

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-522198

(P2008-522198A)

(43) 公表日 平成20年6月26日(2008.6.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	F
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁)

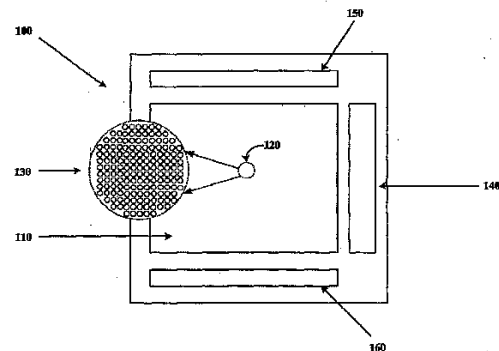
(21) 出願番号	特願2007-544541 (P2007-544541)	(71) 出願人	507182782
(86) (22) 出願日	平成17年12月2日 (2005.12.2)		ブリテスト, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年8月6日 (2007.8.6)		アメリカ合衆国ワシントン州98052,
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/043642		レドモンド, ワンハンドレッドアンドフィ
(87) 国際公開番号	W02006/060663		フティーセカンド・アヴェニュー・ノース
(87) 国際公開日	平成18年6月8日 (2006.6.8)		イースト 2897
(31) 優先権主張番号	60/633, 217	(74) 代理人	100099623
(32) 優先日	平成16年12月3日 (2004.12.3)		弁理士 奥山 尚一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096769
(31) 優先権主張番号	60/645, 428		弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成17年1月20日 (2005.1.20)	(74) 代理人	100107319
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松島 鉄男
(31) 優先権主張番号	11/069, 351		
(32) 優先日	平成17年3月1日 (2005.3.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リフレックス・サブリメンタルテスト感染症、疾患もしくは他の状態を備える被験者を同定するための迅速、効率的かつ高度に正確な方法

(57) 【要約】

本開示は、病原体および/またはマーカー分子を検出するための方法、組成物および装置に関する。特定の実施形態では、検出される病原体は、マイコバクテリウム・ボビスまたは哺乳動物において結核を惹起する任意の他のマイコバクテリウム属の種であってよい。しかし、本明細書に開示した方法は限定されず、実質的に任意のタイプの病原体および/またはマーカー分子をスクリーニングおよび検出することができる。好ましい実施形態は、およそ100%の感受性および可能性のある最高相対感受性 - 1つの実施例では70% - で同一アッセイを用いるリフレックス・サブリメンタルテストを含む。反復して使用されるそのようなアッセイ条件は、各検査ラウンドについて未感染被験者の70%の排除を生じさせる。4ラウンド以上の検査の使用が生じさせる誤差は1%未満である。陽性サンプルだけが再検査されるので、本方法は、感染被験者を検出するための迅速、安価かつ高度に正確な方法を提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1 群のサンプル中で病原体を検出する方法であって、

a) 前記病原体の存在について約 100% の感受性で前記サンプルをアッセイするステップと、

b) 同一のアッセイを用いて、陽性検査結果を示すサンプルだけを繰り返して再検査するステップと、

c) 選択レベルの正確度が入手されるまで、各検査ラウンド後に陽性検査結果を示すサンプルについてだけ前記反復再検査を繰り返すステップと

を含む方法。

10

【請求項 2】

前記反復再検査は、3、4、5 または 6 サイクル繰り返される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記アッセイは、100% の感受性および 70% の選択性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記アッセイは、99%、99.5%、99.8%、99.9% または 100% の感受性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記病原体はマイコバクテリウム属の種である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記病原体はマイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*) である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アッセイは、被験者由来の血液、血清又は血漿のサンプルに CP10-ESAT 融合タンパク質を曝露させるステップと、前記融合タンパク質に結合している抗体を検出するステップとを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記被験者は、ウシ、アナグマ、バイソン、シカ又はヒトである、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

偽陰性検査結果の数はゼロである、請求項 1 に記載のリフレックス・サブリメンタルテスト法。

【請求項 10】

化学発光を発生させるためにビオチン化ヤギ IgG 抗ウシ IgM 抗体、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート化ストレプトアビジンおよび過酸化ルミナル溶液を用いて、サンプル中の抗融合タンパク質抗体の存在を検出するステップをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

化学発光は、全光学アッセイ装置 (Total Optical Assay Device) を用いて測定される、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

化学発光は、リフレクティブ・ハニカムセルを備えたカセットを用いて測定される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

各サンプル由来の測定された化学発光シグナルについてデータ分析を実施するステップをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記データ分析は、自動閾値補正を含む、請求項 13 に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記データ分析は、ピクセル群についてのバックグラウンド決定を含み、ピクセル群についての前記バックグラウンドは前記群内の任意ピクセルについての最高バックグラウンド発光と等しくなるように設定される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記データ分析は、量子効率補正係数を適用することを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

陽性検査結果についての閾値は、多数の陰性サンプルについての平均検査値を約 1.6 標準偏差超えるように設定されている、請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記融合タンパク質は、磁気ビーズにコンジュゲートされる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 19】

溶液から磁気ビーズを収集するために球状磁石を使用することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

サンプル中で分子マーカを検出する方法であって、

a) 前記分子マーカ存在について約 100% の感受性で前記サンプルをアッセイするステップと、

b) 同一のアッセイを用いて、陽性検査結果を示すサンプルだけを繰り返して再検査するステップと、

20

c) 選択レベルの正確度が入手されるまで、各検査ラウンド後に陽性検査結果を示すサンプルについてだけ前記反復再検査を繰り返すステップとを含む方法。

【請求項 21】

前記分子マーカは、疾患状態についてのマーカである、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

< 関連出願 >

30

本出願は、米国特許法第 119 条 e 項の下で、2004 年 12 月 3 日に提出された「Reflex Supplemental Testing for Mycobacterium Bovis - A Rapid Method to Isolate and Identify Infected Animals」と題する米国仮特許出願第 60/633,217 号、および 2005 年 1 月 20 日に提出された「Rapid Diagnostic Test for Mycobacterium bovis Infection」と題する米国仮特許出願第 60/645,428 号の利益を主張する。本出願は、2005 年 3 月 1 日に提出された米国特許出願第 11/069,351 号に対する優先権もまた主張する。各出願の全内容は、参照して本明細書に組み込まれる。

【0002】

40

< 発明の分野 >

本発明は、生物学的サンプル中の病原体および/またはマーカ分子の存在を検出するための方法に関する。特定の実施形態では、本方法は、病原体および/またはマーカ分子の存在についての高度に感受性かつ選択性の試験の使用を含む。感受性は 100% もしくは 100% 近くとなるように選択できるので、陰性の検査結果は病原体もしくはマーカの不存在の指標であると見なされる。より特定の実施形態では、陽性の検査結果を示すサンプルは、同一アッセイを用いる、100% もしくは 100% 近くに設定された感受性を備えるリフレックス・サブリメンタルテストにかけられる。2 回目の陽性検査結果は、第 3 ラウンドの検査の指標として使用できる。リフレックステストの各ラウンドに伴って、偽陽性検査結果の数が減少する。偽陽性の存在は、試験される被験者の数、使用するア

50

ッセイの感受性および特異性に依存して、反復リフレックステストの適切な回数を選択することによって、任意の所望レベルへ排除もしくは減少させることができる。陽性サンプルのリフレックステストの選択されたラウンド回数の使用は、結果として偽陽性の実質的排除を生じることができる。

【背景技術】

【0003】

ウシ結核症は、マイコバクテリウム・ボビスによる感染によって惹起される、畜牛における感染性かつ高度に伝染性の疾患である。この疾患は、マイコバクテリウムへのエアロゾル曝露または汚染した物質の摂取によって蔓延することがある。この疾患は、初期段階には比較的無症候性の慢性炎症として進行する傾向がある。進行した症例は、衰弱、食欲不振、リンパ節腫脹、持続性の咳および呼吸窮迫などの非特異的症状を特徴とし、他のタイプの呼吸器疾患と間違えられることがある。この細菌は優先的に畜牛に感染するが、ヒトや他の哺乳動物への伝播も報告されている。

10

【0004】

現在標準的な検出方法には、ツベルクリン皮膚テストが含まれる。しかし、標準的皮膚テストの偽陰性もしくは偽陽性検査結果は珍しくない。陽性検査結果は、その動物に直接的に曝されていた他の群内動物と一緒に推定感染動物の駆除を生じさせる可能性が高いので、結核検査のためのより感受性が高くかつ正確な方法に対する必要が存在する。そのような方法があれば、ヒト被験者を結核や他の疾患について検査するためにも有益である。

20

【0005】

偽陽性検査結果の発生を減少させるためのリフレックステストは、ウイルス性C型肝炎、ヒト免疫不全性ウイルス(HIV)感染およびB型肝炎感染などの感染症についても推奨されている(例えば、Morbidity and Mortality Weekly Report, Dept. Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, February 7, 2003, 52(RR-3): 1-13を参照)。しかし、そのようなリフレックステストは、初期陽性検査結果を生成するために使用されたアッセイとは相違するタイプのアッセイを用いて実施されている。例えば、米国疾病管理予防センター(CDC)は、抗C型肝炎抗体の存在についての初期陽性検査結果については、組換え免疫ブロットアッセイまたは核酸スクリーニング検査などのより特異的な血清学検査を用いるリフレックステストを用いてフォローアップすることを推奨している(同上)。そのような試験はより費用が高くなり、時間を要し、より高度の専門技術を必要とするので、相違する、より高感受性のアッセイを用いるリフレックステストは、確定的な検査結果を入手する費用、遅延、または困難を相当大きく増加させる可能性がある。以前のリフレックステストの例は、精度は低いが速度、経済性もしくは便宜性の高い初期試験を使用し、その後に通常は速度が遅く、費用が高く、さらにより複雑な試験方法を備えるより高精度のリフレックステストを行うことに重点を置いていた。特に、そのような試験プロトコルは、偽陰性の存在に悩まされ、結果としてその疾患を蔓延させる可能性がある感染被験者の集まりが残留する結果を生じていた。そこで、偽陽性および偽陰性検査結果を減少または排除するために、同一タイプのアッセイを繰り返し利用できるリフレックステスト法に対する必要が存在する。

30

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

当業者は、本明細書に開示かつ請求の範囲に記載したリフレックステスト方法がウシまたはヒトにおける結核症に限定されず、むしろ広範囲の病原体および/またはマーカー分子の存在についての試験に適用できることを理解する。様々な病原体および/またはマーカー分子に対する多数の相違する試験が当分野において知られ、市販で入手できる。例えば、温度、pH、洗浄ステップの回数および/またはストリンジェンシー、洗剤、カオトロピック剤(例えば、ホルムアミド、ウレア、グアニジニウム、イソチオシアネート)、

50

キレート剤（EGTA、EDTA）、抗体もしくは他の検出部分の非特異的結合を減少させるための化合物（例えば、ウシ血清アルブミン）、などの剤の存在、不存在もしくは濃度、塩の濃度、二価カチオンの濃度のパラメータを変化させるステップおよび当分野において知られている他の技術によって、高レベルもしくは低レベルのストリンジェンシーを提供するためにそのような試験を実施するために使用される条件を変化させることは当業者の技術に範囲内に含まれる。そのような技術を用いて、所与の試験の相対感受性および／または特異性を調整できる。多くの場合に、感受性および特異性は逆に変化する。すなわち、アッセイの感受性が増加すると、特異性は相互の、類似の病原体または分子との非特異的結合または交差反応性のために減少する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本明細書に開示かつ請求した好ましい実施形態では、対応して減少した特異性ととともに、100%もしくは100%近くの感受性を提供できるようにアッセイ条件を選択できる。そのような条件は、陰性検査結果を示すサンプルをその後の検査から排除できるように、偽陰性検査結果の存在を排除するように選択できる。偽陽性は、以前の検査サイクルにおいて陽性検査結果を示したサンプルについてのみ反復検査を行うことによって減少または排除できる。本明細書に開示かつ請求した検査方法は、検査の経済性、速度、効率、単純性ならびに偽陽性および偽陰性の減少もしくは排除に関して先行技術の検査方法よりすぐれた実質的長所を提供する。

【0008】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の所定の実施形態を詳細に例証するために含まれている。これらの実施形態は、本明細書に明示した特定の実施形態についての詳細な説明と組み合わせて1つまたは複数のこれらの図面を参照することにより明確に理解できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の典型的な実施形態を例示している追加の詳細は、それらの各々の本文が参照して本明細書に組み込まれる2003年4月29日に提出された米国特許出願第10/425,222号；2003年2月24日に提出された第10/373,546号；2003年2月24日に提出された第10/373,408号；2003年2月24日に提出された第10/373,408号および2004年2月17日に提出された国際特許出願PCT/US2004/04675に開示されている。

【0010】

定義

本明細書に他に特に規定されていない用語は、それらの平易かつ通常の意味にしたがって使用される。

【0011】

本明細書で使用する「1つの」は、1つまたは2つ以上の品目を意味することがある。

【0012】

本明細書で使用する「捕捉分子」もしくは「プローブ」は、1つまたは複数の病原体、病原体関連分子、および／またはマーカー分子に対する結合親和性を有する分子もしくは凝集体を指す。本発明の範囲内では、当該の一部の病原体および／またはマーカー分子に対する結合親和性を有する実質的に任意の分子もしくは凝集体は「プローブ」であり得る。「プローブ」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、Fabフラグメント、ヒト化抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、アフィボディ、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸、アプタマー、結合タンパク質、受容体タンパク質、ビオチン、ストレプトアビジン、アビジン、ならびに少なくとも1つの病原体および／または病原体関連分子に結合できる任意の他の知られているリガンドが含まれるが、それらに限定されない。

【0013】

本明細書で使用する「マーカー」分子は、サンプル中のそれらの存在、不存在および／または濃度が疾患、病原性微生物もしくは他の状態の存在または不存在の指標である、分子もしくは分子の凝集体を指す。例えば、被験者における特定形状の癌の存在は前立腺特異的抗原（PSA）、CA125、rasもしくはHer2-neuタンパク質の突然変異体形、CEA（胎児性癌抗原）および他の分子などの様々なマーカー分子の存在もしくは上昇濃度によって指示することができる。同様に、アルツハイマー病は、アミロイドβペプチド、アミロイド前駆体タンパク質（APP）または他の知られているマーカーの存在または上昇したレベルによって指示されることがある。多くのそのようなマーカー分子もしくは分子複合体は、様々な疾患状況もしくは状態について当分野において知られ、任意のそのような公知のマーカーは請求の範囲に記載された方法を用いてアッセイできる。

10

【0014】

本明細書で使用する「病原体」は、感染性疾患と関連していることが当分野において知られている任意のウイルス、細菌、微生物、分子もしくは分子凝集体である。病原体の非限定的例は、表6に列挙されている。

【0015】

本明細書で使用する「量子効率」は、イメージング装置のために利用される、またはイメージング装置の電流もしくはシグナル出力に寄与する光線もしくは光子束の比率を意味する。

【0016】

本明細書で使用する「イメージセンサ」、「イメージング装置」、または「イメージャ」は、画像を捕捉するための装置を指す。この用語には、CMOS（相補型金属酸化膜半導体）イメージセンサおよびCCD（電荷結合素子）イメージャが含まれるが、それらに限定されない。

20

【0017】

本明細書で使用する「光子束」は、イメージセンサの表面を含む、表面に衝突する光子のエネルギーを意味する。表面に衝突するエネルギーは、 $W(\text{ワット}) / \text{cm}^2$ で測定することができ、所与時間にわたり単位面積に衝突する光子数と相関している。

【0018】

< ウシ結核症について検査 >

典型的な実施形態では、本明細書に開示したリフレックステスト法は、ウシまたはヒト被験者において結核症を誘発する細菌の存在について検査するために使用できる。結核症は、世界的に重大なヒトおよび動物の健康問題であり、ヒト疾患は年間約300万人の死亡を引き起こしている（世界保険機構、「1990年代についての結核の管理および研究戦略。WHO会議の覚書」、Bulletin W.H.O. 70:17-21, 1992）。ウシ結核症は、経済的損失の主要な原因および人畜共通感染症の重大な原因を提示する（Daborn, C. J. and Grange, J. M., HIV/AIDS and its implication for the control of animal tuberculosis, 1993, Br. Vet. J. 149:405-417）。

30

【0019】

畜牛では、結核（TB）は、ヒト病原体である結核菌（Mycobacterium tuberculosis）の近縁菌である細菌、マイコバクテリウム・ボビスによる感染によって惹起される。それらがどちらも「結核菌複合体」として規定されている細菌に含まれるこれらの菌株によって発現した抗原においては極めて限定された相違しか見出されていないが、抗原発現の明白な相違が疾患誘発物質を非病原性菌株から識別する（Pollack, J. M. and P. Andersen, 「Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with Mycobacterium bovis in cattle,」 Infect Immun, 1997, 65:2587-92; Andersen, A. B. et al., 「Structur

40

50

e and function of a 40,000 MW protein antigen of Mycobacterium Tuberculosis,」 Infect. Immun., 1992. 60: 2317 - 2323; Harboe, M. T. et al., 「Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG,」 1996, Infect. Immun. 64: 16 - 22)。ウシ結核症は、ヒト、他の家畜および一部の野生動物（ヘラジカおよびオジロジカを含む）にも感染することがある。

10

【0020】

ウシ結核症根絶プログラムは、現在、米国および多数の他の国々において実施されている。有病率の追跡は1917年に開始され、根絶プログラムに関連する有病率における減少は、経時的に増加する各年に実感された利益を生じさせている。2004年の見積利益は、年間1億9,000万ドルであった。（2004年結核委員会の報告書、usaha.org/committees/reports/report-tb-2004）。それでも、ウシ結核症による感染は、頻回に発見されている。2003事業年度においては10の罹患畜牛群が検出され、2004年には6群以上が検出された。感染酪農用未出産雌牛/去勢牛の起源は、感染した畜牛またはTB感染領域からの違法移動と混合された、米国酪農業における未検出TBと関連付けられている。不適切な動物の同定は、さらにまた感染起源を同定する検証努力を妨害することがある。2003事業年度における39症例の発見と比較して、2004事業年度には畜殺サーベイランスによって、35の結核症例が明らかにされた。メキシコでは、感染率は、2003事業年度における0.34/10,000頭（畜牛）に比較して2004年に輸入された0.22/10,000頭（畜牛）であった。1996年から2004年1月までに畜牛における確認された新規感染発生を生じさせた英国における拘束されていない群についての試験のパーセンテージを図9に示したが、これはより良好な試験および根絶法に対する必要を協調している。2004年10月からは、試験した動物372,284頭中1311頭の感染動物が確認された（有病率0.4%）。現在のおおよその有病率は、米国では0.2%、メキシコでは0.4%および英国では0.4%である。

20

30

【0021】

ヒトは、1)感染した動物もしくは感染したヒトが近くで咳やくしゃみをした後で細菌に汚染した空気を吸入すること；2)感染したウシ由来の未殺菌乳汁を飲んだり、感染した動物由来の生肉もしくは加熱が不十分な肉を食べたりすること；または3)屠殺動物の下ごしらえおよび処理において感染した肉を取り扱うことによって、特に食事をする前に注意深く手を洗わなかった場合に、ウシ結核症に罹患する。

【0022】

しかし、任意の他の疾患より多数のヒトが結核で死亡することは認識されている。世界保健機構（WHO）によると、2003年には結核のために200万人を超える人が死亡した。世界中で3人中1人が潜伏性結核を有し、ほぼ3億人の感染者がいることになるというのが現在の推定である。結核は、風邪に似て高度に伝染性で、迅速に蔓延するので、世界的に制御されなければ米国内で根絶することはできない。

40

【0023】

ヒトにおけるウシ結核症の症状は、一般に伝播方法に関連し、結核（Mtb）感染症において観察される症状に類似する。これらの症状には、咳、熱、寝汗、疲労および体重減少が含まれる。MbouvもしくはMtbに感染した患者は、典型的にはツベルクリン精製タンパク質誘導体（PPD）皮膚テストを用いて同定され、いずれの症例でも同一処方薬を用いて治療される。TBを治療するために使用される薬物は、決して無害ではなく、適正な療法のためには患者は長期間にわたる治療に耐えることが要求されるので、罹病および死亡の原因となる。これは、適切には容易に治療できないために、世界的な主要な感染

50

性死因である。薬物耐性TBの有病率は、高速で上昇し、現在は3%を超えている。現在利用できる最高の試験を用いて個人が感染していることを確認するためには数週間から数カ月間を要する。

【0024】

生物は単離するのが困難であり、緩徐に増殖し、そして予測不能に播種性であるために、感染していて疾患を広めている個人を容易に同定する高速診断試験はない。皮膚テストは、実施するために高度の専門技術を必要とし、この微生物に感染している、もしくは保有するBCGワクチン接種済み患者を確実に同定するためには使用で傷、真に感染している個人の30~40%を同定することができない。感染している個人を見つける際に、そしてTBを根絶およびまたは制御するために彼らを治療する際には、迅速(1~4時間)かつ単純な血液検査が極めて価値がある。

10

【0025】

<結核の根絶>

結核の制御および根絶は、感染した被験者を同定する困難さのために深刻な挑戦課題を提示する。ほとんどの疾患において、ヒトおよび動物は異種タンパク質に反応して検出可能なレベルの抗体を容易に発生し、これは特定病原体による感染の確実な指標を与える。実際に、現代の疾患診断およびサーベイランスは、一般に疾患因子自体よりむしろ、感染性因子に対する抗体の検出に基づいてきた。

【0026】

しかし、TB病原体は、病原体が明確に確定されて疾患の臨床徴候が既に明白である感染後期になるまでは、伝統的方法によっては検出可能な抗体がほとんど観察されないより潜行性の疾患因子群の1つである。M.ボビスに感染した大多数の畜牛は、有効な細胞媒介性免疫(CMI)応答を増加させ、低抗体反応を有し、さらに長期間にわたり局所病巣内に感染を含有することは証明されている(Theon, C.O. and Morris, J.A., The immune spectrum of Mycobacterium bovis infections in some mammalian species: a review, 1983, Vet. Bull, Weybridge, 53: 543-550)。その理由から、TB感染に応答して発生した特異的抗体を測定する診断試験は、TBの多数の偽陰性または見逃し症例を生じさせるので、ツベルクリンPPD皮膚テストより(ヒトおよび畜牛のどちらにおいても)低感受性であることが証明されている。これらの血清学試験は、典型的には、それらが他の比較的無害のマイコバクテリアに応答して身体によって生成された抗体を頻回に検出し、偽陽性を生じさせる点で、低特異性を有することも証明されている。

20

30

【0027】

<畜牛における診断方法>

畜牛においてTBを診断するために現在好ましい方法は、M.ボビス感染への細胞媒介性免疫(CMI)応答を測定するフィールド試験である単回ツベルクリン皮内テスト(SIDT)である。詳細には、このテストはウシツベルクリンPPDの皮内接種後のCMI応答の構成要素である遅延型高感受性反応を測定する。結果は、72時間後に評価される(Wood, P.R. and Jones, S.L. Bovigam (商標) an Internationally Accredited Diagnostic test for Bovine Tuberculosis, USAHA Proceedings, 1998, 1-9)。このテストは、広範囲に感染が広がっている群では96~99%という高い特異性を有すると報告されている(Monaghan, M., et al., The tuberculin test, 1994, Vet. Micro. 40: 111-124)。

40

【0028】

しかし、感染した動物の28%は未感染であると不正確に同定されるために、TB根絶プログラムにおいてはこのテストの中等度の感受性(72%)は問題が多い。未感染と同定された畜牛は、明白に疾病ではない限り群に戻され、他の未感染畜牛に感染を蔓延させ

50

る。同様に、一部の地理的領域では、特異性は、非定型マイクバクテリアとの重大な交差反応性のためにさらにいっそう減少する。オジロジカ、ヘラジカ、アナグマなどを含む根絶プログラムに含まれていない他の感染した動物もまた、以前に直っていた畜牛を再感染させ、それによって根絶に関連する問題の一因となり、問題を悪化させる。

【0029】

感受性および特異性はどちらも、疾患を根絶させる際に重大な影響を及ぼす。有病率の減少に伴って、真の陽性動物に比較して検出される偽陽性動物の数は、特異性が100%未満であるために増加する。陽性予測値は有病率と正比例して減少し、結果として大多数の動物は低有病率で感染すると不正確に同定される。感染していると不正確に同定されたそれらの動物を根絶することは、経済的に容認できない。さらに、これらの短所にもかかわらず、皮膚テストは過去100年以上にわたって大規模集団（ヒトもしくは動物）をスクリーニングするために利用できる唯一の実際的テストであった。

【0030】

結核を有する大多数の畜牛は、臨床徴候を示さない。しかしそれらは、他の家畜およびヒトにとって深刻な脅威を提示する。結核の有病率は、現在根絶プログラムが進行中である米国および多数の他の国々内では低いと考えられているが、このプログラムにおける弱点は持続している。多数の国々では、2つの完全ではない試験様式を組み合わせる標準的な「連続式」テストが使用されている（M. Thrusfield, *Veterinary Epidemiology*, 2nd Edition, Blackwell Science, Malden, MA, USA, 1995）。第1テストは、容疑（反応者）または陽性のどちらかを同定するために設計されているCaudal Foldテスト（CFT）と呼ばれるPPD皮膚テストである。次に、陽性もしくは反応者のどちらかであるという結果の出た全動物は、ときには比較頸部テストとも呼ばれる短間隔比較ツベルクリンテスト（SICCT）を用いて再検査される。CFTについての感度範囲は68～95%であり、特異性範囲は96～98.8%である。SICCTは77～95%の感受性範囲を有し、特異性は99%より高い（Francis, J. et al., 「The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins,」 *Veterinary Record*, 1978 103: 420 - 425; Monaghan, M. L. et al., 「The tuberculin test,」 *Veterinary Microbiology*, 1994, 40: 111 - 124）。このテスト結果が陽性である場合、動物は屠殺され、培養および組織学検査のために組織が採取される。完全ではないテストを2つ組み合わせることによって、総合感度はほぼ70%へ減少するが、特異性は100%近くあるので、不正確に同定された動物が屠殺されずにすむ。しかし、感度の低下は一部の偽陰性検査結果を生じさせ、対応する感染したかどうかがいまいな動物の存在は持続的に低レベルの感染率を生じさせる。連続式で行なわれる診断試験のための連続式試験の統計的転帰についての良好な例については、prevmed.vet.ohio-state.edu/ext_62b.htmで考察されている。

【0031】

<CFP10 - ESAT6 融合タンパク質>

伝染力の強いM. ボビスと弱毒化ワクチン菌株によるM. ボビスBCGとの遺伝学的相違についての分子分析が実施された。サブトラクティブゲノムハイブリダイゼーションを用いて、RD-1～RD-3と指名された3つの相違領域が同定された。RD-1は結核菌およびM. ボビスの全菌株で検出されたが、全BCG亜株では不存在である（Maheras, G. G. et al., 1996, 「Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*,」 *J. Bacteriol* 178: 1274 - 1282）。早期分泌抗原標的（Early Secreted Antigen Target）6kDタンパク質をコードするE

10

20

30

40

50

SAT-6 遺伝子は、RD-1 内で見出されている。ESAT-6 は、結核菌短期培養濾液から精製されている主要 T 細胞抗原である (Sorensen, A. L. et al., 1995, 「Purification and characterization of a low molecular mass T-cell antigen secreted by M. tuberculosis,」 Infect. Immun. 63:1710-1717; Harboe, M. et al., 1996, 「Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG,」 Infect. Immun. 64:16-22)。ESAT-6 に帰せられている機能はまだないが、ESAT-6 は本質的に強度に抗原性であり、マウス記憶免疫 T リンパ球由来の γ インターフェロンの産生を刺激し、抗結核免疫の発生に寄与できる可能性がある (Andersen, et al., 1995, 「Recall of long-lived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice,」 J. Immunol. 154:3359-3372)。

【0032】

ESAT-6 と共転写される、lhp と指名された新規遺伝子が同定されている。lhp/esat-6 オペロン内では、新規遺伝子ファミリーを規定する、計 13 の潜在的遺伝子 (もしくはオープンリーディングフレーム、ORF) もまた同定されている。結核菌 lhp 遺伝子産物は、同様に短期培養濾液中でも見出されている低分子量 10 kD 培養濾液タンパク質である CFP-10 として同定されている (Berthet, F. X., et al., 1998, 「A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10),」 Microbiology 144:3195-3203)。そこで、CFP-10 および ESAT-6 はどちらも結核菌もしくは M. ボビスにおいて早期に一緒に転写され、どちらも小輸出タンパク質をコードする。2 つの遺伝子はいずれのゲノム内でも相互に隣接して発生するので、両方の全長タンパク質から構成される融合タンパク質組換え抗原は、本発明者らのアッセイのための捕捉プローブとして設計した。

【0033】

< Bovigam テスト >

現在は、結核菌もしくは M. ボビスへの曝露後に免疫系によって活性化されたキラー T 細胞が、これらの生物由来の特異的細菌エピトープを用いて刺激された場合に γ インターフェロン (IFN- γ) 産生についてアッセイされる新規パネルの試験が評価されている。この試験のウシ適用は、Bovigam (商標) と呼ばれ、霊長類適用は Primagam (商標) およびヒト適用は Quantiferon (商標) である。これらのアッセイでは、全血が患者から採取されてツベルクリン (結核菌もしくは M. ボビスから抽出したタンパク質) とともに一晩インキュベートされる。患者 (ヒトもしくは動物) が以前に TB に曝露させられている場合は、血液中の T 細胞は、単純な研究室アッセイで検出可能な IFN- γ を産生する。そのような試験の長所は、試験血液サンプルの抽出は被験者の免疫状態を妨害しないので、必要であれば反復検査が可能であり (皮膚テストは、再検査前に少なくとも 60 日間の間隔を必要とする)、感染の早期症例を検出するために使用できる。

【0034】

これらのテストは、皮膚テストを使用できない HIV 感染者および他の免疫不全者においても容易に使用できる。世界中での 300,000 頭をはるかに超える畜牛を対象とする試験は、Bovigam (商標) が皮膚テストについての 65.6 ~ 84.4 % に比較して 77 ~ 93.6 % の範囲内の感受性を有することを証明している。Bovigam (

商標)および皮膚テストと一緒に使用することができ、その場合にはより高度の感受性を達成できる。

【0035】

<Quantiferon試験>

Quantiferon(商標)は、現在までに3,000を超える個体を含む臨床試験において試験されている。Quantiferon(商標)の改良バージョンでは、結核菌抗原であるESAT-6もしくはCFP-10(MtbもしくはMbovの活性感染症において早期に発現する遺伝子産物)であるQuantiferon-TB GOLDテストがツベルクリンPPDの代わりに使用される。ESAT-6配列は、結核性非ヒト霊長類(Kanaugia, G.V. et al., 「Recognition of ESAT-6 Sequences by Antibodies in Sera of Tuberculous Nonhuman Primates,」 Clin. and Diag. Lab. Immunol., 2004, 11(1):222-226)および畜牛(Buddle, B.M., et al. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. Vet Microbiol, 2001. 80:37-46; Buddle, B.M., et al. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test positive cattle. The Veterinary Record, 2003. 615-620; Vordermeier, H.M., et al. Use of synthetic peptides derived from the antigens esat-6 and cfp-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. 8:571-8)ならびにヒト(Arend, S.M., et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. Infect Immun, 2000. 68:3314-21; Arend, S.M., et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. J Infect Dis, 2000. 181:1850-4; Berthet, F.X., et al. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology, 1998. 144:3195-203; Brock, I., et al. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Int J Tuberc Lung Dis, 2001. 5:462-7.)の血清中の抗体によって認識されることが証明されている。

【0036】

多数の公表された臨床試験は、TB感染を検出するためのESAT-6および/またはCFP-10(Bovigam(商標)またはQuantiferon(商標)以外の方

10

20

30

40

50

法を用いる) に対する IFN- γ 応答を測定するステップの有用性を証明している (Dillon, D.C., et al. Molecular and immunological characterization of Mycobacterium tuberculosis CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in Mycobacterium bovis BCG. J Clin Microbiol, 2000. 38: 3285-90; Pathan A.A., et al. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN- γ -secreting CD4 T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals: Associations with clinical disease state and effect of treatment. J Immunol, 2001. 167: 5217-25; Shams H., et al. Contribution of CD8+ T cells to gamma interferon production in human tuberculosis. Infect Immun, 2001. 69: 3497-501; Smith, S.M., et al. Human CD8(+) T cells specific for Mycobacterium tuberculosis secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in The Gambia. Infect Immun, 2000. 68: 7144-8; Vekemans J., et al. Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia. Infect Immun, 2000. 69: 6554-7)。しかし、これらの試験は一般に、実行するのが面倒な試験システムを使用し、日常的な診断用途(例えば、精製リンパ球培養、ELISPOT)のためには適合しない。オーストラリアで実施された試験は、Quantiferon(商標)試験の感受性および特異性が各々ほぼ90%および98%であることを見いだした。これに比較すると、皮膚テストは、ヒトTB感染を検出するために約70%の感受性を有する。

