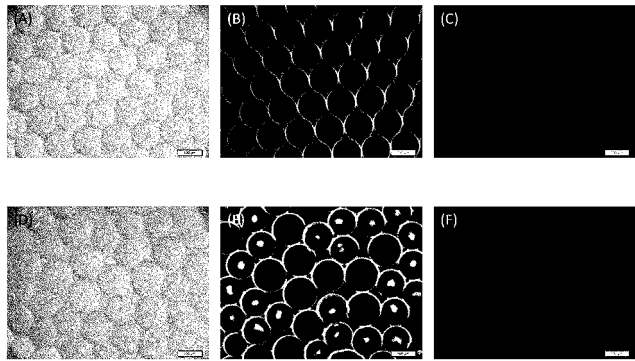
【 図 6 】



【 図 8 】

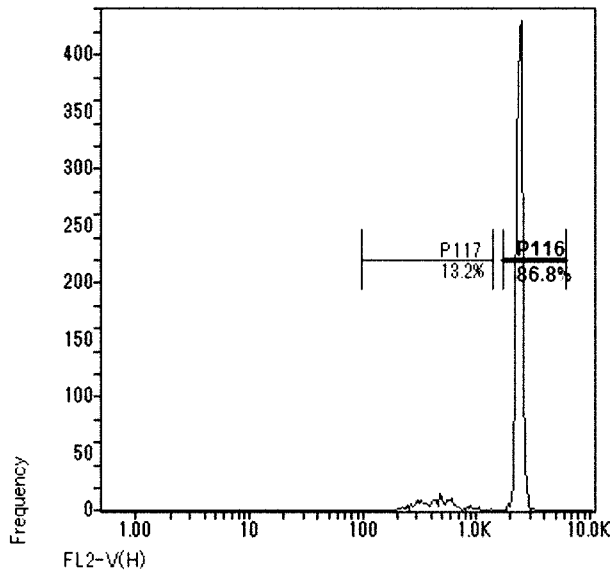


【 図 9 】

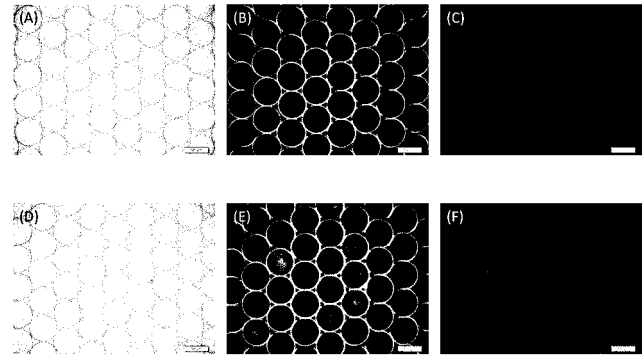




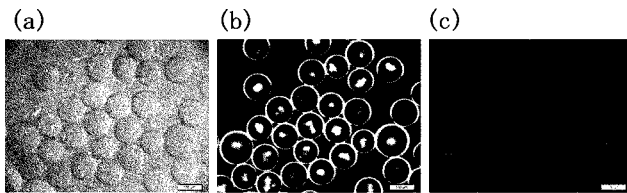
【 図 1 0 】



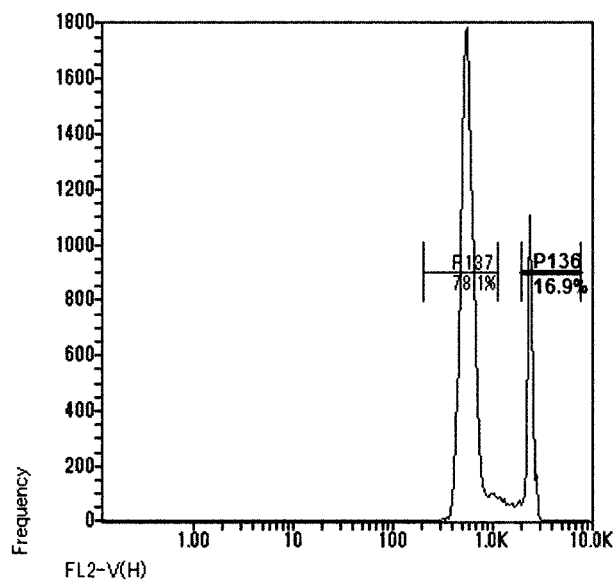
【 図 1 2 】



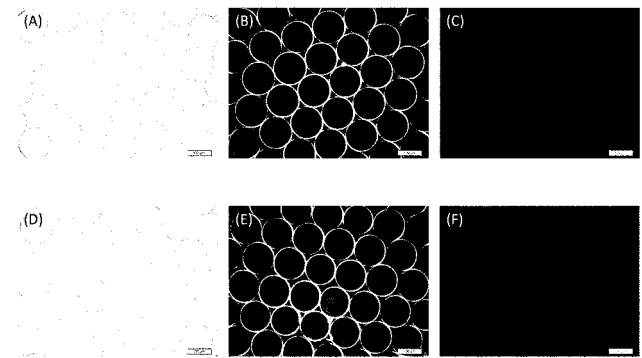
【 図 1 1 】



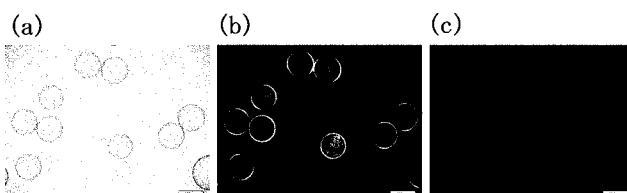
【 図 1 3 】



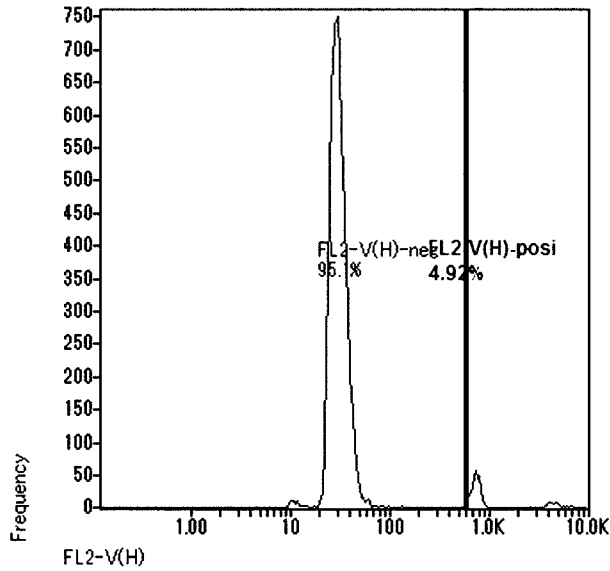
【 図 1 5 】



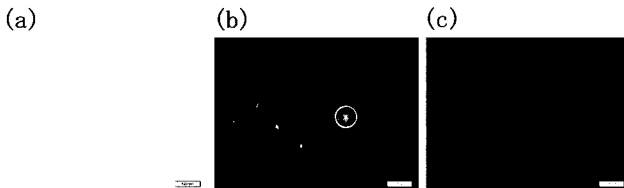
【 図 1 4 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



## 【 配列表 】

2019073902000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和2年2月26日 (2020.2.26)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

W/Oエマルションにおけるドロップレット内の微生物の増殖を検出する方法であって、

- ( a ) 微生物を含むドロップレットを作製する工程と
  - ( b ) 前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と
  - ( c ) 前記ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、前記微生物より体外に分泌または放出されたRNaseまたはDNaseに作用して蛍光特性の変化を生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定する工程と
- を含み、

蛍光特性の変化が検出された前記ドロップレットが、インタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットであることを示す、検出方法。

