

(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2002 - 541457

(P2002 - 541457A)

(43)公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S 4 H 0 4 5
33/543	521	33/543	521
33/569		33/569	F
// C 0 7 K 14/47	ZNA	C 0 7 K 14/47	ZNA

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 40数)

(21)出願番号	特願2000 - 609793(P2000 - 609793)	(71)出願人	ユニリーバー・ナムローゼ・ベンノート シャープ オランダ国ロッテルダム、ヴェーナ 455
(86)(22)出願日	平成12年4月3日(2000.4.3)	(72)発明者	バドリー , ロバート・アンドリユー イギリス国、ベドフオードシャー・エム・ ケイ・44・1・エル・キユー、ベドフオード 、シャーンブルック、コルワース・ハウス、 ユニリーバー・リサーチ・コルワース
(85)翻訳文提出日	平成13年10月5日(2001.10.5)	(72)発明者	ヒューズ , グレン イギリス国、チエシャー・エス・ケイ・11 ・7・ユー・ダブリュ、マクルズフィールド 、コングルトン・ロード・80
(86)国際出願番号	PCT/EP00/02869	(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外 5名) 最終頁に続く
(87)国際公開番号	W000/60354		
(87)国際公開日	平成12年10月12日(2000.10.12)		
(31)優先権主張番号	99302711.9		
(32)優先日	平成11年4月7日(1999.4.7)		
(33)優先権主張国	欧州特許庁(EP)		

(54)【発明の名称】 リポ多糖の免疫測定法と試験装置

(57)【要約】

リポ多糖結合蛋白及びリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体を第一又は第二結合試薬として使用することを含む、大腸菌 (E . c o l i)、クラミジア (C h l a m y d i a) 又はサルモネラ (S a l m o n e l l a) のようなグラム陰性菌からのリポ多糖を検出するための免疫測定法ならびにそれを実施するための装置。分析物を第一結合試薬と反応させて複合体を形成させ、次に第二結合試薬と反応させて、分析物と第一及び第二結合試薬を含む複合体を形成させる。その後最終複合体の存在を検出する。結合試薬の1つは標識されており、他方の結合試薬は標識されておらず、支持体に固定されている。装置は第一領域を含み、遊離標識第一結合試薬はそこから毛管作用を通してサンプルと共に、非標識第二結合試薬を含む検出領域へと運搬される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) サンプルを、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される第一結合試薬と接触させ、その際、リポ多糖が、もし存在する場合には、第一結合試薬と結合して、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体を形成するのに十分な時間、サンプルと第一結合試薬が接触するようにし、

b) 第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体を、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される第二結合試薬と接触させ、その際、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体が第二結合試薬と結合して、第一及び第二結合試薬/リポ多糖分析物複合体を形成するのに十分な時間、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体と第二結合試薬が接触するようにし、そして

c) 形成された第一及び第二結合試薬/リポ多糖分析物複合体の存在を検出する段階を含み、

結合試薬の1つがリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であり、他方の結合試薬がリポ多糖結合蛋白であって、

結合試薬の1つが標識結合試薬であり、他方の結合試薬が非標識結合試薬である

、

サンプル中のリポ多糖分析物の存在を検出する方法。

【請求項2】 結合試薬の1つが支持体に固定されており、他方が固定された結合試薬の位置まで移動することができ、かかる移動結合試薬が標識結合試薬であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 第一結合試薬がリポ多糖結合蛋白であり、第二結合試薬がリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であって且つ支持体に固定されている、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 サンプル中のリポ多糖分析物がグラム陰性菌の細胞膜に由来する、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 サンプル中のリポ多糖分析物が、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ菌 (*Salmonella*) 及びクラミジア菌

(Chlamydia) から成る群から選択されるグラム陰性菌の細胞膜に由来する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 サンプル中のリポ多糖分析物がクラミジア菌の細胞膜に由来する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 サンプルが尿、血清、唾液、頸部又は尿道液から成る群から選択され、当該方法が、サンプルをグラム陰性菌細胞膜の溶解を生じさせるのに十分な量の界面活性剤に接触させる段階をさらに含み、この段階がサンプルを第一結合試薬と接触させる前に行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項8】 標識結合試薬が微粒子標識を含む、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 結合試薬の1つが抗クラミジア菌アリポ多糖抗体を含む、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 結合試薬の1つが、約5000Da未満の分子量を持つポリペプチドであるリポ多糖結合蛋白を含む、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 ポリペプチドが3000 - 4000Daの分子量を持つ、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 ポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 支持体の第一領域に、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される標識結合試薬が可逆的に固定されており、さらに支持体の第二領域には、リポ多糖分析物に対

して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される非標識結合試薬が不可逆的に固定されていて、かかる第二領域がサンプル中の分析物の存在の検出領域である、支持体を含み、結合試薬の1つだけがリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であって、他方がリポ多糖結合蛋白であり、さらに支持体が、液体生物サンプルと接触したときに毛管作用によってサンプルと非標識結合試薬を検出領域に運搬することができることを特徴とする、液体生物サンプルにおいてリポ多糖分析物の存在を検出するための分析試験装置。

【請求項16】 標識結合試薬がリポ多糖結合蛋白である、請求項15に記載の装置。

【請求項17】 リポ多糖結合蛋白が約5000Da未満の分子量を持つポリペプチドである、請求項16に記載の装置。

【請求項18】 ポリペプチドが3000-4000Daの分子量を持つ、請求項17に記載の装置。

【請求項19】 ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、抗体が抗クラミジアリポ多糖抗体である、請求項18に記載の装置。

【請求項20】 ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項19に記載の装置。

【請求項21】 ポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の装置。

【請求項22】 標識結合試薬が微粒子標識を含む、請求項15-21のいずれかに記載の装置。

【請求項23】 支持体が乾燥多孔性担体材料から成る、請求項15-22のいずれかに記載の装置。

【請求項24】 支持体がニトロセルロースから成る、請求項23に記載の装置。

【請求項25】 液体生物サンプルが、尿、血清、唾液、頸部又は尿道液から成る群から選択される液体を含み、リポ多糖分析物がグラム陰性菌の細胞膜に由来する、請求項15-24のいずれかに記載の装置。

【請求項26】 リポ多糖分析物が、大腸菌、サルモネラ菌及びクラミジア菌から成る群から選択されるグラム陰性菌の細胞膜に由来する、請求項25に記載の装置。

【請求項27】 リポ多糖分析物がクラミジア菌の細胞膜に由来する、請求項26に記載の装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、特異的結合を含む免疫測定法及びそのような測定法を実施するための試験装置に関する。特に、本発明は、同定された分析物に結合することができる、モノクローナル又はポリクローナル抗体と蛋白の両方の使用を含む免疫測定法（及び試験装置）に関する。

【0002】**(発明の背景)**

サンプル中の対象分析物の存在を検出するために抗体型分子の特異的結合特性を利用する免疫測定法が記述されている。そのような測定法に適した抗体型分子は、全抗体 - モノクローナル又はポリクローナル - であるか、若しくは抗体断片、例えばFv又はFab断片でありうる。