【0037】

<血液検査対皮膚テスト>

Bovigam(商標)、Primagam(商標)およびQuantiferon(商標)は、1回の血液採取しか必要とせず、現在までに皮膚テストおよびTB抗体検出試験よりはるかに正確であり、それらは相当に実行するのに費用がより高額であり、自動化されておらず、活性化T細胞リンパ球とM.ボビスもしくは結核菌特異的抗原とのインキュベーション24時間後まで結果を入手できないので実施するのが冗長である。さらに、各テストのために新鮮血液サンプルが必要とされ、採血後24時間以内にアッセイされなければならない。そこで、これらの検査を広範なスクリーニングのために使用することは非実際的であり、より単純な初期スクリーニング方法によって陽性とされた試験サンプルの確認アッセイとして使用するのが最もよい。

【0038】

英国では、皮内比較頸部ツベルクリンテスト(SICCT/皮膚テスト)は、畜牛においてTBを診断するために使用される唯一の試験である。BovigamテストはSICCTテストより高感受性であるが低特異性であると思われるので、感染した群を根絶するためにBovigamを使用する確率が調査された。従来型PPD抗原およびより新規な合成抗原の両方が、IFNテストが有用であるかどうかを決定するための費用効果性試験において使用された(defra.gov.uk/animalh/tb/forum/papers/tb71.pdf)。血液検査は皮膚テストが陽性になる前に検出できることが観察されたが、複雑性および動物1頭当たりの総費用のために、この試験の経済的な全体的利益は正当化できない。

【 0 0 3 9 】

皮膚テストに比較して血液検査に関連する長所には、以下が含まれる。

- ・ 群が移動制限下に置かれる時間の長さが減少する。
- ・ 皮膚テストのために必要とされるような家畜を2回訪問検査する必要が取り除かれる。
- ・ 検査に消費される時間を減少させることによって獣医学および検査の費用が減少する。
- ・ 検査の増加した感受性のために感染を解決するために必要とされる検査のラウンド数を減少させる。
- ・ 感染の早期段階に畜牛の感染を検出する。
- ・ 皮膚テストにおける問題のような干渉（少なくとも60日間の間隔）なしで極めて短い間隔で再検査する能力。
- ・ 感染が迅速に蔓延しているときにより多くの疾患を取り上げるために理想的に適合する高感受性。
- ・ BCGでワクチン接種した畜牛とM.ボビスに感染した畜牛とを識別する。
- ・ 結果の分析は、訓練を積んだ獣医による皮膚反応の主観的評価よりはるかに正確である。

10

【 0 0 4 0 】

皮膚テスト（S I C C TもしくはC F T）は、検査を実施して2～3日後に結果を再び読み取るために動物を集合させる必要がある。このテストの感受性が経験を積んでいない技術者が行った場合には20%と低い可能性があるので、経験を積んだ獣医が実施することが高度に推奨されている。検査を実施して読み取るために経験および訓練を積んだ獣医を使用することは、血清に基づく試験に比較してはるかに多くの時間および費用を必要とする。

20

【 0 0 4 1 】

M.ボビスに対する循環中抗体を検出できる血清学的アッセイについては長年にわたり絶えざる研究が行われてきたが、現在までにルーチン使用するための診断テストとして適合するものにする適正な感受性もしくは特異性を証明できたアッセイはない（Wood, P. R. and Rothel, J. S. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. 1994, Vet. Micro, 40: 125 - 135）。

30

【 0 0 4 2 】

<リフレックス・サブリメンタルテスト - TB感染被験者を同定するための迅速で効率的かつ高度に正確な方法>

マイコバクテリウム・ボビス（Mb v）感染についてのPriTest迅速診断テストは、畜牛におけるTB感染の広範なスクリーニングについての理想的な血清学的方法を提供する。本方法は、皮膚テストに比較して多数の点で優れ、少量の血清サンプルを必要とする（単回血液採取からの0.1mLという少量の血清が、多数回のラウンドの検査について十分以上の物質を提供する）。本検査は、初回スクリーニングについて1.5時間未満で高度に正確な結果を生じさせるので、高レベルの技術的専門性を必要としない。単一の血液サンプルが必要とされるすべてであり、結果は次に研究室で処理され、そこで結果は機器およびソフトウェアによって自動的に解釈できる。

40

【 0 0 4 3 】

本試験は、特に試験デザインに備わっている高度の正確性が再検査しなければならない動物の数を最小限に抑えるので、極めて多数の畜牛をスクリーニングする際に使用するために経済的である。リフレックス・サブリメンタルテスト（RST）を用いると、最終結果は、Bovigamを特徴とするより効果で面倒な試験に頼る必要なく入手される。そして血液サンプルはいつでも再検査することができ、正確なBovigam試験のために必要とされる時間依存性要件（15時間）を有していない。

【 0 0 4 4 】

PriTest迅速診断テストでは、ツベルクリン注射が行われず、結果が1日以内（初期スクリーニングおよび陽性サンプルを対象とする2回の確認リフレックス・サブリメ

50

ンタルテストを含む)に検査室内で入手されるために、免疫応答性は影響を受けない。P r i T e s t 迅速診断テストは、B o v i g a m (商標)を用いた場合と同様にM . ボビスに対して特異的であり、M . ボビスとパラ結核菌 (M . p a r a t u b e r c u l o s i s) などの他のマイコバクテリア感染との鑑別診断を提供する。どちらの検査もB C G ワクチン接種動物には陽性反応しない。B o v i g a m (商標)は、15時間以内に試験されなければならない特殊な取り扱い要件とともに新鮮血液サンプルを必要とする。P r i T e s t 迅速診断テストは血清を試験しさえすればよく、特殊な取り扱いを必要としないので、サンプルを採取して、後になって試験するために冷凍保存することさえできる。

【0045】

典型的な試験は、カルボキシルアクリルポリマーでコーティングされたフェライト粒子にコンジュゲートしているM t b C F P - 10 / E S A T - 6 の組換え融合タンパク質捕捉プローブを用いるステップを含む。規定量のビーズは、10 mM のP B S、0.1%のB S A および0.05%のP r o C l i n からなる希釈バッファ中に1:50で希釈されている試験血清サンプル中に分散させる。希釈した血清およびビーズは、室温(R T)で15分間インキュベートする。次にビーズはネオジウム磁石を用いてサンプルチャンバの壁に付着させ、洗浄バッファ中に再分散させ、2回以上収集する。好ましい実施形態では、1対の球状磁石を1つはサンプルチャンバホルダ(微小遠心管ホルダなど)の片側に置いてプラスチックブロック内に配置することができる。球状磁石は、溶液からフェライトビーズをより効率的に収集するためのより強度の局所磁場を提供することが見出されている。

【0046】

二次ビオニチル化抗ウシ抗体は、フェライトビーズ上の組換え抗原によって捕捉されているウシT B 抗体を標識するために使用する。10分間の室温でのインキュベーション後に、ビーズは、磁石を用いて1.5 mLのエッペンドルフ微小遠心管などのチャンバの側壁へ再び付着させ、洗浄バッファ内にさらに2回分散させ、再収集する。次にウシ抗体へ付着したビオチン化抗体を含むビーズは、ホースラディッシュペルオキシダーゼストレプトアビジン(H R P - S A)とともに5分間インキュベートし、次に2回分散させ、ビーズを洗浄する。

【0047】

次にビーズは1:1のルミノール-過氧化物溶液中で懸濁させ、化学発光は、例えば、P r i T e s t T O A D (商標)(例えば、参照して本明細書に組み込まれる2004年1月29日に提出された米国仮特許出願第60/540,720号を参照されたい)のようなホトイメージャ内で検出する。例えば、画像は、ビーズに結合した抗体レベルに対応する光子画像を正確に測定するために10分間にわたって完全暗色チャンバ内で入手できる。ソフトウェアパッケージ(例えば、S l i d e r バージョン3.6、2003年2月24日に提出された米国特許出願第10/373,408号を参照)を使用すると、ワンパスで12サンプルまでを処理することができる。指定された陽性または陰性の数値は、陰性コントロール参照血清に基づいて計算される。

【0048】

各c r i b セットは現在、陰性コントロールに加えて11という多数の試験サンプルを有する。数値として与えられる観察されたシグナルは、観察されたサンプル値からc r i b のバックグラウンドを減じることによって各サンプルの比視感度(R L)を計算する自動プログラムに入力される。次に各サンプルについてのデータ比視感度($\Delta R L$)は、サンプルを陽性と読み取らなければならない閾値基準を設定するために統計的調整を行って各サンプルのR L から陰性コントロール(T B について試験して陰性であった約10例のウシ血清のプール血清からなる)のR L を減じるステップによって計算される。

【0049】

サンプルをM . ボビス抗体について陰性または陽性であると指定するための閾値、もしくはカットオフ値は、プログラム内に含有される事前設定アルゴリズムによって決定される。スクリーニングの第1ラウンドにおいて検査結果が陽性であるサンプルは、第2ラウ

10

20

30

40

50

ンドで再検査される（リフレックステスト# 1）。第2ラウンドにおいて検査結果が陽性であるサンプルは、確認ラウンドで再検査される（リフレックステスト# 2）。リフレックステストにおける任意の時点で検査結果が陰性であった任意のサンプルは、陰性であると確認される。リフレックステスト# 2後に検査結果が陽性であるサンプルは、指定において陽性であると確認される。

【0050】

1回の検査では、100%の確実性で感染した動物を効果的に単離するために必要とされる感受性（感度）および特異性のレベルを一貫して生じさせない。リフレックス・サブリメンタルテストは、陽性を検出するための閾値が100%の陽性感染動物を捕捉するために十分に低く設定されているので、偽陽性（すなわち、100%もしくは100%近くで）が予想される閾値で慎重に検査するステップを含む。

10

【0051】

次に第2バッチにおいて同一アッセイを用いて感染について試験した結果が再び陽性になった動物の全部を検査することによって、未感染動物の第2バッチは安全に放出される。リフレックス・サブリメンタルテストプロセスは、検査結果が陽性の動物だけを各間隔で再検査して、真陽性単離体だけが確認されるまで段階的に継続される。迅速に検査する本方法は、感染した動物に重点が置かれるが、他方では偽陽性検査結果の動物は実際にそれらが感染していない場合は陰性であると再検査できる。感染している動物を正確に確認することについては、単回スクリーニングテストよりはるかに効率的である。

20

【0052】

< RST数を計算する >

自信を持って再検査を停止するためには、何回のリフレックス・サブリメンタルテストが必要であるか？過剰に多数回の検査は、時間、資金および資源が浪費されるので価値がない。この数は、容易に計算することができる。血清反応陽性および血清反応陰性動物はどちらも、1回のアッセイで容易に決定できる試験値を有する。感染（陽性）および未感染（陰性）動物両方についての数値の正規分布曲線を決定できる（図10を参照）。

【0053】

分布曲線は、対称的である必要はなく（図示したように）、図10に示したように実際には重複する。陽性および陰性についての2本の曲線が重複しない場合は、曲線間の閾値は、100%の特異性および感受性で感染および未感染畜牛の2つの集団間を容易に識別する。しかし、畜牛におけるTBの場合のように曲線が重複する場合でさえ、試験された全感染（陽性）動物の左（低い数値）に閾値を選択できる。閾値指定を用いると、全部の真に陽性の動物の100%は正確に検出される（すなわち、偽陰性はゼロになる）が、未感染畜牛の一部は、図10を調査することによって明らかなように誤って陽性であると同定される（すなわち、「陰性血清」曲線の一部分は閾値の右の方にある）。しかし、図から明らかなように、リフレックステストの各繰り返しに伴って、偽陽性検査結果の数が迅速に減少する。

30

【0054】

各試験、および各リフレックス・サブリメンタルテストを用いた各動物（感染または未感染いずれか）についてのアッセイ値は、図10に示した2本の曲線の1つ内に入り、アッセイで使用した閾値に基づいて、陽性または陰性検査結果であると指定できる。数値は、適切な曲線下のいずれか（感染または未感染）に含まれると予想され、測定された以前の数値を必ずしも高度の精度で再現しない場合がある。分布曲線の形状によって規定されるように、分散が予想される。

40

【0055】

最高RST数（N、繰り返し試験のサイクル数に等しい）は、3つの因子に左右される - プロセッシングについてのサンプルの総数（X）、試験されたサンプル数における真に感染した畜牛の数（有病率）、および真に感染した畜牛全部に「陽性」値を正確に指定するために十分に低い閾値に対する特異性。各テストを用いて、実際的に未感染であるサンプルのパーセンテージは、試験のために一致してサンプルのプールから除去される。リフ

50

レックス・サブリメンタルテストは、その後のテストを受ける準備が整っている陰性に比較した陽性のパーセンテージを高める各サイクルを生じさせる。この方法は有病率を増加させ、検査の陽性予測値を、プロセスにおける各再検査により良好にし、リフレックステスト # 1 からリフレックステスト # 2 などへの相対分布における変化において図 10 に示されている。プール内の陽性の比率は、各サイクルの試験を用いてプール内の陰性に比較して増加する。最適化された R S T は、試験された陽性総数に比較して偽陰性検査結果を最小限に抑える。最適化のための試験の総数は、合計として計算できる。

試験の総数

$$(\text{スクリーニング} + \text{R S T}) = X \{ 1 + F + F^2 + F^3 + \dots + F^N \}$$

F は特異性に依存する偽陽性因子であり、

$$F = 1 - \text{特異性}$$

偽陽性の数 = $F \{ (X - \text{真陽性数}) \}$

X = 総サンプルプロセス数

N = 最適化された R S T 数

【 0 0 5 6 】

本発明者らは、試験されるサンプルの総数において 1 頭の感染動物の有病率があることを推定して 1 頭の偽陽性動物を排除するための最小基準を設定することによって合理的特異性を用いて最適化できる（本明細書に開示した典型的プロトコルを用いた場合と同様に、特異性が 50 % より実質的に大きいことを推定して）。これは、合計において最終シリーズを 1 の数値へ設定すること、そしてサンプルの総数 (X) および特異性に基づいて N

$$X F^N = 1$$

$$N = \{ \text{Log } 1 - \text{Log } X \} / \text{Log } F$$

【 0 0 5 7 】

スクリーニングにおける特異性、有病率、および初期テストの数が、100 % の感度で所与のアッセイについて自信を持って感染もしくは感染の除去と畜牛を指定するために必要とされるリフレックス・サブリメンタルテストの総数を決定する。R S T 数は、図 11 に示したように 100 ~ 500, 000 例の畜牛のサンプル中で 1 頭の真陽性動物について、表 7 において 0.70、0.74 (典型的試験)、0.90 および 0.99 の特異性について計算される。特異性が高いほど必要とされる総試験数は少なくなることは明白であるが、さらに R S T 法は、100 頭の動物群において真に感染した動物を 3 ~ 4 サイクル以内に高速で同定する。

【 0 0 5 8 】

R S T 数を最適化すると、血清学的陰性 (未感染) 畜牛についての平均値を約 1.6 標準偏差超える閾値は、100 % 感受性で現行 P r i T e s t 迅速 M b v 畜牛アッセイにおける 74 % の特異性を生じることが明らかになる。単回スクリーニングおよび 3 回のリフレックス・サブリメンタルテストでは、陽性感染動物は 1000 頭の畜牛の群中で 4 頭中 1 頭以内へ同定されるはずであり、追加の 4 回の試験によって陽性であると同定できる。これらの条件下で、1,000 頭の動物群において 1 頭の感染動物を陽性であると同定するために実施される試験の総回数は 1348 回である。そこで、リフレックステストの複数の繰り返しサイクルを用いた場合でさえ、必要とされる試験の総数は群のサイズに比較して相当に低い。

【 0 0 5 9 】

< 病原体またはマーカー検出のための装置 >

本発明の所定の実施形態は、病原体および / またはマーカー分子検出アッセイのための使用の装置に関する。本発明の典型的な実施形態を例示している追加の詳細は、それらの各々の本文が全体に参照して本明細書に組み込まれる 2001 年 10 月 10 日に提出された米国特許出願第 09 / 974,089 号; 2002 年 10 月 9 日に提出された第 10 / 035,367 号; 2003 年 4 月 29 日に提出された第 10 / 425,222 号; 2003 年 2 月 24 日に提出された第 10 / 373,546 号; 2003 年 2 月 24 日に提出

10

20

30

40

50

された第 10 / 373 , 408 号および 2004 年 1 月 29 日提出された仮特許出願第 60 / 540 , 720 号に開示されている。

【0060】

< 全光学アッセイ装置 (TOAD) >

図 12 は、全光学アッセイ装置 (Total Optical Assay Device : TOAD (商標)) の非限定的な典型的実施形態を示している。この実施例では、TOAD (商標) は、ヒンジ付きリッド 1220 を備える遮光性ケーシング 1210 を含む。リッド 1220 が閉鎖されると、ケーシング 1210 は、TOAD (商標) の内部からの外部光線を遮断し、生物発光または分析対象のサンプルから発光された他の光線の高感受性検出を可能にする。リッド 1220 は、ステージ 1230 を示すために開かれている。GRABBER (商標) スライド (下記参照) もしくはマイクロタイターウエル装置を含むがそれらに限定されないイメージングできる装置は、ステージ 1230 の上部に配置できる。ステージの下方には、CCD (電荷結合素子) チップまたは他の光センサ (図示していない) の上部に載っている単一集束レンズがある (図示していない)。スライドもしくはマイクロタイターウエルは、ステージ 1230 の上部の対応する形状の凹所とアライメントさせるステップによってステージ 1230 の上に配置できる。ケーシング 1210 は、TOAD (商標) の移動を容易にするための凹所、ハンドルもしくは他の機能を含むことができる。

10

【0061】

図 13 は、TOAD (商標) の典型的実施形態の略図を示し、ケーシング 1310 の本体は内部構成要素を示すために移動させられている。リッド 1320 は、イメージング装置 1350 の上部に配置された CCD チップの上方にスライド、マイクロタイターウエルまたは他の装置を配置するために使用されるステージ 1330 の上に重なる。非限定的実施例では、イメージング装置 1350 は、QICAM 10 ビットのモノクロ冷却 CCD カメラ (Qimaging (商標)、Burnaby, B.C.、カナダ国、製品番号 QIC-M-10-C) である。しかし、TOAD (商標) は典型的実施形態には限定されず、他の知られているタイプのイメージング装置 1350 を利用することが企図されている。単集束レンズ (図示していない) は CCD チップとステージ 1330 との間に挿入され、例えば、C-マウントアダプタを用いて、イメージング装置 1350 の上部に取り付けることができる。

20

30

【0062】

典型的な実施形態では、イメージング装置 1350 は、CCD チップに加えて、CCD チップを取り囲んでいるペルチエ (Peltier) 型熱交換素子を含む。イメージング装置 1350 の残りは、6 ピンファイアワイヤコネクタなどの電源装置への連結部、ソフトウェアインターフェースおよび外部データポートと一緒に、CCD チップによって検出されるシグナルを処理するための電子部品を含む。ペルチエ型熱交換器は、CCD カメラ 1350 から熱を取り除き、それをケーシング 1310 の内側へ放出する。TOAD (商標) が過熱するのを防止するために、単独ファン駆動式冷却装置 1340 は、イメージング装置 1350 の上部に隣接して配置される。冷却装置 1340 は、高温空気をケーシングからケーシング 1310 の背部 (図示していない) で遮光性ベントを通して排出し、ケーシング 1310 の内部を通して冷却空気を循環させる。標準作動中、冷却装置 1340 は、CCD カメラ 1350 を過熱させずに持続的に作動させるために十分効率的に機能する。CCD カメラ 1350 の過熱は、バックグラウンド雑音の実質的増加を生じさせ、CCD チップの光学視野を通しての見かけの光検出のランダムバーストを生じさせる。

40

【0063】

イメージング装置 1350 は、ステージ 1330 に比較してイメージング装置 1350 を正位置に保持するベース 1360 の上部にのっている。ベース 1360 の底部は、イメージング装置 1350 の底部のオンオフスイッチ、および電源装置 (例えば、110 ボルトの AC 電気コード)、ファイアワイヤおよび任意の他の外部連結部にアクセスできるよ

50

うに開いている。

【0064】

図14は、TOAD（商標）の典型的実施形態の上面図を示している略図であり、ステージ1420の上面を示すためにケーシング1410は取り外されている。ステージ1420の上部には、スライド、マイクロタイターウエルまたはCCDチップの上方の他の装置のポジショニングを可能にするように配列されたくぼみ1430、1440が示されている。ステージ1420の中心にある穴1460は、スライド、マイクロタイターウエルまたは他の装置を通る光線透過および下にあるCCDチップ1450による検出を許容する。当業者には、以下でより詳細に考察するように、透明性もしくは透過性装置の使用は、光学的に読み取る装置の下方に配置された光学検出器を備えるTOAD（商標）装置の使用を促進することは明白である。

10

【0065】

上記で考察した典型的実施形態は、以下に開示するルミノール系などの例えば任意の知られている化学発光もしくは生物発光検出系を用いて、自然に発光するサンプルを用いて光学検出するために設計されている。この場合には、結合した分析物を検出するためには励起光の外部光源は必要とされない。当業者は、標的分析物に結合する蛍光標識検出分子などの代替系を利用できることを明確に理解する。そのような系は、当分野において周知である。蛍光検出系の使用は、励起光源（例えば、レーザー、光ダイオードアレイなど）、励起光線から光検出器をスクリーニングするためのカットオフフィルタ、および蛍光検出系のための他のそのような公知の構成要素などの追加の構成要素を必要とする。上記で考察した具体的実施形態は、最小のバックグラウンド雑音で構造および使用の単純性、低コスト、および標的分析物の高感受性検出という長所を有する。

20

【0066】

<スライド>

所定の実施形態では、光学検出は、チップ、マトリックスアレイおよび/または、病原体および/またはマーカー分子を検出するための結合表面としての顕微鏡スライドなどのスライドと組み合わせて使用できる。様々なスライド基質は、以下で考察するように知られている。

【0067】

<伝統的な透過性スライド>

ガラスもしくはプラスチック製顕微鏡スライドは、一般にマイクロアレイ分析のための固体マトリックス支持体として使用されてきた。プローブ分子は、架橋化合物を用いてガラスもしくはプラスチック表面に付着させられている（例えば、Schena, Microarray Analysis, J. Wiley & Sons, New York, NY, 648 pp., 2002を参照）。プローブは、スポットの2Dアレイとして印刷できる。多数の相違する種類の架橋剤は、プローブ機能性に影響を及ぼさずに表面へ架橋結合（例えば、標的分子結合）させることのできるプローブ分子上で利用できる反応性部分（例えば、スルフヒドリル、アミノ、カルボキシル、フェニル、ヒドロキシル、アルデヒドなど）のタイプに依存して知られている。

30

【0068】

プローブ付着のための以前の方法についての問題は、付着能力が限定されることである。孔径が増加するにつれて、予想される標的分子のために可能性のある結合部位の数は一般に減少する。プローブのための結合部位が検出閾値より下方のレベルで飽和している場合は、たとえプローブと標的分子との間で結合が発生している場合でさえシグナルは観察されない。

40

【0069】

アビジンコーティングスライドおよびビオチンコンジュゲート化プローブ分子を用いてガラス表面にプローブを付着させることが試みられてきた。または、アミノシランもしくは3-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランなどのシラン類がガラス表面上にコーティングされ、シラン部分はガラスに付着し、反応部分はプローブ分子に架橋している。

50

その他のアプローチは、ガラス表面へそれを永続的に付着させるために、プローブ分子との共有結合を形成できる官能性アルデヒド、カルボキシル、エポキシ、またはアミン基との反応性基質でコーティングされたスライドを利用してきた。

【0070】

これらの方法は小さなプローブ分子のためには中等度に良好に機能するが、官能性（結合）がプローブの方向付け、柔軟性および架橋度に左右されるより大きなプローブ分子（例えば、抗体）のためには不良にしか機能しない傾向がある。共有結合方法は、さらにまたマトリックス表面へ極めて少しの物質しか結合させない傾向もある。結果として、プローブ濃度は低く、シグナル検出は困難である。2Dアレイの表面上では相当に少量のプローブしか利用できないので、そのような系はプローブと標的との間の陽性結合反応について低い信号対雑音比を示す。

10

【0071】

タンパク質もしくはペプチド標的分子は、捕捉分子として抗体を用いることによって検出されることが多い。臨床診断またはプロテオミクスにおいて使用される二次元アレイは、タンパク質またはペプチド標的分子のためのプローブとして頻回に抗体を利用する。抗体はそれらの標的抗原に対して高度に特異的である傾向を示すが、それらは架橋剤および標準方法を用いてはガラスまたはプラスチック表面に容易に付着させられない。これは、標的結合すると弱いシグナルを生じさせる、知られている化学を用いてマトリックスへ付着させることのできる限定された量の物質であるからである。また別の問題は、抗体特異的結合は、適正な水化およびマトリックス内の支持体を用いずには維持できないことである。そこで、抗体結合固体マトリックスアレイの長期安定性は、アレイの年齢に依存して入手される矛盾しない結果とともに、限定される傾向を示す。

20

【0072】

この問題は、タンパク質を安定化させてその機能的プローブ特徴を保持する環境を作り出すことによって解決することが試みられてきた。例えば、Prolinx社（ワシントン州ボセル）は、それらの表面に付着させられたポリマーブラシフォーマットを備える標準ガラススライドを用いる化学親和性システムを開発した。このシステムは、安定性の複合体を形成する2つの合成小分子であるフェニルジボロン酸（PDBA）およびサリチルヒドロキサム酸（SHA）間の相互作用に基づいている（例えば、Stolowitz et al., Bioconjugate Chem. 12: 229-239, 2001を参照）。PDBAは、最初にタンパク質プローブとコンジュゲートされる。コンジュゲートプローブは、次に3D機能的アレイを形成するためにポリマーブラシへ付着したSHAに連結する。この方法は、表面に結合できる抗体の量によって限定される。より重要にも、標的抗原は、マトリックスに付着した抗体と反応するためにブラシ境界を通して拡散するために十分に小さくなければならない。そのような方法は、全細胞または細菌などの大きな標的を同定および/または定量するためには適合しない。

30

【0073】

<不透明スライド>

マトリックスアレイに付着したプローブの量を安定化かつ増加させる方法は、高度に望ましい。そのような方法は、一般に不透明スライドを生じさせるが、これはプローブ結合を増加させて安定性を維持するために使用されるマトリックス物質が、典型的には非透過性ゲル、ヒドロゲル、寒天、およびその他のガラス表面上にコーティングされた物質を含むからである。そのような不透明マトリックス材料に取り付けられたタンパク質は、二次元アレイ内での疎水性および静電性相互反応によって安定化させられる。

40

【0074】

ゲノムおよびプロテオミクスマイクロアレイにおいて現在使用されている大多数のスキナは、不透明マトリックスアレイを用いて、結合プローブおよび標的分子と同側からスライドを読み取る。マイクロアレイを生成するために使用される不透明マトリックスコーティング物質には、ナイロン、PVDF（ポリフッ化ビニリデン）およびニトロセルロースが含まれる。50年以上にわたって使用されている伝統的なポリマー基質であるニトロ

50

セルロースは、マイクロアレイ適用のために極めて魅力的な特性を備える基質である（例えば、Tonkinson and Stillman, *Frontiers in Bioscience* 7:c1-12, 2002）。

【0075】

不透明ニトロセルロースは、生体分子分析のためにタンパク質および核酸を固定化するために広範囲に使用されてきた。ニトロセルロースはほぼ定量的方法で当該の分子を固定化し、短期および長期貯蔵を可能にする。ニトロセルロースは、さらにまた液相標的種が固定化された捕捉分子へ効率的に結合することを可能にする。ELISA法を用いる診断装置は、捕捉試薬を膜へ結合させるためにラテラルフロー・プロセスとともにニトロセルロース膜を使用してきた（Jones, *IVD Technology*, 5(2):32, 1999）。

10

【0076】

伝統的な不透明膜物質は、多数の魅力的な特徴を有する。それらは構築するのが安価であり、リンカーコーティングガラススライドによって結合できる100倍以上の量のタンパク質に結合し、一般に容易に機能する。これは、特に長い使用歴を有する不透明のニトロセルロース膜について当てはまる。

【0077】

ニトロセルロースは、通常は、不透明な表面を形成するためにガラススライドの表面に適用できるマイクロポラス形で生成される。次に、プローブは標準ニトロセルロース結合法を用いて、マイクロアレイ内の不透明ニトロセルロース膜に付着させることができる。そのようなスライドは、放射、蛍光および化学発光検出系とともに使用されてきた（例えば、Brush, *The Scientist* 14[9]:21, 2000）。

20

【0078】

伝統的なニトロセルロース膜はさらにまた支持構造もしくは基礎の不存在下では極めて脆性であり、頻回なクラッキングまたは断片化を引き起こす。この理由から、不透明ニトロセルロースは、プラスチックシートに結合したマイクロポラス形で使用されてきた。そのようなシートは、マイクロポラス形のために常に不透明であり、取り扱い中の損傷を回避するために支持構造（例えば、酢酸塩またはセルロース）を必要とする。

【0079】

<透過性ニトロセルローススライド>

30

本明細書に開示した方法および組成物は、スライドの底部（非結合）側に配列された検出器の使用を可能にしながら、不透明のニトロセルロース膜の有益な結合特性を保持するコロイド状ニトロセルロースの透過性表面コーティングを生成するために使用できる。プローブと標的分子との相互作用は、透過性ニトロセルロース固体マトリックス上で直接的に観察できる。

【0080】

一部の実施形態では、透過性ニトロセルロースマトリックスアレイを使用できる。そのような実施形態では、透過性ニトロセルロースマトリックスは、ガラスまたはプラスチックスライド（例えば、ナイロン）の片側に付着させることができる。プローブはニトロセルロースに付着させることができ、プローブと標的分子との相互作用はセンサまたはカメラを用いてスライドを通して観察できる。

40

【0081】

ニトロセルロース物質は、本明細書に開示した方法によって形成した場合は、完全に透過性（すなわち、透明性）である。そこで光シグナルは、不透明物質からの散乱または干渉を伴わずに観察することができる。これは、不透明のマイクロポラス形ニトロセルロースマトリックスアレイと比較して、より大きな信号対雑音比および標的分子の容易な検出を可能にする。そのような不透明のマトリックスアレイは、標的分子が結合すると生成される光線もしくは反応インジケータ種（例えば、生物発光化合物）の部分を覆い隠すことができる。

【0082】

50

酢酸アミル溶媒中のコロイドの形状にあるニトロセルロースは、標本のための鑄造物を形成するために電子顕微鏡技師によって使用されてきた。コロイド状ニトロセルロースは、水面上に極薄フィルムとして鑄造するステップによって形成される。次に、フィルムは透過型電子顕微鏡 (TEM) グリッド上に取り上げられ、TEM 標本のための支持体フィルムとして使用できる。フィルムは極めて清潔かつ一様でなければならないので、その製造においては大きな注意が払われなければならない。コロイド状ニトロセルロースは、酢酸アミル中に容易に溶解性である。酢酸アミルは、水溶性であり、均一に蒸発して均質なフィルムを形成する。これは、極めて純粋なニトロセルロースの 1 % 溶液として供給される。

【0083】

EM グレードの酢酸アミル (コロジオン) 中の高純度ニトロセルロースは、市販の入手起源から購入できる。酢酸アミルは、全水分を除去するために酸化カルシウムの上方で還流させるステップによって精製される。可溶性および懸濁化物質は、緩徐な蒸留によって除去される。溶媒からの微量の全水分の除去は、実質的に穴を備えていない極めて強力なコロイド状ニトロセルロースフィルムの形成を許容する。

【0084】

典型的な実施形態では、コロジオンは Ernest F. Fullam 社 (ニューヨーク州ラザム) からバルクで入手され、高品質透過性ニトロセルロースマトリックスアレイを製造するために使用された。1 % のコロジオン溶液の 200 μ L アリコート新しく洗浄した標準 25 $\times$ 75 mm のガラススライドの表面上にピペットで移した。コロジオンは粉塵を含まない領域内のガラススライド表面の辺縁まで均一に広げた。室温で 2 時間乾燥させた後、スライドを約 60 $^{\circ}$ C でさらに 1 時間以上加熱した。乾燥させたスライドに標識し、マイクロアレイを製造するために貯蔵した。

【0085】

ガラスアレイ表面を使用する場合は、各スライドの辺縁は、水溶液へ曝露させると極薄ニトロセルロース基質がガラスから離れるのを防止するためにラッカー (例えば、マニキュア液) または他の接着剤を用いてシールした。コロイド状ニトロセルロースがナイロンスライド、酢酸塩フィルムまたは他のプラスチック表面に適用される場合は、接着剤を必要とせず、しっかりと結合する。スライドは、酢酸アミルが表面と反応してそれを変色させたり、またはその特性を変化させたりしない限り、ほぼ任意の透過性物質から構成されてよい。所定のタイプのプラスチックは、酢酸アミルに曝露させられると不透明になるので、その溶媒系とともに使用するためには適合しない。また別の実施形態では、コロイド状ニトロセルロースは、ナイロン、ガラスまたは他の透過性スライドに適用する前に酢酸アミル以外の他の揮発性有機溶媒中に懸濁させることができる。