【 請求項 2 】

請求項 1 に記載の検出方法であって、

前記 ( c ) の検出工程がマイクロ流路上で行われる、検出方法。

【 請求項 3 】

請求項 1 または 2 に記載の検出方法であって、

前記微生物が環境由来である、検出方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の検出方法であって、  
前記微生物が人工的に作製されたものではない、検出方法。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載の検出方法であって、  
前記微生物が遺伝子組換え微生物である、検出方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の検出方法であって、  
前記 ( a ) ドロップレットを作製する工程が、二種以上の微生物を含むドロップレット  
を作製する工程である、検出方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の検出方法であって、  
前記 ( a ) ドロップレットを作製する工程が、微生物を一細胞単位で含むドロップレ  
ットを作製する工程であって、  
前記 ( c ) の検出工程において蛍光特性の変化が検出された前記ドロップレットが、イ  
ンタクトかつ増殖した微生物であって、単一の細胞由来の微生物を含むものである、検出  
方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の検出方法であって、  
前記 ( c ) の検出工程において前記蛍光修飾核酸プローブは、  
(ア) 前記 ( a ) のドロップレットの作製工程において、ドロップレット中に封入される  
か、または、  
(イ) 前記 ( c ) の検出工程の前に、微生物を含むドロップレットと蛍光修飾核酸プロー  
ブを含むドロップレットとを合一させることにより、微生物を含むドロップレット中に封  
入される、検出方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の検出方法であって、  
前記蛍光修飾核酸プローブがFRET型蛍光修飾核酸プローブである、検出方法。

【請求項 10】

W/Oエマルションからインタクトかつ増殖した微生物を含むドロップレットを回収する  
方法であって、  
( i ) 微生物を含むドロップレットを作製する工程と  
( i i ) 前記ドロップレット中で微生物を培養する工程と  
( i i i ) 前記ドロップレット内の微生物の増殖を検出する工程であって、  
前記微生物より分泌または放出されたRNaseまたはDNaseに作用して蛍光特性に変化を  
生じる蛍光修飾核酸プローブを用いて、前記蛍光修飾核酸プローブが生じる蛍光を測定す  
る工程と  
( i v ) 蛍光特性の変化を検出したドロップレットを回収する工程と  
を含む、回収方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の回収方法であって、  
前記 ( i i i ) および ( i v ) の工程をさらに 1 回または複数回繰り返す、回収方法。

【請求項 12】

請求項 10 または 11 に記載の回収方法であって、前記 ( i v ) の回収工程の後に  
( v ) 前記ドロップレットから微生物を回収することを含む、回収方法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の検出方法、または、請求項 10 ~ 12 のいずれか  
一項に記載の回収方法に使用されるキットであって、  
W/Oエマルション水相用の培養液と

W/Oエマルション油相用の油成分と  
W/Oエマルションを安定化するための界面活性剤と  
RNaseまたはDNaseに作用して蛍光特性に変化を生じる蛍光修飾核酸プローブと  
を含む、キット。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/037257
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. C12Q1/6806(2018.01) i, C12Q1/02(2006.01) i, C12N15/11(2006.01) n  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) Int.Cl. C12Q1/6806, C12Q1/02, C12N15/11  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ITO, Manami et al., "A Bacterial Continuous Culture System Based on a Microfluidic Droplet Open Reactor", ANALYTICAL SCIENCES, 2016, vol. 32, pp. 61-66, ISSN 1348-2246, in particular, title, abstract, page 61, right column, lines 3-9, page 63, left column, line 12 to right column, line 17, page 63, right column, line 10 from the bottom to bottom line, fig. 1, 3a	1-14
Y	HERNANDEZ, Frank J. et al., "Non-invasive Imaging of Staphylococcus aureus Infections with a Nuclease-Activated Probe", Nat. Med., 2014, vol. 20, no. 3, pp. 301-306, ISSN 1546-170X, abstract, fig. 1, 3	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 December 2018 (21.12.2018)		Date of mailing of the international search report 08 January 2019 (08.01.2019)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/037257