【0003】

免疫測定法において實際上役立つには、対象分析物に対する抗体型分子の特異的結合親和性が本質的にそれ自体十分ではない。免疫測定法はまた、抗体型分子と分析物の結合のレベルを測定することができる手段を提供する。これに関して、抗体型分子をある種の標識に連結することが一般的に受け入れられるようになった。既知の標識は、放射性、蛍光、電気活性（レドックス標識など）又は化学発光化合物、酵素、及び微粒子標識（ラテックスビーズ又は金ゾルなど）を含む。

【0004】

基本的には、2つの一般的な形態の免疫測定法が知られており、上述した成分を使用して構築されてきた。競合アッセイは、一般に、分析物が標識抗体型分子又は既存複合体からのリガンドの置換を生じさせうる環境を提供することによって特定の分析物の存在を検出し、その結果は、サンプル中の比較的高いレベルの分析物が低いシグナルを生じ、比較的低いレベルの分析物が高いシグナルを生じる。様々な形態の競合アッセイが、Schuursらの米国特許第3,654,090号及びBadleyら、WO97/44664号に詳細に記述されている。

。

【0005】

その他の一般的な形態の免疫測定法は、しばしばサンドイッチ型アッセイと称される。典型的にはそのようなアッセイでは、抗原とそれに結合する同じか又は異なる特異性の少なくとも2つの抗体から成る複合体を、連続的に又は同時に形成させる。しばしば、抗体の1つが固体表面に結合されており、サンドイッチ複合体の検出のために何らかの形態の標識をそれに結合する。その構造ゆえに、そのようなサンドイッチ型アッセイは、サンプル中の分析物の量に直接比例する分析物シグナルを提供する。様々な形態のサンドイッチアッセイが、DavisらのEP 0042755号及びElsevier (Amsterdam, 1985)によって出版されたP. Tijssenの「酵素免疫測定法の実施と原理 (Practice and Theory of Enzymatic Immunoassay)」に詳細に記述されている。

【0006】

上述した2つの形態の免疫測定法は、広い範囲の分析物の存在を同定するために使用できる。ヒト絨毛性ゴナドトロピン、黄体形成ホルモン又はエストロンのようなホルモン分析物、あるいはそれらの代謝副産物は、Mayらの米国特許第5,656,503号に述べられているように、尿、血清又は他の体液から同定されうる。他の潜在的な分析物は、癌のマーカー、農薬及び代謝産物を含む。

【0007】

病原性種のマーカーである一部の分析物も、時宜を得た有効な治療を提供することができるように、十分に早期の段階で感染を同定するための手段として検定することが望ましい。これに関しては、細菌及びウイルスを検定することが知られている。これらやその他の分析物の検出のための代表的なアッセイは、「微生物学及び免疫学における迅速な方法と自動化 (Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology)」、Spencerら編集、Intercept発行 (United Kingdom, 1994)。

【0008】

病原性種のマーカーとして役立つそのような分析物の1つがリポ多糖である。リポ多糖(LPS)は、すべてのグラム陰性細菌の外膜の必須成分であり、そのような細菌に感染した患者における炎症反応の責任を担う主要物質であると考えられている。グラム陰性菌は、大腸菌(*Escherichia coli*)、及びサルモネラ属(*Salmonella*) (例えば*S. minnesota*及びネズミチフス菌(*S. typhimurium*))、クラミジア属(*Chlamydia*) (例えばトラコーマクラミジア(*C. trachomatis*)及びナイセリア属(*Neisseria*) (例えば淋菌(*N. gonorrhoeae*)及び*N. lactamica*)の種を含む。

【0009】

LPSの構造は3つの異なる領域から成ると決定されている：脂質A領域、コアオリゴ糖、及び反復するオリゴ糖単位の長鎖から成るO-多糖鎖。これら3つの領域すべてを持つLPSは、スムーズケモタイプ又はS化学型と称される。但し、グラム陰性菌の一部の突然変異体ならびに一部の天然に生じるグラム陰性菌は、O-多糖領域を持たないLPSの形態である、ラフケモタイプ又はR化学型として知られるものを生じることもわかっている。さらに、R化学型の中に追加的な変種が存在することも知られている。例えば、大腸菌とサルモネラ菌の一部の突然変異体及び天然に生じるクラミジア菌は、部分的なコアオリゴ糖だけを持つLPSを生成する。

【0010】

LPSの構造は細菌種の中でかなり大きく異なるため、対象とする種特異的LPSに対して特異的結合親和性を持つ抗体の使用を通して、種特異的免疫測定法をデザインすることが望ましいと考えられてきた。PronovostらのWO 97/06436号はそのような免疫測定法の1つを記述している。具体的には、当該LPSに結合することができる2つの異なる抗体を使用する、LPSを検出するためのサンドイッチ型免疫測定法を開示している。

【0011】

しかしながら、LPSに対する大部分の抗体は、細菌の変コア多糖領域に対して特異的結合親和性を持つことが知られている。この理由から、2つの異なる

抗体を使用する免疫測定法は、抗体がLPS上の同じエピトープについて競合することがあるので効力が限られていると考えられ、あるいはエピトープが非常に近接しているため、抗体が互いのそれぞれの結合反応を妨げることがある。

【0012】

上記の問題を取り除くための1つの可能性は、抗体の1つがLPSのリピドA領域に結合する、2抗体免疫測定法を提供することである。しかし、脂肪酸に特異結合することができる抗体はごくわずかしか同定されておらず、グラム陰性菌から誘導したLPSのリピドA領域に直接結合することを示したものはなかった。それ故、グラム陰性菌の存在を検出するための有効な免疫測定法、特に検出する各々の分析物又は抗原に関して複数の結合事象が起こることを必要とするサンドイッチ型アッセイを提供するという点では限られた成功しか収められていない。

【0013】

しかしながら、サンドイッチ型アッセイにおいて第二の成分をLPSに結合するための他の手段を提供することは既知である。Mertsolaら、免疫リムルスアッセイによる実験的b型インフルエンザ菌血症及び内毒素血症の検出(Detection of Experimental Haemophilus influenza Type b Bacteremia and Endotoxemia by Means of an Immunolimus Assay)、1991年4月、The Journal of Infectious Diseases, 164巻、p.353-358は、LevinとBangの行った以前の研究(リムルス(カプトガニ)血液の細胞外凝固における内毒素の役割(The Role of Endotoxin in the Extracellular Coagulation of Limulus Blood, 1964年4月、Bulletin of Johns Hopkins Hospital, 115巻、p.265-274)及びリムルスアメーバ様細胞分解産物(LAL)系に関する他の研究を引用している。彼らは、b型インフルエンザ菌を検出するために複雑な溶解産物であるLALを非標識モノクローナル抗体と組み合わせて使用する免疫測定法を開示している。そ

のようなアッセイでは、抗体をマクロタイタープレートに固定する。LPS分子のコアオリゴ糖領域との複合体の形成を通して、抗体によってLPSが捕獲される。その後LAL系の活性化によって結合LPSの検出が生じる。