【0086】

透過性ニトロセルロース表面の長所は、プローブ結合反応の進行をスライドの透過性の下面を通して確認することによって試験できることである。これは、より効果的なプローブ結合が発生することを可能にする。プローブ-標的結合反応の進行は、さらにスライドの下面を通してリアルタイムで監視することもできる。

【0087】

< GRABBER (商標) スライド >

所定の実施形態は、透明性コーティングスライド、例えば上記に開示したように調製した GRABBER (商標) の装置および使用方法に関する。GRABBER (商標) は、スライドの表面上でアッセイされた溶液中の 1 つまたは複数の当該標的を検出および同定するための容易な使用方法を提供する。即時に試験する準備が整っている、付着した捕捉プローブ (例えば、抗体) が事前にスポットされたスライドを提供できる。または、それらの独自の 2D スポットしたアレイを調製したいと望む使用者は、1 時間で試験のための手動アレイを調製できる。

【0088】

所定の好ましい実施形態では、検出方法は、一次抗体を利用して、ビオチン化もしくは

10

20

30

40

50

さもなければ標識されている二次抗体との免疫複合体を形成するために抗原標的を捕捉する。一次抗体プローブは、透明性ニトロセルロースコーティングスライド（GRABBER（商標））へ付着させられ、全手順中はスライドの表面に付着されたままである。

【0089】

形成される場合は、免疫複合体は、周知の酵素活性化生物発光プロセスを用いて検出できる。例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）は、過酸化物の崩壊を触媒し、崩壊プロセス中にルミノールが溶液に加えられると強度の光線を生成する。ルミノールは、430nmで光子の放出を生じさせる不安定性フリーラジカル中間体を形成する。ストレプトアビジン（SA）へHRPをコンジュゲートさせることによって、免疫複合体は、適切かつ感受性光子検出器を用いて検出することができる。ビオチンおよびストレプトアビジンは、迅速に結合してこの光線生成複合体を形成する。

10

【0090】

典型的なタンパク質（例えば、抗体）プローブは、0.05～0.2mg/mLの濃度で1スポット当たり1～5nLの液体でスポットできる。一次抗体がスライド、マトリックスアレイまたは他の表面に付着させられる場合は、ビオニチル化抗体などの二次タグ付け抗体は、事前にスポットしたスライドによる標的検出のための最適化濃度で事前に混合された希釈バッファ中で提供することができる。最適化濃度は、使用者が経験によって決定できる。二次抗体は、希釈バッファ中で典型的には5～30μg/mLの範囲内の濃度へ希釈できる。

【0091】

TOAD（商標）（全光学アッセイ装置）には、使用者がスライドの表面のシグナルを読み取り、解釈し、そして記録することを可能にするソフトウェアを用意することができる。イメージファイルおよびレポートは、その後の分析および比較のために保存またはプリントすることができる。

20

【0092】

GRABBER（商標）は、結合した分子の機能性および3D構造を保持しながらコーティングされた表面にそれらを強力に付着させる、しっかりとかつ即時にタンパク質、炭水化物および/またはオリゴヌクレオチドに結合する透明性ニトロセルロース基質（例えば、2003年2月24日に提出された米国特許出願第10/373,546号を参照）でコーティングできる。プローブをスライド表面へ付着させるためには他の化学プロセスは必要としないので、2Dアレイ法を単純かつ高速にする。優れた接触角を備える疎水性表面は、緻密なロボット印刷アレイのために特に適合する。

30

【0093】

生物発光反応は長期持続性であり、シグナルは長期間にわたって獲得できるので、検出において特別な感受性を可能にする。単一サンプル中で多数の標的を同時に同定できる。適正な一次プローブ抗体およびビオチン化二次抗体は、適正に検出するために標的と強度に相互作用するはずである。事前に印刷されたスライドおよび提供された試薬は、高品質検出を生じさせるために最適化される。当業者は、透明性でコーティングされたスライドが標的結合を検出するための単に1つの好ましい代替物であること、そして以下で考察する磁気ビーズなどの他の代替物を光学検出系とともに使用できることを明確に理解する。

40

【0094】

<再構成可能なマイクロアレイ>

所定の実施形態では、固体マトリックスの表面に結合したアプタマーもしくはアフィボディなどの小さなリンカー分子を用いることによって再構成可能なマイクロアレイを製造できる。アプタマーは、SELEX（例えば、Brody and Gold, Molecular Biotechnology 74:5-13, 2000）と呼ばれるインビトロ進化的プロセスによって引き出されるオリゴヌクレオチドである。アプタマーは、知られている方法（例えば、米国特許第5,270,163号；第5,567,588号；第5,670,637号；第5,696,249号；第5,843,653号）によって製造できる、または市販入手源（例えば、Somalogic、コロラド州ボールダー

50

）から入手できる。アプタマーは、約 7 ~ 50 kDa の相当に小さな分子である。それらは小さく、安定性であり、タンパク質ほど容易に損傷しないので、それらは固体マトリックスの表面へ多数が結合できる。これはアレイの表面上のプロープ反応部位の数を効果的に増幅させる。

【0095】

Affibody（登録商標）リガンド（米国特許出願第 5,831,012 号）は、アプタマーと同様に設計および使用できる高度に特異的な親和性タンパク質である。アフィボディは、製造できる、または市販起源（Affibody AB、スウェーデン国ブローマ）から購入できる。アプタマーおよびアフィボディは、プロープ分子結合のための透明性もしくは非透明性固体マトリックスの機能的アビディティを増加させるために抗体と組み合わせて使用できる。増加した結合は、順にシグナル強度の増加、より大きな信号対雑音比、より再現性の標的分子検出およびより大きな検出感受性を生じさせる。

10

【0096】

再構成可能なマイクロアレイは、2つの抗体と捕捉プロープと組み合わせて使用できる。捕捉プロープは、アフィボディ、アプタマー、または複数の抗体のうちの1つに結合できる任意の他のプロープであってよい。両方の抗体は、標的細胞、分子、または抗原に選択的に結合するはずである。

【0097】

結合の有効性は、捕捉プロープが IgG クラスに特徴的な抗体の一部分に結合する場合は増加する。そのようなプロープは、抗体-標的複合体と反応して結合するために抗体構造の小さな部分が存在することしか必要としない。微生物もしくは細胞などのより大きな標的は、抗体と極めて大きな複合体を形成できる多数の抗原で被覆される。しかし、短縮 IgG 抗体フラグメントはそのような大きな標的と相互作用し、それでもスライド表面上でアプタマーもしくはアフィボディプロープに結合できる。

20

【0098】

所定の実施形態では、2つの抗体が溶液中の標的に結合させられる。標的-抗体複合体が形成されると、その複合体は、再構成可能なマトリックスアレイ上でアプタマーまたはアフィボディプロープ分子に曝露させることができる。プロープは一次抗体に結合することができるが、二次抗体は生物発光タグまたは他のマーカーにコンジュゲートすることができる。次にタグ付き複合体は、光学検出または任意の他の知られている検出方法を用いて、マトリックスの表面上で検出できる。

30

【0099】

例えば、アプタマーはマウス IgG の Fc 部分へ高親和性で特異的に結合するように特別仕立てすることができる。当該の標的分子を含有するサンプルは、当該の抗原に対して特異的なマウス抗体と溶液中で相互作用させることができる。このサンプルは、同一抗原上の相違するエピトープへ結合する、相違するビオチン化、さもなければタグ付け二次（非マウス）抗体と混合される。一次および二次抗体へ結合した標的抗原は、アプタマーマイクロアレイに曝露させられる。抗マウスアプタマーは、複合体を固体マトリックスへ付着させる。未結合タグ付き抗体を除去するための広範囲の洗浄後、マトリックスアレイ表面に取り付けられているタグ付き抗体を含有する複合体が検出される。

40

【0100】

当業者は、このスキームの多数の変形を使用できることを明確に理解する。例えば、また別の実施形態では、一次抗体を多数のタグ付き二次抗体と結び付けて使用できるが、それらは各々標的分子の相違するエピトープに結合する。これは、例えば、利用できる二次抗体がポリクローナル抗体である場合に発生することがある。または、同一抗原に対する親和性を備える2つ以上の二次抗体は、検出の感受性を改良できる。さらにまた別の実施形態では、1つの二次抗体は1クラスの標的（例えば、全大腸菌（E.coli））に結合することができ、他方では二次抗体は特異的サブクラス（例えば、大腸菌株 O157:H7）に結合する。

【0101】

50

非限定的な実施例では、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) を検出するために、IgGマウス抗リステリアm. 抗体を適切な濃度 (典型的には $1 \sim 50 \mu\text{g/mL}$) で当該の食品サンプルと一緒にインキュベートしてよい。ウサギ (または他の非マウス) ビオチン化二次抗リステリアm. 抗体 ($1 \sim 50 \mu\text{g/mL}$) を加え、 $5 \sim 30$ 分間インキュベートしてよい。次に両方の抗体を備えるサンプルは、抗マウスIgGアプタマーを含有するアレイに適用してよい。短時間の間隔 (約 15 分間) 後、アレイを洗浄すると、リステリアm. と複合化したマウスIgGおよびウサギビオチン化抗体だけがアレイ上に維持される。次に表面上に適用されたHRPコンジュゲート化ストレプトアビジンもしくは他のインジケータの溶液は、表面上に付着した抗リステリアm. 抗体複合体の存在または不存在を解明することができる。

10

【0102】

< 磁気ビーズ >

所定の実施形態では、当該のプロープ、抗原または他のリガンドは、標的結合を分離および/または検出するために磁気ビーズに付着させることができる。磁気ビーズとともに使用するためのプロトコルの追加の詳細は、以下の実施例のセクションにおいて開示する。好ましい実施形態では、ビーズに付着したプロープ、抗原または他のリガンドは、例えば抗体、抗体フラグメント、抗体結合タンパク質 (例えば、プロテインA) または標的抗原などのタンパク質またはペプチドであってよい。分子を磁気ビーズもしくはマグネタイト基質へ結合させるためのプロセスは、当分野において、すなわち米国特許出願第4,695,393号、第3,970,518号、第4,230,685号、および第4,677,055号において周知である。結合は、共有または非共有のいずれであってもよい。EDC、ジニトロベンゼン、ビスイミデート、スベリン酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ジメチル-3,3'-ジチオ-ビスプロピオンイミデート、4-(プロモアミノエチル)-2-ニトロフェニルアジド、酒石酸ジスクシンイミジルおよびアジドグリオキサルを含む多数の潜在的化学架橋剤は、当分野において周知である。

20

【0103】

使用される磁気粒子は様々なサイズがあることは想定されている。大きな磁気粒子 (溶液中の平均径が $10 \mu\text{m}$ 超) は弱い磁場および傾斜磁場に反応できるが、それらはすぐに沈殿する傾向を示すので、均質な状態を必要とする反応のためには有用性を限定する。大きな粒子はさらに、重量当たり表面積が小さな粒子よりも限定されるので、それらに結合できる物質が少なくなる。好ましい実施形態では、磁気ビーズは径が $10 \mu\text{m}$ 未満である。

30

【0104】

強磁性物質は、一般に磁場に反応して永久的に磁化される。「超常磁性」と呼ばれる物質は、傾斜磁場において力を受けるが、永久的には磁化されない。酸化鉄磁性体の結晶は、結晶のサイズに依存して、強磁性または超常磁性のどちらかの可能性がある。鉄の酸化鉄超常磁性体は、一般に、結晶の直径が約 300 オングストローム () 未満である場合に生じる; 大きな結晶は、一般に強磁性の特性を有する。

【0105】

分散性の酸化鉄磁性体粒子は、報告によれば 300 の径を有し、表面アミン基は、米国特許出願第4,267,234号にしたがってポリエチレンイミンの存在下で塩化第一鉄および塩化第二鉄 ($\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+} = 1$) の塩基沈降によって調製される。これらの粒子は調製中に磁場へ3回曝露させられ、再分散性であると記載されている。磁気粒子は、 $0.1 \mu\text{m}$ と報告された径を備える磁気ポリグルタルアルデヒドミクロスフェアを形成するためにグルタルアルデヒド懸濁重合系と混合される。ポリグルタルアルデヒドミクロスフェアは、タンパク質などのアミノ含有分子への結合を形成できる表面上のコンジュゲート化アルデヒド基を有する。

40

【0106】

本明細書に開示した方法には様々な粒径を適用できることは想定されているが、好ましい実施形態では、粒子の径は約 $0.1 \sim 1.5 \mu\text{m}$ である。この範囲内にある平均径を

50

備える粒子は、生物親和性吸着結合のための高い能力を提供する、約 $100 \sim 150 \text{ m}^2 / \text{gm}$ という大きさの表面積を備えて製造できる。このサイズ範囲の磁気粒子は、大きな粒子の高速沈殿問題を克服するが、小さな粒子を分離するために必要とされる磁場および傾斜磁場を生成するための大きな磁石の必要を回避する。磁気粒子を分離するために使用される磁石は、約 $100 \sim 1,000$ エルステッドの磁場を生成できればよい。そのような磁場は、好ましくは磁気粒子の分散を保持する容器より小さい永久磁石を用いて入手できるので、ベンチトップ使用のために適合する可能性がある。強磁性粒子は本発明の所定の適用において有用な可能性があるが、超常磁性粒子は強磁性粒子に関連する磁気凝集を示さず、再分散および再使用を許容するので、超常磁性挙動を備える粒子が通常は好ましい。好ましい実施形態では、1対の球状磁石を 1.5 mL のエッペンドルフチューブなどの容器に並列させることができ、チューブの側面上に磁気ビーズを収集するために使用できる。球状磁石の使用は、溶液からの磁気ビーズの分離を促進する、より強度の限局性磁場を提供する。

【0107】

磁気粒子を調製する方法は、微細な磁気金属酸化物結晶を形成するために塩基中に金属塩を沈降させるステップと、再分散させるステップと、水中および電解液中で結晶を洗浄するステップとを含むことができる。磁気分離は、結晶が超常磁性である場合は洗浄間で結晶を収集するために使用できる。次に結晶は、金属酸化物に吸着的もしくは共有的に結合できる、およびタンパク質もしくは他のリガンドと結合するための官能基を有する物質でコーティングすることができる。例えば Dynal Biotech 社（米国ウィスコンシン州ブラウンディア）のような磁気ビーズの市販入手源も当分野において知られ、使用できる。

【0108】

< イメージングカセットのハニカムアルミニウムコア >

典型的な実施形態では、イメージングハニカム・センターセルカセットは、上記で考察した TOAD（商標）などの光学イメージャ上でイメージングして視感度を測定するための ディスプレイ装置器具 である。これは、CCDカメラへのカセットの適正な方向付けを提供するためにステージ上の2本のロッキングピンによって適所に配置かつ保持される。カセットの下面（底部）は、ハニカムアルミニウムコアへ取り付けられた光学的に透明な窓である。カセットの不透明上面（トップ）は、ハニカム内に個別セルを充填するためのテンプレートを形成するためにマーキングされる。ハニカムの上面に取り付けられたその内面は高度に反射性であり、さもなければ検出を免れた光子をセンサへ送り返す。センターセル55型カセットは、ワンパスで計55までのサンプルを処理できる。しかし、本明細書で請求した主題の範囲内で相違する立体配置およびセル数を利用できることは明白である。

【0109】

カセットを構築するステップは、スキンを適正なサイズに切断するステップとおよそ 2.75×2.75 インチ平方のサイズの正方形にアルミニウムハニカムをパターンカットするステップを含む。底部透明層は、それがアルミニウムハニカムに付着させられる前に穿孔されたロッキングホールを用いてダイカットされる（図19を参照）。セルを充填するためにオペレータにガイダンスを提供する上方スキンテンプレートは、最終ステップにおいて付着させられる。

【0110】

下方スキンをハニカムへ付着させるステップは、接着剤（例えば、活性化ガラスファイバー樹脂）を最初にハニカムの下面に提供するステップと、および次に光学窓を汚すことを回避するための注意を払いながら、結合するために下方スキン上にハニカムを配置させるステップとによって実施すべきである。酢酸塩へのアルミニウムの確実な結合は、浅い樹脂製トレイ内に浸漬したハニカムの下縁を軽度コーティングするステップと、酢酸塩上に重みづけを伴わずに平穩に静止させるステップによって、ガラスファイバー樹脂および触媒を用いて容易に実行した。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

アルミニウムハニカムは、水平カットはセルだけを二等分し、垂直カットは直線でセルおよびノードを二等分することを認識して、以下に示すように必要とされるパターンに注意を払って生成物を照明するための視覚的グレードのセル 5 . 2 密度の非穿孔コアであり 0 . 2 5 0 ' ' × 4 8 ' ' × 9 6 ' ' 1 / 4 インチのストックから切り取ることができる。カット公差要件は、各カットの全長に対して開始して 1 / 4 セル行または垂直列内にとどまることである。

【 0 1 1 2 】

< 上方および下方スキン >

好ましい実施形態では、下方スキンは、標準 A v e r y ラベル 5 1 9 6 と正確に同一サイズの 2 . 6 4 × 2 . 6 4 インチの正方形の型抜きポリエステル製透明 7 ミルシート材である。上方スキンは、同様に標準 A v e r y ラベル 5 1 9 6 のサイズに型抜きされたサイズが同様に 2 . 6 4 × 2 . 6 4 インチの正方形であるアルミニウムハニカムへ付着させられたホイル張り裏面を備えるタグストックである。上面は、テンプレートパターンが印刷されている、または A v e r y 5 1 9 6 印刷ラベルが付着させられている。テンプレートホールは、ピペットチップを上方スキンに通して容易に通過させて内容物をセルへ分注できるように、ホイルへ K I S S 穿孔される。

10

【 0 1 1 3 】

< 接着性結合剤 >

使用できる可能性のある数種の接着剤がある。ポリエステルまたはエポキシ樹脂はどちらも良好に機能するはずである。結合要件は最小であるので、エポキシ樹脂により与えられるより高度の強度は不要と思われる。ポリエステル樹脂は、良好に使用されてきた。この樹脂は、硬化するにつれてポリエステルシート上に流れ込む樹脂が少なくなるように、硬化時間中の樹脂の濃度を高くするために粉末充填剤と混合すべきである。アルミニウム粉末は、さらに接着剤を完全に不透明にさせ、1つのセルから次のセルへの光線交差汚染（ドア下漏出）を最小限に抑えるので、推奨されている。

20

【 0 1 1 4 】

< 材料のリスト >

1 カセット当たりの材料および寸法の典型的なリストは、ハニカムについてのおおよその寸法とともに表 1 に示されている。ハニカムパターンカットは、最終組立体がセル窓をカメラの上方で中心に配置するために、正確な寸法よりも重要である。当業者は、また別の寸法を使用できることを明確に理解する。

30

【 0 1 1 5 】

【 表 1 】

表 1 : 材料リスト

原材料	カセットの寸法
アルミニウム 1/4"セル 0.25"×48"×96"	2.75"×2.75"
ポリエステル 100826 厚さ 7 ミル	2.64"×2.64" (Avery 5196)
高度に反射性のタグボード 厚さ約 7 ミル	2.64"×2.64" (Avery 5196)
ロッキングピンホールのサイズ	ラージ 3/16"、スモール 1/16"
ロッキングピンの位置	中下方スキン 2.375" (中心間距離)
ステージのアパーチャの測定値	2.375"

40

【 0 1 1 6 】

スキンのレイアウトおよびカット、アルミニウムハニカム、ならびにロッキングホール

50

を用いたハニカムのポジショニングに関する追加の詳細は、以下で考察する典型的図面に提供されている。典型的な実施形態では、ロッキングホールは、図 22 に示したアライメントを用いて透明スキンがハニカムに付着させられる前に事前に穿孔されていることに留意されたい。キーセルは、光学アパーチャの上方で中心となるようにアライメントされる。好ましい実施形態では、全ハニカムセル構造は、キー（中央）セルを光学アパーチャの上方の中心において、同時に光学的に検出できる。

【0117】

< セルの番号付けおよび立体配置 : >

カセットに付着させた不透明の上方テンプレートは、オペレータハウエル内にサンプルを装填するための視覚ガイドを提供する。カセット内の各セルはアドレスを有する。アドレスは、行および行内の番号（図 20 を参照）によるが、また別の番号付けスキームも使用できる。

10

【0118】

例示した典型的な実施形態では、9つの行が A、B、C、D、E、F、G、H および I と指定され、行内の各セルの位置の番号は、図 20 に示されている。例えば、中心に置かれたセルのアドレスは E 4 である。オペレータヘセルにサンプルを装填することを指示する装填テンプレートは、カセットの上面に印刷することができ、イメージングの前に取り除かれる（図 23 を参照）。

【0119】

< 装填テンプレートの寸法 : >

20

典型的な実施形態では、装填のための上方テンプレートは標準 A v e r y ラベル 5 1 9 6 と同一サイズであり、2 . 6 4 インチ平方で、8 . 5 × 1 1 インチのプレカットタグストックのシート内に9つのテンプレートが印刷されている。テンプレート上には55のセルアクセスポートが存在する。アクセスポートは、行およびサンプルのための番号によって番号付けされ、同定される。

【0120】

ポート位置は、表 2 に 5 5 セルの実施形態について示されている。測定は、テンプレートの左縁（上左隅にあるインジケータ）からポートの中心へ水平に、そしてテンプレート縁（0 インチ）から始めて上部から底部へ垂直に行なわれる。センターセルの水平位置（E h 4）に対する座標は 1 . 3 2 インチであり、垂直位置（E v 4）は 1 . 3 2 インチである。

30

【0121】

【表 2】

表 2 : 55 型セルテンプレートについての水平および垂直座標

55 型カセット

各セルについての座標

行 A、B、C、D、E、F、G、H、I

位置

指示された番号(ハニカム ID マップを参照)

水平寸法

2.64

インチ

測定を左から右へ始める(「h」で指示)

垂直寸法

2.64

インチ

測定を上から下へ始める(「v」で指示)

センターセルの座標

1.32

インチ

水平および垂直

10

位置									左 か ら 右
行	1	2	3	4	5	6	7	8	
Ah	1.03								
Av	7	1.32	1.603						0.566
Bh	0.39	0.39	0.39						
Bv	0.61								
Ch	2	0.895	1.178	1.461	1.744	2.027			1.415
Cv	0.62								
Dh	3	0.623	0.623	0.623	0.623	0.623			
Dv	0.47								
Eh	1	0.754	1.037	1.32	1.603	1.886	2.169		1.698
Ev	0.85								
Fh	5	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855		
Fv	0.32								
Gh	9	0.612	0.895	1.178	1.461	1.744	2.027	2.31	1.981
Gv	1.08								
Hh	8	1.088	1.088	1.088	1.088	1.088	1.088		
Hv	0.47								
Ih	1	0.754	1.037	1.32	1.603	1.886	2.169		1.698
Iv	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32		
Jh	0.32								
Jv	9	0.612	0.895	1.178	1.461	1.744	2.027	2.31	1.981
Kh	1.53								
Kv	3	1.533	1.533	1.533	1.553	1.533	1.533	1.533	
Lh	0.47								
Lv	1	0.754	1.037	1.32	1.603	1.886	2.169		1.698
Mh	1.76								
Mv	5	1.765	1.765	1.765	1.785	1.765	1.765		
Nh	0.61								
Nv	2	0.895	1.178	1.461	1.744	2.027			1.415
Oh	2.01								
Ov	8	2.018	2.018	2.018	2.018	2.018			
Ph	1.03								
Pv	7	1.32	1.603						0.566
Qh	2.25	2.25	2.25						
Qv									
T to B			1.86	1.395		0.91	1.533		

アルミニウムコア上のパターンカット:

20

30

40

【 0 1 2 2 】

< アルミニウムコア上のカットパターン >

アルミニウムコア材料の大きなシートについての典型的なカッティングパターンは、図

50

21に示したとおりである。シートからカットされた約2.75×2.75インチの寸法の各正方形は、図23に示したセル構造を完全に有していなければならない。これらのセルを越える辺縁は、トリミングしたり研磨したりする必要はない。それらはきれいにカットしなければならない、微粒子物質や研磨剤が付着してはならない(きれいに洗浄する)。

【0123】

目的を達成するためのカットパターンの詳細な拡大図は図22に、シート全体については図21に示されている。コアアルミニウムからカットされた正方形は、輸送中損傷することがないように注意深く包装された箱の中にプラスチックバッグに入れて清潔に、チリや粒子状物質が付着していない状態で供給されなければならない。

10

【0124】

<イメージセンシングおよびデータ分析>

様々な実施形態では、例えば、実施例1に例示したように、化学発光標的-リガンド複合体によって放出された光シグナルの分析によって陽性アッセイ結果を検出することができる。光シグナルを検出および分析するための様々な方法および装置は、当分野において知られ、本明細書で請求する方法で利用できる。例えば、相補的金属酸化物半導体(CMOS)イメージセンサはデジタルカメラ内で使用され、様々な分析機器においてますます多く見出されるようになってきている。CMOSイメージセンサは品質が改良され、低レベルスペクトル画像を検出するために電荷結合素子(CCD)に挑戦して取って代わりつつある。

20

【0125】

現在の大多数の光検出器は、標的に向けて二次元アレイの感受性光ダイオードを提示することによってスペクトルシグナルを捕捉するように設計されている。光ダイオードは、光線に曝露させられると電流を発生するように設計され、結果として生じる電流は様々な方法で分析できる。現代のセンサは、アナログの光ダイオードシグナルをデジタルのシグナルフォーマットへ変換するので、これは後の分析のために保存かつ処理することができる。適切な抗原、光学系、イメージセンサ、およびコンピュータを用いると、高分解能デジタル画像を1ピクセル毎に生成できる。そのようなシステムを用いると、モノクロまたはカラーフォーマットのどちらでも写真画像を入手できる。

30

【0126】

しかし、光ダイオードは、標的が特定波長での単色光線によって照明された場合などの特別な状況においてのみ、光ダイオードアレイに衝突するエネルギーと相関するアナログ出力シグナルを生成する。例えば光ダイオードの出力シグナルが光ダイオードに適用された照明に対して本質的に直線状であっても、ピクセルに対するシグナル値は一般に光子束と正確には相関しない。これは、光子束を光ダイオード電気エネルギーへ変換させるための量子効率(QE)が所定の因子に伴って変動するためである。さらに、ほとんどの場合、単一波長以外の光線が光ダイオードに衝突する。

【0127】

どの光ダイオードも、波長および温度などの因子に伴って変動する所定のQE値を有する。光子束は、二次元アレイの表面に衝突する電磁エネルギーを表し、QEは、そのエネルギーを電気エネルギーに変換する光ダイオードの能力を表している。QEは、通常は100%未満の何らかのパーセンテージに等しい、エネルギー束のパーセンテージとして表示される。QEは光ダイオードを照明する光線の波長に伴って大きく変動するので、1つの波長でのシグナルとまた別の波長でのシグナルとの比較は、適用される全波長についてのQE係数が知られていない限り、解釈するのは困難である。さらに、大多数のイメージセンサは、製造業者によってフィルム上またはヒトの目によって見える画像とほぼ同等である画像を生成するように設計されている。製造業者は、「真に迫った」画像および色を再生することに関心を抱いている。製造業者は、各ピクセルについて生のデジタル情報へのアクセスを提供できるが、イメージセンサは一般に、ヒトの視覚的予想を表すより「真に迫った」色および強度にするために、分析に入手できる前にその情報を処理する。これ

40

50

らの理由から、イメージセンサによって生成されるデータは、センサの光ダイオードアレイに衝突する光子束には直接的には関連していない。この要素は、分析目的でのイメージセンサの有用性を制限する。

【0128】

< イメージセンサの操作 >

光ダイオード検出器を使用する研究者は、検出器から獲得したデジタルデータが検出器に衝突する光子束と相関すると不正確に想定することがあるが、それはシグナル出力の強度の増加が一般に特定波長または帯域幅におけるシグナル入力が増加と直接的に相関するためである。光ダイオードは出力において極めて直線性であるので、光ダイオード表面上方での相違する波長での光子束の増加は光ダイオードのダイナミックレンジ全体で、直線状出力シグナルを生成する。しかし、出力データは、光ダイオードに衝突する波長範囲全体にわたってQEが変動性の場合には、光子束と相関しない。ある期間にわたり光ダイオードに衝突する特定数の光子については、光ダイオードについてのQEが第2波長より第1波長についての方が高い場合には、より大きな電流が第2波長より第1波長で光ダイオードによって生成される。

10

【0129】

フィルタリングまたはレーザー光源を使用することによって分析用の光源を狭い帯域に制限しても、正確度の問題は解決しない。イメージセンサを用いて評価される発光スペクトルは、たとえ励起光源が狭い波長範囲を有する場合でさえ極めて広い可能性がある。このために、光ダイオードのためのQE曲線の形状は、イメージセンサからの出力データを評価する際に注意深く考察すべきである。

20

【0130】

イメージセンサの選択に関しては、CMOSイメージセンサは電荷結合素子とは基本的に相違し、顕微鏡および診断機器においてますます多く使用されるようになっているが、それは安価で構築することができ、作動させるために必要な電力が相当に少なく済むからである。CCDカメラは、以前は実際にそうであった低強度光線状況においてもはや明らかに優れていない。CMOS画像は、現在はフィルム上の伝統的なカラーイメージング法に匹敵し、容易に操作される。

【0131】

画像は、整列させたデータピクセルアドレスを保存する様々なフォーマットで1つのプロセッサから別のプロセッサへデジタルファイルとして転送することができる。製造業者は、色をヒトの目の経験に極めて近付けることでデジタル画像を強化するために様々なカラーフィルタおよび内挿法を用いて多数のエネルギー再生性「真に迫った」カラーイメージセンサに専念してきた。しかし、カラーCMOSイメージセンサを用いて入手された魅力的な「真に迫った」カラー画像は、分析方法のためには有用ではない。画像が滅多に真実ではない単一波長の光線によって生成されない限り、モノクロ画像についても類似の問題が存在する。

30

【0132】

図1は、利用できるカラーCMOSイメージセンサの実施例の略図である。CMOSイメージャの全部の構成要素および機能が例示されているわけではない。図1および本セクションの残りの図面は例示することを目的とし、必ずしも縮尺で描かれてはいない図1では、イメージセンサ100は、イメージングアレイ110を含む。イメージングアレイは、二次元アレイで配列された極めて多数のピクセルから構成される。アレイ110の特定領域の拡大したピクセルアレイ120に示したように、イメージングアレイ110内のピクセル各々と関連付けられたフィルタが存在する。イメージセンサ100は、一般にイメージングアレイ110によって生成されるシグナルの処理および伝送に関連する、アナログシグナルプロセッサ140、アナログ-デジタル変換器150、およびデジタルロジック160を含む電子機器をさらに含有する。

40

【0133】

CMOSカラーイメージセンサ内の光ダイオードアレイは、従来型Bayer RGB

50

(レッド・グリーン・ブルー)二次元アレイにおけるような規則正しく並んだポリマーフィルタの薄層によって覆われている。各フィルタは、入射照明光線の広い帯域幅からカラー情報を捕捉するために連続(Bayer)パターンで個別光ダイオードの上方に適合するようなサイズにされている。RGBアレイでは、550nmにヒトの視覚的最高反応を指定するためにグリーンフィルタに大きな強調が置かれている。レッドフィルタ1つ毎およびブルーフィルタ1つ毎に2つのグリーンフィルタが存在する。しかし、ヒトの目がグリーン550nm領域により適合させられる場合でさえ、QE因子に関しては一般的にはイエローが優れた選択である。

【0134】

CMOSイメージセンサおよびアクティブピクセルアレイを規定する集積回路は、元来は、光線の色にではなく光ダイオードに衝突する電子の総数にのみ反応するモノクロ(黒および白)機器である。カラーは、光線を連続シリーズのフィルタ(レッド、グリーン、およびブルーフィルタなど)に通過させること、またはピクセルアレイの上方に配置される小型透明ポリマー製薄層フィルタを用いてのいずれかで検出される。

【0135】

アクティブピクセルセンサ(APS)テクノロジーは、CMOSイメージ検出器のための最もポピュラーなデザインである。光ダイオードに加えて、各ピクセル(もしくはイメージング素子)は、その表面上に蓄積した電荷を測定可能な電圧に変換し、光ダイオードをリセットし、電圧を垂直コラムバスへ移送する三つ組のトランジスタを含む。そこで光ダイオードは、ピクセル領域の1分画しか占めていない。光ダイオードの領域は、大多数のCMOSセンサについて全ピクセル領域の30~80%に等しい領域を包含する。光ダイオードに占められたこの領域は、光子を吸収する領域であるが、ピクセルの他の部分は相当に不透明であり、光線を遮断する、反射する、または吸収する。光ダイオード領域もしくは窓は、ピクセルもしくはイメージセンサの「アパーチャ」もしくは「フィルファクタ」と呼ばれている。小さなアパーチャもしくはフィルファクタは、重大な感受性の消失および対応する信号対雑音比の減少を生じさせ、センサのダイナミックレンジの減少を引き起こす。

