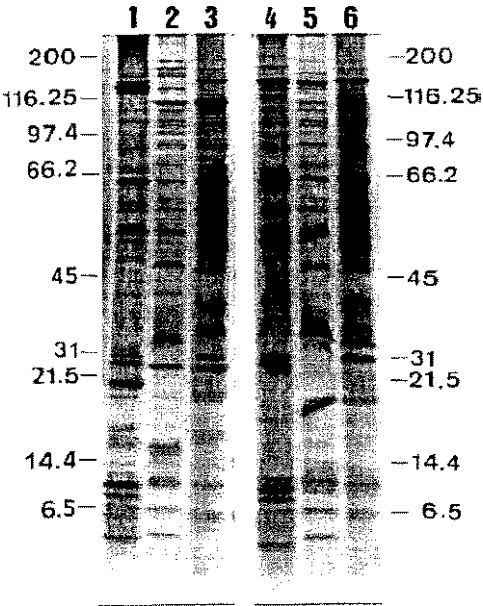


(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] （参考）
C 0 7 K 14/29		C 0 7 K 14/29	4 B 0 6 5
16/12		16/12	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
5/06		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53		33/569	B
審査請求 未請求 予備審査請求（全 33数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－545516(P2001－545516)	(71)出願人	ユニヴェルシテ ドゥ ラ メディテラネ （エクス－マルセイユ ドゥー） UNIVERSITE DE LA M EDITERRANEE (AIX－MA RSEILLE II) フランス国 F－13284 マルセイユ セデ ックス 07 ブルヴァール シャルル リ ヴォン 58 ジャルダン デュ ファロ
(86)(22)出願日	平成12年12月12日(2000.12.12)	(72)発明者	ラウル、デディエ
(85)翻訳文提出日	平成14年6月13日(2002.6.13)		フランス国 F－13008 マルセイユ リュ ドゥ ロレーヌ 16
(86)国際出願番号	PCT/FR00/03475	(74)代理人	弁理士 恩田 博宣（外1名）
(87)国際公開番号	W001/044438		
(87)国際公開日	平成13年6月21日(2001.6.21)		
(31)優先権主張番号	99/15777		
(32)優先日	平成11年12月14日(1999.12.14)		
(33)優先権主張国	フランス(FR)		
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Rickettsiapulicis 菌及び血清学的診断法

(57)【要約】
本発明は、28℃の培養温度でツメガエルの細胞又は任意の他の細胞上でRickettsia pulicis 菌を単離するための方法に関する。Rickettsia pulicis 菌は、該疾患の原因となる細菌を患者の血清又は体液に接触させることからなる血清学的診断法のために用いられる。本発明は、ノミ又はヒト試料中の細菌をインビトロ検出するために前記方法を実行する装置にも関する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離され、培養で樹立された*Rickettsia pulicis*菌。

【請求項2】 25～30℃、好ましくは28℃の温度での細胞培養で単離された、請求項1に記載の細菌。

【請求項3】 1) 細胞培養物、好ましくは*Xenopus laevis*細胞を、25～30℃、好ましくは28℃の培養温度で得る工程と、
2) 細菌が、粉碎したノミを遠心単離するか、或いは前記細菌に感染したヒト又は動物を起源とするいずれか別の試料を遠心単離することにより、工程1で培養した細胞層に接種し、細菌の増殖が観察されるまで25～30℃、好ましくは28℃でインキュベートする工程と、
3) 細菌を、培養細胞に逐次再接種することにより培養で樹立する工程とから成る方法により得られる、請求項1又は2のいずれかに記載の*Rickettsia pulicis*菌。

【請求項4】 前記細菌が、工程3の細胞培養物の上清を遠心単離することにより精製される、請求項3に記載の細菌。

【請求項5】 No. I-2363の番号で1999年12月8日にCNCM (National Collection of Microorganism Cultures at the Institut Pasteur、フランス) に提出された、請求項1～4のいずれか1項に記載の細菌。

【請求項6】 請求項1～5に記載の細菌の抗原。

【請求項7】 SDS-PAGE法により測定された分子量約17Kd、30Kd、及び150Kdの蛋白質から選択された蛋白質である、請求項6に記載の細菌の抗原。

【請求項8】 請求項1～7に記載の細菌の抗原に対して特異的に作製された抗体。

【請求項9】 動物を起源とするポリクローナル抗体である、請求項6に記載の抗体。

【請求項10】 マウス免疫グロブリンである、請求項9に記載の抗体。

【請求項11】 請求項1～5のいずれか1項に記載の細菌の細胞培養物。

【請求項12】 前記細胞が、(好ましくはNo. I-2364の番号で1

999年12月8日にInstitut PasteurのCNMに提出された健常なXTC-2細胞から得られた)前記細菌に感染したXenopus laevis細胞である、請求項11に記載の培養物。

【請求項13】 前記細菌の感染に関連する疾患のインビトロ診断のための、請求項1～5のいずれか1項に記載の細菌、又は請求項9及び10に記載の培養物の使用方法。

【請求項14】 請求項1～5のいずれか1項に記載の細菌による感染に関連する疾患のインビトロ診断のための、請求項6～10のいずれか1項に記載の抗原又は抗体の使用方法。

【請求項15】 請求項6～8の1項に記載の細菌の特異的抗体と、前記細菌の抗原との免疫学的反応を検出する工程から基本的に成る、Rickettsia pulicis感染のインビトロ血清学的診断方法。

【請求項16】 請求項1～5に記載の前記細菌を認識するヒト免疫グロブリンの特異的抗体と、請求項1～5に記載の前記細菌を認識する前記ヒト免疫グロブリンとの免疫学的反応を検出する工程から基本的に成る、Rickettsia pulicisのインビトロ血清学的診断方法。

【請求項17】 請求項1～5に記載の前記Rickettsia pulicis菌を認識するヒト免疫グロブリン(好ましくはG、M、又はA型)の特異的抗体が、動物免疫グロブリン、好ましくはヤギ免疫グロブリンである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 請求項1～5のいずれか1項に記載の細菌、請求項11又は12の1項に記載の培養物、及び／又は請求項8～10に記載の特異的抗体を、血清、体液、ノミ、又はヒト試料からなる患者を起源とする試料に接触させる、請求項16～17に記載のRickettsia pulicis菌による感染に関連する疾患の診断方法。

【請求項19】 一固相支持体の内部又は上部に請求項1～5に記載の細菌の溶液を堆積させる工程と、

一前記支持体の内部又は上部に、試験する血清又は体液を添加する工程と、

一前記支持体の内部又は上部に、前記細菌を認識するヒト免疫グロブリンの特

異的標識抗体溶液を添加する工程と、
—一定期間、インキュベートする工程と、
—前記固相支持体をリンスする工程と
—前記免疫グロブリン反応の検出を実行する工程と、から成る、請求項10に記載の血清学的診断方法。