【0014】

LAL系が働く機序は完全には理解されていないが、LALを含むLPSアッセイにおけるシグナル生成は、蛋白とLPSの複合体形成によって開始され、色素形成基質を発色団に転換することができる酵素の活性化をもたらし、その結果検出可能なシグナルを生じるという酵素反応カスケードの結果である。

【0015】

Mertsoilaらが述べた免疫測定法は、第二抗体が検出可能なシグナルを生じる必要がないという点で、既存の市販されている大部分のアッセイと異なっている。しかし、複雑な抽出物であるLAL自体を使用するという難点がある。そのような抽出物は、固有の相違がある生物に由来するため、許容しがたい変動性を持つアッセイを生じる可能性がある。さらに、LALは、検出可能なシグナル生成のために酵素カスケードが起こる必要があるため、LALを含むアッセイは必然的に比較的緩慢な速度で進行し、これはある種の市販環境においては望ましくないと考えられる。

【0016】

(発明の開示)

それ故、上記の難点を克服しうる免疫測定法を提供し、そのような免疫測定法を実施することができる分析試験装置を提供することは望ましいであろう。これに関して、本発明は、

a) サンプルを、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される第一結合試薬と接触させ、その際、リポ多糖が、もし存在する場合には、第一結合試薬と結合して、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体を形成するのに十分な時間、サンプルと第一結合試薬が接触するようにし、

b) 第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体を、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される第二結合

試薬と接触させ、その際、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体が第二結合試薬と結合して、第一及び第二結合試薬/リポ多糖分析物複合体を形成するのに十分な時間、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体と第二結合試薬が接触するようにし、そして

c) 形成された第一及び第二結合試薬/リポ多糖分析物複合体の存在を検出する

段階を含み、

結合試薬の1つがリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であり、他方の結合試薬がリポ多糖結合蛋白であって、

結合試薬の1つが標識結合試薬であり、好ましくは、標識されておらず、好ましくは支持体上に固定されている他方の結合試薬の位置に移動することができるものである、

サンプル中のリポ多糖分析物の存在を検出する方法を提供する。

【0017】

そのようなアッセイを実施するための分析試験装置も考慮されている。かかる装置は、支持体の第一領域に、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される標識結合試薬が可逆的に固定されており、さらに支持体の第二領域には、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される非標識結合試薬が不可逆的に固定されていて、かかる第二領域がサンプル中の分析物の存在の検出領域である支持体を含む。

【0018】

かかる装置においては、結合試薬の1つだけがリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であり、他方がリポ多糖結合蛋白でなければならない。さらに、支持体は、液体生物サンプルと接触したときに毛管作用によってサンプルと非標識結合試薬を検出領域に運搬することができなければならない。

【0019】

本発明の免疫測定法は、臨床あるいは在宅試験市場のような市販に理想的に適した、正確で再現可能な試験結果をもたらすことができるアッセイ装置の構築を

提供する。さらに、そのような免疫測定法は、複雑な抽出物の使用あるいは多数の検定段階をほとんど必要とせずに、迅速且つ簡単に実施することができる。そのような簡単さは、臨床又は在宅試験市場のような市販状況にとってやはり理想的である。

【0020】

(発明の詳細な説明)

本発明の免疫測定法は、所与のサンプルにおけるリポ多糖分析物(LPS)の存在又は不在を同定するために使用される。すなわち本発明のアッセイは、サンプルが、自らの細胞膜内にLPSの種特異的変異体を組み込んだ、大腸菌(*Escherichia coli*)、サルモネラ菌(*Salmonella*)、あるいはクラミジア菌(*Chlamydia*)のようなグラム陰性菌を含むかどうかを同定することができる。

【0021】

サンプルにおいて検出すべきLPSはグラム陰性菌細胞膜の不可欠な成分であるので、主要なアッセイ段階をサンプルに適用する前に(すなわち、下記で述べるようにサンプルを第一結合試薬に接触させる前に)、好ましくは細胞膜からLPSの抽出を行うことが想定される。抽出は既知の何らかの手段によって実施しうる。好ましくは、3-([クロロアミドプロピル] -ジメチルアミノ) - 1 - プロパンスルホネート(CHAPS)のような両性イオン性界面活性剤又はポリエチレングリコールオクチフェニルエーテルのような非イオン性界面活性剤を、細菌細胞膜の溶解を生じさせるのに十分であるが、アッセイの障害が起こるレベルよりは低いレベルでサンプルに適用する。最も典型的には、これらのレベルは約0.01%(w/v)から約2.0%(w/v)の間であるが、それ以上及びそれ以下のレベルも個々に考慮される。

【0022】

免疫測定法は実質的にどのような種類のサンプルにも適用しうるが、尿、血清、唾液、頸部又は尿道液、及び便試料に由来する液体生物サンプルが、アッセイの対象である細菌を含有する可能性が最も高い。本発明のアッセイに適する他の液体は、食品サンプル及び表面からのサンプルである。アッセイを行う前にサン

ブルを精製又は希釈してもよい。

【0023】

ひとたびその宿主細菌の細胞から抽出されれば、LPSを本発明の方法に従って検定することができる。特に、本発明の方法は「サンドイッチ型」免疫測定法を対象とし、その例は、DavisらのEP 0042755号及びElsevier (Amsterdam, 1985) によって出版されたP. Tijssenの「酵素免疫測定法の実施と原理 (Practice and Theory of Enzymatic Immunoassay)」に記述されている。そのようなサンドイッチ型アッセイは、所与のサンプル中のいずれかのLPSに関して複数の結合事象が起こることを必要とする。これに関して、本発明のアッセイでは、LPSを、最初にLPSに対して特異的結合親和性を持つ抗体又はリポ多糖結合蛋白のいずれかから選択される第一結合試薬と接触させ、結合させて、第一結合試薬/LPS複合体を形成させる。生じた第一結合試薬/LPS複合体を、次にLPSに対して特異的結合親和性を持つ抗体又はリポ多糖結合蛋白のいずれかから選択される第二結合試薬と接触させ、試験者に検出可能なシグナルを提供することができる第二複合体を形成させる。

【0024】

LPSと第一結合試薬、及び第一結合試薬/LPS複合体と第二結合試薬間の接触をもたらすには、従来の方が使用できると考えられる。例示的な方法は、従来のストリップ (例えばニトロセルロース) 含有試験装置で起こる毛管作用から、一部の形態のELISA型免疫測定法及びエネルギー転移免疫測定法において生じる、溶液中の1又はそれ以上の成分の、他成分の位置への単純な拡散までにわたる。

【0025】

第一結合試薬が抗体である場合には、抗体がモノクローナル抗体であることが好ましいが、ポリクローナル抗体を使用することも個々に考慮される。抗体はさらに、既知の全抗体から生化学的方法又は抗体エンジニアリング法によって、あるいは抗体又は抗体様分子のライブラリーから間接的に調製することができる、Fab、Fvのような機能的抗体断片、及びH鎖可変断片のようなさらに一層小