【0136】

CMOSイメージセンサは、アクティブピクセルセンサアレイ内の各ピクセルと関連している光ダイオード表面に光子が衝突したときに生成するシグナルに基づいて画像を生成するために利用できる。ピクセルシグナルは、モノクロ(黒および白)またはカラーのどちらかで全画像を形成するために処理される。モノクロCMOSイメージセンサは、ピクセルの光ダイオード部分の上方ではカラーフィルタを有していない。しかし、カラーCMOSイメージャは、標準Bayerパターンフィルタを用いた場合でさえ、一般にモノクロCMOSイメージャよりはるかに感受性が高い。フィルタを備えていないモノクロCMOS光ダイオードは、フィルタを通過する一部の光線は吸収されて決してカラーフィルタ付き光ダイオード内の光ダイオードへ到達しないので元来より感受性であると思われる可能性があるが、これは一般に真実ではない。この仮定は所定のシグナルを増強する可能性があるフィルタが光ダイオードのためにQE上で及ぼす作用を十分には考慮に入れておらず、以下で説明するカラー光ダイオード構造内のマイクロレンズによって提供される長所を無視している。モノクロCMOSイメージセンサはカラーフィルタを有しておらず、通常は各ピクセルの上方にマイクロレンズも有していない。これらは、イメージャの感受性に関してモノクロイメージャがカラーCMOSイメージセンサよりも魅力的でなくなる重要な要素である。

【0137】

図2は、利用できるカラーイメージセンサのイメージングアレイの小さな区域を例示している。例示した区域は、イメージングアレイ全体で繰り返される。区域200は、各々が1つのフィルタを有する4つのピクセルから構成される。フィルタ220~250は、アレイのために行なわれた選択に基づくカラーを有する。フィルタの下方では、210は個別ピクセルの構造を例示している。ピクセル260などの各ピクセルについて、光ダイ

10

20

30

40

50

オード 270 を含む一部分が存在し、光ダイオードのその領域は全領域の 1 分画に過ぎない。イメージセンサは、光ダイオード領域上に落ちる光線の部分しか検出しない。

【0138】

分析において使用されるカラーイメージャでは、1つの可能性のあるアプローチは、ほぼ一定である所与の帯域幅についてのQE係数を生成するためにフィルタおよび光ダイオードを注意深く選択することによってイメージャを構築することである。アレイ内の適切な数の光ダイオードと選択したフィルタとを結び付けることによって、光線エネルギーの測定はより正確になる。選択されたフィルタは、QE係数のレベリングおよび改良に役立つ。しかし、実際には、フィルタおよび光ダイオードは、視覚的に最も魅力的な画像を生成することを目標に、他の目的のために選択される。量子効率およびスペクトル反応を改良するために、数社のCMOS製造業者は、標準加法混色の原色であるレッド、グリーン、およびブルー(RGB)の代わりに、減法的原色であるシアン、マゼンタ、およびイエロー(CMY)に基づくカラーフィルタアレイを使用している。CMOS画像製造業者は、一般に、Bayer RGBもしくは写真画像のために選択されているBayer CMYパターンのどちらかを使用する。

【0139】

図3は、RGBおよびCMYフィルタの例示である。これらのフィルタのために、イメージングアレイはフィルタの小さなアレイに分割されるが、そのようなフィルタのアレイは各々が同一フィルタパターンを有する。RGBフィルタアレイ300は、2×2アレイのフィルタを含有し、各アレイは2つの対角ピクセルに対して1つのレッドフィルタおよび1つのブルーフィルタならびに残りの2つの対角ピクセルに対して2つのグリーンフィルタを含有する。CMYフィルタアレイ310は、2×2アレイのフィルタを含有し、各アレイは2つの対角ピクセルに対して1つのシアンフィルタおよび1つのマゼンタフィルタならびに残りの2つの対角ピクセルに対して2つのイエローフィルタを含有する。例示したフィルタは最も一般的なフィルタ配列であるが、多数の他のフィルタのカラーおよびパターンが可能であり、任意のフィルタパターンを使用できる。所定の波長範囲において利益を提供する所定の他の代替フィルタパターンは、表8に示されている。

【0140】

モノクロイメージセンサとは対照的に、カラーCMOSイメージセンサは光ダイオードアパーチャへ光子を効果的に差し向けるマイクロレンズをさらに含有する。一般に抗反射性コーティングを含むバブルレンズは、所定の適用ではおよそ60%という有意な量で光ダイオードの表面積を効果的に増加させることができる。マイクロレンズは、実質的に有効フィルファクタを増加させ、光ダイオードに到達できる全光線を削減するフィルタを補償する以上のことができる。

【0141】

図4は、イメージセンサ内のマイクロレンズの略図である。イメージセンサ内には、複数のピクセル405が存在する。各ピクセルはアクティブ部分410を有し、アクティブ部分はピクセル領域のほんの一部分しか含んでいない。通常はアクティブ部分410に衝突しない光エネルギーを部分的に補償するために、ピクセル405の各々は結び付いたマイクロレンズ420を有する。各マイクロレンズ420の機能は、より多くの光エネルギーをアクティブ部分410に集束させ、そこで入射光子束のより大きなパーセンテージの測定を可能にすることである。例えば、光線430はマイクロレンズ420に衝突し、ピクセル410のアクティブ部分405上に集束する。

【0142】

<イメージセンサの最適化>

イメージセンサの光感受性領域による光子収集を減少または妨害する3つの主要メカニズムは、吸収、反射、および透過である。これらの要素は、本質的に波長依存性であり、一部にはイメージセンサの量子効率(QE)を規定する。例えば、入射光線の反射および透過は、波長の関数として発生し、高いパーセンテージの400nm未満の短波長は反射される。短波長は光感受性領域の最初の数ミクロン内に吸収されるが、650nmを越え

10

20

30

40

50

る最長波長は光感受性領域を通過することが多い。

【0143】

図5は、イメージセンサに対する典型的な量子効率およびスペクトル反応を例示している。図5については、Bayer CMYフィルタが評価されている。スペクトル反応500は、イメージセンサ上の様々な波長の入射光線についてのイメージセンサの量子効率を例示している。マゼンタフィルタ510を備える1つのピクセル、シアンフィルタ520を備える1つのピクセル、およびイエローフィルタ530を備える1つのピクセルについて個別反応曲線が存在する。各曲線は、相違する入射光線の波長で山および谷を有する。

【0144】

イメージセンサにおいて使用される各フィルタタイプについてQE波長依存性曲線を調査することによって、モノクロイメージセンサについてのピクセルを含む任意の波長または当該の間隔について光子束に比例する出力シグナルを決定できる。多くの場合に、アレイ内の各ピクセルは、フィルタの種類(CMY、RGB、他のパターン、またはフィルタなし)を除いてその隣のピクセルと本質的に同一である。フィルタの作用は、所与の光子束についての光ダイオードエネルギー出力を増加させる、または減少させるかのいずれかである。シグナルへの作用は、波長依存性である。QEは、出力シグナル内で変動性であり、ありとあらゆるピクセルについてイメージングアレイ全体で公平な比較を行わなければならない場合は、方程式から解釈すべきである。

【0145】

CMOSイメージャでは、ピクセルシグナルは、設定時間間隔に対してアナログ-デジタル変換器が数値を変換した後に生データとして各ピクセルに対して入手される。QEが分画として表示される場合は、ピクセルシグナルはQEと光子束の積に正比例している。

ピクセルシグナル = 定数 × QE × 光子束

【0146】

生データを適切なQEにしたがって標準化できる場合は、より正確なその後の分析に使用できるデジタル値を作製できる。カラーCMOSイメージセンサについてのピクセル値は、オンチップ変換が始まる前に入手でき、その数値は特定カラーフィルタに対する各シグナル値に逆QEを掛けることによって標準化できる。比較的狭い帯域幅については、QEは使用される波長およびフィルタタイプに依存して定数として扱うことができる。1つの実施例では、Kodak 1310カラーCMOSイメージセンサのために550~650nmの範囲内に渡るBayer CMYパターンは、およそ46%のQEを提供し、その後650nmから990nmでの5%へ、5nm毎におよそ0.6%ずつ低下する。さらに、マゼンタおよびイエローフィルタは、630nm~990nmの範囲にわたって極めて類似である。

【0147】

670nmでCMYパターンのKodak 1310カラーイメージセンサを用いる特定の実施例について、QE値は表9に示したとおりである。イエローフィルタを備えるピクセルはデジタル生データ×2.38、マゼンタフィルタを備えるピクセルは×2.27、およびシアンフィルタを備えるピクセルは×7.69を有する。本実施形態では、各ピクセルについてのシグナルは、実際の光子束に正比例する数値へ有効に変換される。表9は、特定波長(670nm)の光線がイメージセンサに衝突した場合のイメージセンサについてのQEしか含有していないことに留意されたい。任意の他の光線波長についてのQEは、図5に示したように変動する。

【0148】

< QE係数の相関 >

QEにおける相違を補償する補正は、特定のフィルタタイプおよび波長に対して知られているQE係数に基づいて行うことができる。(例えば、表8および表9に含まれているデータを参照されたい)。しかし、イメージセンサは、ピクセルQEにおける相違を自動的に補正するためにも利用できる。各フィルタの四分円などのセンサアレイの各領域は、

四分円内の各ピクセルをリアルタイムで光子束に対して最適に調整できるように標準化できる。ピクセルおよびフィルタが、例えば、表 8 に示したように Y Y Y Y、M M M M、および C C C C フィルタパターンのように全部同一タイプである場合は、補正は行なわれない。アレイ内に 2 つ以上のフィルタタイプが存在する（例えば、Y Y Y C、R G B B a y e r、または修正 C M Y B a y e r などのフィルタパターン）場合は補正を行うことができる。2 つ以上のフィルタおよび光ダイオードタイプの任意の組み合わせに対しては Q E について自動補正する方法を使用することができ、そのような方法は、各ピクセルが等価の出力シグナルを生成するように四分円内の 4 つのピクセルを標準化するように補正する。

【 0 1 4 9 】

ピクセルがアレイの所与領域全体に光子束内の変化に対して四分円内で密に充填されている場合は、任意の所与の瞬間に四分円内で同一数の光子が各ピクセルに衝突すると仮定できる。現在利用可能な高分解能センサ、および分解能において予想される将来の改良を考えると、任意の所与四分円内の隣接ピクセルは同一光子束を経験するという仮定が適切である。この仮定を用いると、四分円内のピクセル各々は同一出力を生成するはずである。したがって、各フィルタ四分円内の隣接ピクセルと同一にするために自動補正を使用できる。四分円内の最高感受性ピクセルタイプを使用すると、Q E および波長の差を解釈することができ、これは波長および帯域幅依存性について補正する問題を単純化する。1 つの実施例では、四分円内の最高感受性ピクセルについてバックグラウンドの補正ファクタが決定されると、同一四分円内の他のピクセル各々について同一バックグラウンド補正ファクタを推定できる。自動補正は、相違するフィルタおよび光ダイオードタイプについて温度変化に関連する問題をさらに減少または排除する。以下のセクションでは、閾値および標準化視感度指定のための自動方法について考察する。

【 0 1 5 0 】

また別の実施例では、イメージセンサのアレイは複数のフィルタ四分円を含む。4 つのピクセルからなる各四分円内で 2 つ以上のフィルタが使用される。4 つのピクセルからなる各四分円内では、各フィルタおよび光ダイオードタイプについての平均アナログ・デジタル変換されたシグナル出力が決定される。例えば、四分円内に 3 つのイエローフィルタを備えるピクセルと 1 つのシアンフィルタを備えるピクセルが存在する場合は、3 つのイエローピクセルが最初に決定される。イエローピクセルについての出力値は次にシアンピクセルについての数値と比較され、どちらの出力が数値として大きいかが決定される。この実施形態では、全 4 つのピクセルが同等の光子束を受け入れることを前提としている。最高出力値が四分円内の全 4 つのピクセルに指定される。アレイ内の次の四分円は、その後同一方法で補正することができ、このプロセスはアレイ全体に光子束と相關するように補正出力値が指定されるまで継続される。

【 0 1 5 1 】

自動補正のプロセスは、イメージセンサが画像を記録するために使用されるにつれて経時的に繰り返される。さらにまた別の実施例では、イメージセンサによって受け入れられた光線の波長は第 1 波長から第 2 波長へ変化することがある。第 1 タイプのフィルタは第 1 波長に対して最高 Q E を提供できるが、他方第 2 タイプのフィルタは第 2 波長に対して最高 Q E を提供する。波長における変化は計算プロセスに含むことができ、このために変化する光線についての自動補正をリアルタイムで行うことができる。

【 0 1 5 2 】

Q E の相違を自動補正するために各フィルタタイプについて前もって Q E が知られている必要はない。画像が入手される時点の光子束に基づいてセンサを自動補正するステップは、光子束と相關させるために写真画像を最適化する。このシグナルを補正する方法は、相違するフィルタタイプについての温度および波長依存性を除去し、ソフトウェアを用いて実行できる。そこでそのような方法は、イメージセンサに衝突する広範囲の帯域シグナルについて自動的に補正する。さらにまた別の実施例では、光子束について自動補正されたイメージセンサによって生成されたデジタルシグナルは、その後モノクロ描写で視認

するためにグレースケール画像にすることができる。

【 0 1 5 3 】

< イメージセンサのキャリブレーション >

イメージセンサの最適化は、キャリブレーションステップを含むことができる。キャリブレーションは、カラーフィルタおよび光ダイオードを知られている波長および強度の光線で照明するステップによって遂行できる。カラーCMOSイメージャについては、各フィルタのための生データが入手されて予想値と比較される。結果として生じた比較から、アレイ内のありとあらゆるピクセルのために使用される各カラーフィルタのための等価の出力シグナルを入手するために必要とされるQEおよび乗数（標準化係数）を入手できる。

10

【 0 1 5 4 】

QE係数変換を用いて入手された最適化されたシグナルは、シグナルを光子束へより正確に関連付けることができ、このために化学反応における励起・発光スペクトルまたは吸収現象に関連する光学事象などの事象をより正確に特徴付けることができる。感受性および正確度は、どちらもQE係数を明らかにするためにシグナルを適切に変換するステップによって強化される。標準CMOSイメージャ（Kodak 1310カラーCMOSイメージセンサなど）を使用すると、生成された生データはシグナル最適化のために処理できる。シグナルは、イメージャ上に入射した光子束と相関する数値に変換される。このプロセスは、シグナルを光子束と比例させるためにカラーまたはモノクロCMOSイメージセンサのどちらにも適用できる。

20

【 0 1 5 5 】

処理されたデータは、実際光子束と相関する白黒画像を生成するためにグレースケール標準（0～255の単色）などによって可視化することができる。データの視像はグレースケールモノクロイメージセンサと表面的には等価であるが、同等輝度に対しては、カラーCMOSチップは一般にモノクロチップより高感受性であるので、モノクロの非変換CMOS対応物によって生成される画像より高強度である。カラーイメージセンサは、一般により良好なシグナルを生成し、モノクロイメージャより高感受性であるが、それはピクセル光ダイオードフィルタが光ダイオードのためのQEを向上させるからである。カラーイメージセンサによる光線のフィルタリングは、光子束と正比例している数倍シグナルを変換させるためにQE係数を用いて補正することができる。さらに、また別の長所は、光ダイオードのためのアパーチャを効果的に増幅させるカラーフィルタのマイクロレンズによってもたらされる。

30

【 0 1 5 6 】

< プロセスの例示 >

図6は、イメージセンサを最適化するためのキャリブレーションについてのプロセスの非限定的実施例を例示している。キャリブレーションプロセス（600）では、波長および強度が知られている光線が生成される（605）。強度が知られているので各ピクセル上の光子束が知られているが、これはピクセルのQEが100%である場合は出力となる。知られている光線は、イメージセンサ上に方向付けられる（610）。イメージセンサの各ピクセルの出力が入手される（615）。イメージセンサの出力は、次に実際光子束と比較できる（620）。比較を用いるとピクセルの量子効率を計算することができ（625）、次に量子効率に基づいて標準化係数が計算される（630）。カラーCMOSイメージセンサについては、比較および計算は各フィルタカラーについて実施でき、結果として各フィルタカラーについての標準化係数を生じる。他の実施形態では、比較および計算はイメージセンサの各ピクセルについて、またはイメージセンサのピクセルの区域について行うことができ、その場合はイメージセンサの所定の部分に適合する標準化係数が得られる。標準化係数はイメージセンサに衝突する光線の各波長について変動するので、知られている光線の波長が変動させられ（635）、必要とされる各波長についてこのプロセスが繰り返される。

40

【 0 1 5 7 】

50

所定の実施形態では、イメージセンサは、各ピクセルが1つのフィルタを備えるピクセルのアレイを含有するカラーセンサであってよい。フィルタは、四分円で配列されてよく、各四分円は特定のフィルタパターンを有する。アレイの第1四分円内のピクセル各々の出力を入手できる。四分円内の各フィルタタイプの平均出力が次に決定される。1つの実施例では、フィルタ四分円が1つのシアンフィルタ、1つのマゼンタフィルタ、および2つのイエローフィルタを含有するCMYパターンである場合は、シアン出力、マゼンタ出力、および2つのイエロー出力の平均値が決定される。これらの出力は、次に比較されて、最高出力が決定される。最高出力は、次に四分円内の各ピクセルに指定される。例えば、平均イエロー出力がCMY四分円について最高出力である場合は、特定条件下では、イエローフィルタが最高QE係数を有することを指示しているので、次にイエローの平均出力が四分円内のピクセルの各々に指定される。アレイ内により多くの四分円が存在する場合は、次の四分円の出力が入手され、プロセスが継続される。最終四分円が補正されると、このプロセスは完了し、そのアレイについての補正出力を入手できる。このプロセスは、イメージセンサについてのリアルタイムQE係数補正を許容するために経時的に繰り返すことができる。

10

20

30

40

50

【0158】

図8は、イメージセンサを最適化するための典型的プロセスを例示しているフローチャートである。最適化プロセス(700)では、事象の画像がイメージセンサを用いて捕捉される(705)。本発明の1つの実施形態の下では、イメージセンサは、Bayer RGBまたはCMYパターンなどのフィルタパターンを利用するカラーCMOSイメージセンサである。事象の画像についての生データはイメージセンサから入手される(710)。この生データは、イメージセンサの性質のために、一般にはイメージセンサに衝突した実際光子束から大きく変動する非最適化データである。標準化係数は光線の波長に依存するので、波長が決定される(715)。適切な標準化係数は、光線の波長に基づいて各ピクセルに対して決定される(720)。カラーCMOSイメージセンサを利用する1つの実施形態については、標準化において各レンズカラーに対する標準化係数が使用される。他の実施形態の下では、標準化係数は他の要素に基づいて変動することがある。生データは、次にイメージセンサのピクセルに対して適切な標準化係数を用いて変換され(725)、次に捕捉された事象の画像についての実際光子束に近似する最適化データセットを生成する。本発明の1つの実施形態の下では、変換されたデータを用いて画像を生成できる(730)。

【0159】

< 蛍光検出 >

ガラス表面上の結合反応の存在または不存在を検出するためには、蛍光体を使用されることが多い。蛍光検出器は、蛍光体がレーザーまたは他の光源を用いて励起されたときに生成されるエバネッセント波の強度を測定する。典型的には、レーザーを使用して蛍光体とその吸収ピークで励起され、検出器はその特定蛍光体に特徴的である長い発光波長で発光シグナルを読み取るために調整される。吸収と発光の間の波長の変化は、ストークス・シフトと呼ばれている。大多数の蛍光検出方法は大きなストークス・シフトを備える蛍光体を使用するので、発光および吸収曲線は明確に分離する。小さなストークス・シフトを有する蛍光体を使用する場合は、発光および吸収曲線が重複するために最適ピーク吸収極大値より短い波長で励起することが必要になる。シグナル放出強度が減少し、標的分子を検出するための感度が低下する。大きなストークス・シフトに対する必要もまた、使用できる蛍光体の選択を限定する。

【0160】

吸収および発光についての曲線は相互に極めて近いことが非常に多いために、発光シグナルの正確な読み取りは複雑になる可能性がある。発光および吸収曲線の間隔が小さい場合は、発光スペクトルからの光線を吸収シグナルの光線から分離するのは困難である。発光スペクトル曲線のすぐ下の所定の臨界点まで全光線を除外するためのフィルタとともに、吸収ピークで狭い帯域を備えるレーザーが使用されることが多い。適切なロングパスフ

フィルタ、帯域通過フィルタ、またはロングパスフィルタと帯域通過フィルタの組み合わせを選択することによって、励起光源からの干渉の多くを排除して、発光シグナルを狭いウィンドウ内で観察することができる。励起光源からの干渉は、さらにまた検出器および装置をアライメントすることによって回避されるので、発光シグナルは励起ビームに対して大きな入射角で読み取ることができる。フィルタはほとんどのシグナルを励起光源から排除するが、それらはエバネッセント（発光された）シグナルの重要な部分も除外する。大多数の帯域通過フィルタは、発光シグナルの40～50%という多くを除外する。ロングパスフィルタは、発光シグナルのさらに10%を除外する可能性がある。

【0161】

蛍光検出は、多数の一般的試験方法において使用されている。DNAハイブリダイゼーションは、ハイブリダイズしてスライドに付着したオリゴヌクレオチドを捕捉する1セットの知られているオリゴヌクレオチドに結合した適切な蛍光体を用いて、一般にこの方法で分析されている。サンドイッチイムノアッセイもまた、一次抗体に結合するタグ付け二次抗体を用いる、または二次ビオチン化抗体およびタグとしてのアビジン蛍光体を用いるどちらかで、この分析方法を使用する。この方法の多くの変形は周知である。

10

【0162】

蛍光検出においては、様々な他のタイプの光干渉が発生することがある。励起ビームの反射によって光散乱が発生し、他方励起ビームの反射および屈曲によって光分散が発生する。散乱および分散は、検出器に衝突する光線の大部分を表すことがある。一般に、物質（タンパク質、核酸または他の生体分子など）がスライドガラスの表面に付着させられると、それは様々な方向へ光線を反射および散乱させる鏡として作用する。被覆された表面の量および付着した物質の質量もしくは密度は散乱光の量に大きな影響を及ぼすことがある。ガラス表面に付着したタンパク質、オリゴヌクレオチドまたはポリマーの化学組成もまた、以下の図8から明らかなように、散乱光に影響を及ぼすことがある。さらに、ガラス表面物質に付着した物質自体が蛍光を発することがある。使用されるガラスは、検出器によって受信されるシグナルに影響を及ぼし得る表面不規則性を有することもある。ガラス全体にわたって吸収されるエネルギーは、1つのスポットから別のスポットにかけて変動することがあるので、シグナル分析には極めて大きな問題が生じる。そのような問題は、蛍光検出および/またはデータ分析の新規な方法の使用を必要とする。

20

【0163】

30

<エバネッセント発光および散乱光>

エバネッセントシグナルは、一般に極めて弱く、光散乱は強度であるので、正確な分析の定量的検出には問題が生じる。光散乱は、しばしばフィルタによって排除されると想定されている。しかし、散乱光はほとんど常に存在し、検出器に到達する全シグナルの重大な部分である可能性がある。光散乱を除去するために使用されるフィルタは、標的発光シグナルの大部分も除去してしまうので、これにより検出器の感受性が低下する。フィルタは、また少量の散乱光も透過させる。散乱光がエバネッセント発光に比較して相対的に大きい場合は、検出されるシグナルは数種の起源の組み合わせとなり、標的分子結合を表しているのはその内の1つだけである。

【0164】

40

光散乱の構成要素は、図8に例示されている。2つのスポット（例えば、相違する抗体）がガラス表面に配置されている。標的を検出する方法の間、これらのスポットの一方は、完全に非反応性のままである。他方のスポットは、細菌病原体および/または他の試薬などの標的と反応する。反応性抗体への標的結合はスポットに付着した質量を増加させ、そのスポットでのより大きな表面積および分子構造の変化を生じさせる。質量効果が発生している。反応性スポットからの光散乱は、標的分子結合前の光散乱とは相違する。感受性光子計数検出器であれば、散乱におけるこの相違を検出できる。所定のフローサイトメーターおよび濁度計などの様々な機器は、溶液中の物質の量を定量するために散乱を利用している。それらの機器は、標的物質上に衝突する光線についての散乱角度を測定する。シグナルにおける変化は、参照シグナル（ S_{ref} ）とシグナル2（ S_2 ）との相違である。

50

図 8 では、 S_2 シグナルは、2 つの構成要素である、結合病原体の修正散乱シグナル + 質量効果シグナルを有するように示されている。反応性スポットからのシグナルは変化するが、他方非反応性スポットシグナルからのシグナルは一定である。

$$\Delta S (\text{非反応性スポット}) = 0$$

$$\Delta S (\text{反応性スポット}) = \text{修正} (S_p) + M_1 - S_{ref}$$

【0165】

大きな散乱効果を誘発するために質量効果が十分であれば、標的検出のために使用される蛍光体を排除できる。例えば、DNA ハイブリダイゼーション実験では、標準オリゴヌクレオチドプローブ（約 24 ヌクレオチド長）を用いて表面に付着させられた質量は、標的核酸に結合すると係数 2 以上増大することがある。そのような質量における大きな変化は、エバネッセント波の代わりに光散乱を監視することによって検出可能である。ビオチン化二次抗体を用いたサンドイッチイムノアッセイの場合には、ビオチン化抗体が病原体に結合した時点で別の質量効果が発生する。アビジンコンジュゲート化蛍光体がビオチンに結合すると、第 3 の質量効果が発生する。

10

【0166】

最高感受性シグナルは、蛍光体が付着させられて励起された後に入手される、最後に捕捉されたシグナルから最初の参照シグナルを減じることによって入手できる。そのシグナルは、反応スポットについての修正蓄積質量効果および発光シグナルを表す。

$$\Delta S (\text{反応性スポット}) = \text{修正蓄積質量効果} + \text{発光} - S_{ref}$$

【0167】

20

この分析方法は、CMOS イメージャまたはその後の処理のためにピクセル画像の保存を可能にする任意の知られているデジタルイメージング法とともに使用できる。各スポットから入手したシグナルはより有用な情報を含み、適正なサブトラクション法が使用されれば標的結合後のより強度の変化を示す。散乱効果は、標的結合を検出する際に長所へ転換することができる。さらに、疑似シグナルは画像から取り去られるので、蛍光体の発光および吸収曲線を明確に分離させる必要がない。発光シグナルの全強度は、フィルタを用いて発光光線を減少させずに測定できる。

【0168】

サブトラクション法は、例えばスライドガラス表面における非均質性（小片、傷）に由来するアーチファクトおよび欠陥もまた排除する。非反応性スポットは、完全に無効にされ、シグナルとしては出現しない。CMOS イメージャおよびピクセル捕捉装置は、一般に、無作為の、極めて低レベルの雑音を示すので、どの種類のシグナルを検出できるかに関して制限がある。任意の所与時点で、ベースライン時参照は、無作為の数のスパイクを示すことがある。2 つのスパイク間に含まれる弱いシグナルは、通常はこのバックグラウンド雑音に対して検出されない。

30

【0169】

信号対雑音の問題は、多数の画像が捕捉され、1 枚ずつ他の画像に追加されると、改善することができる。CMOS イメージャなどの検出器に固有の無作為スパイクは常に移動するので、フレーム画像の蓄積は無作為雑音を平均化する傾向を示す。しかし、励起蛍光体の発光からの弱いシグナルはそのピクセル位置を変化させない。このため、標的結合によって誘発された蓄積シグナルは経時的に増加する。この方法は、対象が空のかなたへ移動するにつれて追跡することによる、遠くの星または星雲の写真画像を撮影する方法に類似している。シグナルが検出器上の同一スポットで蓄積されるが、バックグラウンド光線は平均化されるので、該の対象は、経時的にバックグラウンドに比してより明るく見えるようになる。

40

【0170】

< 分析方法 >

典型的な実施形態では、ガラスもしくはナイロンスライドまたは他のマトリックスアレイがステージ上に固定される。標的分子結合の前に、励起用レーザーは、約 30 ~ 40 度の入射角度でスライドの一方の端に集束させられる。スライドは、表面上に、結合した一

50

次抗体を含有するスポットへ励起光を案内する導波管として機能する。光シグナルを捕捉するためには、CMOS、CCDまたは他の光学イメージャが使用される。イメージャは、スライドの下方に位置して、スライド上のスポットがイメージャのすぐ上に来て、光学レンズおよびアパーチャを備えるイメージャ表面上に明確に焦点が合うようにアライメントすることができる。

【0171】

多数の画像が撮影される。各画像は、単一フレームを表す。例えば、50ミリ秒間の露光を用いて10フレームが撮影される。露光は、単一フレーム内に捕捉される光線の量がカメラの感受性範囲内に入るように選択される。10枚のデジタルフレームは、次に望ましくない（バックグラウンド）シグナルの減算のために使用される参照セットを提供するために加えられる。蓄積画像は、キャリブレーションスライドと呼ばれる。

10

【0172】

参照スライド画像を入手するために使用された同一数のフレームが、同一露光を用いて、一次および/または二次抗体、酵素および試薬などの結合後に同一スライドから撮影される。蓄積フレームセットは、サンプルスライド画像と呼ばれる。各スポットについての発光シグナルは、サンプルスライド画像から参照スライド画像を減じることによって決定される。このプロセスは、本質的にバックグラウンド雑音およびマトリックスアレイのアーチファクトを排除し、標的分子の極めて高感受性検出を生じさせる。

【0173】

また別の実施形態では、スチルフレームまたはビデオモードのどちらかで画像を入手できる。典型的なビデオフレームは、参照およびサンプル分析の各々のために2000msで行い、100フレームを捕捉する。本方法は、アーチファクトおよび非反応性スポットを除去し、アレイへの標的分子結合を表すシグナルだけを残す。

20

【0174】

< 自動閾値補正 >

サンプル分析における一般的問題は、測定を行って、絶対的標準値が存在しない場合に数値の意味を解釈しなければならない。例えば、視感度を測定する際には、反応が開始した時点には測定値を通常は正確に入手できないために、そして基質の濃度は典型的には知られていないので、一般には相対視感度測定値だけが入手されて、分析プロセスにおいて使用される。それに対してシグナルを測定できる絶対的な標準は存在しない。

30

【0175】

視感度は、ソフトウェアを備えるCCDカメラを用いて測定されることが多い。各機器は、回路、光学素子、CCDチップおよびハウジングなどにおける変化のために、絶対数値に関して様々に測定する。同一機器さえ瞬間毎およびスキャン毎に、さらに相違する日には温度および回路反応におけるかすかな変化、溶液、スキャン時間における変動などに起因して測定結果が相違するので、所与測定値セットにおいて入手される絶対値を解釈することを困難にさせる。

【0176】

特定の機器については、シグナルにおけるこれらの相違が入手された数値に比較して相対的に小さい場合は、1セット内の1つのサンプルをそのセット内の他のサンプルに比較して容易に識別し、例えば特定のマーカーについて陰性または陽性血清サンプルとしてそれを相違する分布プロファイルを備える集団に指定することが可能な場合がある。しかし、実際には、1つの実験から次の実験までの測定値における相違は、同一もしくは類似サンプルについては絶対数値に比較して大きいことがある。これは、特に比視感度の数値が極めて低く、低レベル測定が行なわれる場合に当てはまる。

40

【0177】

それに他の全測定値が比較される1セットの測定値内の参照値を使用することによって、シグナルがその参照数値より大きい、等しい、または小さいかのいずれであるかを正確に陳述することが可能になる。そして、観察されることの多い比視感度単位で1,000超~1,000,000の広いダイナミックレンジを用いると、比視感度を明確に数/1

50

、000単位にまで測定することが可能になる。

【0178】

しかし各新規セットの測定値を用いると、絶対値における変化のために、バックグラウンド測定値、または特異的サンプル測定値を別の測定値から減じることによって入手される1セットの測定値の比視感度は、必ずしも試験サンプルについての同等比視感度を提供しない。別の(陽性または固有にマーキングおよび識別されたサンプルセット)の分布曲線とは相違する分布曲線を備える一連の1つのサンプルセット(血清の陰性または正常セット)を識別する方法が必要とされる。さらに、同一方法でそれらがシグナルを識別する能力において全機器を同等にさせる方法もまた必要とされる。これは、任意のサンプル試験のために、陰性または陽性参照セットどちらかを提供するサンプルについて測定された比視感度だけを用いて実施することができ、バックグラウンド参照シグナルもまたスキャン方法で入手される。

10

【0179】

一般に、サンプルのプールを調製して、同時に試験かつ平均化された数種のサンプルについて平均予想値に密接に近似する参照として使用できるので、参照として陰性または正常セットを使用した方がよい。陽性または固有にマーキングされた血清は、マーカーに依存して相当大きく変動することがある。例えば、当該のマーカーとしての循環中抗体を備えるM.ボビスに感染した畜牛は、感染の早期にはほとんど抗体を有していない可能性がある。相違する動物または感染の後期には、抗体濃度は極めてはるかに高くなる、または濃度が低くなることがある。陽性感染動物は、参照作製のためには使用すべきではない。陰性(正常)血清は、M.ボビスに対して特異的な抗体マーカーに欠けているので、参照として使用できる。