【請求項20】 前記標識抗体が、酵素又は蛍光剤の放射性プローブで標識されている、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネートである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記細菌を含有する前記溶液の0.5～5 μ l、好ましくは約1 μ lが用いられる、請求項19～21に記載の方法。

【請求項23】 前記細菌を含有する溶液を内部又は上部に堆積させた固相支持体を備えた、請求項19～22のいずれか1項に記載の方法を適用するための装置。

【請求項24】 前記固相支持体がガラススライドである、請求項23に記載の装置。

【請求項25】 —請求項1～5及び11～12に記載の細菌又は細胞培養物を含有する溶液、及び／又は
—請求項8～10に記載の特異的抗体を含有する溶液、及び／又は
—請求項1～5に記載の前記細菌を認識するヒト免疫グロブリンの特異的抗体を含有する溶液、
という基本的構成要素から成る、請求項15～22のうちの1項に記載の方法によるRickettsia pulicis菌のインビトロ検出キット。

【請求項26】 前記特異的抗体が標識されている、請求項25に記載のキット。

【請求項27】 前記特異的抗体が、放射性同位体、酵素、又は蛍光化合物により標識されている、請求項26に記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、微生物学の分野、特に微生物学的診断の分野に関する。より正確には、本発明は、「*Rickettsia pulicis*」と呼ばれる新しい細菌を一時的に単離する方法に加え、その菌株を使用して血清学的試験を実施するための方法に関する。

【0002】

従って、本発明は、「*Rickettsia pulicis*」に起因する感染のインビトロ血清学的診断の方法に加え、この方法を実行するための装置に関する。本発明は、その細菌のインビトロ検出のためのキットにも関する。

【0003】

米国では、*Rickettsia* に対して作用する抗体により *Rickettsia* を染色する Gimenez 法を用いる間接染色反応により、また、ある細菌について *Rickettsia* に特異的な遺伝子配列を検出することにより、ノミからある細菌の存在が見出されたが単離されてはいない。この時、該細菌は、E L B 因子と命名された [Adams JR., Am. J. Trop. Med Hyg., 1990; 43: 400-409]。 *Rickettsia* に共通な遺伝子を、この細菌内で増幅し、塩基配列決定すると、その細菌が新種であることが示された。この細菌は、Californiaでのノミ由来 *Rickettsia* の罹患率を説明する1つの因子であるとみなされている [Schriefer ME., J. Med. Entomol., 1994; 31: 681-5]。この細菌に関係するヒトでの感染の一例 [Schriefer ME., J. Clin. Microbiol., 1994; 32: 949-54] が、報告されている。今日まで、この細菌の培養が多数試行されてきたが、いつも不成功に終わっていた。動物からの培養 (VERO細胞及びL229細胞) も試行された [Higgins JA., J. Clin. Microbiol., 1996; 34:671-4; Radulovic S., Infect. Immun., 1995; 63:4826-9; Radulovic S., Antimicrobiol. Agent. Chemother., 1995; 39:2564-6]。上記3つの出版物は、*Rickettsia felis* と命名された該当細菌の培養物を報告している。しかし、これらの出版物は確認追試されておらず、この細菌を単離したと主張する実験室には利用可能な菌株が存在しない。これらの実験室から送られた試料は、いかなるリケッチアも含まない試料か、或いは別のリケッチアである *Ricket*

tsia typhiが混入した試料のいずれかであった。SDS-PAGE分析により、これらの著者らにより単離され、*R. felis*と命名された菌株が、実際には*R. typhi*であり、ELB因子とほとんど一致しないことが示された。このため、実際にはELB因子の最初の単離物である本発明の細菌を、一時的に「*Rickettsia pulcis*」と呼んでいる。

【0004】

それゆえ本発明以前には、血清学的反応を得ることができず、その上この細菌の単離物はいずれの収集機関又は実験室でも利用できなかった。一方で、ノミの多くは自然感染して、上記細菌が母親から子孫に系統的に伝染される結果、100%感染されたノミの収集物が存在する。

【0005】

本願発明者は、「*Rickettsia pulcis*」菌を培養するための特異的かつ独創的な方法を開発した。

*Rickettsia*属の細菌は通常、チフス群の細菌の場合には37℃、斑点熱群の細菌では32℃で培養される [Weiss E., Annu. Rev. microbiol., 1982; 36:345-70]。

【0006】

哺乳類VERO L929細胞、HEL細胞、及びMRC5細胞又は鳥細胞を37℃及び32℃で培養する試みは未だ成功していない。

本願発明者は驚くべきことに、宿主細胞の培養が、30℃未満、好ましくは25℃～30℃、より好ましくは28℃の温度で実行されなければならないことを発見した。

【0007】

本願発明者は、28℃で培養した*Xenopus laevis* XTC-2細胞系に粉碎したノミを接種した。その細菌は、14～28日後に得られる。ゲノム検出法(PCR)により陽性と試験された20のノミのうち19が、この方法による培養に成功した。これは、95%の成功率となる。単離対照細菌(URRWFXC a 1 2)が樹立され、現在では10継代が得られている。単離細菌は、クエン酸合成酵素遺伝子及びRNA 16S(それぞれGene Bank U 33922 及びL28944)に関

してE L B因子で記載された遺伝子特性を有している。

【0008】

それゆえ本発明は、このように単離され、抗原の供給源として培養で樹立されたRickettsia pulicis菌に関する。

用語「培養で樹立する」とは、細菌が再現性のある様式で得られ、細胞培養物を逐次再接種した後、適時に増殖することを意味している。

【0009】

より詳細には、本発明は、25～30℃、好ましくは28℃の温度で継代培養（cell culture-to-culture）で単離及び樹立されたRickettsia pulicis菌を包含する。

【0010】

より詳細には、本発明によるRickettsia pulicis菌は、Xenopus laevis細胞のXTC-2系で培養される。

1つの実施態様において、本発明による単離方法は、以下の1)～3)の工程から成る：

1) 細胞培養物、好ましくはXenopus laevisXTC-2細胞系培養物を、25～30℃、好ましくは28℃の培養温度で得る工程

2) 細菌を、粉碎したノミを遠心単離するか、或いは該細菌に感染したヒト又は動物を起源とするいずれか別の試料を遠心単離することにより、工程1の培養物の細胞層に接種し、細菌の増殖が観察されるまで25～30℃、好ましくは28℃でインキュベートする工程

3) 細菌を、培養細胞に逐次再接種することにより培養で樹立する工程。

【0011】

細菌は、上記の工程3に記載された細胞培養物の上清を遠心単離することにより精製することができる。

本発明は、前記細菌の抗原、特にSDS-PAGE法を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定された17Kd、30Kd、及び150Kd蛋白質から選択された蛋白質にも関する。

【0012】

本発明は、本発明の細菌に対する特異的抗体、より詳細には動物を起源とするポリクローナル抗体、特にマウス又はウサギ免疫グロブリンにも関する。

本発明は、上記細菌を認識するヒト免疫グロブリン（好ましくはIgG、IgM、又はIgA）に対する特異的抗体、より特別には動物の免疫グロブリン、特にヤギ抗ヒト免疫グロブリンの検出にも関する。