さな単位を含みうる（例えば、VerhoeyenとWindust、分子免疫学における抗体エンジニアリングの進歩：分子生物学のフロンティア（Advances in Antibody Engineering in Molecular Immunology: Frontiers in Molecular Biology, 第2版、Oxford University Press出版、p. 283 - 325 (Oxford, 1995)）。抗体が、対象とするLPSに対して特異的結合親和性を示すということ、すなわち、抗体が、対象ではない他のLPS分子を含めた他の物質の過剰量の存在下で選択的に、また有用なアッセイを提供するのに十分なほどに（十分に高い親和性で）、対象LPSと結合することは重要である。例えば、抗体はクラミジア菌LPS、又はネズミチフス菌（*S. typhimurium*）の特定化学型だけに結合するが、他の化学型には結合しない。

【0026】

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、Macmillan Publishers Ltd (London, 1997) 出版のPriceら、免疫測定法の原理と実施 (Principles and Practice of Immunoassays)、第2版に述べられているものを含めて、何らかの適当な既知の方法によって調製できる。

【0027】

LPSに特異的なモノクローナル抗体ならびにそれらの製造方法は、Poxton、リポ多糖に対する抗体 (Antibodies to Lipopolysaccharide)、1995年5月、Journal of Immunological Methods, 185巻、p. 1 - 15、及びLukら、サルモネラ菌リポ多糖のヘキソースコアドメインを認識する4つのモノクローナル抗体のエピトープマッピング (Epitope Mapping of Four Monoclonal Antibodies Recognizing the Hexose Core Domain of Salmonella Lipopolysaccharide)、1991年12月、Journal of Biological Chemistryにおいても論じられて

いる。

【0028】

その代わりに、第一結合試薬はリポ多糖結合蛋白であってもよい。そのような蛋白は、一本鎖又は複数鎖ポリペプチドでありうる；単純であるか又は複合されていてもよく、及び/又は線維状又は球状であってもよい。しかしそれらは、抗体又はその部分（例えばF_v又はF_{ab}配列）以外である。さらに、それらは対象とするLPSに対して結合親和性を示し、これは、過剰量の他の物質の存在下で、すべてではないにせよ大部分の化学型のLPSに対して全般的特異性を持つことを意味する。

【0029】

本発明の免疫測定法はサンドイッチアッセイであるので、リポ多糖結合蛋白は、アッセイの第二段階で抗体によって結合される部位とは異なるLPS分子上の部位に対して結合親和性を持つ。これは、第一と第二結合試薬の両方がそれぞれLPS分子に結合できることを保証する。最も典型的には、蛋白はLPS分子の脂質部分に結合する。すなわち、それらは種特異的ではなく、どのようなグラム陰性菌から誘導されたどのようなLPSにも結合する。この理由から、特定種から誘導されたLPSを検出するための免疫測定法を提供するためには、リポ多糖結合蛋白と、特定種依存性形態のLPSに特異的結合親和性を持つ抗体の両方を結合試薬として含む必要がある。

【0030】

リポ多糖結合蛋白は従来 of 既知の方法によって調製できる。Wrightら、リポ多糖(LPS)とLPS結合蛋白の複合体に関するレセプタ(A Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide(LPS) and LPS Binding Protein)、1990、Science、249巻、p.1431-1433；Bazilら、53-kDa単球表面抗原の可溶性形態の生化学特性指摘(Biochemical Characterization of a Soluble Form of the 53-kDa Monocyte Surface Antigen)、1986、Eur. J. Immunol. 16(12)巻、p.1

583-1589; Lehrerら、殺菌性カチオン蛋白1及び2の抗菌活性、ウサギ肺マクロファージの天然ペプチド抗生物質 (Antibacterial Activity of Microbicidal Cationic Proteins 1 and 2, Natural Peptide Antibiotics of Rabbit Lung Macrophages)、1983、Infect. Immun. 42(1)巻、p. 10-14; Juanら、可溶性CD14におけるLPSシグナル伝達に必須であるがLPS結合には必須でないドメインの同定 (Identification of a domain in soluble CD14 essential for LPS signalling but not LPS binding)、1995、J. Biol. Chem. 270(29)巻、p. 17237-17242; Haasら、合成リポ多糖結合ペプチド (A Synthetic Lipopolysaccharide-Binding Peptide)、1998、J. Immunol. 161巻、p. 3607-3615; 及び Selstedら、ウサギ腹膜好中球の6個の抗菌ペプチドの一次構造 (Primary Structures of Six Antimicrobial Peptides of Rabbit Peritoneal Neutrophils)、1985、J. Biol. Chem., 260(8)巻、p. 4579-4584に記述されているもののような蛋白が、Mertsolaら、免疫リムルスアッセイによる実験的b型インフルエンザ菌血症及び内毒素血症の検出 (Detection of Experimental Haemophilus influenza Type b Bacteremia and Endotoxemia by Means of an Immunolimus Assay)、1991年4月、The Journal of Infectious Diseases, 164巻、p. 353-358に記述されているリムルスアメーバ様細胞溶解産物 (LAL) から分離されたりポ多糖結合蛋白と共に、本発明における使用に適する。LALからのLALリポ多糖結合蛋白の精製は、当該技術において既知の方法によって実施しうる。例えば、そのような蛋白は、Aketagawa Jら、リムルス抗凝固性抗リポ多糖因子の一

次構造 (Primary Structure of Limulus Anticoagulant Anti-Lipopolysaccharide Factor)、1986、J. Biol. Chem. 261(16)巻、p. 7357-7365が記述しているように、ヘパリン-セファロースクロマトグラフィーによって入手することができる。

【0031】

本発明の好ましい実施態様では、リポ多糖結合蛋白はポリペプチドであり、より特定すると、レーザー脱着 (MALDI) 質量分析によって測定したとき約5000Da未満の分子量を持つ一本鎖ポリペプチドである。より好ましくは、同じように測定したとき約3000から4000Daの分子量を持つ一本鎖ポリペプチドである。特に適するポリペプチドが、選択的蛋白分解開裂法によって配列決定された。特に、次の中から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、至適には100%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを使用することが好ましい：

【0032】

【化1】

SEQ ID NO:1:

Gly Leu Arg Lys Arg Leu Arg Lys Phe Arg Asn Lys Ile Lys Glu
Lys Leu Lys Lys Ile Gly Gln Lys Ile Gln Gly Leu Leu Pro Lys
Leu Ala

SEQ ID NO:2:

His Glu Cys His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys
Trp Lys Tyr Lys Gly Lys Phe Trp Cys Pro Ser

SEQ ID NO:3:

Asp His Glu Cys His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu
Lys Trp Lys Tyr Lys Gly Lys Phe Trp Cys Pro Ser

SEQ ID NO:4:

Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg
Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln

SEQ ID NO:5:

Asn Ala Asn Cys Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg
Phe Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp Cys Ser Ile

SEQ ID NO:6:

Asp Ser Ser Ile Arg Val Gln Gly Arg Trp Lys Val Arg Lys Ser
Phe Phe Lys Leu Gln Gly Gly Ser Phe Asp Val Ser Val

【0033】

それぞれ配列番号7及び配列番号8として下記に示すもののような実質的により長い又はより短い配列も個々に考慮される。

【0034】

【化2】

SEQ ID NO:7:

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys
Val Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe
Gln Cys Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu
Asn Leu Gly Pro Phe Leu Lys Arg Val Ala Asp Ala Asp Pro