20

【0180】

<比視感度の測定値>

上記で説明した、ソフトウェア、光学素子、および分析用のサンプルセットが装填されている機器ハウジングとともに使用される全光学アッセイ装置(TOAD)はcribセット内の各サンプルについての数値を研究者に提供する。cribセットは、通常は、各々が設定時間(例えば、10分間)内に1枚の画像を捕捉するためにスキャンされるサンプルまたはコントロール溶液のどちらかを含有するウェルを12以上含有する。

30

【0181】

通常は、数種のサンプルが同時にスキャンされる。サンプルの不存在下で観察されたシグナル(バックグラウンド)を表すバックグラウンド数値は、サンプル間のCCDカメラ標的領域内の領域を試験することによってサンプルがスキャンされるのと同時に入手される。サンプル数値とバックグラウンド数値との相違は、特定試験サンプルについての比視感度を表す。12サンプルからなる1セットについての代表的な画像は、参照(陰性コントロール)として使用された同一基質濃度での約10例の陰性動物のプール血清とともに、図15に示されている。

【0182】

単一cribセットアッセイでは11例のサンプルと1例の陰性コントロールしか処理できないので、多数のサンプルを分析するためには多数のセットが必要とされる。各セットに対して、11例の追加のサンプルが入手され、それらの数値はそのcribセットについての陰性コントロール参照と比較して測定できる。表10は、未感染および感染畜牛血清を用いた盲検試験での99例の相違するサンプルについての比視感度とともに9つの連続アッセイセットについての結果を示している。

40

【0183】

cribセット内の各サンプルについての比視感度は、陰性コントロールの参照プールを用いて陰性動物からの陽性感染動物の識別を可能にする有用な情報を提供する。これは、サンプルが陽性であるより上方および陰性であるより下方の閾値を指定することによって遂行される。この閾値は、所与セットの実験条件に対して経験的に入手される。

【0184】

50

< 閾値の指定 : >

サンプルが陽性感染であるか陰性であるかを決定するために使用される閾値カットオフは、経験的に決定される。陰性コントロール参照値は9つのc r i bセットの各々について入手され、バックグラウンド、NC、およびNC比視感度値（NCからBGを減じることによる）は表11に示されている。

【0185】

プール陰性コントロール血清についての比視感度は獲得されている（表11のNC__RLを参照）。NC__RLについての数値は、相当大きく変動している。プール陰性参照に比較した個別に測定された数種の血清の平均値 + 平均値からの多重標準偏差の比率は一定である。この比率は、CCD画像出力はその表面に衝突する光子に正比例し、このためプー

10

【0186】

閾値は、平均予想比視感度値に任意の陰性血清サンプルを含むはずである平均値を超える標準偏差の乗数を加えることによって、プール陰性サンプルの参照に比較して陰性である血清についての平均予想比視感度値と、真陰性もしくは真陰性ではない可能性があるサンプルについて観察された数値との関係を活用することによって自動的に決定される。これは、次の方程式によって表すことができる。

$$\text{閾値} = O b s_{NC} + X (SD) - NC_RL \text{ フール参照}$$

$$O b s_{NC} = \text{観察された陰性コントロールサンプルの血清値}$$

$$X = \text{乗数}$$

$$SD = \text{いくつかの陰性サンプル血清値の標準偏差}$$

$$NC_RL = \text{陰性コントロールプール血清参照値}$$

20

【0187】

サンプルについて観察された数値がNCプール参照に等しい場合は、その閾値は、所与セットの実験条件についてプール参照を超える標準偏差の乗数である。

$$\text{閾値} = X (SD)$$

【0188】

数種の検査結果が陰性のサンプルの平均値 + プール参照試験サンプルに比較して試験したそれらのサンプルについての標準偏差の乗数が一定であるので、閾値は、以下に示すように単純な式によって自動的に計算できる。

30

$$\{ O b s_{NC} \text{ 平均値} + X (SD) \} / NC_RL \text{ フール参照} = \text{定数}$$

このため、

$$\text{閾値} = \{ \text{定数} - 1 \} NC_RL$$

$$\text{閾値係数} = \{ \text{定数} - 1 \}$$

【0189】

1つのc r i bセット内の特定サンプルは、その数値は閾値より上方または下方のいずれかであるので、陽性または陰性のどちらかであると決定される。

陽性の指定

$$O b s \text{ 比視感度} > \text{閾値}$$

40

陰性の指定

$$O b s \text{ 比視感度} < \text{閾値}$$

【0190】

実際には、{ 定数 - 1 } についての数値は試験後に変動させられるので、特異性および感受性測定値への影響を決定できる。次に標準ROC曲線が構築される（例えば、図16を参照）。数値の表から、所望の特異性および感受性カットオフ値に対する閾値係数が選択される（表12）。例えば、0.9の閾値係数は、各々91および76%の特異性および感受性値を表す。

【0191】

< 閾値および比視感度の標準化 >

50

計算された閾値は、陽性感染および正常血清群のいずれかにその比視感度に基づいてサンプルを指定するために使用される。使用した閾値係数が100%感受性を生じさせる場合は、陽性サンプルの全部を同定しなければならないが（すなわち、偽陰性はゼロになるはずである）、閾値はそれらの包含を排除するには低すぎるので、多数の偽陽性（正常血清群）が存在することがある。偽陽性は、リフレックス・サブリメンタルテストを用いたその後の実験において除外できる。

【0192】

選択した閾値に対して比視感度を標準化することによって、サンプルは、その数値は各々1.0より大きい、または小さいので、陽性または陰性のいずれかであると同定できる。これは、そのサンプルについての数値に基づいてどのセットに指定を割り付けるべきかを直ちに判断するために、サンプルのリストを試験することを容易にするために、数値を表示するより有用な方法である。

10

【0193】

閾値は、サンプルについて観察された比視感度をそのcribセットについての閾値で割ることによって比視感度から整数へ変換（標準化）される。それは、1つのサンプルを他のサンプルと比較するときに Δ /閾値が1.0より上か下かを見るだけで理解できる。これだけで、陽性または陰性サンプルについての指定を決定する。比視感度の検査だけではそのような容易な指定の解釈は許容しない。

陽性の指定

{Obs比視感度} / 閾値 1.0

20

陰性の指定

{Obs比視感度} / 閾値 < 1.0

【0194】

99頭の試験された動物について、初回検査ラウンドについてのみ、自動および標準値が表13に列挙されている。スクリーニングおよびリフレックス・サブリメンタルテストについてのグラフ表示は、図17に示されている。

【0195】

閾値を自動計算することによって、所与セットの実験条件に対する感受性および特異性についての基準が設定される。各機器は、同一基準によって同等方法で結果を解釈する。そして、計算比視感度を閾値で割ることにより観察された比視感度を標準化することによって、一連または機器毎の全サンプルは、それらが1.0より上か下のどちらかであるとして選択された閾値に対して陽性または陰性のいずれかであると容易に評価される。

30

【0196】

<タンパク質およびペプチドに対する一般的方法>

病原体および/またはマーカー分子を検出するために、本明細書で請求した方法および組成物の範囲内で様々なポリペプチドまたはタンパク質を使用できる。所定の実施形態では、タンパク質は、抗体または抗原結合部位を含有する抗体のフラグメントを備えていてよい。個別分析物に対する結合特異性を備える多数の抗体は、当分野において知られている。

【0197】

本明細書で使用するタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは、一般に、約200アミノ酸より大きく、遺伝子から翻訳される全長配列までのタンパク質；約100アミノ酸より大きいポリペプチド；および/または約3～約100アミノ酸のペプチドを意味するが、それらに限定されない。便宜性のために、用語「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、本明細書では互換的に使用される。したがって、用語「タンパク質もしくはペプチド」は、天然型タンパク質で見出される20種の一般アミノ酸のうちの少なくとも1つ、または表14に示されているアミノ酸を含むがそれらに限定されない少なくとも1つの修飾もしくは異常アミノ酸を含むアミノ酸配列を包含する。

40

【0198】

タンパク質もしくはペプチドは、標準分子生物学技術によるタンパク質、ポリペプチド

50

もしくはペプチドの発現、天然起源からのタンパク質もしくはペプチドの単離、またはタンパク質もしくはペプチドの化学合成を含む、当業者に知られている任意の技術によって作製できる。ヌクレオチドおよび様々な遺伝子に対応するタンパク質、ポリペプチドおよびペプチド配列は以前に開示され、当業者に知られているコンピュータ・データベースに見出すことができる。そのようなデータベースの1つは、全米バイオテクノロジー情報センターのGenbankおよびGenPeptデータベースである(www.ncbi.nlm.nih.gov/)。知られている遺伝子についてのコーディング領域は、本明細書で開示する技術、または当業者には既知の技術を用いて増幅および/または発現させることができる。または、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドの様々な商業的調製物は、当業者に知られている。

10

【0199】

< 融合タンパク質 >

その他の実施形態は、以下で考察するCP10-ESAT融合タンパク質などの融合タンパク質に関係することがある。これらの分子は、一般に、第2ポリペプチドもしくはタンパク質の全部もしくは一部分へNもしくはC末端で連結したペプチドの全部もしくは実質的部分を有する。例えば、融合は、異種宿主内のタンパク質の組換え発現を許容するために他の種由来のリーダー配列を使用できる。別の有用な融合は、抗体エピトープなどの免疫学的に活性なドメインの付加を含む。所定タイプの融合タンパク質は、広域スペクトルの抗体スクリーニングを提供するために、2種以上の様々なタンパク質由来の抗原性エピトープを使用できる。複数の病原体タンパク質由来の融合エピトープの使用は、感染宿主における抗病原体抗体を検出するために増加した感受性を提供すると期待できる。融合タンパク質を生成する方法は、当業者には周知である。そのようなタンパク質は、例えば二官能架橋試薬を用いる化学結合によって、完全融合タンパク質の新規合成によって、または第1タンパク質もしくはペプチドをコードするDNA配列を、第2ペプチドもしくはタンパク質をコードするDNA配列へ結合させ、その後は無傷融合タンパク質を発現させることによって生成できる。

20

【0200】

< タンパク質の精製 >

所定の実施形態では、タンパク質もしくはペプチドは単離または精製できる。タンパク質精製技術は、当業者には周知である。これらの技術は、1つのレベルでは、細胞、組織もしくは器官の均質化およびポリペプチドおよび非ポリペプチド分画への粗分画化を含む。当該のタンパク質もしくはポリペプチドは、部分もしくは完全精製(または、均質性への精製)を達成するためにクロマトグラフィおよび電気泳動法技術を用いてさらに精製することができる。純粋ペプチドを調製するために特に適合する分析方法は、イオン交換クロマトグラフィ、ゲル排除クロマトグラフィ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、親和性クロマトグラフィ、免疫親和性クロマトグラフィおよび等電点電気泳動法である。ペプチドを精製する特に効率的な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィ(FPLC)または均一HPLCである。

30

【0201】

タンパク質精製において使用するために適合する様々な技術は、当業者には周知である。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いた沈降法、またはその後遠心分離;イオン交換、ゲル濾過、逆相、ヒドロキシルアパタイトおよび親和性クロマトグラフィなどのクロマトグラフィステップ;等電点電気泳動法;ゲル電気泳動法を行う熱変性法、ならびにこれらおよびその他の技術の組み合わせが含まれる。当分野において一般に知られているように、様々な精製ステップを実施する順序は変化させることができる、または所定のステップを削除でき、それでも実質的に精製されたタンパク質もしくはペプチドを調製するための適切な方法を生じさせると考えられている。

40

【0202】

タンパク質もしくはペプチドをそれらの最も精製された状態で常に提供する一般的要件は存在しない。実際に、実質的にあまり精製されていない生成物が所定の実施形態では有

50

用性を有することが想定されている。部分精製は、小数の精製ステップを組み合わせる使用することによって、または同一の一般的精製スキームの様々な形態を利用することによって遂行できる。例えば、HPLC装置を利用して実行されるカチオン交換カラムクロマトグラフィは、一般に、低圧クロマトグラフィシステムを利用する同一技術より何倍も大きな精製を生じさせると理解されている。低度の相対精製を示す方法は、タンパク質生成物の全回収において、または発現したタンパク質の活性を維持することにおいて長所を有することがある。

【0203】

親和性クロマトグラフィは、単離すべき物質とそれに特異的に結合できる分子との間の特異的親和性に基づくクロマトグラフィ方法である。これは、受容体-リガンドタイプの相互作用である。カラム物質は、結合パートナーの一方を不溶性マトリックスへ共有結合させることによって合成される。カラム物質は、次に溶液からその物質を特異的に吸着することができる。溶離は、条件を結合が発生しない条件（例えば、変化したpH、イオン強度、温度など）に変化させることによって発生する。マトリックスは、それ自体は分子を任意の有意な程度まで吸着しない、そして広範囲の化学的、物理的および熱的安定性を有する物質でなければならない。リガンドは、その結合特性に影響を及ぼさないような方法で結合しなければならない。リガンドは、さらに比較的密な結合を提供しなければならない。さらに、サンプルまたはリガンドを破壊せずに物質を溶離させることが可能でなければならない。

10

【0204】

20

<合成ペプチド>

タンパク質もしくはペプチドは、従来型技術にしたがって、溶液中または固体支持体上で、全体として、もしくは部分的に合成できる。様々な自動合成装置は市販で入手することができ、知られているプロトコルにしたがって使用できる。例えば、Stewart and Young, (1984); Tam et al., (1983); Merrifield, (1986); and Barany and Merrifield (1979)を参照されたい。通常は約6から約35~50アミノ酸までの短いペプチド配列は、そのような方法によって容易に合成できる。または、当該のペプチドをコードするヌクレオチド配列が発現ベクター内に挿入され、適切な宿主細胞に変換もしくは形質導入され、発現のために適切な条件下で培養される組換えDNA技術を使用できる。

30

【0205】

<抗体>

用語「抗体」は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子を意味するために使用され、Fab', Fab, F(ab')₂、単ドメイン抗体(DAB)、Fv、scFv（一本鎖Fv）などの抗体フラグメントを含む。様々な抗体をベースとする構築物およびフラグメントを調製して使用する技術は、当分野において周知である。抗体を調製して特性付けるための手段もまた、当分野において周知である（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照）。様々な当該の病原体を検出するために使用される抗体もまた、広範囲の知られている入手起源から市販で入手できる。例えば、様々な抗体分泌ハイブリドーマ系は、アメリカンタイプ・カルチャーコレクション(American Type Culture Collection、メリーランド州ロックビル)から入手できる。

40

【0206】

ポリクローナル抗体は、動物を免疫源により免疫し、その免疫動物から抗血清を採取することによって調製できる。抗血清を製造するためには、広範囲の動物種を使用できる。典型的には、抗血清を製造するために使用する動物は、非ヒト動物、例えば、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、ブタもしくはウマである。ウサギは相当に大量の血液量を有するために、ウサギはポリクローナル抗体を製造するために好ましい選択である。

【0207】

50

ポリクローナルおよびモノクローナル両方の抗体は、当業者には一般に知られているように、従来型免疫技術を用いて調製できる。抗原性エピトープを含有する組成物は、ウサギもしくはマウスなどの1種もしくは複数の実験動物を免疫するために使用でき、それらは次に特異的抗体を生成するように進行する。ポリクローナル抗血清は、抗体生成の時間を置いた後に、単純に動物に出血させ、全血から血清サンプルを調製することによって入手できる。

【0208】

当分野において周知のように、所与の組成物はその免疫原性において相違する可能性がある。このため、免疫源をキャリアへ結合させることによって達成できるように、宿主免疫系を増強することがしばしば必要である。典型的かつ好ましいキャリアは、アオガイヘモシアニン (K L H) およびウシ血清アルブミン (B S A) である。オバルブミン、マウス血清アルブミンまたはウサギ血清アルブミンなどの他のアルブミンもまた、キャリアとして使用できる。抗原をキャリアタンパク質へコンジュゲートさせるための手段は当分野において周知であり、グルタルアルデヒド、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビス - ビアゾ化ベンジジンが含まれる。

【0209】

同様に当分野において周知のように、特定免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる免疫応答の非特異的刺激因子の使用によって強化できる。典型的かつ好ましいアジュバントには、フロイント完全アジュバント (殺滅された結核菌を含有する免疫応答の非特異的刺激因子)、フロイント不完全アジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントが含まれる。

【0210】

ポリクローナル抗体の製造において使用される免疫原組成物の量は、免疫源の性質ならびに免疫に使用される動物に依存して変動する。免疫源を投与するためには様々な経路を使用できる (皮下、筋肉内、皮内、静脈内および腹腔内)。ポリクローナル抗体の製造は、免疫後の様々な時点に免疫動物から血液をサンプリングすることによって監視できる。第2回のブースト注射もまた行うことができる。ブースト注射および力価測定のプロセスは、適切な力価が達成されるまで繰り返される。所望レベルの免疫原性が入手されると、免疫動物を出血させて血清を単離および貯蔵することができる、および / または動物を使用してモノクローナル抗体を生成できる。

【0211】

モノクローナル抗体は、米国特許第4,196,265号に例示されている技術などの、周知の技術の使用を通して容易に調製できる。典型的には、この技術は適切な動物を選択された免疫原組成物で免疫するステップを含む。免疫組成物は、抗体産生細胞を刺激するために有効な方法で投与される。マウスおよびラットなどの齧歯類由来の細胞が好ましいが、ウサギ、ヒツジ、カエル細胞の使用もまた可能である。マウスは好ましく、中でもBALB/cマウスは最も日常的に使用され、一般に高パーセンテージの安定性融合を生じるので最も好ましい。

【0212】

免疫後に、抗体、詳細にはBリンパ球 (B細胞) を産生する可能性がある体細胞が、m A b生成プロトコルに使用するために選択される。これらの細胞は、生検切除した脾臓、扁桃もしくはリンパ節から、または末梢血サンプルから入手できる。脾臓細胞および末梢血細胞は、前者はそれらが分裂中形質芽球期にある抗体産生細胞の豊富な起源であり、後者は末梢血を入手可能であるために好ましい。しばしば、1パネルの動物が免疫されて最高抗体力価を備える動物の脾臓が除去され、シリンジを用いてその脾臓を均質化することによって脾臓リンパ球が入手される。典型的には、免疫したマウス由来の脾臓は、およそ $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 個のリンパ球を含有する。

【0213】

免疫動物由来の抗体産生Bリンパ球は、次に一般には免疫された動物と同一種の細胞である不死骨髓腫細胞の細胞と融合させられる。ハイブリドーマ産生融合方法において使用

10

20

30

40

50

するために適合する骨髓腫細胞系は、好ましくは非抗体産生性であり、高融合効率、ならびに所望の融合細胞（ハイブリドーマ）だけの増殖を指示する所定の選択培地中では増殖不能にさせる酵素欠乏を有する。

【0214】

当業者には知られているように、多数の骨髓腫細胞のうちの任意の1つを使用できる。例えば、免疫動物がマウスである場合は、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1-Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7およびS194/5XX0 Bu1を使用できる；ラットについては、R210、RCY3、Y3-Ag1.2.3、IR983Fおよび4B210を使用できる；ならびにU-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2およびUC729-6は、全部が細胞融合と結び付けて有用である。

10

【0215】

抗体産生脾臓もしくはリンパ節細胞および骨髓腫細胞のハイブリッドを生成するための方法は、通常は、体細胞を骨髓腫細胞と2:1の比率で混合するステップを含むが、この比率は細胞膜の融合を促進する（化学的または電氣的）物質の存在下では、約20:1～約1:1までそれぞれ変動することがある。センダイウイルスを用いる融合方法、および37%（v/v）PEGなどのポリエチレングリコール（PEG）を使用する方法が記載されている。電気誘導融合方法の使用もまた適切である。

【0216】

融合方法は、通常は、約 1×10^{-6} ～ 1×10^{-8} の低頻度で生育可能なハイブリッドを生成する。しかし、これは生育性の融合ハイブリッドが選択培地中で培養するステップによって母体の非融合細胞（特に、通常は無期限に分化し続ける未融合骨髓腫細胞）から識別されるので、問題を有していない。選択的培地は、一般に、組織培養培地中でヌクレオチドの新規合成を遮断する物質を含有する培地である。典型的かつ好ましい物質は、アミノプテリン、メトトレキセート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートは、プリンおよびピリミジン両方の新規合成を遮断するが、アザセリンはプリン合成だけを遮断する。アミノプテリンもしくはメトトレキセートが使用される場合は、培地にはヌクレオチドの起源としてヒポキサンチンおよびチミジンが補給される（HAT培地）。アザセリンが使用される場合は、培地にはヒポキサンチンが補給される。

20

【0217】

好ましい選択培地は、HATである。ヌクレオチドサルベージ経路を作動させることのできる細胞だけが、HAT培地中で生残することができる。骨髓腫細胞は、例えばヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T）などのサルベージ経路の重要な酵素が欠けているので、生残できない。B細胞はこの経路を作動させることができるが、それらは培養中では限定された寿命しか有しておらず、一般には約2週間以内に死滅する。このため、選択培地中で生残できる細胞だけが、骨髓腫およびB細胞から形成されたハイブリッドである。

30

【0218】

この培養するステップは、それから特異的ハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの集団を提供する。典型的には、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレート内での単一クローン希釈によって細胞を培養するステップ、およびその後、所望の反応性について個別クローナル上清を試験するステップ（約2～3週間後）によって実施される。このアッセイは、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、細胞毒性アッセイ、ブランクアッセイ、ドット免疫結合アッセイなどのように感受性、単純かつ迅速でなければならない。

40

【0219】

次に選択されたハイブリドーマは、連続的に希釈されて、個別抗体産生細胞系中にクローン化されるが、それらのクローンは次にmAbを提供するために無期限に増殖させることができる。これらの細胞系は、2つの基本方法においてmAb産生のために活用できる。ハイブリドーマのサンプルは、最初の融合のための体細胞および骨髓腫細胞を提供する

50

ために使用されたタイプの組織適合性動物内へ（しばしば腹腔内へ）注射できる。注射された動物は、融合した細胞ハイブリッドによって産生した特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生する。血清もしくは腹水などの動物の体液を採取すると、高濃度でmAbを提供することができる。個別細胞系は、さらにまた、mAbが自然にそれから容易に高濃度で入手できる培養培地内へ分泌されるインビトロで培養することができる。いずれかの手段によって生成したmAbは、所望であれば、濾過、遠心分離、ならびにHPLCもしくは親和性クロマトグラフィなどの様々なクロマトグラフィ法を用いてさらに精製できる。

【0220】

[実施例]

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を例示するために含まれている。当業者であれば、以下の実施例において開示した技術は本発明者らが本発明の実践において良好に機能することを発見した技術を示していること、したがってその実践のために好ましい様式を構成すると見なせることを理解できるはずである。しかし、当業者であれば、本開示を参考にすると、本明細書に開示した特定の実施形態において多数の変更を加えられること、そしてそれでも本発明の精神および範囲から逸脱せずに同様もしくは類似の結果を得られることを理解できるはずである。

【実施例1】

【0221】

< ウシ結核症を試験するための典型的プロトコル >

上記で考察したように、当該の標的病原体内で発現した1つまたは複数のペプチド配列または他の抗原を含む捕捉プローブは、被験者から入手した血液、血清もしくは他のサンプル中の抗病原体抗体に結合させてその存在を検出するために使用できる。当業者は、検出対象の標的は限定されないこと、およびそれに対する循環中宿主抗体が存在する任意の標的は類似プロトコルを用いて検出できることを明確に理解する。これとは逆に、当該の標的に対する抗体は、捕捉プローブとして使用でき、そして標的抗原の存在は、例えばサンドイッチELISAまたは当分野において周知の他の技術によって検出できる。

【0222】

< 材料および方法 >

< 組換え抗原 (Rec Ag) プローブの生成 >

ウシ結核症検出についてのこの典型的実施形態では、使用される捕捉プローブは、CFP-10およびESAT-6をコードする結核菌H37Rv株ゲノム内の2つの隣接オープンリーディングフレーム (ORF) から発現した組換え融合タンパク質であった。それらの2つの遺伝子産物は、CFP-10のTGA終止コドンがGly (GGA) へ変化させられ、追加のG残基が正しいリーディングフレームを保持するためにCFP-10およびESAT-6の間の32ヌクレオチド介在領域内で下流に挿入されたPCR-指定突然変異誘発のプロセスによってフレーム内で融合させられた。これはORF間領域から介在12「ナンセンス」アミノ酸を備える完全ESAT-6遺伝子産物 (95アミノ酸) へ融合した完全CFP-10遺伝子産物 (100アミノ酸) からなる融合タンパク質を生じさせた。組換え抗原 (Rec Ag) は次に、感染した動物においてウシ抗体に対するプローブとしてフェライトビーズへ付着させた。

CFP-10アミノ酸配列

MAEMKTDAAATLAQEAAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQA AVVRFQEAANKQKQELDEISTNIRQAGVQYSRADEEQQA LSSQM GF (配列番号1)

CFP-10ヌクレオチド配列

a t g g c a g a g a t g a a g a c c g a t g c c g c t a c c c t c g c g c a g g
a g g c a g g t a a t t t c g a g c g g a t c t c c g g c g a c c t g a a a a c
c c a g a t c g a c c a g g t g g a g t c g a c g g c a g g t t c g t t g c a g
g g c c a g t g g c g c g g c g c g g c g g g a c g g c c g c c c a g g c c g

10

20

30

40

50

c g g t g g t g c g c t t c c a a g a a g c a g c c a a t a a g c a g a a g c a
g g a a c t c g a c g a g a t c t c g a c g a a t a t t c g t c a g g c c g g c
g t c c a a t a c t c g a g g g c c g a c g a g g a g c a g c a g c a g g c g c
t g t c c t c g c a a a t g g g c t t c T G A (配列番号2)

ORF 間領域

c c c g c t a a t a c g a a a a g a a a c g g a g c a a a a a c (配列番号3)

E S A T - 6 アミノ酸配列

M T E Q Q W N F A G I E A A A S A I Q G N V T S I H S L L D E G K Q S L T K L A
A A W G G S G S E A Y Q G V Q Q K W D A T A T E L N N A L Q N L A R T I S E A G
Q A M A S T E G N V T G M F A (配列番号4)

10

E S A T - 6 ヌクレオチド配列

a t g a c a g a g c a g c a g t g g a a t t t c g c g g g t a t c g a g g c c g
c g g c a a g c g c a a t c c a g g g a a a t g t c a c g t c c a t t c a t t c
c c t c c t t g a c g a g g g g a a g c a g t c c c t g a c c a a g c t c g c a
g c g g c c t g g g g c g g t a g c g g t t c g g a g g c g t a c c a g g g t g
t c c a g c a a a a a t g g g a c g c c a c g g c t a c c g a g c t g a a c a a
c g c g c t g c a g a a c c t g g c g c g g a c g a t c a g c g a a g c c g g t
c a g g c a a t g g c t t c g a c c g a a g g c a a c g t c a c t g g g a t g t
t c g c a t a g (配列番号5)

完全ヌクレオチド配列

20

a t g g c a g a g a t g a a g a c c g a t g c c g c t a c c c t c g c g c a g g
a g g c a g g t a a t t t c g a g c g g a t c t c c g g c g a c c t g a a a a c
c c a g a t c g a c c a g g t g g a g t c g a c g g c a g g t t c g t t g c a g
g g c c a g t g g c g c g g c g c g g c g g g g a c g g c c g c c a g g c c g
c g g t g g t g c g c t t c c a a g a a g c a g c c a a t a a g c a g a a g c a
g g a a c t c g a c g a g a t c t c g a c g a a t a t t c g t c a g g c c g g c
g t c c a a t a c t c g a g g g c c g a c g a g g a g c a g c a g c a g g c g c
t g t c c t c g c a a a t g g g c t t c G G A c c c g c t G a a t a c g a a a a
g a a a c g g a g c a a a a a c a t g a c a g a g c a g c a g t g g a a t t t c
g c g g g t a t c g a g g c c g c g g c a a g c g c a a t c c a g g g a a a t g
t c a c g t c c a t t c a t t c c c t c c t t g a c g a g g g g a a g c a g t c
c c t g a c c a a g c t c g c a g c g g c c t g g g g c g g t a g c g g t t c g
g a g g c g t a c c a g g g t g t c c a g c a a a a a t g g g a c g c c a c g g
c t a c c g a g c t g a a c a a c g c g c t g c a g a a c c t g g c g c g g a c
g a t c a g c g a a g c c g g t c a g g c a a t g g c t t c g a c c g a a g g c
a a c g t c a c t g g g a t g t t c g c a t a g (配列番号6)

30

【0223】

上述したように、CFP-10コーディング配列の3'末端にあるTGA終止コドンは、GGAグリシンコドンにコードするグリシンへ突然変異させた。さらに、G残基は、CFP-10配列とフレーム単位で融合したESAT-6コーディング配列を作製するために突然変異GGAコドンから6塩基下流に挿入した。組換えCFP-ESAT抗原は、GenWay Biotech社(カリフォルニア州サンディエゴ)によって調製された。

40

【0224】

<磁気ビーズの融合タンパク質へのコンジュゲート>

CFP-10:ESAT-6組換え融合タンパク質抗原(CFP-ESAT)は、結合プロセスにおいてわずかな修飾を加えて、Bangs Laboratories社(インディアナ州フィッシャーズ)からのCOOHミクロスフェア用のPolyLinkタンパク質結合キットを用いてフェライトビーズへコンジュゲートさせた。プロテインAおよび他の干渉物質を含んでいない融合タンパク質は、アクリルカルボキシル(COOH)がコーティングされたフェライトビーズへ共有結合した。手短には、カルボキシル基は、活

50

性エステルを作製するためにこれらの基と反応するNH₂修飾を備える水溶性カルボジイミドを用いて活性化した。このエステルは、ビーズにコンジュゲートされるタンパク質上の第一級アミンに対して反応性である。代表的プロトコルは、データシート# 644 (PolyLinkタンパク質結合キットに添付されている)に開示されている。

【0225】

ストックのフェライトビーズ - CFP - ESATコンジュゲートは、グリシンアミドバッファ中で遮断かつ洗浄した後、微生物阻害剤を備える標準希釈バッファ中に2 mg / mLのフェライトビーズ濃度へ懸濁させた。使用前に、ビーズは、ウシTBアッセイに使用するために標準希釈バッファ (10 mMのPBS、0.1%のBSA、0.05%のProClin) 中の濃度0.04 mg / mLへ希釈した。希釈したビーズ調製物のアリコートを使用して、分析される各サンプルのための希釈血清サンプルをスパイクした。

10

【0226】

<材料>

カルボキシル (COOH) コーティングしたフェライトミクロスフェアおよびPolyLinkタンパク質結合キットは、Bangs Laboratories社 (インディアナ州フィッシャーズ) から入手した。ビオチン化ヤギ抗ウシIgM (μ鎖特異的) は、KPL社 (メリーランド州ゲーサーズバーグ) から入手した。HRP - SA溶液、SuperSignal West Piccoloミノール/エンハンサー溶液およびSuperSignal West Pico安定性過酸化水素溶液は、Pierce社 (イリノイ州ロックフォード) から入手した。

20

【0227】

<プロトコル>

Mbv感染についての迅速診断テストのための典型的な段階的プロトコルを以下に提供する。より一般的には、典型的テストでは、血清サンプルの1:50希釈液は、1.5 mLのエッペンドルフProtein LoBindチューブ内の980 μLの標準希釈バッファ (10 mMのPBS、0.1%のBSA、0.05%のProClin) へ20 μLの全ウシ血清 (好ましくはアジ化物無含有) を加えることによって作製した。次にこのサンプル280 μLを2本目のエッペンドルフLoBindチューブへ分注し、0.05 mg / mLのESAT - 6 / CFP - 10 Bangs Biomagビーズコンジュゲートが良好に分散した溶液70 μLをウシ血清サンプル中にピペットで移し、非磁気ラック位置で15分間、室温でインキュベートした。

30

【0228】

このチューブを磁気ラック内へびったりと挿入し、720 μLの洗浄バッファ (10 mMのPBS、0.05%のTween 20) をサンプルに加え、これをさらに2分間にわたり磁場内でインキュベートした。サンプルチューブは磁気ラック内に残したまま、全サンプル液はL - 1000ピペットチップをチューブの底部へ降下させ、バッファおよびサンプル全部を吸引するステップによって注意深く取り除いた (磁場内には容器の壁にしっかりと付着したフェライトビーズの2つの分離したドット「スネークアイ (snake - eyes)」が残される)。次にチューブをラックから取り外し、900 μLのPBS - 0.05%のTween洗浄バッファを用いてビーズを洗浄した。さらにサンプルは、ビーズに付着させるために2分間、磁場内に置いた。3回の洗浄 (最初は720 μLのスパイクおよびその後2回の洗浄) が達成されるように再び、洗浄ステップを繰り返した。250 μLの透析したKPL (μ鎖特異的) ビオチン化抗ウシIgM (標準希釈バッファ中で0.3 μg / mL) を使用してサンプル壁から溶液中に戻すためにビーズを洗浄した。ビーズは、ビオチン化抗体とともに室温で10分間インキュベートした。