【0013】

本発明は、本発明の細菌の細胞培養物、より詳細にはXenopus laevis細胞、好ましくはXTC-2細胞も包含する。

本発明の細菌は、No. I-2363の番号で1999年12月8日にCNCM (National Collection of Microorganism Cultures at the Institut Pasteur、フランス) に提出され、感染されたXTC-2細胞の細胞培養物の形態でRickettsia pulicis (URRWF Xcal 2) として同定された。健常な（感染していない）XTC-2細胞の培養物は、No. I-2364の番号で1999年12月8日にCNCMに提出された。

【0014】

本発明は、Rickettsia pulicis菌による感染に関連する疾患のインビトロ診断法での本発明による細菌、培養物、又は特異的抗体の使用に加え、本発明によるRickettsia pulicis菌による感染の血清学的診断法も包含する。この方法は、患者の血清又はいずれか別の体液を前記細菌に接触させること、及び免疫学的反応を検出することからなる。

【0015】

より詳細には、本発明は、本発明による細菌、本発明による培養物、又は本発明による特異的抗体を、血清、体液、ノミ、又はヒト試料からなる患者からの試料に接触させるRickettsia pulicis感染のインビトロ血清学的診断法を包含する。

【0016】

本発明による方法は、本発明の細菌に特異的な抗体と前記細菌に対する抗原との免疫学的反応、又は前記細菌を認識する本発明による免疫グロブリンの特異的抗体と前記細菌を認識する前記ヒト免疫グロブリンとの免疫学的反応を、検出す

ることから基本的に成る工程を包含する。

【0017】

1つの実施態様において、本発明による診断法は、
—固相支持体の内部又は上部に本発明の細菌の溶液、特に前記細菌を含有する前記溶液0.5～5 μ l、好ましくは1 μ lを堆積させる工程と、
—前記支持体の内部又は上部に、試験する希釈血清又は体液を添加する工程と、
—前記支持体の内部又は上部に、標識抗体溶液、特に前記細菌を認識するIgG、IgM、又はIgA型のヒト免疫グロブリンに特異的な動物抗ヒト免疫グロブリンを添加する工程と、
—一定期間、インキュベートする工程と、
—必要に応じて前記固相支持体をリンスする工程と、
—前記細菌を認識するヒト抗体と前記ヒト免疫グロブリンとの免疫学的反応の検出を実行する工程と、から成る。

【0018】

細胞及び細菌懸濁液に適したいずれかの装置、特に試験管、ガラススライド、Bijoux型試験管、又はマイクロウェルを備えた硬質ポリエチレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、若しくはニトロセルロース製のマイクロタイトレーションプレートで固相支持体として用いることができ、ガラススライドが好ましい媒体である。

【0019】

検出されるヒト抗体は、免疫グロブリン（特に本発明の細菌に特異的なG、M、又はA型）である。

有利には、本発明による診断法は、ELISA式酵素標識抗体法、又は免疫蛍光法を利用する。

【0020】

酵素標識、放射性標識、又は蛍光標識が、抗ヒト免疫グロブリンの標識として好ましく、蛍光標識が好ましい方法である。

用語「蛍光標識」は、抗体を、フルオレセインイソ（チオ）シアネートのような適切な蛍光剤と結合させる又は複合体形成することにより蛍光性にすることを

意味する。

【0021】

用語「放射性標識」は、抗体が、放射能のカウントによりアッセイを実施できる、（例えば構造的チロシン残基）などの抗体構造の一要素か、又は抗体に結合する適当な基かのいずれかに備えられた放射性同位体を含むことを意味する。

【0022】

用語「酵素標識」は、適切な試薬の使用を組み合わせることで特異的抗体を定量測定させる酵素に、特異的抗体を結合させることを意味する。

【0023】

基質および試薬は、酵素により引き起こされる、これらの物質を用いた反応又は連鎖反応の最終生成物が：

一試験試料に近接する液体媒体に分散し、分光光度法、蛍光定量法、又は視覚的評価のいずれかにより測定され、必要に応じて標準的色範囲と比較される被染色物質又は蛍光物質のいずれか、

または

一試験試料上に堆積し、反射光度法、又は視覚的評価により測定することができ、必要に応じて標準的色範囲と比較することができる可溶性被染色物質又は蛍光被染色物質、
のいずれかとなるよう選択される。

【0024】

蛍光抗体が用いられる場合、試験試料の蛍光は、適切な装置で直接読み取られる。

放射性プローブ（例えば、ヨウ素125）が用いられる場合、試験試料に関する放射能が、いずれか適した方法を用いて（例えば細胞をアルカリ溶液（例えば、ナトリウム溶液）に溶解して吸収緩衝液（absorbent buffer）により放射能を含有する溶液を回収した後に）ガンマカウンタで計測される。

【0025】

特異的抗体に結合する酵素が用いられる場合、酵素基質を含有する溶液及び1または複数の別の薬剤を添加することにより、被染色生成物又は蛍光生成物が得

られ、上に説明したように、それらは、最終生成物が媒体に可溶性の被染色生成物、不溶性の被染色生成物、又は可溶性蛍光生成物のいずれかとなる。次に、光信号が、各状況に適合させた装置：透過光度計、反射光度計、又は蛍光計を用いて測定される。

【0026】

或いは、必要に応じて標準的着色溶液を用い、生成した色を視覚的に評価してもよい。

アルカリホスファターゼを酵素として用いる場合、この酵素を、Boehringer Mannheim-Biochemica法により特異的抗体に結合させる。この酵素に好ましい基質は、蛍光計で読む場合にはパラニトロフェニルホスフェート若しくは5-ブロモ-4-クロロウンベリフェリルホスフェート、又は不溶性被染色反応生成物を得るためには5-ブロモ-4-インドリル-6-ホスフェートである。 β -ガラクトシダーゼも酵素として用いることもでき、その場合好ましい基質は、オルトニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド、又は4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトピラノシドである。

【0027】

優先的には (preferentially)、特異的抗体は、ペルオキシダーゼに結合させてもよい。この場合、結合プロセスは、M. B. Wilson及びP. K. Nakane のImmunofluorescence and related staining techniques, W. Knapp, K. Kolubar, G. Wicks ed. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1978, p. 215-224に記載された技術に基づく。

【0028】

特異的抗体にコンジュゲートしたペルオキシダーゼの存在を示すために用いる試薬は、染色された可溶性最終反応生成物を得るために、酸素化水、その酵素基質、及び適切な色原体（例えば、オルトフェニレンジアミン又は2, 2'-ビスアジノ（3-エチルチアゾリン）スルホン酸、又はABTS）を含有するか、或いは不溶性最終反応生成物を得るために、3, 3'-ジアミノベンジジン、又は3-アミノ-9-エチルカルバゾール、又は4-クロロ- α -ナフトールを含有するか、もしくは媒体に可溶性の蛍光反応生成物を得るために、パラヒドロキシ