SEQ ID NO:8:

Glu Lys Pro Leu Gln Asn Phe Thr Leu Cys Phe Arg Ala

【0035】

配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドを組み込むことが本発明の免疫測定法にとって最も好ましい。

【0036】

第一結合試薬（LPSに対して特異的結合親和性を持つ抗体又はリポ多糖結合蛋白のいずれであっても）をサンプル中のLPSと接触させると、第一結合試薬／リポ多糖分析物複合体が形成する。次にこの複合体を第二結合試薬と接触させて、第二複合体である第一及び第二結合試薬／リポ多糖分析物複合体を形成する。第一結合試薬と同様に、第二結合試薬も、LPSに対して特異的結合親和性を持つ抗体又はリポ多糖結合蛋白のいずれかから選択されることが意図されている。しかし本発明は、2つの結合試薬のうちで、1つだけがLPSに対して特異的結合親和性を持つ抗体であり、他方の結合試薬は必然的にリポ多糖結合蛋白であることを必要とする。それ故、本発明は2つの異なる代替的シナリオを考慮している、すなわち、（a）第一結合試薬が抗体であり、第二結合試薬がリポ多糖結合蛋白である；又は（b）第一結合試薬がリポ多糖結合蛋白であり、第二結合試薬が抗体である。

【0037】

抗体を第二結合試薬として使用する場合、使用に適する抗体ならびに好ましい抗体は、第一結合試薬に関して上述した通りである。同様に、第二結合試薬がリポ多糖結合蛋白である場合、やはり第一結合試薬に関して上述した通りである。

【0038】

本発明の好ましい実施態様では、結合試薬の1つが支持体（例えばDavisら、EP 0042755号においてELISA型アッセイについて記述されているような「ウエル」の表面、又はMayら、米国特許第5,656,503号に述べられているようなニトロセルロースストリップ）に不可逆的に固定されており、他方の結合試薬は、固定された結合試薬の位置まで移動することができる。さらに、固定された結合試薬の位置まで移動できることを特徴とする結合試薬は、第一及び第二結合試薬／リポ多糖分析物複合体の存在を検出する手段を提供するように、何らかの種類の標識と複合される。不可逆的に固定された結合試薬は標識されない。

【0039】

移動結合試薬と複合する標識は、その存在が容易に検出できる実体である。好

ましくは標識は、Mayら、米国特許第5,656,503号に詳細に述べられているもののような直接標識である。直接標識は、その自然の状態、裸眼で、又は光学フィルター及び/又は刺激の適用、例えば蛍光を促進するためのUV光を用いて容易に見ることができる実体である。例としては、放射性、化学発光、電気活性(レドックス標識など)、及び蛍光化合物を含む。染料ゾル、金属ゾル(例えば金)、炭素粒子やセレン粒子のような非金属元素粒子、及び着色ラテックスのような直接微粒子標識も非常に適しており、好ましい。これらの選択肢の中で、着色ラテックス粒子が最も好ましい。小さな区域又は容量中の標識の濃度は容易に検出可能なシグナル、例えば強く着色した領域を生じるはずである。これは眼で、又は所望に応じて機器によって評価できる。

【0040】

酵素、例えばアルカリホスファターゼ及びホースラディシュペルオキシダーゼのような間接標識も使用できるが、これらは通常、可視シグナルが検出できる前に基質のような1つ又はそれ以上の展開試薬の添加を必要とする。それ故、それらはあまり好ましくない。そのような追加試薬は、液体サンプルを適用したときに溶解又は分散するように支持体に組み込むことができる。その代わりに、サンプルを支持体に適用する前に展開試薬をサンプルに加えることもできる。

【0041】

標識の移動結合試薬への結合は、所望に応じて共有結合又は非共有結合(疎水結合を含む)によって、又は吸着によって実施できる。また、アビジン/ビオチン「架橋」を通してのカップリングによっても実施しうる。そのような結合のための手法は当該技術において常套的であり、本発明で使用される個々の結合試薬と標識に容易に適合させうる。好ましい実施態様では、標識は着色ラテックス粒子であり、吸着を通してそれを移動結合試薬に結合させる。

【0042】

本発明の免疫測定法を実施することができる分析試験装置は、実施するアッセイの厳密な性質(例えば対象とする分析物、支持体の種類、個々の結合試薬、等々)に依存して、数多くの形態のいずれか1つをとりうる。好ましい実施態様では、装置は、支持体の第一領域に、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を

持つ抗体又はリポ多糖結合蛋白のいずれかから選択される標識結合試薬が可逆的に固定されており、さらに支持体の第二領域には、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体又はリポ多糖結合蛋白のいずれかから選択される非標識結合試薬が不可逆的に固定されていて、かかる第二領域がサンプル中の分析物の存在の検出領域である、支持体を含み、結合試薬の1つだけがリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であって、他方がリポ多糖結合蛋白であり、さらに支持体は、液体生物サンプルと接触したときに毛管作用によってサンプルと非標識結合試薬を検出領域に運搬することができることを特徴とすることが想定されている。

【0043】

そのような装置は、例えばMayら、米国特許第5,622,871号及びMayら、米国特許第5,656,503号に述べられている一般的な種類のものでありうる。好ましくは、これらの装置は、最も典型的には乾燥多孔性担体である、支持体の入った中空の長いケースを含む。支持体は、ケースから突出した又は突出していない吸収性の液体サンプル受容部分を通して、ケースの外部と間接的に連絡しており、支持体とサンプル受容部分は、液体サンプルが毛管作用によってその2つの間を移動できるように連結されていて、支持体は、標識を担う結合試薬（好ましくはリポ多糖結合蛋白）が可逆的に固定されている第一領域を持つ - すなわち、結合試薬は乾燥支持体上に固定されているが、支持体が湿潤化したときには支持体上又は支持体内を自由に運動する。第一領域における結合試薬のそのような可逆的固定は、多くの既知の方法（例えばTaylor、蛋白の固定（Protein Immobilisation）、Marcel Dekker, Inc. 出版、1991に述べられているような）のいずれか1つによって実施しうる。特に、そのような固定は、Mayら、米国特許第5,622,871号に述べられているように、支持体への吸着によって生じることが好ましい。

【0044】

サンプル受容部分から支持体に沿って空間的に離れたところに、標識されていない異なる結合試薬（好ましくはLPSに対して特異的結合親和性を持つ非標識

抗体)がその上に不可逆的に固定されている第二領域(検出領域)がある。「不可逆的に固定された」とは、非標識結合試薬が、それが(又は支持体が)湿潤化したときに移動するのを防ぐように支持体上に組み込まれている又は支持体に結合されていることを意味する。支持体への結合試薬の不可逆的固定は、各々が当業者にとって明白である多くの方法のいずれか1つによって実施できる。結合試薬は、例えばCNBr、カルボニルジイミダゾール、又は塩化トレスルを用いて、あるいはアビジン/ビオチンカップリングによって支持体に化学結合することができる。その代わりに、様々な「印刷(printing)」手法が使用できる。これらは、微量注射器、直接印刷、インクジェット印刷、等による液体結合試薬の適用を含む。結合試薬を適用する前の支持体の化学的又は物理的处理も、固定を容易にしうるので、個々に考慮される。