40

【0229】

サンプルを再び720 μLのPBS - Tween洗浄バッファを用いてスパイクし、磁石上でインキュベートし、最初のサンプルインキュベーションステップについて上述したとおりに洗浄した。フェライトビーズしか含有していないチューブを再び磁場から取り外し、200 μLのHRPSA (標準希釈バッファ中で0.2 μg / mL) を使用してビー

50

ズを溶液中へ分散させ、それらを室温で5分間インキュベートした。最後に、同一プロセスを使用して、サンプルに720 μ LのPBS-Tween洗浄バッファでスパイクし、分散および2分間間隔でビーズを付着させることによって2回洗浄した。次に各チューブへ200 μ Lのルミナル-過酸化物の1:1混合液(Pierce社)を加え、ビーズをこの溶液中に一様に分散させた。

【0230】

全200 μ Lのルミノール-過酸化物-ビーズ複合体を透明分離型ウエル内に移し、イメージングのために12サンプルのcrib内へ挿入した(1サンプルは常にTBについての検査結果が陰性であるプールウシ血清からなる陰性コントロールサンプルであった)。放出された光子は、上述したTOAD(商標)装置上で10分間にわたり捕捉される。陰性コントロールならびにバックグラウンド(4つのバックグラウンドフィールド上の平均シグナルとして決定される)を含む、各サンプルについて観察された数値は、次に自動閾値指定を用いるソフトウェア上で処理した。結果は、プログラムによってMbV陰性または陽性と決定された。陽性は、上述したように2回のリフレックスラウンドで再検査した。この一般的な方法は、当分野において周知の技術による日常の実験がその後に実施されても、または日常の実験によって修飾されてもよい。以下では本明細書に請求した方法において使用するより詳細な典型的な段階的プロトコルについて説明する。

10

【0231】

< 詳細なプロトコル >

当業者は、以下に列挙する詳細なプロトコルステップが本明細書に請求した方法の好ましい実施形態を表すこと、様々なステップ、濃度、量、時間などは日常の実験によって本明細書に請求した方法の範囲内で変更できることを明確に理解する。全血清希釈液は、好ましくは作製するべきで、全検査は1.5 mLのエッペンドルフProtein LoBindチューブ内で実施すべきである。各cribセット(12サンプル)内には、1例の陰性コントロールサンプルを含めた。TBについての検査結果が陰性であったプールウシ血清(1:50希釈液)の280 μ Lアリコートで個別血清サンプルの代わりに使用し、試験されるウシサンプルと正確に同様に処理した。

20

【0232】

陽性コントロールを含めるかどうかは任意であるが、陽性コントロールを用いて定期的に行うことはアッセイ試薬の品質管理試験のためには良い考えである。標準PriTest希釈バッファ(10 mMのPBS、0.1%のBSA、0.05%のProClin)中で作製した0.04 mg/mLのBBSAコンジュゲート化Bangs Biomagビーズの溶液50 μ Lは、1.5 mLのエッペンドルフProtein LoBindチューブ内へ分注した。ビーズを磁石に付着できる量にするためにさらに280 μ Lの希釈バッファを加えた。陽性コントロールは、以下のステップ6(洗浄ステップ)で始まる他のサンプルと正確に同様に処理した。

30

1) 20 μ Lの全ウシ血清(アジ化ナトリウム無含有)を980 μ Lの希釈バッファ(10 mMのPBS、0.1%のBSA、0.05%のProClin)へ、そしてアリコート280 μ Lを1.5 mLのエッペンドルフProtein LoBindチューブへ加えることによって検査対象の各血清サンプルの1:50希釈液を作製する。

40

2) 0.05 mg/mLのESAT-6/CFP-10 Bangs Biomagビーズコンジュゲートのしっかりと分散した溶液70 μ Lを280 μ Lのウシ血清サンプル中にピペットで移し、室温で15分間インキュベートする。各チューブを磁気ウエル内にぴったりと挿入し、サンプルに720 μ Lの洗浄バッファ(10 mMのPBS、0.05%のTween 20)を用いてスパイクする。磁石に曝露させたチューブの側面上でフェライトビーズの凝縮斑である「ピンぞろ」を形成させるためにさらに2分間、磁石上でインキュベートする。

3) L-1000ピペットをチューブ内に挿入して、先端で気泡が観察されるまで平滑で安定した流れの中で底部から液体を吸引することによって、側面に結合したビーズを乱さないようにチューブから液体を注意深く吸引する(全プロトコルを通して、1つのサン

50

ブルに1つのピペットの先端を専用で使用した)。

4) 磁気ウエルからチューブを取り外した後、900 μ Lの洗浄バッファを加え、チューブの壁に接触させたチップからピペット溶液を緩徐に出したり入れたりすることによってビーズを再び溶液内に静かに混合する(発泡を最小限に抑えるように注意を払う)。チューブを磁気ウエル内に戻し、2分間インキュベートする。上述したように結合したビーズを妨害しないように液体をピペットで除去する。全3回の洗浄を行うためにこのステップをもう1回繰り返す(初回スパイクおよびその後2回の洗浄)。

5) チューブを磁気ウエルから取り外した後、希釈バッファ中で0.3 μ g/mLで調製した、250 μ Lの透析したKPLビオチンコンジュゲート化親和性精製ヤギ抗ウシIgM(μ 鎖特異的)抗体を各サンプルに加え、静かに手作業で溶液内に攪拌することによってビーズを分散させる。室温で10分間インキュベートし、磁気ウエル内にぴったりと挿入し、720 μ Lの洗浄バッファでスパイクし、さらに2分間インキュベートする。

6) 上記のステップ4に記載したように、追加の2回の洗浄ステップを用いて、ステップ3と同様に注意深く液体をピペットで除去する。サンプルチューブを磁気ウエルから取り外す。

7) 各チューブに200 μ LのPierce HRP-SA(希釈バッファ中で0.2 μ g/mLで調製した)を加え、ビーズを溶液中に分散させ、室温で5分間インキュベートする。磁気ウエル内にぴったりと挿入し、サンプルに720 μ L洗浄バッファをスパイクし、室温で2分間インキュベートする。

8) 液体をピペットで注意深く除去し、ステップ4で上述したようにさらに2回洗浄する。サンプルチューブを磁気ウエルから取り外す。

9) 1:1の比率でPierce Super Signal West Picoルミノール/エンハンサーとSuper Signal West Pico安定性過酸化物の溶液を調製し、200 μ Lを各サンプルチューブに加える。各チューブの内容物を静かに手作業で攪拌し、ビーズを溶液中に分散させるためにL-200ピペットを用いてチューブの側面へ液体を注ぎ込む。全200 μ L量を各サンプルチューブから透明なプラスチック製分離型ウエルへ移し、12サンプルのcrib内へ挿入する(そのサンプルの1つはプールMb ov陰性血清からなる陰性コントロール(1:50希釈液)である)。

10) 放出された光子は上述したTOAD(商標)装置上で10分間にわたり捕捉し、冷却CCD高分解能カメラを用いて最適化条件下でソフトウェアを用いて分析する。各サンプルおよび陰性コントロールならびにバックグラウンド(4つのバックグラウンドフィールドの平均値として決定)について観察された数値を、リフレックステスト-自動閾値調整Excelシートテンプレート内に挿入する。各サンプルについての結果は、Excelテンプレートにおいてアルゴリズムによって分析され、Mb ov陰性または陽性の指定が与えられる。この初回ラウンドのスクリーニングにおける陽性は、上述したように正確に再検査される(リフレックステスト#1)。この第2回検査ラウンドの陽性は、陽性状態(M.ボビス感染)を確認するために最後の1回(リフレックステスト#2)で試験される。

【0233】

< 結果 >

PriTest高速診断テストおよびリフレックス・サブリメンタルテストを用いて入手された3回の感受性および特異性盲検試験からの結果は、1つの99サンプル試験にプールされた。初回スクリーニングの結果は表10に示されている。アッセイは、70 μ LのフェライトコンジュゲートGW ESAT、0.04 mg/mLのプロープ、10 mMのPBS、0.05%のTween 20洗浄バッファ、0.3 μ g/mLのIgM、10 mMのPBS、0.1%のBSA、0.05%のPC抗体溶液、0.2 μ g/mLのHRPSA、10 mMのPBS、0.1%のBSA、0.05%のPC、および15、10、5分間のインキュベーションサイクルを用いて上述したように実施した。3回の検査は、88の平均感受性、84の特異性、0.94のROC、52のPPVおよび96のNPVを示した。11例の血清および1例の陰性コントロールの単一cribセットについて

10

20

30

40

50

の代表的な画像は、図 15 に示されている。

【0234】

リフレックス・サプリメンタルテストの長所は、表 13 に示されている。リフレックス・サプリメンタルテスト方法が、入手される偽陽性検査結果の数を減少させることは明白である。血清を対象とする 500 回を超える試験が完了している。およそ 20 例の陽性サンプルおよびより多くの陰性血清サンプルが、アッセイの有効性に影響を及ぼす因子を同定するために 1 : 50 の希釈率で使用されてきた。以下では所定のこれらの因子について考察する。

【0235】

< Mbv 検出に温度が及ぼす作用 >

温度がアッセイに及ぼす作用は、結果を有意に変化させることがある。低温（約 4 ）および高温（約 37 ）はどちらも、陽性および陰性血清サンプルを相互から識別することをはるかに困難にする。高温では、陰性血清を含む全サンプルは極めて強力に反応すると思われるので、極めて多くの光線が生成され、シグナルは本質的に識別不能になる。低温は、陰性および陽性血清どちらについてもシグナル消失を伴う全く正反対の作用を及ぼす。好ましい温度は、極めて室温に近い温度（約 25 ）であると思われる。

【0236】

< Mbv 検出に pH が及ぼす作用 >

限定された分析に基づく、最適のシグナルは約 pH 7.4 で検出された。pH を 4.0 へ低下させると、陽性血清についてのシグナルの顕著な減少が生じた。

【0237】

< ビオチン化二次抗体 >

本アッセイでは、ビオチン化 IgY 抗ウシ IgG、ビオチン化ヤギ IgG 抗ウシ IgG およびビオチン化ヤギ IgG 抗ウシ IgM を含む多数のビオチン化二次抗体が試験されてきた。組み合わせについてもまた試験されている。個別および組み合わせ試験は全部が陽性および陰性血清を様々な程度に識別することに成功したが、使用するのが最も単純で現在最適化されている抗体は、ビオチン化ヤギ IgG 抗ウシ IgM であった。0.2 µg / mL の HRP __ SA を含む最適濃度は、標準希釈バッファ中で 0.3 µg / mL の IgM であった。

【0238】

< プロテイン A の干渉 >

プロテイン A を含んでいないフェライトビーズコンジュゲートを調製するために大きな努力が費やされてきた。プロテイン A は、偽陽性検査結果および / または高度のバックグラウンドを生成してアッセイ発生を実質的に干渉することが見出された。Rec Ag コンジュゲーション中に溶媒もしくは基質中に存在するプロテイン A は微量でさえ、ビオチン化抗体およびウシ血清抗体と強度に反応するビーズを生じさせた。微量汚染により、陰性コントロールについてのバックグラウンドシグナルは、陽性血清検査結果と同等以上に明るくなる。

【0239】

プロテイン A は、抗体精製スキームのために一般に使用され、抗体と共溶離させられることが多いので排除すべきであり、さもなければ偽陽性シグナルが観察される。これは、プロテイン A は Fc および Fab（少ない程度に）の両方に結合して他の抗体への架橋を可能にするために、抗体の使用法とは無関係に言えることである。

【0240】

抗体をフェライトビーズへコンジュゲートしなければならず、混合液中にプロテイン A を有する場合は、プロテイン A の一部は最後に抗体と一緒にフェライトビーズ上に残る。本発明者らはフェライト上の抗体反応を典型的には一次抗体が認識したものと同一もしくは連結した標的に対するビオチン化抗体との抗体 - 抗原相互作用として検出するので、（ルミノールとの HRP SA 反応によって）獲得された任意のビオチンは、一次抗体がエピトープを獲得していた確証であると推定される。フェライトビーズ上のプロテイン A およ

10

20

30

40

50

び感受性検出器を用いると、プロテイン A はビオチン化二次抗体の一部を捕捉し、一次抗体に何が発生したのかとは無関係にアッセイ終了時に光検出を生じさせる。エピトープの不存在下では偽陽性が検出される。

【0241】

抗体がビオチン化され（二次抗体検出器であると意図されている）、プロテイン A が存在する場合は、プロテイン A の一部はビオチン化され、それがビオチン化抗体の F c および F a b と結合するので、透析後にさえ試薬中に残留する。プロテイン A は、エピトープが存在しない場合でさえ、それらを連結している 2 つの抗体間で架橋できるので、ビオチン化抗体はフェライト上で抗体に結合（またはニトロセルロース上でスポット化）して、同様に偽陽性検出を生じさせる。

10

【0242】

< プロテイン A を除去するための抗体透析 >

低 pH では、プロテイン A の抗体に対する親和性は劇的に低下する。本発明者らは、10 mM のグリシン (pH 2.8) 透析液を使用し、100 kD 膜カットオフを備える透析チューブ内へ抗体を配置することによって解離を駆動し、透析液中でタンパク質に膜を通過させて捕捉するためにグリシンヘカチオン樹脂を加える。典型的には、膜チューブ (float analyzer) 内の 5 mL の抗体に対して 1 リットルの交換を行う、1 g の強力カチオン交換樹脂を pH 2.8 のグリシンに加え 16 ~ 24 時間にわたり透析を実施して 2 ~ 3 リットルの交換を実施する。透析液を pH 7.4 の 10 mM の PBS リットルに切り替え、さらに 16 ~ 24 時間透析を継続して 2 ~ 3 リットルの交換を実施する。そこで、グリシンバッファ (pH 2.8) 中の比率は 200 : 1 × 3、さらに PBS 媒質中でも同一である (100 万倍の初回および 100 万倍の第 2 回の交換比)。ビオチン化抗体を用いて作業をする場合は、10 mM の PBS、0.1 % の BSA、0.05 % の Procaine (抗微生物阻害因子) 溶液を第 2 セットの交換のために使用する。これは、フェライトビーズのコンジュゲートもしくはビオチン化のための準備が整っている PBS 中の第 1 実施例およびアッセイ作業のための適切なレベルへ希釈するための準備が整っている第 2 実施例において、極めて純粋な抗体を生じさせる。

20

【0243】

< サイズが 10 kD ~ 100 kD のタンパク質からのプロテイン A の除去 >

このカテゴリーに含まれるタンパク質は、通常はエピトープである。プロテイン A が存在する場合は、プロテイン A が抗体へ非特異的に結合するので、そしてエピトープがプロテイン A によって汚染されていると推定されるので、イムノアッセイは正しく機能しない。プロテイン A へ結合させるために、結合が強力である pH で抗体を使用する。第 1 ステップは、タンパク質溶液に、好ましくはビオチンを含んでいない適切な IgG 抗体をスパイクするステップである。これはさらに、アッセイにおいて一般に使用される抗体とは異なるファミリー由来の抗体でなければならない。抗体は、典型的には pH 7.4 の PBS 溶液中でタンパク質溶液と 30 分間インキュベートする。次に濾過し、100 kD の膜フィルタ (例 Amicon 100 kD フィルタ) を用いて濾液が収集する。47 kD のプロテイン A は、通常はフィルタを通過するが、それに抗体が結合している場合は通過しない。当該のタンパク質はこのフィルタを通過するので、プロテイン A を含まずに収集される。収集したタンパク質は、pH 7.4 の PBS に対して透析する。

30

40

【0244】

典型的な例は、約 27 kD である CFP10ESAT6 である。用量 1 mL の融合タンパク質の 500 µg/mL の溶液を 50 µL のヤギ抗マウス IgG 抗体 (0.7 µg/mL) でスパイクし、30 分間インキュベートする。この溶液を Amicon 100 kD フィルタへ移し、遠心分離機上に配置し、濾液を収集する。回収濾液量は約 1 mL である。濾液は 10 kD の膜を備える 1 mL の透析チューブへ移し、1 L の 10 mM の PBS (pH 7.4) 溶液中へ入れ、24 時間にわたり透析して 3 回交換する。次に新しく単離した融合タンパク質を修正プロトコルでフェライトビーズへコンジュゲートさせる。

【0245】

50

< バッファおよび他の試薬からのプロテイン A の除去 >

多くの市販試薬がプロテイン A で汚染されている。全試薬は、プロテイン A が不注意にこれらの時点に混合液中に戻ってこないことを確実にするために、コンジュゲートステップを作動させる前に、30 kD Amicon フィルタに通して濾過する。例えば、コンジュゲート前のフェライトビーズの MES 洗浄ステップでは、およびビーズ活性化のために EDC および NHS 試薬を調製する際には、MES を事前に濾過する。クエンチングおよびその後のビーズの安定化のためにも、濾過した溶液もしくは清潔な溶液を使用する。

【0246】

< 血清サンプルにおける変動性 >

Mbv アッセイを開発する際の 1 つの困難は、サンプル分析における顕著な変動性に関連していた。同一サンプルを繰り返し試験した場合でさえ、陰性コントロールのプールに比較して比視感度における相当に大きな変動が頻回に観察された。変動問題を最小限に抑えるために多数の技術的修飾および方法の改良が開始されたが、それでもまだ任意の所与サンプルについては絶対 RL 値に関して再現性が不良であった。しかし最終的には、陰性血清および陽性血清は、陽性血清が陰性コントロールとして使用された陰性プール血清を永続的に大きく越えている限り相違する挙動を示すが、他方検査結果の高い陰性血清が一貫して高い検査結果を示すわけではないので、リフレックス・サブリメンタルテストによって排除できることが理解された。

【0247】

一般に、陽性血清についての閾値が、試験される複数の陰性血清についての平均値よりおよそ 1.6 標準偏差高く設定された場合には、極めて再現性の結果が達成されることが見出された。この閾値では、単純な非フレックススクリーニング（例えば、表 10）では、感受性は 88% および特異性は 84% であった。分析における何らかの考えられる偏りを回避するために、99 サンプル全部について無作為割り付けおよび盲験プロトコルを用いて試験した。陽性血清の一部は極めて弱い陽性であるように見えたが、それでも初回スクリーニングおよびサブリメンタル・リフレックステストの両方で検出された。初回スクリーニングとサブリメンタル・リフレックステストとの比較は表 10 に示されている。極めて低い流行状態では、100% 未満の特異性を備える任意の試験は多数の偽陽性を生じさせ、陽性予測値をほぼ無用のものにすることを理解することが重要である。リフレックス・サブリメンタルテスト戦略を採用することによって、各回毎に試験される動物のプールが豊富になって集結したので、提供される感受性が高くなった。これは、偽陽性を排除して、確信を持って真に感染した動物を同定することを可能にする。

【0248】

本アッセイを最適化した決定因子の一部は、洗浄溶液中での 0.05% の Tween の使用およびエップンドルフ LoBind チューブの使用に関連している。プラスチック製容器の表面上への極めて少量ではあるが予測不能な量の吸着は変動性の原因となっていたが、これを LoBind フォーマットでは低下させることができた。可能性のあるビーズ消失についての証拠を見出すために相当に大きな努力が費やされたが、これは観察された変動における重大な要素ではなかったと思われる。

【0249】

< ROC 曲線 >

データは、任意の試験閾値位置が変動するにつれた感受性および特異性における変動を考慮に入れている ROC（受信者動作特性）曲線と呼ばれるまた別の統計学アプリケーションによって分析することもできる。試験がいかに有用であるのかは、真陰性と真陽性の 2 つの集団間を識別するとき、ROC 曲線下面積を試験することによって特徴付けられる。面積が 0.5 に近いほど検査結果は不良であり、1.0 に近いほど検査結果は良好である。本明細書に開示した高速診断テストを用いた 1 回の初回スクリーニング後の ROC 曲線下面積は、0.94 である（図 16）。

【0250】

< 陽性予測値および有病率 >

C a u d a l F o l d法、B o v i g a m法について報告された感受性および特異性値、ならびに本明細書に開示したリフレックス・サブリメンタルテストを用いて試験した99例の無作為化畜牛血清におけるアッセイ結果を用いた、使用した方法に基づく陽性予測値(P P V)の直接比較は以下に示されている(図18)。所与の有病率に対して高いP P Vを示す試験は、どの動物が感染しているのかをより正確に予測する。陽性予測値は、式：

(群中の全真陽性血清数 - 非検出真陽性数) / 検査において検出された全陽性数
によって計算される。

【0251】

本明細書に請求した方法が、陽性予測値において現行のアッセイ法であるB o v i g a m法およびC a u d a l f o l d法より優れている点は、図18から明らかである。リフレックス・サブリメンタルテストを用いると、高特異性(99%)のために、低有病率試験環境において予測される偽陽性の大部分は、本明細書に開示したリフレックス・サブリメンタルテスト方法による偽陽性検査結果の数の減少によって明示されるように、間違っ

10

【0252】

< 結論 >

本明細書には、マイコバクテリウム・ボビスに陽性感染した畜牛と未感染畜牛とを組換え体を用いて識別する高速(4時間未満)法が開示されている。99サンプルのスクリーニングは、88%の感受性および84%の特異性を生じた。閾値を調整することによって、本試験は約74%の特異性で陽性感染動物の100%を捕捉するように設定できる。

20

【0253】

リフレックス・サブリメンタルテストは、偽陽性検査結果を減少または排除することによって改良された結果を生じさせる。本方法は、感受性(88%)における何らの変化も伴わずに特異性を99%へ増加させるためにほんの少数回の追加の試験しか必要としない。P P Vに基づく、本明細書に開示したリフレックス・サブリメンタルテスト方法は、現在当分野において知られている最も正確な試験であるB o v i g a m法またはC a u d a l f o l dテストのいずれよりも優れている。本方法は、より高速ではるかにより安価であり、実施するための技術的要件を必要としないので、畜牛におけるM . ボビスを根絶するための有用なツールである。

30

【0254】

必要とする唯一のサンプルは血清であるので、1回の訪問およびサンプルが、動物が感染しているかどうかを決定するために必要な情報を提供できる。血清は、試験を開始する準備が整うまでの不明確な期間中は冷凍保存することができる。適切と思われる場合は、血液のサンプリングにおける動物の免疫反応を変化させる懸念なしに反復検査を実施できる。

【実施例2】

【0255】

< 病原体の検出方法 >

本方法、組成物および装置は、C P 1 0 _ E S A T融合タンパク質アッセイを用いて、結核感染動物の効果的かつ高速の同定および単離を可能にする。そのようなアッセイでは、マイコバクテリウム・ボビスの1つまたは複数の抗原性エピトープを提示する合成タンパク質もしくはペプチドが、M . ボビスに感染していることが疑われる動物由来の血液、血清または血漿と反応させられる。抗体の標的抗原への結合は、その動物がM . ボビスに感染していることを指示する。使用したC P 1 0 _ E S A T融合タンパク質はヒトなどの他の種に感染することが知られているマイコバクテリア種と免疫交差反応性を提示するので、当業者は、ヒト、野牛、シカ、またはマイコバクテリア種に対する潜在的キャリアであることが知られている他の動物などの他の種における結核を検出するために同一組成物、装置および方法を使用できることを明確に理解する。C P 1 0 およびE S A Tと同種であるタンパク質は、様々なマイコバクテリア種に対して周知の抗原である(例えば、v a

40

50

n Pittius et al., Genome Biology 2(10), 2001)。タンパク質チップ、Grabber(商標)スライドまたは磁気ビーズなどの基質に付着させたCP10-ESAT融合タンパク質を用いると、感染宿主血液中に存在する抗マイコバクテリア抗体もまた基質へ結合する。適切な洗浄ステップ後に、サンプル中の抗マイコバクテリア抗体の存在は、例えば、市販で入手できるビオチン化抗ウシ抗体の添加によって、そして次に上記で考察したようにコンジュゲート化HRP-SA、過酸化物およびルミノールを用いる化学発光アッセイによって検出できる。

【0256】

ウシ血清の33サンプルの予備セットは、上記で開示したプロトコルを用いて、盲験法で試験した。アッセイ条件下では、偽陰性検査結果はゼロであった。33例の盲験サンプル中、第1ラウンドのアッセイでは4例の偽陽性検査結果が入手された。初回ラウンドで検査結果陽性であった各サンプルには、より高感受性で同一アッセイを用いて、リフレックス再検査にかけた。リフレックス再検査後、偽陽性の数はゼロに減少した。感受性対特異性を分析するROC曲線は、本アッセイが約70%の特異性で本質的に100%の感受性を入手でき、他方100%特異性は約70%の感受性で入手されることを示している(例えば、表12および図16を参照)。リフレックスサンプル試験を100%感受性および70%特異性で実施することによって、実質的に全部の偽陽性検査結果を排除することが可能になる。

10

【0257】

当業者は、本明細書に開示したリフレックス・サブリメンタルテスト法が結核の検出に限定されず、適切なリガンドおよび/またはプローブを入手できる限り、実質的に任意のタイプの病原体、汚染因子、バイオハザード、生物兵器、疾患細胞もしくは他の状態を検出するために使用できることを明確に理解する。この特定の典型的実施形態では、本方法は、約100%の感受性および約70%の特異性の条件で同一アッセイを用いて、全陽性サンプルを対象にサブリメンタル・リフレックステストを実施するステップを開示している。これらの条件下では、実質的に偽陰性検査結果は生じない。このため、繰り返しリフレックステストの各ラウンドは、陽性検査結果プールから真陰性被験者の約70%を排除する。以前のラウンドで検査結果が陽性であったサンプルだけに適用する反復リフレックステストの4ラウンドの使用は、感染した動物を検出する際に100%に近い正確度を生じさせるはずである。例えば、70%特異性での4サイクルの繰り返し検査は、 $0.3 \times 0.3 \times 0.3 \times 0.3$ 、または1%未満の偽陽性率を生じさせる。5サイクルの使用は、約0.25%の偽陽性率を生じさせる。6サイクルの使用は、0.1%未満の偽陽性率を生じさせる。さらに、リフレックステストは陽性サンプルについてのみ実施されるので、実施されるアッセイ数は各サイクル毎に急速に減少し、100%に近い試験正確度を達成するための高速、効率的および安価な方法を生じさせる。リフレックス・サブリメンタルテスト戦略は、数時間以内に感染した動物への明確な経路を提供するので、感染動物が群に再び入って他の動物を感染させることは決してない。

20

30

【0258】

米国およびヨーロッパなどの先進諸国では、群内での感染動物のパーセンテージは相当に低い。1,000頭中1頭の感染率が推定されている。

40

【表 3】

事象	観察
1,000頭の畜牛中1頭がMBに感染している可能性がある	1頭のMB感染動物 999頭の非感染動物
98%の感受性および特異性についての検査結果	20頭の「偽陽性」 <u>真陽性</u> 50頭毎に49頭が検出される
予想される結果	検査結果が陽性であった21頭全部について、その動物が群に戻って他の動物を感染させないことを前提とするために、1頭の感染動物を見つけるための確認試験を使用しなければならない。

10

【0259】

実験室設定において一貫して98%の感受性および98%の特異性を生成するアッセイを使用したと想定されたい。これはほとんどの標準によって極めて良好であると考察される。しかし1頭の感染動物(1,000頭中1頭の動物が感染)を見つけるために多数の陰性動物がスクリーニングされる上記の実施例では、非感染動物中20頭が偽陽性の検査結果を生じると予測される。本発明者らは、高い感受性および特異性だけが効果を出すのではないことを見ている。本発明者らは、感染した動物が偽陰性として検出されずに群へ静かに戻ってしまわないことを前提にして、その群内の21頭の動物が陽性と測定されることを予想する。陽性動物50頭毎に1頭が洩れ出てしまい、98%の感受性でその群を再感染させる。本発明者らは、21頭中のどの1頭が真に感染しているのかを同定する方法が分からない。そこで次は、この問題を処理するためにこれらの21頭の動物にはるかに高価な確認試験を実施しなければならない。

20

30

【0260】

群のサイズが10,000頭で感染動物が1頭である場合は、初回通過は201頭の陽性を提供するはずである。そして群内の感染動物の数が増加するにつれて、多数の偽陰性検査結果が発生する。検出されなかった動物は、群に再び戻って群内の他の動物を感染させる。

【0261】

1回の検査では、100%の確実性で感染した動物を効果的に分離するために必要なレベルの感受性および特異性を一貫して生じさせることは決してできない。リフレックス・サブリメンタルテストは、陽性を検出するための閾値は陽性感染動物の100%を捕捉するために十分に低く設定されているので、故意に偽陽性が予測される閾値で検査を実施するステップを含む。次に同一アッセイにおける初回ランで陰性通過しなかった動物全部を第2バッチにおいて試験することによって、第2バッチの真非感染動物を安全に解放できる。このプロセスは、真陽性単離体だけが確認されて迅速に感染動物に集中するまで連続ステップで継続できる。本方法は、原理的には、単回ステップアッセイよりはるかに効果的である。

40

【0262】

特異性が、100%感受性を予想できる閾値より中等度に高い場合は、極めて多数の動物が各ランにおいて解放される。1本の血清チューブで十分であり、「陽性」検査結果動物にのみ検査が繰り返される。感受性は100%であるので、初回ランで陽性検査結果が出たが第2もしくは第3回ランで陰性検査結果であった動物は、真に非感染動物として安

50

全に解放できる。本明細書に開示した典型的なアッセイは、100%感受性についての閾値として70%特異性を提供する。本発明者らは、計算によって群内の1,000頭中での陽性感染動物数を得ることができる。例示によって、計算は10,000頭の動物数について示されている。

【0263】

【表4】

リフレックス・サブリメンタルテスト	観察	
	感染または「陽性」	「陰性」として解放
1,000頭の畜牛中1頭がMBに感染している可能性 がある	1頭のMB感染動物	999頭の非感染動物
初回スクリーニングテスト	300	700
リフレックス#1	90	210
リフレックス#2	27	63
リフレックス#3	8	19
リフレックス#4	2	6
合計	427	998頭の非感染動物

10

20

【0264】

各動物についての血清は保持され、それが検査結果陽性である場合にのみリフレックステストされる。1,000の群サイズから2頭の動物を分離するための検査総数は1128回であり、全試験を完了するために各動物について1mL未満の血清で十分過ぎるほどである。各パス毎に多数の動物が解放されるので、2分の1の確率へ感染動物を分離するために必要な追加検査は128回に過ぎない。10,000頭の群サイズで2頭の動物をスクリーニングおよび選択するために必要であるのは、6種のリフレックステスト方法および11,285回の検査だけである。本発明者らは、初回スクリーニングにおいて7,000頭の動物を解放できると予測する。

30

【実施例3】

【0265】

< TBの検出についてのその後の検査 >

診断学の分野における多数の技術的進歩にもかかわらず、現在までに、最小能動性マイコバクテリア感染さえ診断するための高速で安価かつ正確な手段は存在しない。他の検査より優れた単独試験は存在せず、それらは全部が、感受性または特性が欠けていて、一般に不良である。Zahrani et al. (Am. J. Respir. Crit. Care Med., Volume 162, Number 4, 2000, 1323-1329)は、60例の能動性TBを診断するための典型的所見を報告している。以下の検査の感受性および特異性は、各々、マイコバクテリア培養法73%および100%; PCR法42%および100%; 胸部X線検査法67~77%および66~76%; ツベルクリンテスト法94%および20%; ならびに血清学検査法33%および87%である。ツベルクリンテストは現在、潜伏性疾患を検出できる唯一のテストであるが、本方法によって多数の偽陽性検査結果が生じる。

40

【0266】

マイコバクテリア感染に対する循環中抗体を検出できる血清学的アッセイについては長年に渡り持続性の研究が行なわれてきたが、ラテラルフローまたはELISA法を用いた結果は一般に不良である。血清学的検査は、一般に他の方法に比較して高速であり、試験するための材料をほんの少量しか必要とせず、能動性疾患を有する患者からさもなければ感染組織(例えば、唾液サンプル)を取り扱うヒトに感染する感染する機会を最小限に抑

50

えるために、魅力的である。血清検査は、さらに、潜伏性非能動性疾患の検出可能性もまた提供するので、早期に治療することができ、将来の合併症および1つの個体から他の個体への広がりを最小限に抑える。これは、急激にTBで死亡してしまう、そして感染を他の接触者へ広げる可能性があるHIV TB感染患者において特に興味深い。

【0267】

循環中マイコバクテリア抗体がそのようにとらえどころなく検出を免れる理由は、正確には不明である。多くの仮説がある。本開示に示した典型的な方法、組成物、イメージングソフトウェアおよび機器は、ヒトTBに密接に類似する疾患（畜牛やアナグマに感染するM.ボビス）において使用した場合に、すでに抗体は豊富に存在すること、そして能動形および潜伏形の疾患を容易に検出できることを高い感受性および特異性で証明した。M.ボビス（Mb v）血清学的検査は、ヒトにおけるTB血清学的検査と同様に、歴史的に感染動物を正確に検出して非感染動物から識別することに失敗してきた（Wood, P. R. and Rothel, J. S. *In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis*, 1994, *Vet. Micro*, 40: 125 - 135）。同一の方法、組成物および装置を用いて、ヒトTBのための高速、正確および費用効果性の試験を達成できる。