フェニルプロピオン酸を含有する。

【0029】

本発明による別の実施態様は、アセチルコリンエステラーゼに結合させた特異的抗体の使用である。

アセチルコリンエステラーゼを、好ましくはフランス特許第2550799号明細書に記載のプロセスに基づくプロセス、又は公知の技術（適切なヘテロ二機能剤との反応により酵素を修飾した後、このようにして得られた生成物を結合させること）を用いた抗体断片の作製を包含するプロセスにより、抗体に結合させる。コンジュゲートした免疫酵素を作製するためのその他の公知の工程も、この場合に用いることができる。

【0030】

アセチルコリンエステラーゼにより認識された抗原に特異的に関連する酵素活性の検出は、好ましくは例えばPra delles et al., Anal. chem., 1985; 57:1170-1173 に記載されるように、該当例に適合する任意の変形例に従ってアセチルチオコリンを酵素基質として用い、Ellman試薬又は5, 5'-ジチオ-2-ニトロ安息香酸を色原体として用いる確立された技術に基づく。

【0031】

上述の色素原は、天然の形態、又は水溶性塩の形態で使用される。

本発明による血清学的診断法は、生物学及び／又は解剖病理学の実験室での使用に適合する。この趣意で、本願出願人は、先に定義したように、本発明による細菌含有溶液を上部又は内部に堆積させた固相支持体を包含する、上記方法を実行するための装置を提案する。

【0032】

本発明の別の態様は、Rickettsia pulicisのインビトロ検出のためのキットにも関する。このキットは、以下の成分：

- 陽性対照として上述したように単離及び樹立された、本発明によるRickettsia pulicisを含有する溶液と、
- （好ましくは標識された）本発明の細菌を認識する特異的抗体を含有する溶液、及び／又は、本発明の細菌を認識するヒト免疫グロブリンの特異的抗体を含有

する溶液と、

一可能ならばリンス溶液と、からなる。

【0033】

本発明によるキットに用いられる特異的抗体は、有利には放射性プローブ、酵素、または蛍光物質で標識される。

【0034】

特異的抗体が酵素で標識されている場合、キットは、酵素活性を肉眼で見ることができるようにする酵素基質及び1または複数の試薬も含む。

【0035】

特異的抗体が蛍光剤で標識されている場合、蛍光イソ（チオ）シアネートが好ましい。

本発明による好ましい実施態様によれば、免疫グロブリン、好ましくはマウス免疫グロブリンが、特異的抗体として用いられる。

【0036】

本発明は、本発明を適用して実施した実験を記載した、以下の複数の欄に分けた説明を読めばより明らかとなろう。これらの実施例は、単に例示のために与えられている。

【0037】

（実施例）

実施例1

XTC細胞で*R. pulicis*を単離するための手順

1. 1次単離 (Primoisolement)

*Xenopus laevis*細胞系を接種したBijoux管での遠心単離法を用いて、1次単離を実施した [Pudney M, Varma MRG, Leake CJ. Establishment of a cell line (XTC-2) from the south African clawed toad *Xenopus laevis*. *Experientia*. 29:466-467]。これらの細胞を、5%ウシ胎児血清 (Gibco, Gaithersburg, メリーランド州) 及び2%リン酸トリプトース (Gibco) を添加したL-グルタミン及びL-アミノ酸 (Gibco) を含むLeibowitz 15培地で培養する。12mmの支持体カバースリップを備えたBijoux管 (Sterilin-Felthan England, 3.7m

1) に、細胞約50000個を含む培地1mlを接種して、28℃で24～48時間インキュベートすると、サブコンフルエントの細胞層が得られる。2バッチのネコノミ (*Ctenocephalides felis*) について細菌の単離を試行した。各バッチは、50匹のノミから構成されていた。ノミは共に、各5匹からなる20群に群分けした (California群1～10、及びPete群1～10)。各群において、ノミは0.2%ヨウ素を含有する70%メチルアルコールに5分間浸漬させることにより、除染を行った。その後、ノミを蒸留水でリンスし、液体窒素で凍結して粉碎した。その後、粉碎したノミを培地0.8mlに取り出し、その粉末を用いてBijoux管に接種した (1本/粉末)。その後、これらの管を22℃、700×gで1時間遠心単離した。上清を除去し、層を滅菌PBS緩衝液で2回洗浄して、その後最終濃度4μg/mlとなるようコトリモキサゾールを添加した培地1mlと共に28℃でインキュベートした。上清は、毎週新しい培地に交換した。除去した上清は、Gimenez染色のために低温遠心単離した [Gimenez DF. 1964. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. Stain Technol. 39:135-140]。Gimenez染色で細胞内細菌が検出できたら (接種後15～30日目)、細胞をカバースリップから剥離して、培地5mlを含む25cm²培養皿を用いてサブコンフルエントの細胞層に接種し、その後28℃でインキュベートした。上清を用いてクエン酸合成酵素遺伝子を増幅及び塩基配列決定することにより、*Rickettsia* sp.を検出した。California群の1群を除けば、その他の全群が陽性であった。

【0038】

2. 単離物の増殖

細胞培養皿での感染率を、上清中の感染細胞のGimenez染色を実施することにより2日毎に確認した。感染率が最高になったら、健常なサブコンフルエントXTC-2細胞を含有する170cm²培養皿に、細胞培養物を培地30mlと共に再接種した。

【0039】

California2の菌株 (URRWFXC a l 2) を大量生産するために、本願出願人はトリプシン処理による感染細胞の増殖技術を用いた。174cm²皿でX

TC-2細胞を感染させた後5～6日目経ち、細胞感染率が80%を超えたら、培養上清を除去して、細胞層をRinaldini で洗浄し、その後0.05%トリプシン (Gibco) と共に37℃で5分間インキュベートした。感染細胞を、培地150mlに再懸濁させた。このようにして希釈した感染細胞を、5枚の174cm² 培養皿に30ml/皿の割合で分割した。これらの174cm² 皿の同等な200枚を作製して、後の試験に十分量となる材料を得るために、各皿で同様の手順を5日毎に繰り返した。血中ゲロース及び大豆トリプチカーゼゲロースで培養皿を系統培養することにより、生成手順全体を通して細胞培養物中にコンタミネーションがないことを確認した。

