

(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2005-530998

(P2005-530998A)

(43) 公表日 平成17年10月13日(2005.10.13)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569	GO 1 N 33/569	F 4 B O 6 3
CO 7 K 1/14	CO 7 K 1/14	4 B O 6 5
CO 7 K 14/195	CO 7 K 14/195	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/20	C 1 2 N 1/20	C
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-515733 (P2004-515733)	(71) 出願人	394010986 アクゾ・ノベル・エヌ・ベー
(86) (22) 出願日	平成15年6月5日 (2003.6.5)		オランダ国、6824・ベー・エム・アー
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月7日 (2005.2.7)		ネム、フェルペルウエヒ・76
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/017593	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W02004/000096		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成15年12月31日 (2003.12.31)	(74) 代理人	100114188
(31) 優先権主張番号	10/176, 735		弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成14年6月21日 (2002.6.21)	(74) 代理人	100103920
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明
		(72) 発明者	ベスキ、フレデリック・ランダル
			アメリカ合衆国、デラウェア・19966
			、ミルスボロ、ミル・ランディング・5
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E L I S A 診断において使用される新規なバルトネラ抗原溶解物抽出物

## (57) 【要約】

本発明の実施態様は、一般には、新規な細菌抗原抽出およびその使用方法に関する。本発明のさらなる実施態様では、本発明の新規な細菌抗原が、血清または他の体液におけるバルトネラ抗体を検出するための診断キットにおいて使用される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

酵素結合免疫吸着アッセイにおいて使用される新規なバルトネラ (*Bartonella*) 抗原の抽出であって、

- (a) バルトネラ属細菌細胞を集める工程、
- (b) バルトネラ属細菌細胞を第 1 の分離物中に分離する工程、
- (c) 第 1 の分離物を第 1 の懸濁物中に懸濁する工程、
- (d) 第 1 の懸濁物を超音波処理する工程、および
- (e) 抗原を可溶性画分中に抽出する工程

を含む前記抽出。

10

## 【請求項 2】

超音波処理する前に、懸濁されたバルトネラ属細菌細胞を第 2 の分離物中に分離すること、および、第 2 の分離物を第 2 の懸濁物中に懸濁することをさらに含む、請求項 1 に記載の抽出。

## 【請求項 3】

第 1 の懸濁物が界面活性剤緩衝液中にである、請求項 1 に記載の抽出。

## 【請求項 4】

第 2 の懸濁物が界面活性剤緩衝液中にである、請求項 2 に記載の抽出。

## 【請求項 5】

バルトネラ属細菌細胞を成長させることをさらに含む、請求項 1 に記載の抽出。

20

## 【請求項 6】

バルトネラ属細菌が、バルトネラ・ヘンセラエ (*Bartonella henselae*)、バルトネラ・キンタナ (*Bartonella quintana*)、バルトネラ・クラリドゲイアエ (*Bartonella claridgeiae*) およびバルトネラ・ビンソニイ (*Bartonella vinsonii*) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抽出。

## 【請求項 7】

バルトネラ属細菌細胞を分離する工程が遠心分離機において分離される、請求項 1 に記載の抽出。

## 【請求項 8】

バルトネラ属細菌細胞を分離する工程がボルテックス処理をさらに含む、請求項 1 に記載の抽出。

30

## 【請求項 9】

ペレットを溶液に懸濁する工程が緩衝化生理的食塩水溶液中にである、請求項 1 に記載の抽出。

## 【請求項 10】

界面活性剤溶液が非イオン性である、請求項 3 に記載の抽出。

## 【請求項 11】

抽出された上清を免疫アッセイにおいて溶解物として利用することをさらに含む、請求項 1 に記載の抽出。

40

## 【請求項 12】

免疫アッセイが酵素結合免疫吸着アッセイである、請求項 11 に記載の抽出。

## 【請求項 13】

溶解物が、バルトネラ・ヘンセラエ (*Bartonella henselae*)、バルトネラ・キンタナ (*Bartonella quintana*)、バルトネラ・クラリドゲイアエ (*Bartonella claridgeiae*) およびバルトネラ・ビンソニイ (*Bartonella vinsonii*) からなる群から選択されるバルトネラ属細菌抗体の血清中の存在を検出するための診断キットの一部である、請求項 11 に記載の抽出。