10

【0268】

マイコバクテリウム・ボビス（Mb v）感染のために本明細書に開示した典型的な実施形態は、畜牛におけるTB感染の広汎なスクリーニングのための理想的な血清学方法を提供する。これは、アナグマの試験においても良好に機能することもまた証明されている。本試験は、初回スクリーニングのためには2時間未満で高度に正確な結果を生じさせると思われ、高レベルの技術的専門性を必要としない。血清のリフレックス・サブリメンタルテストを用いて、最小の偽陽性を生じるために感受性および特異性の両方を最適化することが実施される。同一方法を使用して、たった1滴の血液を用いてヒトにおけるTBを高い特異性および感受性で検出できる。

20

【0269】

TBについてアナグマ血清を試験するためにMark Chambers（VLA）との共同研究を実施した。本試験は、Mb vについての培養によって確認されたアナグマをMb v抗体について陽性または陰性のどちらかであると識別することが可能であることを証明した。Mb v培養陽性アナグマは、MPB83およびCFP10__ESAT6（融合タンパク質）を含む様々なエピトープに対する抗体を生成する。

30

【0270】

抗体をベースとするアッセイを使用して、非感染および陽性感染アナグマが同定された。H & Eおよび培養で確認されたMb v陽性および非感染（陰性）アナグマからのサンプルアナグマ血清に基づいて最適化の結果が入手され、報告された。陰性コントロール試験および参照値は、捕らえられた、決して感染していないことが既知であるアナグマを試験することによって入手した。マイコバクテリア抗原に対する抗体を検出するための一般的スキームは、図25に示されている。

【0271】

フェライトエピトープコンジュゲートを使用して、Mb vが血清中に存在する場合は、Mb vに対する抗体が同定および単離される。ヒトにおけるTBを検出するためにも同一試験を使用できる。コンジュゲートは、希釈血清と一緒に30分間インキュベートされる。次に磁気ポートでフェライトが収集される。使用された希釈血清は廃棄される。

40

【0272】

フェライトコンジュゲートは、残留する微量のアナグマ血清を除去するために洗浄される。それらは再び収集され、アナグマ（または畜牛）抗体に対する抗体を備える溶液中に懸濁させられる。コンジュゲートに付着した抗体は、溶液にビオチン化ウサギ抗マウスまたは抗ニワトリ抗体を加えることによって検出される。

【0273】

20分後に、フェライトコンジュゲートは再び収集され、洗浄され、次にホースラディ

50

ツシュペルオキシダーゼ中に10分間懸濁させられる。フェライトは収集され、2回洗浄され、ルミノール過酸化物中に懸濁させられる。次にルミノール過酸化物フェライトコンジュゲートは、イメージングのためにハニカムカセットへ移される。

【0274】

2つのエピトープが試験された。MPB83を使用して、英国内の研究者によって提供された極めて多数のアナグマおよび畜牛における全血清中で試験した。本発明者らは、さらにMPB83についての検査結果陽性であったワクチン接種および非ワクチン接種アナグマ血清中でCFP10__ESAT6について試験した。アッセイは、最初に培養、H & E および剖検に基づく極めて正確な指定を用いて最適化され、その後の盲検において血清分析単独による結果が疾患指定について陽性および陰性と正確に相関していることが証明された(表5参照)。

10

【0275】

各サンプルの視感度は、バックグラウンドおよびカセット内の他のサンプル各々と比較して測定した。エピトープに対する抗体を同定するために、Mb v についての培養陰性である処理されたアナグマ(または畜牛)サンプルについてのシグナル強度をMb v について培養陽性であるアナグマについてのシグナルに対して測定した。

【0276】

MPB83フェライトコンジュゲートは、人工的に感染した、ワクチン接種した捕らえられたアナグマを正確に同定すると思われる。これは、適切な抗体組み合わせを用いて畜牛においても証明された。BCGがアッセイにおいて干渉を引き起こす確率を詳細に決定するために、本発明者らは、それまでに一度も人工的に感染したことがなかった、ワクチン接種した捕らえられたアナグマからの血清サンプルを要請した。フィールドアナグマ試験における陰性コントロール血清サンプルとして、BCGワクチン接種したが一度も感染したことの無い捕らえられたアナグマ血清を含めたが、これは群中1例を除いて、他の陰性血清から識別可能であった。これは、フェライトプローブ上のMPB83抗原が依然として感染動物とBCGワクチン接種非感染動物とを識別することを強く証明している。

20

【0277】

3種の機器上で、3人の相違するオペレータによって、盲検試験におけるほぼ半分で1,500例超のアナグマサンプルを試験した。感受性および特異性はどちらも、一貫して0.95~1.0の間のROC面積を備える単純スクリーニングにおいてほぼ90%であった。

30

【0278】

英国で試験された畜牛血清の冷凍アンブルは、Martin Vordermeier社(英国)によって、皮膚テストおよび培養結果に基づく指定を備えて提供された。畜牛血清は、MPB83もしくはCFP10__ESAT6どちらかのフェライトコンジュゲートに基づいて感染について陽性または陰性のどちらかであると迅速に同定された。畜牛の試験で入手された特異性および感受性の種類は、最適化プロトコルに基づいて図26に示されている。

【0279】

【表 5】

表5：Mb vに感染した畜牛およびアナグマについてのスクリーニングおよびR S T e
s t 結果

	感受性	特異性	PPV	NPV	ROC
スクリーニング					
畜牛 CFP10_ESAT6	94	84	55	99	0.94
畜牛 MPB83	90	96	97	89	0.98
アナグマ MPB83	95	93	86	89	0.96
サブリメンタル・リフレックス					
畜牛 CFP10_ESAT6	88	99	94	96	n/a
アナグマ MPB83	85	100	100	79	n/a

【0280】

<リフレックス・サブリメンタルテスト：>

1回の試験で、優れたアッセイ方法においてさえ発生することが予測される偽陽性の数を最小限に抑えるために必要とされるレベルの感受性および特異性を一貫性で生成することはできない。リフレックス・サブリメンタルテストは、陽性を検出するための閾値が陽性感染動物の100%を捕捉するために十分に低く設定されているので、アッセイのスクリーニング部分中に偽陽性が予測されて容認される閾値で試験を慎重に実施するステップを含む。これは、統計学に基づいて、正確に反応陽性者を同定することを改良するために実施される。スクリーニングにおける全陽性サンプルのリフレックス・サブリメンタルテスト(R S T e s t)は、スクリーニング特異性を特徴とする比率で偽陽性を反復して排除する。この方法で、真陽性血清が維持されて同定され、その間に偽陽性サンプルはその後の試験において疾患について真陰性であることが証明される。本発明者らは、不正確に指定される陽性数を最小限に抑えながら、本試験方法が真陽性を同定する際に最も効率的であることを見いだした。現在開示されたアッセイにおける高い特異性および感受性を用いると、理想的な試験結果のために必要な繰り返し数は相当に少なくなる。ヒトにおけるTBを検出するための試験において、同一方法を使用できる。

【0281】

1,500頭を超える畜牛の試験が実施され、アッセイ最適化プロトコルにおいて多くの改良が加えられた。フェライトコンジュゲートのための抗体および抗原の適正な選択が重要である。本発明者らは、所定のタンパク質が血清の試験においてどの程度強度に干渉し得るかについて理解できるようになった。例えば、プロテインAは、フェライトプローブに付着したときに抗原に極めて低レベルで付随する場合でさえ、試験がほぼ無益となるほど大きな干渉を引き起こす。これらの種類の汚染因子を排除するための適切なステップを使用しなければ、多数の偽陽性検査結果が見られる。大多数の抗体は、プロテインAカラム上で、多くの研究者が問題が多いと認識できなかった重大な干渉構成成分の1つを導入することで、親和性精製される。これは、ラテラルフロー法およびELISA法がむしろ非感受性検出法である理由を一部には説明できる。

【実施例4】

【0282】

<ヒトTB試験>

本明細書に開示したソフトウェアを備えるCCDイメージングテクノロジーは、アトグ

10

20

30

40

50

ラム (10^{-18}) / mL レベルまで標的タンパク質を一貫して検出できる。フェライトコンジュゲートに付着した適切に選択された抗原を用いると、高度に正確、安価および高速であるヒト TB についての血清学試験もまた提供できる。MPB 83 および CFP 10 — ESAT 6 フェライトコンジュゲートは、疾患ヒト血清について明確に特徴付けられた陽性および陰性サンプルについて試験される。その他の抗原または抗原の組み合わせについてもまた試験できる。畜牛およびアナグマの試験に基づいて、潜伏性および能動性の両方の疾患が、ヒト血清 TB 試験において 2 時間の試験時間内で高度の感受性および特異性で同定される。

【 0 2 8 3 】

本明細書に開示かつ請求した組成物、方法および装置の全部は、本開示を参照すると無用な実験を行わずに作製かつ実行できる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態に関して記載してきたが、当業者には、組成物、方法および装置ならびに本明細書に記載した方法のステップまたはステップの順序において本発明の概念、精神および範囲から逸脱せずに変更を加えられることが明白である。より詳細には、化学的および生理学的両方に関連する所定の物質は、本明細書に記載した物質に置換することができ、それでも同一もしくは類似の結果が達成されることは明白である。当業者に明白なそのような類似の代替形および修飾はすべてが、添付の特許請求項によって規定された本発明の精神、範囲および概念の中に含まれると見なされる。

【 0 2 8 4 】

【表 6 A】

表 6 非限定的な病原体の例示

<i>Actinobacillus spp.</i>	<i>B. canis,</i>	
<i>Actinomyces spp.</i>	<i>B. melitensis</i>	
アデノウイルス (タイプ 1、2、3、4、7)	<i>B. suis</i>	
アデノウイルス (タイプ 40、41)	<i>Brugia spp.</i>	10
<i>Aerococcus spp.</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	
<i>Ancylostoma duodenale</i>	<i>Campylobacter fetus subsp. fetus</i>	
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>C. coli</i>	
<i>Ascaris spp.</i>	<i>C. fetus subsp. jejuni</i>	20
<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Candida albicans</i>	
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Capnocytophaga spp.</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>	
<i>Bacteroides spp.</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	
<i>Balantidium coli</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	
<i>Bartonella bacilliformis</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>	30
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	
ブルータングウイルス	<i>Clostridium difficile</i>	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Clostridium tetani</i>	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Clostridium spp.</i>	
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	40
<i>Brucella spp.</i>	コロラドダニ熱ウイルス	
<i>B. abortus</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	

【表 6 B】

<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Escherichia coli</i> , 腸管病原性	
コクサッキーウイルス	<i>Escherichia coli</i> , 腸管毒素病原性	
クロイツフェルトーヤコブ感染性物質、クールー感染性物質	<i>Fasciola hepatica</i>	
クリミアーコンゴ出血熱ウイルス	<i>Francisella tularensis</i>	
	<i>Fusobacterium spp.</i>	10
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Gemella haemolysans</i>	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Giardia lamblia</i>	
サイトメガロウイルス	<i>Giardia spp.</i>	
デングウイルス (1, 2, 3, 4)	<i>Haemophilus ducreyi</i>	
類ジフテリア	<i>Haemophilus influenzae (group b)</i>	
	ハンタウイルス	20
西(東)ウマ脳炎ウイルス	A型肝炎ウイルス	
エボラウイルス	B型肝炎ウイルス	
<i>Echinococcus granulosus</i>	C型肝炎ウイルス	
<i>Echinococcus multilocularis</i>	D型肝炎ウイルス	
エコーウイルス	E型肝炎ウイルス	
<i>Edwardsiella tarda</i>	単純ヘルペスウイルス	
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Herpesvirus simiae</i>	30
<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
エンテロウイルス 70	ヒトコロナウイルス	
<i>Epidermophyton floccosum</i> ,	ヒト免疫不全ウイルス	
<i>Microsporum spp. Trichophyton spp.</i>	ヒトパピローマウイルス	
<i>Epstein-Barr virus</i>	ヒトT細胞白血病ウイルス	40
<i>Escherichia coli</i> , enterohemorrhagic	インフルエンザウイルス	
<i>Escherichia coli</i> , enteroinvasive		

【表 6 C】

フニンウイルス／マチュポウイルス	オムスク出血熱ウイルス	
<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>	
キャサヌール森林病ウイルス	<i>Opisthorchis spp.</i>	
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Parvovirus B19</i>	
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Pasteurella spp.</i>	10
<i>Leishmania spp.</i>	<i>Peptococcus spp.</i>	
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Peptostreptococcus spp.</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス	<i>Powassan encephalitis virus</i>	
マールブルグウイルス	<i>Proteus spp.</i>	
麻疹ウイルス	<i>Pseudomonas spp.</i>	20
<i>Micrococcus spp.</i>	狂犬病ウイルス	
<i>Moraxella spp.</i>	Respiratory syncytial virus	
<i>Mycobacterium spp.</i>	ライノウイルス	
<i>Mycobacterium tuberculosis, M. bovis</i>	<i>Rickettsia akari</i>	
<i>Mycoplasma hominis, M. orale, M.</i>	<i>Rickettsia prowazekii, R. canada</i>	
<i>salivarium, M. fermentans</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>	30
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ロスリバーウイルス／0' Nyong-Nyongウイルス	
<i>Naegleria fowleri</i>	風疹ウイルス	
<i>Necator americanus</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Salmonella typhi</i>	40
<i>Neisseria spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	
<i>Nocardia spp.</i>	<i>Schistosoma spp.</i>	
ノーウォークウイルス		

【表 6 D】

スクレイピー感染性物質	水痘・帯状疱疹ウイルス	
<i>Serratia spp.</i>	ベネズエラウマ脳炎ウイルス	
<i>Shigella spp.</i>	水泡性口内炎ウイルス	
シンドビスウイルス	<i>Vibrio cholerae, serovar 01</i>	
<i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10
セントルイス脳炎ウイルス	<i>Wuchereria bancrofti</i>	
マレー溪谷脳炎ウイルス	黄熱病ウイルス	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Yersinia pesti</i>	20
<i>Streptococcus faecalis</i>		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
<i>Streptococcus pyogenes</i>		
<i>Streptococcus salivarius</i>		
<i>Taenia saginata</i>		
<i>Taenia solium</i>		
<i>Toxocara canis, T. cati</i>		
<i>Toxoplasma gondii</i>		30
<i>Treponema pallidum</i>		
<i>Trichinella spp.</i>		
<i>Trichomonas vaginalis</i>		
<i>Trichuris trichiura</i>		
<i>Trypanosoma brucei</i>		
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		40
ワクシニアウイルス		

【表 7】

表 7 予測 R S T 数の特異性及び有病率への依存
リフレックス/サブリメンタルテスト-数値計算表

特異性		0.99											
陽性数		1											
偽陰性数		1											
特異性係数 (1-Sp)		0.01											
サンプル #	N	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	合計 試験数	合計 試験数
100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	101
500	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	505
1000	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	1010
2000	2	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	2020
5000	2	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	5050
10000	2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	10100
100000	3	1000	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1010	101010
500000	3	5000	50	0	0	0	0	0	0	0	0	5050	505050
特異性		0.74											
特異性係数 (1-Sp)		0.26											
100	3	26	6	1	0	0	0	0	0	0	0	34	134
500	5	130	33	8	2	0	0	0	0	0	0	174	674
1000	5	260	67	17	4	0	0	0	0	0	0	348	1348
2000	6	520	135	35	9	2	0	0	0	0	0	700	2700
5000	6	1300	338	88	22	6	1	0	0	0	0	1754	6754
10000	7	2600	676	175	45	12	3	0	0	0	0	3510	13510
100000	9	26000	6760	1757	457	118	31	8	2	0	0	35132	135132
500000	10	130000	33800	8788	2285	594	154	40	10	2	0	175672	675672
特異性		0.70											
特異性係数 (1-Sp)		0.30											
100	4	30	9	2	0	0	0	0	0	0	0	41	141
500	5	150	45	13	4	0	0	0	0	0	0	211	711
1000	6	300	90	27	8	2	0	0	0	0	0	426	1426
2000	6	600	180	54	16	4	1	0	0	0	0	854	2854
5000	7	1500	450	135	40	12	3	0	0	0	0	2139	7139
10000	8	3000	900	270	81	24	7	2	0	0	0	4282	14282
100000	10	30000	9000	2700	810	243	72	21	6	2	0	42853	142853
500000	11	150000	45000	13500	4050	1215	364	109	32	9	3	214280	714280

【表 8】

表 8 : CMOS カラーイメージャ用の代替カラーフィルタ

波長範囲(nm)	フィルタのタイプ	修正 Bayer パターン
510-810	イエロー	Y、Y、Y、Y
610-810	マゼンタ	M、M、M、M
490-550	シアン	C、C、C、C
490-810	イエロー、シアン	Y、Y、Y、C
350-550	なし	モノクロパターン

10

【 0 2 8 7 】

【表 9】

表 9 : K o d a k 1 3 1 0 イメージセンサ (6 7 0 n m) についての量子効率および標準化係数

20

フィルタのタイプ	量子効率(%)	標準化係数
イエロー	43	2.38
マゼンタ	44	2.27
シアン	13	7.69
モノクロ(フィルタなし)	28	3.57
レッド	35	2.86
グリーン	5	20.0
ブルー	3	33.3

30

【 0 2 8 8 】

【表 10 A】

表 10 ウシTB S & S 盲検式初回スクリーニング

Obs サンプルについて観察された数値
 BG サンプル間のバックグラウンド数値
 RL 比視感度 (Obs-BG)
 Δ NC 差の数値 (Obs-NC)
 Pos >NC閾値の場合、サンプルは陽性と指定される
 Neg <NC閾値の場合、サンプルは陰性と指定される

	Obs	BG	RL	Δ NC	偽 Pos Neg	真 Pos Neg	非盲検化 指定
14-1	4034	3226	808	-181	0	0	Negative
14-2	4488	3226	1262	273	0	0	Negative
14-3	4651	3226	1425	436	0	0	Negative
14-4	3430	3226	204	-785	0	0	Negative
14-5	4170	3226	944	-45	0	0	Negative
14-6	4260	3226	1034	45	0	0	Negative
14-7	4556	3226	1330	341	0	0	Negative
14-8	3923	3226	697	-292	0	0	Negative
14-9	5205	3226	1979	990	0	0	Negative
14-10	4708	3226	1482	493	0	0	Negative
14-11	4372	3226	1146	157	0	0	Negative
14-12	2041	840	1201	594	0	0	Negative
14-13	1813	840	973	366	0	0	Negative
14-14	1116	840	276	-331	0	0	Negative
14-15	1744	840	904	297	0	0	Negative
14-16	2208	840	1368	761	0	0	Negative
14-17	2784	840	1944	1337	0	0	Negative
14-18	3508	840	2668	2061	0	0	Negative
14-19	2280	840	1440	833	0	0	Negative
14-20	3173	840	2333	1726	0	0	Negative
14-21	2163	840	1323	716	0	0	Negative
14-22	1853	840	1013	406	0	0	Negative
14-23	3713	3713	578	-418	0	0	Negative
14-24	3713	3713	869	-127	0	0	Negative
14-25	3713	3713	1595	599	0	0	Negative
14-26	3713	3713	566	-430	0	0	Negative
14-27	3713	3713	1303	307	0	0	Negative
14-28	3713	3713	1580	584	0	0	Negative
14-29	3713	3713	1463	467	0	0	Negative
14-30	3713	3713	1532	536	0	0	Negative
14-31	3713	3713	968	-28	0	0	Negative
14-32	3713	3713	1056	60	0	0	Negative
14-33	3713	3713	2269	1273	0	0	Negative

10

20

30

40

【表 10B】

サンプル	Obs	BG	RL	Δ NC	Pos	Neg	偽 Pos	Neg	真 Neg	Pos	非盲検化 指定
16-1	3179	2198	981	182	0		0	0	1	0	Negative
16-2	2561	2198	363	-436	0		0	0	1	0	Negative
16-3	3704	2198	1506	707		0	0	0	0	1	
16-4	2981	2198	783	-16	0		0	0	1	0	Negative
16-5	3352	2198	1154	355	0		0	0	1	0	Negative
16-6	4816	2198	2618	1819		0	0	0	0	1	
16-7	3760	2198	1562	763		0	1	0	1	0	Negative
16-8	3452	2198	1254	455	0		0	0	1	0	Negative
16-9	2952	2198	754	-45	0		0	0	1	0	Negative
16-10	3466	2198	1268	469	0		0	0	1	0	Negative
16-11	4256	2198	2058	1259		0		0	1	0	Negative
16-12	2843	2058	785	-282	0		0	0	1	0	Negative
16-13	3719	2058	1661	594	0		0	0	1	0	Negative
16-14	3705	2058	1647	580	0		0	0	1	0	Negative
16-15	2908	2058	850	-217	0		0	0	1	0	Negative
16-16	4794	2058	2736	1669		0	0	0	0	1	
16-17	3438	2058	1380	313	0		0	0	1	0	Negative
16-18	3540	2058	1482	415	0		0	0	1	0	Negative
16-19	2844	2058	786	-281	0		0	0	1	0	Negative
16-20	4508	2058	2450	1383		0	0	0	0	1	
16-21	3120	2058	1062	-5	0		0	0	1	0	Negative
16-22	2977	2058	919	-148	0		0	0	1	0	Negative
16-23		2188	878	-68	0		0	0	1	0	Negative
16-24		2188	1177	231	0		0	0	1	0	Negative
16-25		2188	1038	92	0		0	0	1	0	Negative
16-26		2188	1146	200	0		0	0	1	0	Negative
16-27		2188	2405	1459		0	0	0	0	1	
16-28		2188	1233	287	0		0	0	1	0	Negative
16-29		2188	2274	1328		0	0	0	0	1	
16-30		2188	271	-675	0		0	0	1	0	Negative
16-31		2188	1372	426	0		0	0	1	0	Negative
16-32		2188	1208	262	0		0	0	1	0	Negative
16-33		2188	1020	74	0		0	0	1	0	Negative

10

20

30

【表 10 C】

サンプル	Obs	BG	RL	Δ NC	Pos	Neg	偽 Pos	Neg	真 Neg	Pos	非盲検化 指定
17-1	4080	3557	523	35	0		0	0	1	0	Negative
17-2	4182	3557	625	137	0		0	0	1	0	Negative
17-3	4164	3557	607	119	0		0	0	1	0	Negative
17-4	4014	3557	457	-31	0		0	0	1	0	Negative
17-5	4020	3557	463	-25	0		0	0	1	0	Negative
17-6	4331	3557	774	286	0		0	0	1	0	Negative
17-7	4581	3557	1024	536		0	0	0	0	1	
17-8	3704	3557	147	-341	0		0	0	1	0	Negative
17-9	3920	3557	363	-125	0		0	0	1	0	Negative
17-10	4162	3557	605	117	0		0	0	1	0	Negative
17-11	4499	3557	942	454		0	0	0	0	1	
17-12	5451	3510	1941	1195		0	0	0	0	1	
17-13	4511	3510	1001	255	0		0	0	1	0	Negative
17-14	4088	3510	578	-168	0		0	0	1	0	Negative
17-15	5142	3510	1632	886		0	0	0	0	1	
17-16	4227	3510	717	-29	0		0	0	1	0	Negative
17-17	4039	3510	529	-217	0		0	0	1	0	Negative
17-18	4914	3510	1404	658		0	0	0	0	0	Negative
17-19	4515	3510	1005	259	0		0	0	0	0	Negative
17-20	4742	3510	1232	486		0	0	0	0	0	Negative
17-21	4222	3510	712	-34	0		0	0	1	0	Negative
17-22	4396	3510	886	140	0		0	0	1	0	Negative
17-23		3442	831	89	0		0	0	1	0	Negative
17-24		3442	1232	490		0	0	0	1	0	Negative
17-25		3442	901	159	0		0	0	1	0	Negative
17-26		3442	927	185	0		0	0	1	0	Negative
17-27		3442	1047	305	0		0	0	1	0	Negative
17-28		3442	1274	532		0	0	0	0	1	
17-29		3442	810	68	0		0	0	1	0	Negative
17-30		3442	549	-193	0		0	0	1	0	Negative
17-31		3442	1353	611		0	0	0	0	1	
17-32		3442	1384	642		0	0	0	0	1	Negative
17-33		3442	1251	509		0	0	0	0	1	Negative
					29	72	13	2	82	17	Totals
感度					94						
特異性					84						
ROC 面積					0.94						
PPV					55						
NPV					99						

【 0 2 8 9 】

【表 1 1】

表 1 1 : 9 C r i b セットについての陰性コントロールの参照視感度

NC	BG	NC_RL	{定数-1}	閾値	Crib セット
4215	3226	989	0.62	613	1
1447	840	607	0.62	376	2
4709	3713	996	0.62	618	3
2997	2198	799	0.62	495	4
3125	2058	1067	0.62	662	5
3134	2188	946	0.62	587	6
4045	3557	488	0.62	303	7
4256	3510	746	0.62	463	8
4184	3442	742	0.62	460	9

10

【 0 2 9 0】

【表 1 2】

20

表 1 2 : M. ボビスに関する 9 9 サンプルの陽性および陰性についての R O C プロット図¹

特異性(%)	感受性(%)	閾値係数
66	100	0.4
74	100	0.5
82	94	0.6
84	94	0.62
85	94	0.66
88	94	0.68
89	94	0.7
89	88	0.8
91	76	0.9
93	65	1
93	53	1.1
94	47	1.2
96	41	1.3
98	41	1.4

30

40

¹ 偽陽性 (%) は 1 0 0 % - 特異性 (%) である。

【 0 2 9 1】

【表 1 3 A】

表 1 3 ウシTB S & S 盲検試験の要約

サンプル	Obs	BG	RL	Δ NC			偽		真		非盲検化 指定
					Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	
14-1	4034	3226	808	-181	0		0	0	1	0	Negative
14-2	4488	3226	1262	273	0		0	0	1	0	Negative
14-3	4651	3226	1425	436	0		0	0	1	0	Negative
14-4	3430	3226	204	-785	0		0	0	1	0	Negative
14-5	4170	3226	944	-45	0		0	0	1	0	Negative
14-6	4260	3226	1034	45	0		0	0	1	0	Negative
14-7	4556	3226	1330	341	0		0	0	1	0	Negative
14-8	3923	3226	697	-292	0		0	0	1	0	Negative
14-9	5513	3711	1802	737		0	0	0	0	1	
14-10	4708	3226	1482	4113	0		0	0	1	0	Negative
14-11	4372	3226	1146	157	0		0	0	1	0	Negative
14-12	5690	3711	1979	914		0	0	0	0	1	
14-13	1813	840	973	366	0		0	0	1	0	Negative
14-14	1116	840	276	-331	0		0	0	1	0	Negative
14-15	1744	840	904	297	0		0	0	1	0	Negative
14-16	5692	3749	1943	741	0		0	0	1	0	Negative
14-17	5659	3749	1910	708	0		0	0	1	0	Negative
14-18	5729	3711	2018	953		0	0	0	0	1	
14-19	5482	3711	1771	706		0		0	1	0	Negative
14-20	6545	3711	2834	1769		0	0	0	0	1	
14-21	5264	3749	1515	313	0		0	0	1	0	Negative
14-22	0	3749	3749	-4951	0		0	0	1	0	Negative
14-23	4291	3713	578	-418	0		0	0	1	0	Negative
14-24	4582	3713	869	-127	0		0	0	1	0	Negative
14-25	5308	3713	1595	599	0		0	0	1	0	Negative
14-26	4279	3713	566	-430	0		0	0	1	0	Negative
14-27	5016	3713	1303	307	0		0	0	1	0	Negative
14-28	52113	3713	1580	584	0		0	0	1	0	Negative
14-29	5176	3713	1463	467	0		0	0	1	0	Negative
14-30	5245	3713	1532	536	0		0		0	1	
14-31	4681	3713	968	-28	0		0	0	1	0	Negative
14-32	4769	3713	1056	60	0		0	0	1	0	Negative
14-33	5425	3711	1714	649	0		0	0	1	0	Negative

10

20

30

【表 1 3 B】

サンプル	Obs	BG	RL	Δ NC			偽		真		非盲検化 指定
					Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	
16-1	3179	2198	981	182	0	1	0	0	1	0	Negative
16-2	2561	2198	363	-436	0	1	0	0	1	0	Negative
16-3	10000	3477	6523	6026	0	0	0	0	0	1	Negative
16-4	2981	2198	783	-16	0	1	0	0	1	0	Negative
16-5	3352	2198	1154	355	0	1	0	0	1	0	Negative
16-6	5346	3477	1869	1372	1	0	0	0	0	1	Negative
16-7	4043	3391	652	157	0	1	0	0	1	0	Negative
16-8	3452	2198	1254	455	0	1	0	0	1	0	Negative
16-9	2952	2198	754	-45	0	1	0	0	1	0	Negative
16-10	3466	2198	1268	469	0	1	0	0	1	0	Negative
16-11	4161	3391	770	275	0	1	0	0	1	0	Negative
16-12	2843	2058	785	-282	0	1	0	0	1	0	Negative
16-13	3719	2058	1661	594	0	1	0	0	1	0	Negative
16-14	3705	2058	1647	580	0	1	0	0	1	0	Negative
16-15	2908	2058	850	-217	0	1	0	0	1	0	Negative
16-16	6229	3477	2752	2255	1	0	0	0	0	1	Negative
16-17	3438	2058	1380	313	0	1	0	0	1	0	Negative
16-18	3540	2058	1482	415	0	1	0	0	1	0	Negative
16-19	2844	2058	786	-281	0	1	0	0	1	0	Negative
16-20	100000	3477	96523	96026	1	0	0	0	0	1	Negative
16-21	3120	2058	1062	-5	0	1	0	0	1	0	Negative
16-22	2977	2058	919	-148	0	1	0	0	1	0	Negative
16-23	3066	2188	878	-68	0	1	0	0	1	0	Negative
16-24	3365	2188	1177	231	0	1	0	0	1	0	Negative
16-25	3226	2188	1038	92	0	1	0	0	1	0	Negative
16-26	3334	2188	1146	200	0	1	0	0	1	0	Negative
16-27	5443	3477	1966	1469	1	0	0	0	0	1	Negative
16-28	3421	2188	1233	287	0	1	0	0	1	0	Negative
16-29	6118	3477	2641	2144	1	0	0	0	0	1	Negative
16-30	2459	2188	271	-675	0	1	0	0	1	0	Negative
16-31	3560	2188	1372	426	0	1	0	0	1	0	Negative
16-32	3396	2188	1208	262	0	1	0	0	1	0	Negative
16-33	3208	2188	1020	74	0	1	0	0	1	0	Negative

10

20

30

【表 1 3 C】

サンプル	Obs	BG	RL	Δ NC			偽		真		非盲検化 指定
					Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	
17-1	4080	3557	523	35	0		0	0	1	0	Negative
17-2	4182	3557	625	137	0		0	0	1	0	Negative
17-3	4164	3557	607	119	0		0	0	1	0	Negative
17-4	4014	3557	457	-31	0		0	0	1	0	Negative
17-5	4020	3557	463	-25	0		0	0	1	0	Negative
17-6	4331	3557	774	286	0		0	0	1	0	Negative
17-7	4455	3511	944	181	0		0		0	1	Negative
17-8	3704	3557	147	-341	0		0	0	1	0	Negative
17-9	3920	3557	363	-125	0		0	0	1	0	Negative
17-10	4162	3557	605	117	0		0	0	1	0	Negative
17-11	10000	2203	7797	7250		0	0	0	0	1	Negative
17-12	4115	2203	1912	1365		0	0	0	0	1	Negative
17-13	4511	3510	1001	255	0		0	0	1	0	Negative
17-14	4088	3510	578	-168	0		0	0	1	0	Negative
17-15	4054	2203	1851	1304		0	0	0	0	1	Negative
17-16	4227	3510	717	-29	0		0	0	1	0	Negative
17-17	4039	3510	529	-217	0		0	0	1	0	Negative
17-18	4324	3511	813	50	0		0	0	1	0	Negative
17-19	4515	3510	1005	259	0		0	0	1	0	Negative
17-20	0	3511	3511	-4274	0		0	0	1	0	Negative
17-21	4222	3510	712	-34	0		0	0	1	0	Negative
17-22	4396	3510	886	140	0		0	0	1	0	Negative
17-23	4273	3442	831	89	0		0	0	1	0	Negative
17-24	0	3511	3511	-4274	0		0	0	1	0	Negative
17-25	4343	3442	901	159	0		0	0	1	0	Negative
17-26	4369	3442	927	185	0		0	0	1	0	Negative
17-27	4489	3442	1047	305	0		0	0	1	0	Negative
17-28	3684	2203	1481	894		0	0	0	0	1	Negative
17-29	4252	3442	810	68	0		0	0	1	0	Negative
17-30	3991	3442	549	-1113	0		0	0	1	0	Negative
17-31	3698	2203	1495	908		0	0	0	0	1	Negative
17-32	4166	3511	655	-108	0		0	0	1	0	Negative
17-33	4373	3511	862	99	0		0	0	1	0	Negative
					16	83	1	2	82	17	
感度		88									
特異性		99									
PPV		94									
NPV		96									