【0040】

3. 電子顕微鏡試験

8日前に細菌を接種した感染細胞を回収し、その後電子顕微鏡用に調製した。0.15M PBS緩衝液 (Biometieux, Marcy letoile、フランス) に溶解した2.5%グルタルアルデヒド溶液で、細胞を4℃で1時間固定した。細胞を同じ緩衝液で一晩リンスし、その後0.15M PBS緩衝液に溶解した四酸化オスミウムで室温で1時間固定した。濃縮度を増したアセトン溶液 (Carlo Erba, Val de Reuil、フランス) で逐次リンスすることにより、脱水を行った。その後細胞を、Aralditeボックス (Fluka, St Quentin Fallavier、フランス) に固定した。Ultracutミクロトーム (Reicher-Leica, Marseille、フランス) を用いて薄片に切断し、その後メタノールに溶解した酢酸ウラニル (Merk, Damstadt、ドイツ) の飽和溶液、水に溶解した硝酸鉛及びクエン酸ナトリウム (Merck) で染色して、Jeol 1220 電子顕微鏡 (Jeol, Croissy sur Seine、フランス) で試験した。この試験により、細菌の細胞内局在化、又は細菌が細胞質に存在しないことを観察できた。細菌は、核内には見出されなかった。

【0041】

実施例2

マウスポリクローナル抗体の作製及び特徴付け

マウスに接種するために用いる細菌は、最初、80%の感染率で、174cm² 細胞培養皿を用いて精製した。上清を皿から除去して、細胞を0.5%トリプ

シン (Gibco) と共に 30℃で 45 分間インキュベートした。細胞を上清と共に取り出し、その後 6 回の超音波処理工程 (40 ワット、1 分) により溶解した。細胞の残渣は、1500 rpm で 15 分間遠心単離することにより除去した。PBS に溶解した 25% ショ糖溶液に上清を加えた。4℃、7500 rpm で 30 分間遠心単離した後、細菌を含有する残渣を PBS 2 ml 中に取り出した。最後に、Renografine 勾配法 (45% から 25% へ) で 4℃、25000 rpm で 1 時間遠心単離することにより、細菌を精製した。遠心単離後に、細菌に対応する層を回収し、細菌を 10000 rpm で 10 分間の 2 回の遠心単離工程により PBS 中でリンスした。

【0042】

0、10、20、及び 30 日目に、 10^6 /ml 精製細菌溶液 0.5 ml 及び Freund 完全アジュバントを、6～8 週齢のマウスに腹腔内経路で接種した。40 日目にマウスを殺処分して、心臓穿刺により採血した。分離後、血清を間接的免疫蛍光法で試験し、その後 -20℃で凍結した。血清を 1:50 に希釈して、XTC-2 細胞に吸着した後、抗マウス抗体を取り出すために使用した。

【0043】

実施例 3

間接免疫蛍光法及びウエスタンブロットによる血清診断法

1. 抗原の調製

上述したように、Rickettsia pulicis (URRWFXC a l 2) を、XTC-2 細胞のコンフルエント層で培養した。R. conorii (Moroccan 株、ATCC VR141)、R. prowazekii (Brein-1)、及び R. typhi (Wilmington 株、ATCC VR144) を、174 cm² 培養皿のコンフルエントの Ver o 細胞層で、それぞれ 32℃、35℃、及び 35℃で培養した。80% の細胞が感染したら、細胞及び上清を回収し、10000 × g で 10 分間遠心単離し、PBS 緩衝液 40 ml で 4 回洗浄し、その後可能な限り少量の滅菌蒸留水に再懸濁させた。この溶液の最終蛋白質量を、紫外分光光度法で測定し、その後最終濃度を 1 mg /ml に調整した後、-20℃で凍結した。

【0044】

2. 間接免疫蛍光測定 (IFA)

その後、4種の抗原を30穴スライド (Dynatech Laboratories Ltd., Billingham, イギリス) の各ウェルに加えて風乾し、その後アセトン中で10分間固定した。血清は全て、3%脱脂粉乳を含むPBSで1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、及び1/128に希釈した。リウマチ因子を吸着した後のIgG及びIgMの測定による間接免疫蛍光測定を、標準的実験室法 [La Scola, B. et al. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. (1997). J. Clin. Microbiol. 35:2715-2727] を用いて実施した。1/64のIgG、及び/又は1/32のIgMの力価が陽性と判定された。複数のリケッチア種間の血清学的交叉反応の場合、IgG及びIgMの力価の合計が交叉反応が観察された種に対するIgG+IgM力価よりも少なくとも2回希積分高い場合に、血清学的反応は、その種に対して特異的に作用すると判定した。

【0045】

3. ウエスタンブロット

精製後、*R. pulicis*、*R. typhi*、及び*R. conorii*を滅菌蒸留水に懸濁して、濃度を2mg/mlに調整した。ウエスタンブロットを実施するために用いた手順は、以前に記載されている [Eremeeva M. N. et al., Serological response of patients suffering from primary and recrudescent typhus: comparison of complement fixation reaction, Weil-Felix test, microimmunofluorescence and immunoblotting. Clin. Diagn. Lab. Immunol. (1995). 1:318-324]。20～50kD抗原に対して反応する抗体は、*R. typhi*及び*R. conorii*中のLPSに特異的である。様々な反応バンドの強度は、ビデオ映像により評価した (The Imager, Appligene, Illkirch、フランス)。

【0046】

4. 血清の選択

一般集団の中の*R. pulicis*の血清罹患率を評価するために、血液ドナーの血清100本を試験した。本願出願人は、*R. conorii*と*R. typhi*との血清学的交叉反応について試験するために、斑点熱患者97名、発疹熱患者16名、及び発疹チ

フス患者67名の急性期の血清を試験した。それゆえ本願出願人は、この組の患者の臨床及び疫学的データを有している。これらの血清は全て、*R. pulicis*、*R. prowazekii*、*R. typhi*、及び*R. conorii*について試験した。

【0047】

5. 血清学的試験の結果

血液ドナーからの血清100本はいずれも、*R. pulicis*を陽性とする血清学的試験結果を示さなかった。*R. prowazekii* と*R. pulicis*との血清学的交叉反応が、発疹チフス患者の血清67本のうち51本(76.1%)で観察された。しかし血清67本はいずれも、抗*R. prowazekii* 抗体価(IgG又はIgMに対するもの)よりも高い抗*R. pulicis*抗体価を有していなかった。

【0048】

*R. typhi*と*R. pulicis*との血清学的交叉反応は、発疹熱患者の血清16本のうち11本(68.7%)で観察された。しかし、16本の血清はいずれも、抗*R. typhi*抗体価(IgG又はIgMに対するもの)よりも高い抗*R. pulicis*抗体価を有していなかった。

【0049】

*R. conorii*と*R. pulicis*との血清学的交叉反応は、地中海斑点熱患者の血清97本のうち67本(69.0%)で観察された。血清97本のうち96本は、抗*R. conorii*抗体価(IgG又はIgMに対するもの)よりも低い抗*R. pulicis*抗体価を有していた。患者1名は、*R. conorii*に対する抗体価よりも2回希釈分高い抗*R. pulicis*抗体価を呈し、結果として*R. pulicis*による感染が疑われた。ウエスタンブロット試験をこの血清で実施して、その患者が*R. pulicis*に特異的に作用する抗体を有していることが確認された。

【0050】

実施例4

4. 1 ポリアクリルアミドドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動法(SDS-PAGE)及びウエスタン移動法(Western transfer)による主要蛋白質の分析