## 【請求項 14】

50

血清がネコから採取される、請求項 13 に記載の抽出。

【請求項 15】

バルトネラ属細菌 (*Bartonella*) に対する抗体の血清中の存在を検出するための診断キットであって、

バルトネラ属細菌の溶解物抗原で被覆されたプレート、および

バルトネラ属細菌溶解物に結合した抗体に結合する酵素標識されたコンジュゲートを含む、前記診断キット。

【請求項 16】

バルトネラ属細菌の溶解物が請求項 1 から 9 のいずれか一項に従って調製される、請求項 15 に記載の診断キット。

10

【請求項 17】

コンジュゲートの可視化を可能にする基質をさらに含む、請求項 15 に記載の診断キット。

【請求項 18】

基質が酵素標識を含む、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 19】

基質が、比色測定シグナル、蛍光測定シグナルまたは化学発光シグナルを酵素標識の存在下でもたすための組成物である、請求項 18 に記載の診断キット。

【請求項 20】

陽性コントロールをさらに含む、請求項 15 に記載の診断キット。

20

【請求項 21】

陰性コントロールをさらに含む、請求項 15 に記載の診断キット。

【請求項 22】

読み取り装置をさらに含む、請求項 15 に記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物においてバルトネラ属細菌 (*Bartonella*) を検出するための方法およびキットに関する。

【背景技術】

30

【0002】

抗体および/または抗原を検出するための従来の免疫アッセイには、ELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ) プロトコルなどの酵素免疫アッセイ、RIA - 免疫沈殿アッセイなどの放射免疫アッセイ、および免疫蛍光プロトコルが含まれる。典型的には、所定量の抗原 (または抗体) が固相 (タンパク質結合性の表面) に吸着させられる。抗体 (抗原) について分析される試験サンプルが、その後、抗原 (抗体) が結合している表面に接触させられ、試験サンプル中の抗体 (抗原) が、固定化されている抗原 (抗体) に結合する。放射活性な免疫グロブリンプローブまたは酵素標識されている免疫グロブリンプローブが、その後、その表面に接触させられ、固定化されている抗体 (抗原) に結合する。固体担体に結合した標識されているプローブの量を定量することができ、その量により、試験サンプル中の抗体 (抗原) 濃度が示される。

40

【0003】

放射免疫アッセイ手法を使用することの欠点には、多数の希釈工程、インキュベーション工程および洗浄工程を含む甚だしいサンプル操作が必要であることが含まれる。さらには、潜在的に有害な放射性同位体が用いられる。放射免疫アッセイプロトコルに従ってサンプルを処理することには、少なくとも数時間が費やされ、また、比較的複雑な実験設備および熟練した技術者が必要である。

【0004】

他方で、免疫蛍光染色では、一般に、特異性が正確に示され、また、抗原 - 抗体反応の可視化が可能である。しかしながら、免疫蛍光方法論は、大規模で行うためには時間がか

50

かり、大規模で行うことが困難である。さらに、免疫蛍光アッセイ結果の分析では、経験を積んだ技術者の分析的判断が要求される。さらに、感度およびイオンからの妨害が、免疫蛍光アッセイにおいて遭遇する問題点である。

#### 【0005】

別のタイプの免疫アッセイとして、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)が含まれる。ELISAプロトコルでは、典型的には、数段階の血清希釈物および1つの標的抗原(抗体)濃度を使用する多数の微量アッセイが伴う。マイクロタイタープレートが、典型的には、抗体(抗原)の存在を検出するために必要な多数の微量アッセイを行うために使用される。ELISAマルチウエル技術は下記の手法上の類似点を有している:

1. ポリスチレン製マイクロタイタープレートのウエルが受動的吸着によって関連した抗原で感受性にされる。その後、プレートは洗浄される。 10
2. 試験サンプルが、感受性にされたウエルにおいてインキュベーションされ、プレートが再び洗浄される。サンプルに存在する抗体がウエル表面上の固定化されている抗原に結合する。
3. 酵素標識された抗Ig(すなわち、サンプルに対応する動物種に対する抗免疫グロブリン抗体)コンジュゲートがウエルにおいてインキュベーションされる。コンジュゲートは酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼなど)を含有する。コンジュゲートは任意の「捕捉」されている抗体または結合している抗体と反応する。過剰な試薬は洗い流される。
4. 酵素の基質が加えられ、プレートがインキュベーションされる。分解速度が、工程2 20  
での試験サンプルにおける抗体濃度に比例する色の変化によって示される。
5. 反応が停止させられるか、または阻止することができ、色の変化が、可視的に、または分光光度計でアッセイされる。