【0045】

装置は、好ましい実施態様に関して上述したように構築されうる、又は、可逆的に固定された結合試薬が標識抗体であり、標識されていない不可逆的に固定された結合試薬がリポ多糖結合蛋白であるように構築されうる。

【0046】

好ましい装置のケースは、典型的には、それを通して分析結果が観察できる、好ましくは裸眼で明らかに観察できる、少なくとも1つの開口部を組み込んだ不透明又は半透明の材料で構築される。

【0047】

そのような装置は、臨床検査室に又は家庭での使用に適したキットとして提供することができる。かかるキットは、湿気不透過性包装で個々に包装され、使用者への適切な指示と共に梱包された1つ又はそれ以上の装置を含む。

【0048】

サンプル受容部分は、液体を迅速に吸収することができる何らかの吸収性、多孔性又は繊維性材料から作製できる。材料の有孔性は、一方向性(すなわち孔又は繊維が全体的に又は主として当該部分の軸と平行に走っている)又は多方向性(当該部分が無定形海面様構造を持つように、全方向性)でありうる。ポリプロピレン、ポリエチレン(好ましくは非常に高分子量の)、フッ化ポリビニリデン

、エチレンビニルアセテート、アクリロニトリル及びポリテトラフルオロエチレンのような多孔性プラスチック材料が使用できる。当該部分を製造の間に界面活性剤で前処理することが好都合であると考えられる。これは当該部分に固有の疎水性を低下させ、それ故、湿潤化したサンプルを迅速且つ効率的に吸収し、送達する能力を高めることができるからである。多孔性のサンプル受容部分はまた、紙又はニトロセルロースのような他のセルロース材料で作製することもできる。好ましくはサンプル受容部分を構成する材料は、多孔性部分をほぼ数秒以内に液体サンプルで飽和できるように選択すべきである。液体は、多孔性サンプル受容部分から支持体内に自由に透過することができなければならない。

【0049】

支持体は、最も好ましくは乾燥多孔性担体である。支持体は、例えば連続的に配置されたいくつかのストリップ、又は別個のストリップ又はシートから作られ、サンプル受容部分と同様に、液体サンプルが、好ましくは毛管作用によって、その長さの一部を通過して移動できることを可能にする何らかの材料又は材料の組合せから構築できる。支持体は、結合試薬をその表面に固定することができ、結合試薬/リポ多糖分析物複合体を形成する結合反応に干渉してはならない。好ましくは、支持体は、紙、ナイロン、ニトロセルロース又は適当な流動特性を持つ何らかの表面から作製される。最も好ましいのはニトロセルロースから作られるものである。

【0050】

支持体は、支持体の長さに沿った液体の毛管作用を促進する吸収性「シンク (sink)」に連結することができる。シンクの明細な材料と適用は当該技術において常套的であり、本発明の装置に容易に適用しうる。

【0051】

下記の特実実施例を参照することにより本発明がよりよく理解できるであろう。これらは例示を意図したものであり、本発明の方法及び装置を網羅するものではない。

【0052】

実施例

これらの実施例は、標識リポ多糖結合蛋白と、LPSに対して特異的結合親和性を持つ、支持体上に不可逆的に固定された非標識抗体を用いる分析試験装置を通して、いかにしてクラミジア菌のLPSを検出することができるかを明らかにする。

【0053】

抗体とリポ多糖結合蛋白の調製：

下記の実験において結合試薬として使用するモノクローナル抗体(Mab7)を、当該技術において既知の手順に従って調製した。モノクローナル抗体を作製するための代表的な方法は、Ganiら、J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1994、48巻、p. 277-282に記述されており、この方法を、クラミジア菌から誘導したLPSに対して特異的親和性を持つ関連抗体を生産するために適合させることができる。適当なモノクローナル抗体は、分析物及び分析物類似体についてのその相対的親和性と特異性に基づいて選択できる。これは、例えばBiacore(登録商標) 2000バイオセンサー(Biacore AB, Sweden)を製造者のプロトコール(Applications handbook, Biacore AB)に述べられているように使用して、一連の緊密に関連する類似体を用いた標準的な反応速度測定を行うことによって実施できる。

【0054】

この実施例で使用するリポ多糖結合蛋白は、Affinity Research Products, United Kingdomから提供されたものである。明細には、リポ多糖結合蛋白は、ウサギ顆粒球から分離された既知のポリペプチド(CAP18)から誘導されたポリペプチドである。蛋白は、Hitataら、Infection & Immunity, 1994、62巻、p. 1421-1426に述べられているように腹膜顆粒球から分離することができ、ペプチド配列は、Larrickら、Biochem Biophys Res. Commun, 179巻、p. 170-175に開示されている配列決定法によって決定できる。明細には、ペプチド(ペプチド1465)は、レーザー脱着(MALDI)質量分析によって測定したとき3801.4Daの分子量を持つ

ち、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を含んでいた。

【0055】

ペプチド1465への標識の複合：

着色（青色）ポリスチレンラテックス粒子（0.5% w/vラテックス固体、粒径約400nm）を含む常用の微粒子標識をDuke Laboratories, Durham N.C. USAから入手した。ペプチド1465を、リン酸緩衝生理食塩水中46で30分間混合することにより、100µg/mlの濃度でラテックスの表面に吸着させた。

【0056】

支持体へのMab7の沈着：

ニトロセルロースストリップを含む支持体にMab7を沈着させ、ストリップの検出領域にMab7を不可逆的に固定した。

【0057】

明細には、長さ340mm、幅40mmのニトロセルロースストリップを、自動X-Yプロッターを用いて0.1µl/mmのプロット速度、1.2mg/mlのレベルで、検出領域（底部縁から10mm）においてMab7で被覆した。プロットしたストリップを55で乾燥した。次に3%（w/v）スクロースを含む1%（w/v）ポリビニルアルコールでストリップを処理し、70で空気乾燥した。実施例1及び2については、幅6mmのストリップを使用した

実施例1

この実施例では、ネズミチフス菌（*S. typhimurium*）から誘導した精製クラミジア様リポ多糖（Re595）が、上記に述べた分析試験装置によって検出可能であることを示した。

【0058】

Re595 LPSは、Sigma Chemical Co., Poole, United Kingdomから入手した。表1に従って複数の希釈溶液を調製した。明細には、Re595 LPSをリン酸緩衝生理食塩水中で100µg/mlに希釈した。Re595 LPS希釈溶液を連続的な10倍希釈によりリン酸緩衝生理食塩水中で1pg/mlまでさらに希釈した。

【0059】

【表1】

表1 - Re595 LPSの希釈溶液

希釈溶液	[LPS]/ml
1	100 μ g
2	10 μ g
3	1 μ g
4	100 ng
5	10 ng
6	1 ng
7	100 pg
8	10 pg
9	1 pg
10	陰性対照