【 0 2 9 2 】

【表 1 4】

表 1 4 修飾および異常アミノ酸			
略称	アミノ酸	略称	アミノ酸
Aad	2-アミノアジピン酸	EtAsn	N-エチルアスパラギン
Baad	3-アミノアジピン酸	Hyl	ヒドロキシリジン
Bala	β -アラニン、 β -アミノ-プロピオン酸	AHyl	アローヒドロキシリジン
Abu	2-アミノ酪酸	3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
4Abu	4-アミノ酪酸、ピペリジン酸	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Acp	6-アミノカプロン酸	Ide	イソデスモシン
Ahe	2-アミノヘプタン酸	Alle	アローイソロイシン
Aib	2-アミノイソ酪酸	MeGly	N-メチルグリシン、サルコシン
Baib	3-アミノイソ酪酸	Melle	N-メチルイソロイシン
Apm	2-アミノピメリン酸	MeLys	6-N-メチルリジン
Dbu	2,4-ジアミノ酪酸	MeVal	N-メチルバリン
Des	デスモシン	Nva	ノルバリン
Dpm	2,2'-ジアミノピメリン酸	Nle	ノルロイシン
Dpr	2,3-ジアミノプロピオン酸	Orn	オルニチン
EtGly	N-エチルグリシン		

【 0 2 9 3 】

【表 1 5】

表 1 5 : スクリーニング結果と R S T 試験結果の比較

	スクリーニング	RST
感受性	94	88
特異性	84	99
PPV	55	94
NPV	99	96
ROC 下面積	0.94	n/a

P P V : 陽性予測値 ; N P V : 陰性予測値

【図面の簡単な説明】

【 0 2 9 4 】

【図 1】C M O S イメージセンサの図である。

【図 2】B a y e r カラーフィルタのモザイクアレイの図である。

【図 3】イメージセンサについて見込まれるフィルタ配列の図である。

【図 4】イメージセンサにおけるマイクロレンズ作動の図である。

【図 5】典型的なイメージセンサの量子効率のグラフである。

【図 6】イメージセンサを最適化するためのキャリブレーションの実施形態を示したフローチャートである。

【図 7】イメージセンサ最適化の実施形態を示したフローチャートである。

【図 8】光散乱検出の図である。

【図 9】英国において 1996～2004 年に確認されたウシ TB による新規畜牛感染を示す。英国環境食糧農林省統計局から入手したデータ(2005 年 2 月 23 日、statistics.defra.gov.uk/esg/statnot/tbpn.pdf)。

【図 10】感染および非感染畜牛についての正規分布を推定している、典型的なリフレックス・サブリメンタルテストのスキームの図である。

【図 11】畜牛を TB について検査する際の RST 数に特異性および有病率が及ぼす作用を示す。

【図 12】全光学アッセイ装置(TOAD(商標))の具体的例の図である。

【図 13】典型的な TOAD(商標)装置の構成要素を例示している略図である。

【図 14】ステージ 1420 を示すために、ケーシング 1410 が取り外されている TOAD(商標)の上面の略図を示す。

【図 15】陽性および陰性の畜牛血清サンプルとのフェライト CP10-ESAT6 融合タンパク質コンジュゲートを用いた、11 例のサンプルと 1 例の陰性コントロール参照を含む典型的な crib セットを示す。サンプルは、実施例 1 に開示したように分析された。

【図 16】典型的な ROC 曲線を示す。

【図 17】M.ボビス陽性感染を有する畜牛についての自動閾値調節標準化比視感度スクリーニングおよび RST 試験についての典型的なアッセイ結果を示す。

【図 18】Caudal Fold 法、Bovigam 法および本明細書に開示したリフレックス・サブリメンタルテスト法についての PPV(陽性予測値)の典型的な比較を示す。

【図 19】リフレクティブ・ハニカムカセットについての典型的なポリカーボネート底部(透明)スキンを示した図である。底部スキンは、丸みを帯びたコーナーを備えるカセットハニカム 2.64"×2.64"に貼付された 7 ミルの透明ポリエステルである(標準 Avery 5096 ラベルサイズ)。ロッキングホール 3/16"および 1/16"は、ハニカムへ貼付する前に穿孔される。

【図 20】ハニカムの 1 つの実施形態ではセルについての、この実施例ではハニカム内の 55 セルについての典型的なナンバリングを示す。隅のインデックスマーカーは、3/16"ホールロッキングピンと同側に位置している。

【図 21】水平列および垂直列のカットを示す、典型的なアルミニウム製ハニカムカットパターンを示す。

【図 22】アルミニウム製ハニカムカットパターンのための典型的なカットの詳細を示す。

【図 23】光学検出器のためのアパーチャの上方に集中したセルとともにカセットの詳細を示す。

【図 24】カセットのための典型的な装填テンプレートを示す。

【図 25】抗マイコバクテリア抗体を濃縮および単離するためにフェライト抗原コンジュゲートを用いる、TB 検出のための典型的プロトコルを例示する。

【図 26】MPB83 コンジュゲートについての ROC グラフのための典型的な畜牛検査結果の要約を提供する。

10

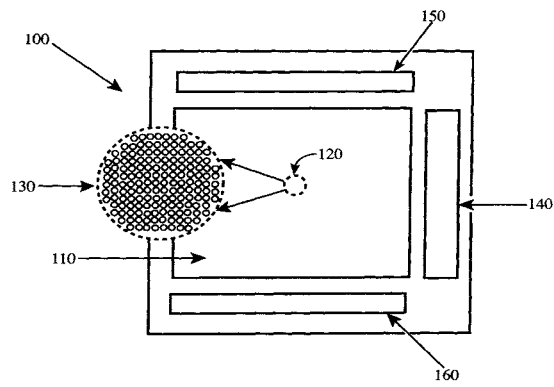
20

30

40

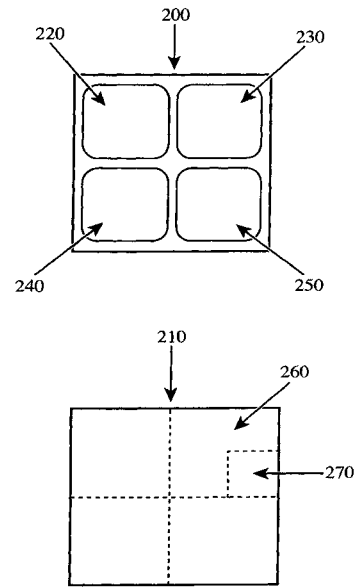
【 図 1 】

Figure 1



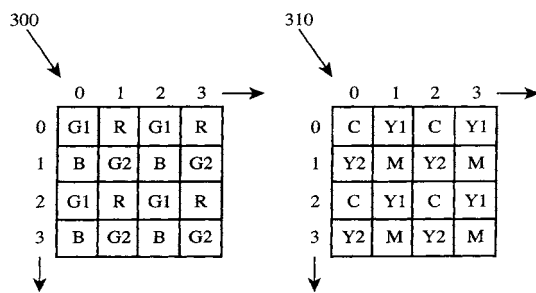
【 図 2 】

Figure 2



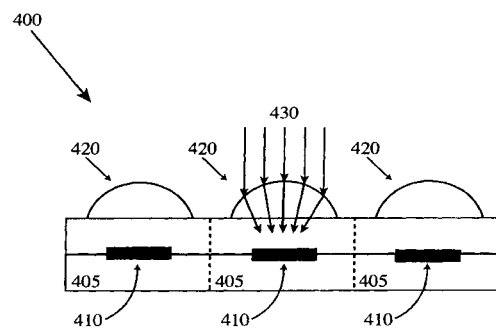
【 図 3 】

Figure 3



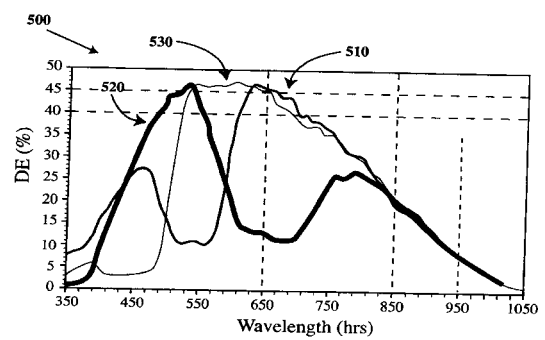
【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5



【図 6】

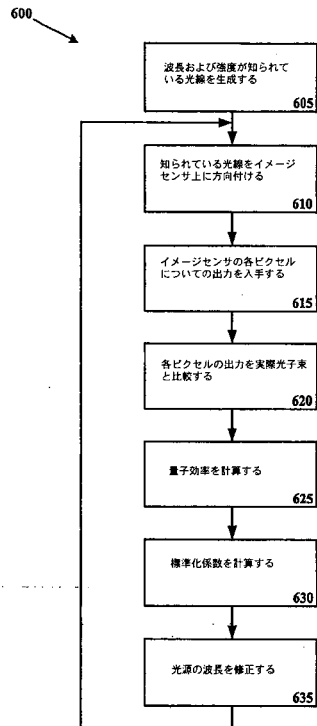


Figure 6

【図 7】

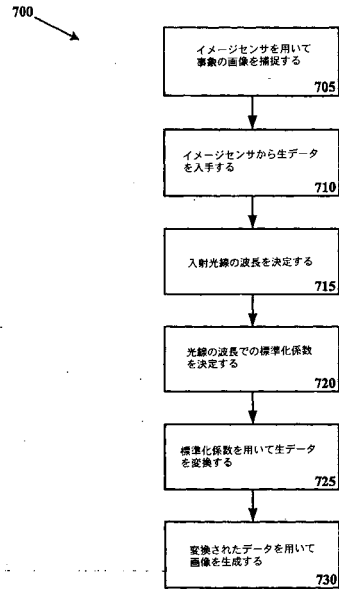


Figure 7

【図 8】

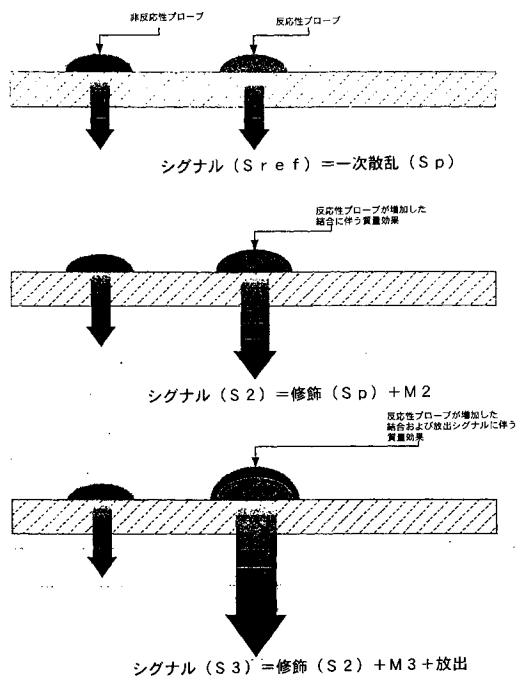
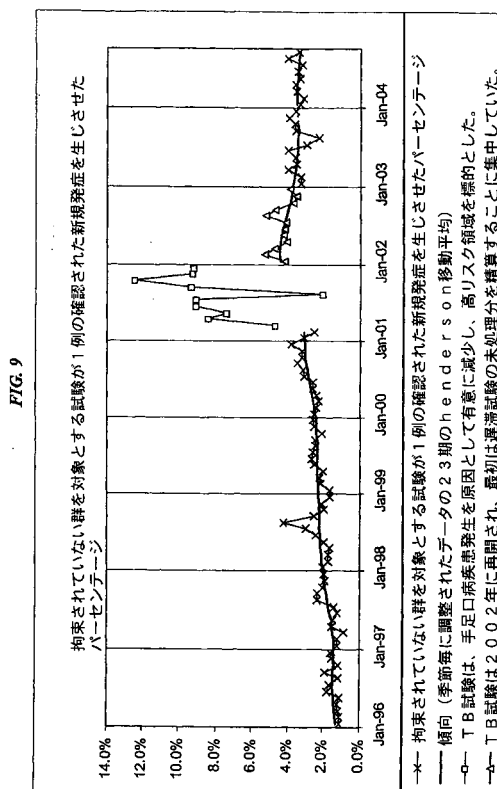


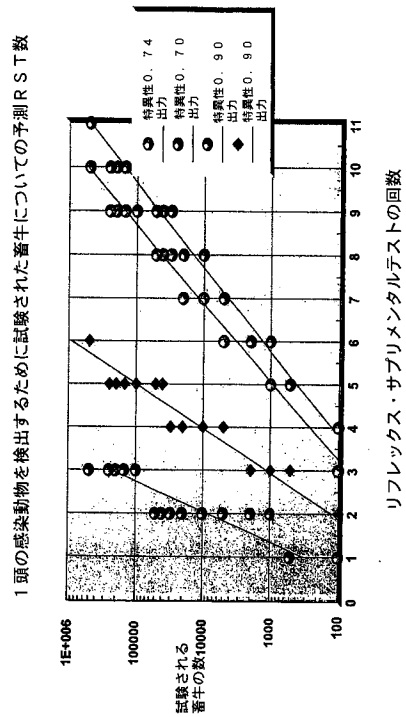
Figure 8

【図 9】



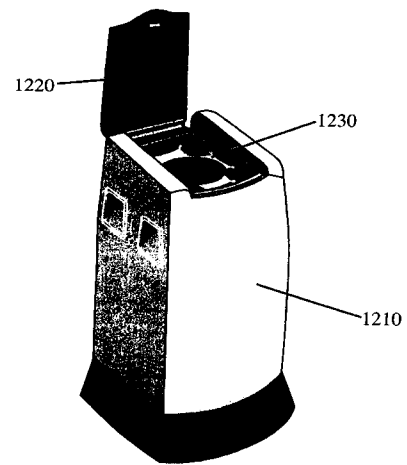
【図 1 1】

FIG. 11



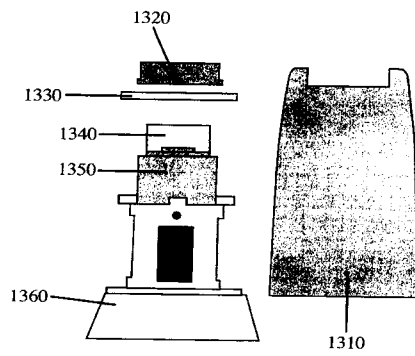
【図 1 2】

Figure 12



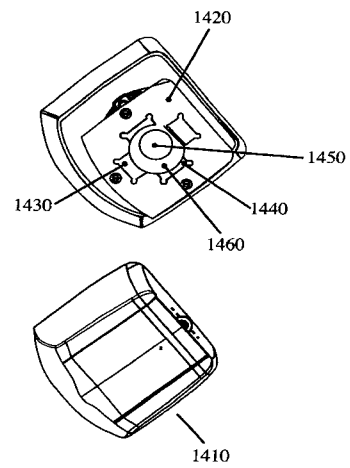
【図 1 3】

Figure 13

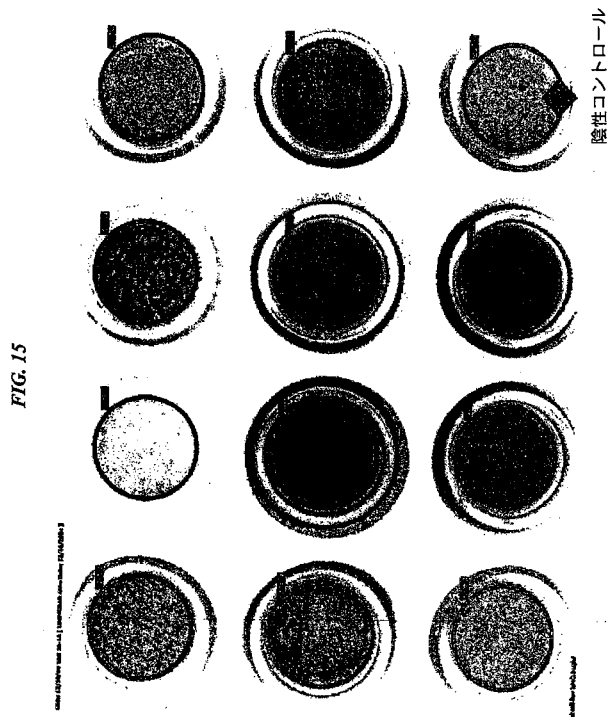


【図 1 4】

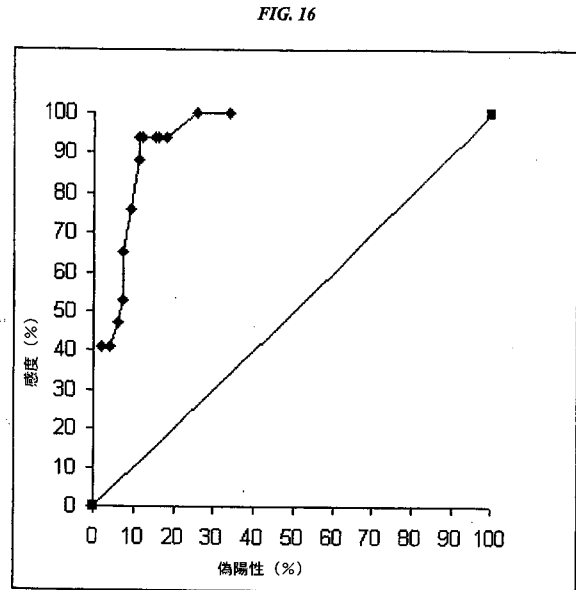
Figure 14



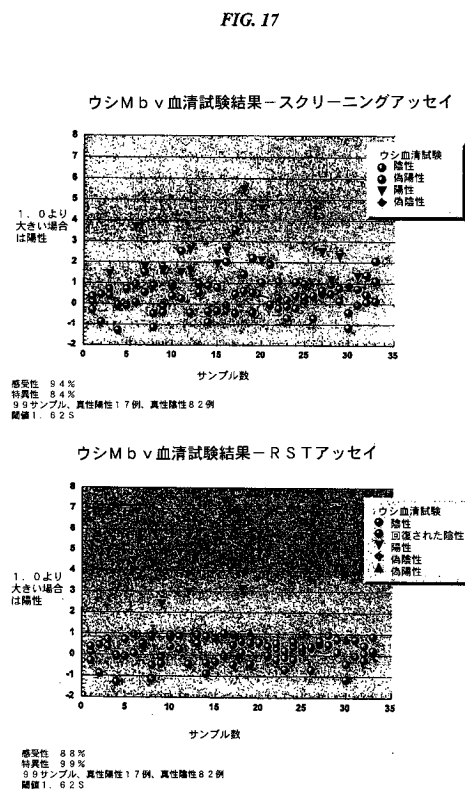
【図 15】



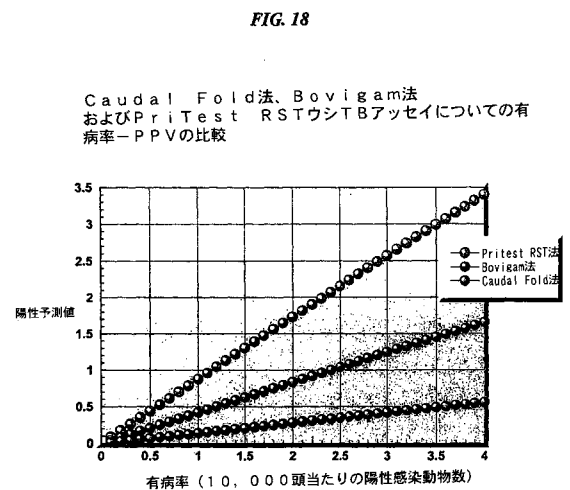
【図 16】



【図 17】



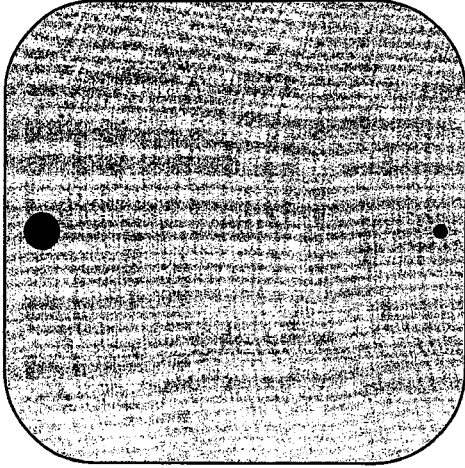
【図 18】



【図 19】

Figure 19

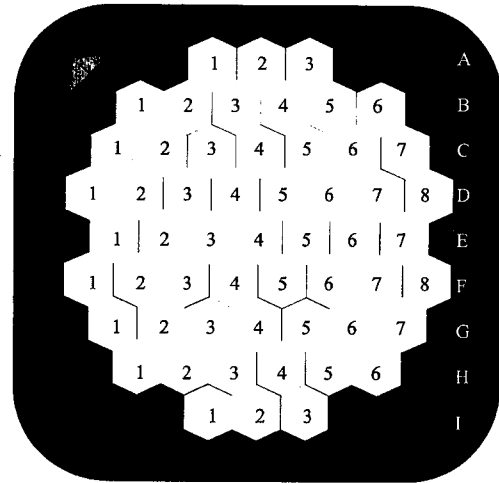
底部スキン：丸みを帯びた隅を備えるカセットハニカム
 (2.64" × 2.64") (標準Avery 5096ラベルのサイズ)
 へ付着させた透明な7ミルのポリエステル (100826)
 ロッキングホール 3/16" および 1/16" - ハニカムへ付着させる前に穿孔



【図 20】

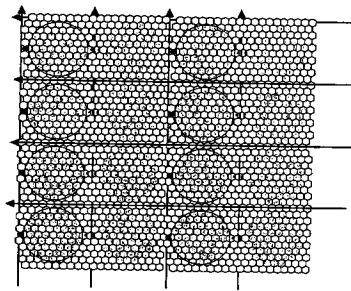
Figure 20

セルの位置番号
 3/16" ホールロッキングピンと同側にインデックスマーカーが付けられる



【図 21】

Figure 21

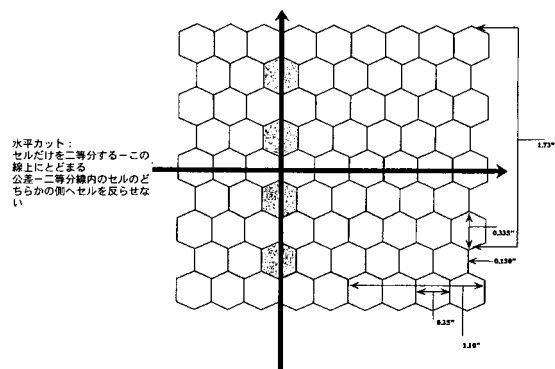


水平列のカット
 始まった列内でセルを二等分し、カットの全長に達して列内にとどまる
 最初の水平列を二等分することによって始まる
 次の水平切カットは前の水平カットから9列移動し、列10でカットを開始し、再びその列内などの全セルを二等分する。
 水平カット間の距離は、約2.75"である。

垂直カット：
 垂直カット図を参照。
 キーセル（イエロー）は、両側に4つの無傷セル（カット間に計9つの完全セル）を有し、次のセルは二等分される。垂直カットは、セルの二等分とノードの切断とを交互に行いながら進行するにつれて、2つおきにセルおよび2つのセルが交わるノードを二等分する。
 垂直カットは、直線状でノードを二等分しなければならない。
 垂直カット間の距離はおよそ2.75"である。

【図 22】

Figure 22



水平カット：
 セルだけを二等分する—この線上にとどまる
 公差—二等分線内のセルのどちらかの側へセルを反らせない

垂直カット：
 ノードおよびセルを二等分する—この洗浄にとどまる
 公差—二等分線内のセルのどちらかの側へセルを反らせない

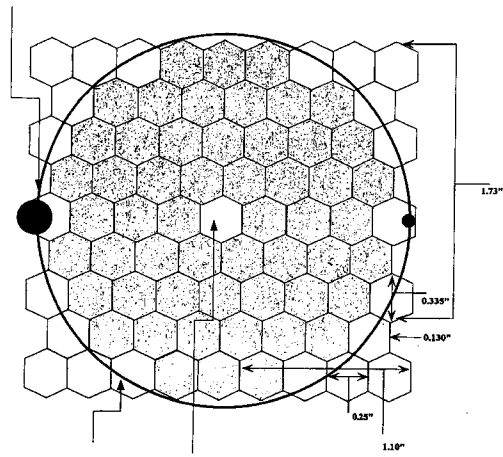
【図 23】

Figure 23

ハニカムPCGA-XR1-5. 2-1/4-N-3003 (Plascore社)

備考：ハニカム垂直ノードのサイズは0.130"であり、各セルの他の4つの壁より短い。製品セル（図示していない）は垂直方向にわずかに長い。図は、カセットデザインのための例示としての対称性の壁の長さを示し、図示された測定値は正確である。

ロッキングピン
キーセル列が中心に置かれている
径測定値は3/16および1/16インチである。

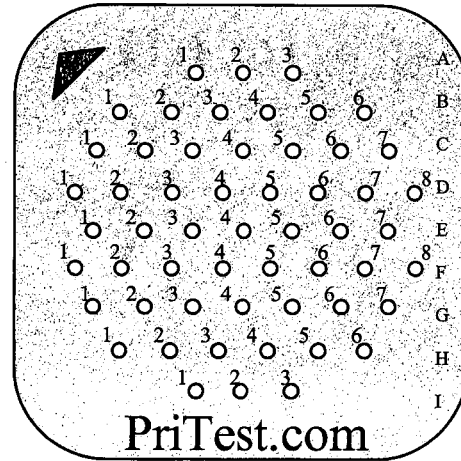


【図 24】

Figure 24

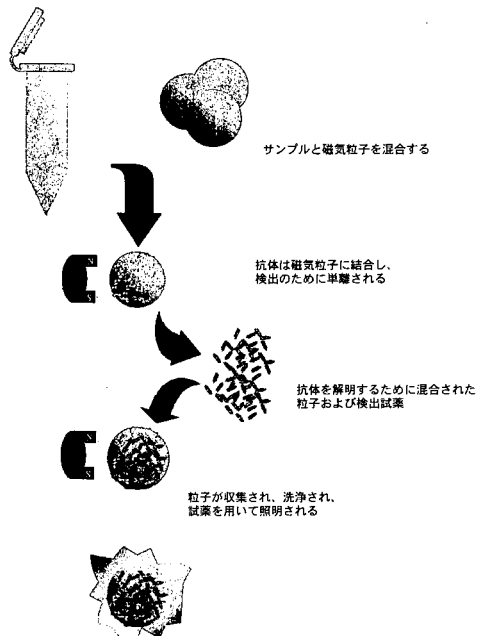
装填テンプレート：アクセスポートおよびインデックスマーカーは、光学ステージ上へのカセットの適正なポジショニングおよびセルの充填を提供する。

ハニカムに付着した非露出面は、高度に反射性で光子をセンサへ方向付ける。



【図 25】

FIG. 25



【図 26】

FIG. 26

90 96 0.98 0.97 0.89

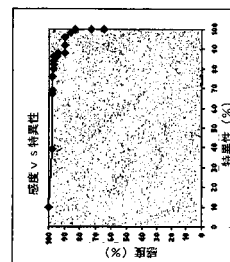
特異性 (%)

感度 (%)

ROC 面積

PPV

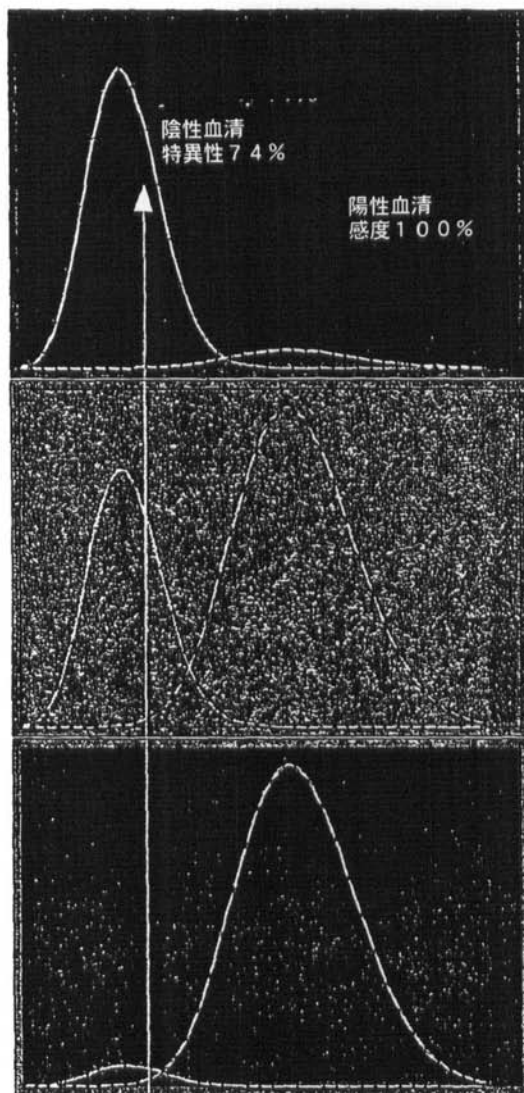
NPV



感度 (%)	特異性 (%)	感度 (%)	特異性 (%)
100	100	100	100
98	98	98	98
96	96	96	96
94	94	94	94
92	92	92	92
90	90	90	90
88	88	88	88
86	86	86	86
84	84	84	84
82	82	82	82
80	80	80	80
76	76	76	76
69	69	69	69
67	67	67	67
39	39	39	39
10	10	10	10

【図 10】

FIG. 10



MbV陽性血清についての閾値 MbV陰性血清
の平均値より約1.6SD上方

スクリーニングアッセイ

リフレックス#1

リフレックス#2

全サンプルプール中における
陽性血清有病率が増加する

【配列表】

[2008522198000001.xml](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/43642																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12Q 1/68(2007.01) USPC: 435/6 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) U.S. : 435/6, 424/190.1, 435/7.1, 435/287.2																						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NPL, Pubmed																						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
XP	Waters et al. "Immune Response to Defined Antigens of Mycobacterium bovis in Cattle Experimentally Infected with Mycobacterium kansasii", Clinical and Vaccine Immunology, June 2006, Vol. 13, No. 6, pp. 611-619, see entire document.	1-21																				
X	Vordermeier et al. "Use of Synthetic Peptides Derived from the Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle", Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, May 2001, Vol. 8, No. 3, pp. 571-578, see entire document.	1-10																				
Y		11-21																				
X	Waters et al. "Use of Synthetic ESAT-6 : CFP-10 fusion protein for Differential of Infections of Cattle by bovis and by M. avium subsp. avium and M. avium subsp. paratuberculosis", Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 2004, Vol. 11, No. 4, pp. 729-735, see entire document, see entire document.	1-10																				
Y		11-21																				
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																						
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"J"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"J"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E"	earlier application or patent 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		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"J"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"E"	earlier application or patent 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 10 December 2006 (10.12.2006)		Date of mailing of the international search report 19 JAN 2007																				
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner of Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Khatol Shahman Shah Telephone No. (571) 272-0863																				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US05/43642

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kanaujia et al. "Recognition of ESAT-6 by Antibodies in Sera of tuberculous Nonhuman Primates", Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, January 2004, Vol. 11, No.1, pp. 222-226, see entire document.	1-21
PY	US 6,861,251 B2 (Green L.R.) 1 March 2005, see entire document.	1-21
Y	US 6,537,552 B1 (Minion et al.)25 March 2003, see entire document.	1-21

フロントページの続き

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

(72)発明者 グリーン, ローレンス・アール

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 4 9 8 , タコマ, シクッスティーナインス・アヴェニュー・サウス
スウェスト 7 5 0 6

(72)発明者 シャーウッド, アン・リー

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 0 3 4 , カークランド, ホームズ・ピーティアー・ドライブ・ノース
スイースト 1 1 8 3 7

专利名称(译)	反射补充测试 - 一种快速，有效和高度准确的方法，用于识别感染，疾病或其他疾病的受试者		
公开(公告)号	JP2008522198A	公开(公告)日	2008-06-26
申请号	JP2007544541	申请日	2005-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	预测试公司		
申请(专利权)人(译)	前测公司		
[标]发明人	グリーンローレンスアール シャウウッドアンリー		
发明人	グリーン,ローレンス・アール シャウウッド,アン・リー		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/553		
CPC分类号	G01N33/5695 G01N33/56911		
FI分类号	G01N33/569.F G01N33/53.U G01N33/553		
优先权	60/633217 2004-12-03 US 60/645428 2005-01-20 US 11/069351 2005-03-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及用于检测病原体和/或标记分子的方法，组合物和装置。在某些实施方案中，待检测的病原体可以是牛分枝杆菌或在哺乳动物中引起结核病的任何其他分枝杆菌种。然而，本文公开的方法不受限制，并且实际上可以筛选和检测任何类型的病原体和/或标记分子。优选实施方案包括在一个实施例中使用相同测定法以约100%灵敏度和可能的最大相对灵敏度（70%）进行反射补充测试。重复使用的这种测定条件将导致每次测试轮次70%消除未感染的受试者。使用4轮以上检查造成的误差小于1%。由于仅重新检查阳性样品，因此本方法提供了用于检测感染对象的快速，廉价且高度准确的方法。