【0051】

リケッチア株をRenografine 法により精製した。Renografine 法で精製した*R. pulicis*、*R. typhi*、*R. prowazekii*、*R. canadensis*、*R. conorii*、及び*R. a kari*を、SDS-PAGE試料緩衝液（0.625M Tris（pH8.0）、0.2%（w/v）ドデシル硫酸ナトリウム、5%（v/v）2-メルカプロエタノール、10%（v/v）グリセロール、及び0.002%（w/v）ブロモフェノールブルー）中に懸濁した。これらの各1アリコート（100℃で10分間加熱し、その後加熱及び非加熱のアリコートを9%～16%のポリアクリルアミドゲル直線勾配法（18cm×20cm×1.5mm）にロードした。その後、蛋白質を40mA、10℃で5時間電気泳動することにより分離した（Laemmli, 1970）。分離した蛋白質を、銀で染色した。主要な免疫原性蛋白質を、以前に記載されたように精製した非加熱抗原（Laemmli, 1970; Teyssere et al., 1992）と抗*R. pulicis*ネズミポリクローナル抗体とを用いたウェスタン移動法により試験した。

【0052】

4.2 抗体への感受性

*R. pulicis*に対するエリスロマイシン活性を、Gimenez 染色を利用した比色分析により、Ver o細胞で測定した。48穴のタイトレーションマイクロプレートでのVer o細胞培養物を、2000PFUのリケッチアに室温で1時間感染させ、エリスロマイシンを様々な列に様々な濃度で添加した。2000、200、20、及び0のPFUで感染した、薬物を含まない列を、対照とした。32℃でプレートをインキュベーションした9日後に、細胞培養物の単層をGimenez 染色で染色して、各ウェル毎に無作為に選択した25の部分に感染部位が存在すること（リケッチアの収集物）を明らかにした。抗生物質を含まない対照に関する感染部位を完全に阻止する最小抗生物質濃度を、MICとした。ドキシサイクリン及びリファンピンでは、1つの濃度（4μg/ml）で試験した。実験は、結果を確認するために二重に実施した。インキュベーション温度を32℃に低下させて、*R. pulicis*を増殖させた。*R. conorii*及び*R. typhi*は対照と同様の方法で試験した。

【0053】

4. 3 結果及び考察

図1は、細胞全体の蛋白質調製物の銀染色したSDS-PAGEプロフィールを示している。レーン1：R. conirii；レーン2：R. pulicis；レーン3：R. typhi；レーン4：R. conirii；レーン5：R. pulicis；レーン6：R. akari。分子量標準は、ゲルの端に見られる。

【0054】

レーン1～3は、コールド抗原に対応する。レーン4～6は、ホット抗原に対応する。

R. pulicisのSDS-PAGEプロフィールは、R. typhi（図1）R. prowazekii、R. canadensis、R. conorii（図2）、及びR. akariで得られたものと実質的に異なっている。R. conoriiと同様にR. pulicisは、MWが150kDaを超える高分子量蛋白質を有しており、これはR. typhi及びR. prowazekiiの場合とは異なっている。R. pulicisは、130kDaの易熱性蛋白質も有しており、このタンパク質は試験したその他のリケッチアのプロフィールには見られなかった。それゆえ、本発明による菌株のSDS-PAGE蛋白質プロフィールは、「R. felis」のものとはかなり異なり、上述のようにウェスタン移動法に関してはR. typhiのものと非常に類似するが（Radulovic et al., 1995b; Higgins et al., 1996; Azad et al., 1997）、R. pulicisの免疫原性抗原はR. pulicisに特異的に反応するヒト血清中R. typhiの抗原及び30kDa抗原に対する反応の結果精製された単離物に対して生成されたマウス抗血清中のR. typhiの抗原と、識別可能であることが示された。

【0055】

R. pulicisのアクチン重合能力を細胞内で評価するために、アクチン及び細菌の蛍光二重染色を実施した。R. pulicis又はR. typhiに感染した細胞では、R. conoriiに感染した細胞とは異なり、アクチンの極性重合（polar polymerisation）が観察されなかった。アクチン重合は、核内での増殖能力（チフス群及びR. pulicis群には欠けているがこれまで試験した斑点熱群のすべてのリケッチアに共通する特性）に関与すると思われた（Heinzen et al., 1993; Teyssie et al., 1992; Burgdorfer et al., 1968）。

【0056】

*R. pulicis*によるエリスロマイシンのMICは、 $32\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のドキシサイクリン又はリファンピンは、阻害性があった。対照から得られた結果は、過去に得られたものと同一であった (Rolain et al., 1998)。 *R. pulicis*単離物は、エリスロマイシン耐性があるが、この抗生物質への感受性は、チフス群のリケッチア (Rolain et al., 1998) 及び「*R. felis*」として公知の細菌 (Radulovic et al. 1995a; Radulovic et al. 1996) の特徴である。

【0057】

*rOmpA*及び*rpOB*遺伝子を、それぞれ第3539番目～第6722番目の塩基、及び第1番目～第3866番目の塩基について塩基配列決定した。*rpOB*の場合、配列同一性は、ヌクレオチド配列では96% (*R. massiliae* bar 26, *R. conorii*) ～87%であった。*R. pulicis*と*R. prowazekii*との配列同一性は、92%であった。アミノ酸配列については、同一性は、98% (*R. massiliae*, Bar 29, *R. conorii*) ～83% (*R. typhi*)であった。*R. pulicis*と*R. prowazekii*との配列同一性は、96%であった。

【0058】

用いた3種の異なる進化系統樹構成法により *rOmpA* から得られたデンドログラムは、*R. pulicis*で同様の系統発生位置を示した。それらは、100%のブートストラップ値で*R. australis*のクラスターを形成した。

【0059】

*R. pulicis*を今は存在しない「*R. felis*」株と識別し得る別のデータは、増殖温度である。*R. pulicis*は、 35°C 又は 37°C では増殖しないが、「*R. felis*」は、Ver o細胞、HUVBC、又はL929細胞中で 34°C で増殖させた場合、細胞変性効果を引き起こして小さな増殖遅延領域を形成することが報告されている (Radulovic et al. 1995b)。その上*R. pulicis*は、 28°C でもL929細胞での増殖能を有していない。これらの結果から、今は存在しない「*R. felis*」単離物が、E.I Laboratoryに供与された感染したネコノミから繰り返し回収したものと同一生物体でないことが実証される。*R. pulicis*単離物の表現型の記載は

、元の「R. felis」単離物のものとは実質的に異なっている。その上、本願発明者は、元の「R. felis」株を単離した後で彼等の試験室に送られてきた「R. felis」のストックからは、R. typhiしか単離できないことを見出した。