【0060】

10 μ lのペプチド1465で増感したラテックスを各々のRe595 LPS希釈溶液1mlに加え、十分に混合して、各希釈溶液180 μ lを、不可逆的に固定されたMab7を含むニトロセルロース試験ストリップの一方の端にピペットで適用した。毛管作用によって希釈溶液を、不可逆的に固定されたMab7を含む検出領域に移動させた。ラインの展開(すなわちRe595 LPSの検出)を視覚的にモニターし、サンプル適用の5分後に走査型デンシトメトリーによって測定した。

【0061】

この実施例の結果を表2に示す。表は、ラテックス粒子で標識したペプチド1465が、不可逆的に固定されたMab7抗体と共に、ニトロセルロース試験ストリップ上の検出領域に可視の青色ラインを形成するようにRe595 LPSを捕獲できることを示した。検出領域の青色ラインの濃度増加をアッセイシグナルとしている。表2において明らかなように、希釈溶液1-4は、なおも有意のアッセイシグナルを示すが、その後の希釈溶液よりは低いアッセイシグナルを示

したことがわかる。これは、より高いRe595 LPS濃度によるストリップ基部でのラテックス粒子の凝集のためであると考えられる。

【0062】

【表2】

表2ーペプチド1465とRe595 LPSに関するアッセイシグナルの結果

LPS 希釈溶液	アッセイシグナル
1	6.95
2	6.63
3	12.7
4	18.36
5	25.97
6	25.89
7	31.73
8	11.14
9	3.64
対照	3.4

【0063】

実施例2

この実施例では、クラミジア菌の細胞溶解産物に組み込まれたLPSが、上記に述べた分析試験装置によって検出可能であることを示した。

【0064】

トラコーマクラミジア菌 (*Chlamydia trachomatis*) (LGV-2) を常套的な組織培養条件下でマッコイ細胞 (McCoy cells) において増殖させた。実施した細胞培養手順は、「ウイルス、リケッチア及びクラミジア感染に関する診断方法」、第5版、American Public Health Association, Inc. (Washington DC) 出版に述べられている通りであった。クラミジア菌の基本小体を含む細胞を、単層から細胞スクレイパーで感染細胞を削り取り、最終濃度1:1000のホルムアルデヒド溶液で16時間、2-8℃で処理して採集した。必要なとき

まで細胞を従来の冷凍庫において - 80 で保存した。

【0065】

使用の前に、クラミジア菌細胞溶解産物を完全に解凍した。次に、溶解産物をリン酸緩衝生理食塩水中で1 : 1626に希釈したことを除いて、実施例1で述べたのと同様にしてクラミジア菌細胞溶解産物をリン酸緩衝生理食塩水で希釈した。生じた希釈溶液を、表3に示すような連続的2倍希釈によってリン酸緩衝生理食塩水中でさらに希釈した。

【0066】

【表3】

表3 - クラミジア菌溶解産物の希釈溶液

希釈溶液 ID	クラミジア菌の希釈
1	1
2	1/2
3	1/4
4	1/8
5	1/16
6	1/32
7	1/64
8	陰性対照

【0067】

ペプチド1465で増感したラテックス10 µlを各々のクラミジア菌細胞溶解産物希釈溶液1 mlに加え、十分に混合して、各希釈溶液180 µlを、不可逆的に固定されたMab7を含むニトロセルロース試験ストリップの一方の端にピペットで適用した。毛管作用によって希釈溶液を、不可逆的に固定されたMab7を含む検出領域に移動させた。ラインの展開(すなわちクラミジア菌LPSの検出)を視覚的にモニターし、サンプル適用の5分後に走査型デンシトメトリによって測定した。

【0068】

この実施例2の結果を表4に示しており、実施例1で得られたものと同様であ

る。結果は、ラテックス粒子で標識したペプチド1465が、不可逆的に固定されたMab7抗体と共に、ニトロセルロース試験ストリップ上の検出領域に可視の青色ラインを形成するようにクラミジア菌細胞溶解産物中に認められるLPSを捕獲できることを明らかにしている。検出領域の青色ラインの濃度増加をアッセイシグナルとしている。

【0069】

【表4】

表4ーペプチド1465とクラミジア菌溶解産物に関するアッセイシグナルの結果

クラミジア菌溶解産物の希釈溶液	アッセイシグナル
1	5.12
2	4.56
3	3.06
4	3.35
5	2.8
6	2.8
7	1.73
対照	1.98

【0070】

本発明をその特定実施態様に関して詳細に述べたが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更と修正を行いうることは当業者には明白であろう。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

5 <110> UNILEVER, PLC
 <120> Lipopolysaccharide Immunoassay and Test Device
 <130> Lipopolysaccharide Immunoassay
 10 <140> 99302711.9
 <141> 1999-04-07
 <160> 8
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 32
 <212> PRT
 20 <213> Lapine
 <400> 1
 Gly Leu Arg Lys Arg Leu Arg Lys Phe Arg Asn Lys Ile Lys Glu Lys
 1 5 10 15
 25 Leu Lys Lys Ile Gly Gln Lys Ile Gln Gly Leu Leu Pro Lys Leu Ala
 20 25 30
 30 <210> 2
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Limulus sp.
 35 <400> 2
 His Glu Cys His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys Trp
 1 5 10 15
 40 Lys Tyr Lys Gly Lys Phe Trp Cys Pro Ser
 20 25
 45 <210> 3
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Limulus sp.
 <400> 3
 50 Asp His Glu Cys His Tyr Arg Ile Lys Pro Thr Phe Arg Arg Leu Lys
 1 5 10 15
 Trp Lys Tyr Lys Gly Lys Phe Trp Cys Pro Ser
 20 25
 55

<210> 4
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 4
 Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe
 1 5 10 15
 10 Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln
 20 25
 <210> 5
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 20 Asn Ala Asn Cys Lys Ile Ser Gly Lys Trp Lys Ala Gln Lys Arg Phe
 1 5 10 15
 Leu Lys Met Ser Gly Asn Phe Asp Cys Ser Ile
 20 25
 25
 <210> 6
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 30 Asp Ser Ser Ile Arg Val Gln Gly Arg Trp Lys Val Arg Lys Ser Phe
 1 5 10 15
 35 Phe Lys Leu Gln Gly Gly Ser Phe Asp Val Ser Val
 20 25
 40 <210> 7
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Lapine
 <400> 7
 45 Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val
 1 5 10 15
 50 Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys
 20 25 30
 Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Gly
 35 40 45
 55 Pro Phe Leu Lys Arg Val Ala Asp Ala Asp Pro
 50 55

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
5 <213> Lapine

<400> 8
Glu Lys Pro Leu Gln Asn Phe Thr Leu Cys Phe Arg Ala
1 5 10
10

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年5月25日(2001.5.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中のリポ多糖分析物の存在を検出する方法であって

、

a) サンプルを、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を有する抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される第一結合試薬と接触させ、その際、リポ多糖が、もし存在する場合には、第一結合試薬と結合して、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体を形成するのに十分な時間、サンプルと第一結合試薬が接触するようにし、

b) 第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体を、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される第二結合試薬と接触させ、その際、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体が第二結合試薬と結合して、第一及び第二結合試薬/リポ多糖分析物複合体を形成するのに十分な時間、第一結合試薬/リポ多糖分析物複合体と第二結合試薬が接触するようにし、そして

c) 形成された第一及び第二結合試薬/リポ多糖分析物複合体の存在を検出する

段階を含み、

結合試薬の1つがリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であり、他方の結合試薬が、3000-4000Daの分子量を持つポリペプチドであって、且つ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むリポ多糖結合蛋白であり、さらに結合試薬の1つが標識