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014/0199245 A1 (MCNAMARA, II, James O. et al.) 17 July 2014, abstract, fig. 1A, 1C, 8B, paragraphs [0039], [0227], etc. & WO 2013/033436 A1 & EP 2751567 A1	1-14
Y	NG, Ee Xien et al., "Single cell multiplexed assay for proteolytic activity using droplet microfluidics", Biosensors and Bioelectronics, 2016, vol. 81, pp. 408-414, ISSN 0956-5663, abstract, fig. 1, 6, p. 409, section "2.1. Experimental methods", p. 413, section "3. 2. live cell protease assay"	1-14
Y	WO 2006/109588 A1 (DENSO CORP.) 19 October 2006, paragraph [0004], fig. 5, 13 & US 2009/0215140 A1, paragraphs [0023], [0031], fig. 5, 13 & EP 1873233 A1 & KR 10-2007-0121051 A	11-14
Y	JP 2015-31517 A (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) 16 February 2015, paragraph [0019], drawings (Family: none)	11-14
PA	大田悠里他, water-in-oil エマルションを用いた微生物の培養および検出技術の構築, 第70回日本生物工学会大会講演要旨集, 07 August 2018, page 182, 2Fp07, (OOTA, YURI et al., "Establishment of techniques of cultivating and detecting microorganism using water-in-oil emulsion", Lecture abstracts of the 70th Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan)	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 3 7 2 5 7													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/6806(2018.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12N15/11(2006.01)n															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/6806, C12Q1/02, C12N15/11															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2018年														
日本国実用新案登録公報	1996-2018年														
日本国登録実用新案公報	1994-2018年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
Y	ITO, Manami et al., A Bacterial Continuous Culture System Based on a Microfluidic Droplet Open Reactor, ANALYTICAL SCIENCES, 2016, vol. 32, p. 61-66, ISSN 1348-2246, 特に、タイトル、要約、61頁右欄3~9行、63頁左欄12行~右欄17行、63頁右欄下から10行~最終行、Fig. 1, 3a	1-14													
Y	HERNANDEZ, Frank J. et al., Non-invasive Imaging of Staphylococcus aureus Infections with a Nuclease-Activated Probe, Nat. Med., 2014, vol. 20, no. 3, p. 301-306, ISSN 1546-170X, 要約、Figure. 1, 3	1-14													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献														
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 21.12.2018		国際調査報告の発送日 08.01.2019													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵	4B 9739												
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 3 7 2 5 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	US 2014/0199245 A1 (MCNAMARA, II, James O. et al.) 2014. 07. 17, 要約、Fig. 1A, 1C, 8B, [0039], [0227]等 & WO 2013/033436 A1 & EP 2751567 A1	1-14
Y	NG, Ee Xien et al., Single cell multiplexed assay for proteolytic activity using droplet microfluidics, Biosensors and Bioelectronics, 2016, vol. 81, p. 408-414, ISSN 0956-5663, 要約、Fig. 1, 6, p. 409, 2. 1. Experimental methods の項、p. 413, 3. 2. live cell protease assay の項	1-14
Y	WO 2006/109588 A1 (株式会社デンソー) 2006. 10. 19, 段落 0 0 0 4、図 5、1 3 & US 2009/0215140 A1, [0023], [0031], Fig. 5, 13 & EP 1873233 A1 & KR 10-2007-0121051 A	11-14
Y	JP 2015-31517 A (浜松ホトニクス株式会社) 2015. 02. 16, 段落 0 0 1 9、図面 (ファミリーなし)	11-14
PA	大田悠里他, water-in-oil エマルションを用いた微生物の培養および検出技術の構築, 第 7 0 回日本生物工学会大会講演要旨集, 2018. 08. 07, 1 8 2 頁, 2 F p 0 7	1-14



## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . S P A N

2 . T W E E N

(72)発明者 宮本 龍樹

茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

(72)発明者 森田 雅宗

茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

(72)発明者 松倉 智子

茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

(72)発明者 野田 尚宏

茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ06 QQ42 QR32 QR39 QR55 QR75 QS24 QX02

4B065 AA26X AC15

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。