【0060】

【表1】

特徴	R. conorii	R. typhi	R. pulicis	「R.felis」
増殖可能性				
28℃	+	+	+	NF
32℃	+	+	+ (低い)	NF
34℃	+	+	—	+
増殖可能性				
XTC-2細胞	+	+	+	NF
Vero細胞	+	+	+	+
L929細胞	+	+	—	+
局在化				
細胞質	+	+	+	+
核	+	—	—	—
アクチン重合	+	—	—	NF
4μg/mlでの阻害				
ドキシサイクリン	+	+	+	+
リファンピン	+	+	+	+
エリスロマイシン	—	+	—	+
SDS-PAGEでの				
蛋白質				
150kDa	+	—	+	—
30kDa	—	—	+	—
17kDa	+	+	+	+
検出した遺伝子				
OmpA	+	—	+	—
OmpB	+	+	+	+

引用文献

- Adams, J. R., Schmistmann, E. T., & Azad, A. F. (1990). Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouche), with rickettsia-like microorganism. *Am J Trop Med Hyg* 43, 400-409.
- Azad, A. F., Sacci, J. B., Nelson, W. M., Dasch, G. A., Schmjdtdmann, E. T., & Cari, M. (1992). Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 43-46.
- Azad, A. F. Radulovic, S., Higgins, J. A., Noden, B. H., & Troyer, J. M. (1997). Flea-borne rickettsiose: ecologic considerations. *Emerg Infecton Dis* 3, 319-327.
- I Bouyer, D. H., Crocquet-Valdes, P. A., & Walker, D. H. (2000). Expression and size I determination of the rOmpA protein of *Rickettsia felis*. In American Society for Rickettsiology 15th-meeting. pp61-61.
- Burgdorfer, W., Anacker, R. L., Bird, R. G., & Bertram, D. S. (1968). Intranuclear growth of *Rickettsia rickettsii*. *J Bacteriol* 96, 1415-1418.
- Drancourt, M., Raoult, D. (1999). Characterization of mutation in *rpoB* gene in naturally rifampin-resistant *Rickettsia* species. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 10 2400-2403.
- Fournier, P. E., Roux, V., Raoult, D. (1998). Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the surface protein rOmpA. In *t J Syst Bacteriol* 48, 839-849.
- Heinzen, R. A., Hayes, S. F., Peacock, M. G., & Hackstad, T. (1993). Directional actin polymerization associated with spotted fever group rickettsia infection of Vero cells. *Infection Immun* 61, 1926-1935.
- Higgins, J. A., Radulovic, S., Schriefer, M. E., & Azad, A. F. (1996). *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic rickettsia isolated from cat fleas. *J Clin Microbiol* 34, 671-674.
- La Scola, B., & Raoult, D. (1996). Diagnosis of Mediterranean spotted fe

ver by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6 year follow-up. *J Clin Microbiol* 34, 2722-2727.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Murray, R. G. E., & Schleifer, K. H. (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int J Syst Bacteriol* 44, 174-176.

Noden, B. H., Radulovic, S., Higgins, J. A., & Azad, A. F. (1998). Molecular identification of *Rickettsia typhi* and *R. felis* in co-infected *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 35, 410-414.

Radulovic, S., Higgins, J. A., Jaworski, D. C., & Azad, A. F. (1995a). In vitro and in vivo antibiotic susceptibilities of ELB rickettsiae. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2564-2566.

Radulovic, S., Higgins, J. A., Jaworski, D. C., Dasch, G. A., & Azad, A. F. (1995b). Isolation, cultivation, and partial characterization of the ELB agent associated with cat fleas. *Infect Immun* 63, 4826-4829.

Radulovic, S., Higgins, J. A., Jaworski, D. C., & Azad, A. F. (1996). In vitro and in vivo antibiotic susceptibilities of ELB rickettsiae (vol 39, pg 2564, 1996). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 2912.

Rolain, J. M., Maurin, M., Vestris, G., & Raoult, D. (1998). In vitro susceptibilities of 27 *Rickettsiae* to 13 antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1537-1541.

Teyssie, N., Chiche-Portiche, C., & Raoult, D. (1992). Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* based on actin polymerization. *Res Microbiol* 143, 821-829.

【0061】

なお、国際公開明細書11頁4行目の

【表2】

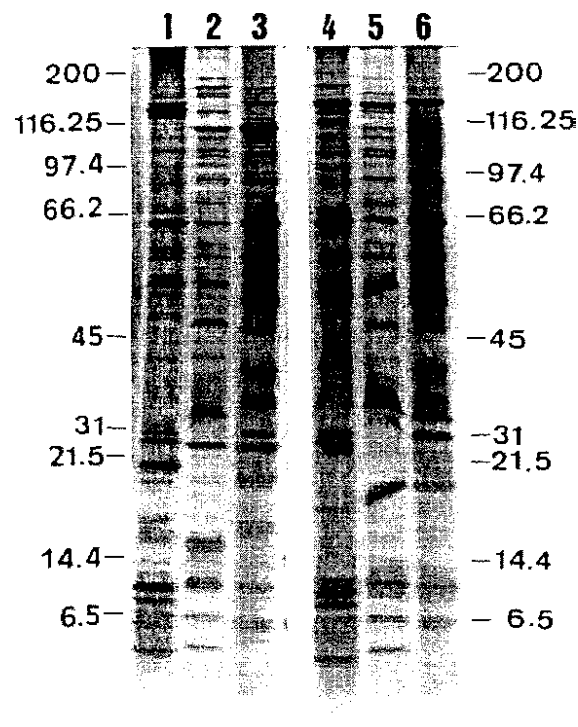
Biométieux, Marcy l'étoile

を、本文中ではBiometieux, Marcy letoile と便宜的に示した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例4で試験した*R. conorii*、*R. pulicis*、及び*R. typhi*菌の蛋白質プロフィール。

【図1】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年12月8日(2001.12.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離され、培養で樹立された、E L B因子と一致するRickettsia菌。

【請求項2】 25～30℃、好ましくは28℃の温度での細胞培養で単離された、請求項1に記載の細菌。

【請求項3】 1)細胞培養物、好ましくはXenopus Laevis細胞を、25～30℃、好ましくは28℃の培養温度で得る工程と、
2)細菌が、粉碎したノミを遠心単離するか、或いは前記細菌に感染したヒト又は動物を起源とするいずれか別の試料を遠心単離することにより、工程1で培養した細胞層に接種し、細菌の増殖が観察されるまで25～30℃、好ましくは28℃でインキュベートする工程と、
3)細菌を、培養細胞に逐次再接種することにより培養で樹立する工程とから成る方法により得られる、請求項1又は2のいずれかに記載の、E L B因子と一致するRickettsia菌。

【請求項4】 前記細菌が、工程3の細胞培養物の上清を遠心単離することにより精製される、請求項3に記載の細菌。

【請求項5】 No. 1-2363の番号で1999年12月8日にCNCM (National Collection of Microorganism Cultures at the Institut Pasteur, フランス) に提出された、請求項1～4のいずれか1項に記載の細菌。