結合試薬であり、他方の結合試薬が非標識結合試薬である、方法。

【請求項2】 結合試薬の1つが支持体に固定されており、他方が固定された結合試薬の位置まで移動することができ、かかる移動結合試薬が標識結合試薬であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 第一結合試薬がリポ多糖結合蛋白であり、さらに、第二結合試薬がリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であって且つ支持体に固定されている、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 サンプル中のリポ多糖分析物がグラム陰性菌の細胞膜に由来する、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】 サンプル中のリポ多糖分析物が、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ (*Salmonella*) 及びクラミジア (*Chlamydia*) から成る群から選択されるグラム陰性菌の細胞膜に由来する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 サンプル中のリポ多糖分析物がクラミジアの細胞膜に由来する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 サンプルが尿、血清、唾液、頸部又は尿道液、及び便試料から成る群から選択され、当該方法が、サンプルをグラム陰性菌細胞膜の溶解を生じさせるのに十分な量の界面活性剤と接触させる段階をさらに含み、この段階がサンプルを第一結合試薬と接触させる前に行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項8】 標識結合試薬が微粒子標識を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】 結合試薬の1つが抗クラミジアリポ多糖抗体を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】 ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】 ポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 液体生物サンプル中のリポ多糖分析物の存在を検出するための分析装置であって、

支持体の第一領域に、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される標識結合試薬が可逆的に固定されており、さらに支持体の第二領域には、リポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体及びリポ多糖結合蛋白から成る群から選択される非標識結合試薬が不可逆的に固定されていて、かかる第二領域がサンプル中の分析物の存在の検出領域である、支持体を含み、結合試薬の1つだけがリポ多糖分析物に対して特異的結合親和性を持つ抗体であって、他方がリポ多糖結合蛋白であり、かかる蛋白は3000 - 4000 Daの分子量を持つポリペプチドであり、且つ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含んでおり、さらに支持体が、液体生物サンプルと接触したときに毛管作用によってサンプルと非標識結合試薬を検出領域に運搬することができることを特徴とする、分析試験装置。

【請求項13】 標識結合試薬がリポ多糖結合蛋白である、請求項12に記載の装置。

【請求項14】 抗体が抗クラミジアリポ多糖抗体である、請求項12又は13に記載の装置。

【請求項15】 ポリペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、及び配列番号6から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項12、13または14に記載の装置。

【請求項16】 ポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項15に記載の装置。

【請求項17】 標識結合試薬が微粒子標識を含む、請求項12 - 16のいずれか一項に記載の装置。

【請求項18】 支持体が乾燥多孔性担体材料から成る、請求項12 - 17のいずれか一項に記載の装置。

【請求項19】 支持体がニトロセルロースから成る、請求項18に記載の

装置。

【請求項20】 液体生物サンプルが、尿、血清、唾液、頸部又は尿道液から成る群から選択される液体を含み、リポ多糖分析物がグラム陰性菌の細胞膜に由来する、請求項12-19のいずれか一項に記載の装置。

【請求項21】 リポ多糖分析物が、大腸菌、サルモネラ及びクラミジアから成る群から選択されるグラム陰性菌の細胞膜に由来する、請求項20に記載の装置。

【請求項22】 リポ多糖分析物がクラミジアの細胞膜に由来する、請求項21に記載の装置。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 00/02869
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/04 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 837 310 A (HAN JIAHUAI ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) column 8, line 66 -column 10, line 29	1-27
X	WO 97 06436 A (QUIDEL CORP.) 30 June 1998 (1998-06-30) cited in the application the whole document	1-27
X	EP 0 279 517 A (DU PONT) 24 August 1988 (1988-08-24) claims 1,8,10 page 4, line 39 - line 46 page 6, line 6 - line 34 examples 1,3-5	1-27
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"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 document 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		"Z" 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 30 August 2000	Date of mailing of the international search report 06/09/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponi, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Routledge, B	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/02869

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 183 383 A (IQ BIO LTD) 16 May 1989 (1989-05-16) claims column 1, line 49 -column 2, line 4 column 2, line 41 - line 42	1-27

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02869

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5837810 A	17-11-1998	AU 2186895 A WO 9525117 A	03-10-1995 21-09-1995
WO 9706436 A	20-02-1997	US 5773234 A EP 0843815 A	30-06-1998 27-05-1998
EP 0279517 A	24-08-1988	US 4906567 A CA 1303982 A DE 3866372 A JP 2054455 C JP 7082021 B JP 63222265 A	06-03-1990 23-06-1992 09-01-1992 23-05-1996 06-09-1995 16-09-1988
EP 0183383 A	04-06-1986	AT 62347 T DE 3582405 D US 4830960 A	15-04-1991 08-05-1991 16-05-1989

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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ザーク、クリシュトフ・ボイチエフ
イギリス国、ベドフォードシャー・エム・ケイ・44・3・ユー・ビー、ベドフォード、プライオリ・ビユイネス・パーク、ユニパス・リミテッド

Fターム(参考) 4H045 AA30 CA40 EA50 FA72 FA74
FA80

专利名称(译)	脂多糖的免疫测定和测试装置		
公开(公告)号	JP2002541457A	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2000609793	申请日	2000-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	荷兰联合利华有限公司		
申请(专利权)人(译)	联合利华, Namuroze奔指出Shiyapu		
[标]发明人	バドリー・ロバート・アンドリュ ヒューズ・グレン ザーク・クリシュトフ・ポイチエフ		
发明人	バドリー,ロバート・アンドリュ ヒューズ,グレン ザーク,クリシュトフ・ポイチエフ		
IPC分类号	C07K14/47 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/04 G01N33/5308 G01N33/543 G01N33/56916 Y02A50/451		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/543.521 G01N33/569.F C07K14/47.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/FA80		
优先权	1999302711 1999-04-07 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

大肠杆菌, 衣原体或沙门氏菌, 包括使用对脂多糖结合蛋白具有特异性结合亲和力的抗体和脂多糖分析物作为第一或第二结合试剂。) 以及用于检测革兰氏阴性细菌中脂多糖的免疫分析方法以及用于执行该方法的设备。 分析物与第一结合剂反应以形成复合物, 然后与第二结合剂反应以形成包含分析物以及第一和第二结合剂的复合物。 然后检测最终复合物的存在。 一种结合剂被标记并且是游离的, 另一种结合剂未被标记并且被固定在支持物上。 所述装置包括第一区域, 游离的标记的第一结合试剂通过毛细作用从第一区域与样品一起被运输到含有未标记的第二结合试剂的检测区域。

希釈溶液	[LPS]/ml
1	100 μ g
2	10 μ g
3	1 μ g
4	100 ng
5	10 ng
6	1 ng
7	100 pg
8	10 pg
9	1 pg
10	陰性对照