【請求項6】 請求項1～5に記載の細菌の抗原。

【請求項7】 SDS-PAGE法により測定された分子量30Kd及び150Kdの蛋白質から選択された蛋白質である、請求項6に記載の細菌の抗原。

【請求項8】 SDS-PAGE法により測定された分子量17Kdの蛋白質である、請求項6に記載の細菌から生成された抗原。

【請求項9】 請求項1～8のうちの1項に記載の細菌の抗原に対する特異的抗体。

【請求項10】 動物を起源とするポリクローナル抗体である、請求項9に記載の抗体。

【請求項11】 マウス免疫グロブリンである、請求項10に記載の抗体。

【請求項12】 請求項1～5のいずれか1項に記載の細菌の細胞培養物。

【請求項13】 前記細胞が、（好ましくはNo. 1-2364の番号で1999年12月8日にInstitut PasteurのCNMに提出された健常なXTC-2細胞から得られた）前記細菌に感染したXenopus laevis細胞である、請求項12に記載の培養物。

【請求項14】 前記細菌の感染に関連する疾患のインビトロ診断のための、請求項1～5のいずれか1項に記載の細菌、又は請求項12若しくは13に記載の培養物の使用方法。

【請求項15】 請求項1～5のいずれか1項に記載の細菌による感染に関連する疾患のインビトロ診断のための、請求項6～11のいずれか1項に記載の抗原又は抗体の使用方法。

【請求項16】 請求項9～11の1項に記載の細菌の特異的抗体と、前記細菌の抗原との免疫学的反応を検出する工程から基本的に成る、Rickettsia感染のインビトロ血清学的診断方法。

【請求項17】 請求項1～5に記載の前記細菌を認識するヒト免疫グロブリンの特異的抗体と、請求項1～5に記載の前記細菌を認識する前記ヒト免疫グロブリンとの免疫学的反応を検出する工程から基本的に成る、Rickettsiaのインビトロ血清学的診断方法。

【請求項18】 請求項1～5のうちの1項に記載の前記Rickettsia菌を認識するヒト免疫グロブリン（好ましくはG、M、又はA型）の特異的抗体が、動物免疫グロブリン、好ましくはヤギ免疫グロブリンである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 請求項1～5のいずれか1項に記載の細菌、請求項12又は13の1項に記載の培養物、及び／又は請求項9～11のいずれか1項に記載の特異的抗体を、血清、体液、ノミ、又はヒト試料からなる患者を起源とする試料に接触させる、請求項17又は18に記載のRickettsia菌による感染に関連する疾患の診断方法。

【請求項20】 一固相支持体の内部又は上部に請求項1～5に記載の細菌の溶液を堆積させる工程と、

一前記支持体の内部又は上部に、試験する血清又は体液を添加する工程と、

一前記支持体の内部又は上部に、前記細菌を認識するヒト免疫グロブリンの特異的標識抗体溶液を添加する工程と、

一一定期間、インキュベートする工程と、

一前記固相支持体をリンスする工程と

一前記免疫グロブリン反応の検出を実行する工程と、から成る、請求項19に記載の血清学的診断方法。

【請求項21】 前記標識抗体が、酵素又は蛍光剤の放射性プローブで標識されている、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネートである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記細菌を含有する前記溶液の0.5～5 μ l、好ましくは約1 μ lが用いられる、請求項20～22に記載の方法。

【請求項24】 前記細菌を含有する溶液を内部又は上部に堆積させた固相支持体を備えた、請求項20～23のいずれか1項に記載の方法を適用するための装置。

【請求項25】 前記固相支持体がガラススライドである、請求項24に記載の装置。

【請求項26】 一請求項1～5及び12～13に記載の細菌又は細胞培養物を含有する溶液、及び／又は

一請求項9～11に記載の特異的抗体を含有する溶液、及び／又は

一請求項1～5に記載の前記細菌を認識するヒト免疫グロブリンの特異的抗体を

含有する溶液、

という基本的構成要素から成る、請求項16～23の1項に記載の方法によるRickettsia菌のインビトロ検出のためのキット。

【請求項27】 前記特異的抗体が標識されている、請求項26に記載のキット。

【請求項28】 前記特異的抗体が、放射性同位体、酵素、又は蛍光化合物により標識されている、請求項27に記載のキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 00/03475		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N1/20 C12N5/06 C07K16/12 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	Relevant to claim No.	
X	RADULOVIC ET AL.: "Isolation, cultivation, and partial characterization of the ELB agent associated with cat fleas" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 12, December 1995 (1995-12), pages 4826-4829, XP002145965 cited in the application page 4826; figures 1-3 ---	1-18, 25-27
A	---	19-24
X	HIGGINS ET AL.: "Rickettsia felis: a new species of pathogenic Rickettsia isolated from cat fleas" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 34, no. 3, March 1996 (1996-03), pages 671-674, XP002145966 cited in the application figures 1-3; table 1 ---	6-10, 14-18, 25-27
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C.		☒ Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 June 2001	Date of mailing of the international search report 17/07/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer van Klompenburg, W	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/03475

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 447 537 A (YUNKER CONRAD E ET AL) 8 May 1984 (1984-05-08) column 7, line 60 - column 8, line 36 ---	2-4
A	WO 99 42479 A (PAAHLSON CARL ; NILSSON KENNETH (SE)) 26 August 1999 (1999-08-26) page 2, last paragraph claims 4-13; examples 1-4 page 5 -----	6-10, 14-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/03475

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4447537 A	08-05-1984	NONE	
WO 9942479 A	26-08-1999	AU 3283199 A	06-09-1999
		EP 1054895 A	29-11-2000
		NO 20004168 A	21-08-2000
		SE 9800504 A	21-08-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/569		C 1 2 N 5/00	E

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

(72)発明者 ラ スコラ、ベルナール
 フランス国 F-13790 ルーセ ロティ
 スマント ネグレル 5

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA90X CA24 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA30 CA11 DA75
 DA86 EA52 FA72

专利名称(译)	Rickettsiapulicis真菌和血清学诊断方法		
公开(公告)号	JP2003517040A	公开(公告)日	2003-05-20
申请号	JP2001545516	申请日	2000-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	UNIV DE LA MEDITERRANEEAIX MARSEILLE II		
申请(专利权)人(译)	Université电德拉地中海 (艾克斯 - 马赛斗)		
[标]发明人	ラウルデディエ ラスコラベルナール		
发明人	ラウル、デディエ ラ スコラ、ベルナール		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/29 C07K16/12 C12N1/20 C12N5/06 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56911 C07K16/1246 C12N1/20 G01N2333/29		
FI分类号	C07K14/29 C07K16/12 C12N1/20.A G01N33/53.D G01N33/569.B C12N5/00.E		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AA90X 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA72		
优先权	1999015777 1999-12-14 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在28°C的培养温度下在非洲爪蟾属细胞或任何其他细胞上分离立克次体细菌的方法。立克次体立克次体细菌用于血清学诊断，其包括使引起疾病的细菌与患者的血清或体液接触。本发明还涉及一种用于执行体外检测跳蚤或人类样品中细菌的方法的装置。