#### 【0006】

そのようなELISA手法は有用であり、しかし、一般には、他の免疫アッセイ技術のように、必ずしも特異的ではない。特に、バルトネラを検出するためのELISA OMPプロセスは、低レベルで特異的でない傾向がある。

#### 【0007】

バルトネラ・ヘンセラエ(*Bartonella henselae*)はヒトのネコひっかき病(CSD)の病原体であり、細菌性血管腫症、細菌性紫斑病、再発性菌血症および心内膜炎に関連している。(ロシャリメア属(*Rochalimaea*)によるネコひっかき病、細菌性血管腫症および他の感染症、N. 他、*New England Journal of Medicine*、1994、330:1509頁~1515頁)。ネコは、バルトネラ・ヘンセラエをヒトに移す媒介体として作用することが証拠から示されているが、ネコは自然感染に対して無症候性であるようである(*Bartonella* R. 菌血症および3つのネコ集団、Kordick 他、抗菌剤および化学療法に関する第34回学際会議のアブストラクト、アメリカ微生物学会、Washington D.C.、1994年)。しかしながら、いくつかの最近の研究では、実験的に感染させたネコが、発熱、食欲不振、嗜眠および末梢リンパ節障害などの臨床的徴候を発症し得ることが示されている(家ネコにおけるバルトネラ・ヘンセラエによる実験的感染および自然感染 40  
、他、*Comp. Immuno. Microbiol. In Fact. Dis.*、1997、20:41頁~51頁)。これらの臨床的徴候は短時間で消失し、ネコの飼い主によって気づかれないことさえあり得る。しかしながら、何回かの感染が再発する傾向がある。

#### 【0008】

文献では、バルトネラ・ヘンセラエによる感染に対する強い免疫応答が存在することが広く報告されている(ネコの液性免疫系によって認識されるバルトネラ特異的な免疫優勢抗原の同定、Free land 他、*Clinical and Diagnostic Immunology*、1999年7月、558頁~566頁)。しかしながら、ネコにおけるバルトネラ・ヘンセラエの病理発生は明瞭には理解されてない。バルトネラ・ヘン 50

セラエの検出における複雑化要因の1つが、バルトネラ・ヘンセラエが自然感染したネコは、一般に、臨床的疾患をそのような期間中に引き起こすことなく数ヶ月から数年に続くことがある菌血症の再発期間を有するということである（バルトネラ・ヘンセラエの病原性菌株が接種された子ネコにおける臨床的疾患、Mikolajczyk他、AJVR、第61巻、第4号、2000年4月、375頁）。

#### 【0009】

実験的に感染させたネコの臨床的徴候に関して矛盾する報告が存在する（家ネコにおけるバルトネラ・ヘンセラエによる自然感染の実験、Abbott他、Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.、1997、20：41頁～51頁）。様々な研究では、実験的に感染させたネコには臨床的徴候がないことが報告されており、一方で、他の研究では、軽い発熱を含む軽度の臨床的徴候、ならびに、感染後8週間までにおける一部のネコでの組織病理学的病変が報告されている（バルトネラ・ヘンセラエ感染ネコの血液伝播の後での菌血症の再発、Kordick他、American Journal of Veterinary Research、1997、58：492頁～497頁）。バルトネラ・ヘンセラエを実験的に感染させた子ネコにおける他の臨床的徴候には、嗜眠および食欲不振が含まれている（バルトネラ・ヘンセラエの病原性菌株が接種された子ネコにおける臨床的疾患、Mikolajczyk他、AJVR、第61巻、第4号、2000年4月、378頁）。別の興味深い観測結果は、バルトネラ・ヘンセラエ感染の子ネコは、臨床的徴候を1回だけ経験したバルトネラ・ヘンセラエ感染の成体ネコとは対照的に、臨床的徴候の2回の症状発現を経験したということである（同上）。

10

20

#### 【0010】

ペットのネコは、通常、バルトネラ感染について、または、B. henselaeに対する抗体についてスクリーニングされていない。しかしながら、血清学的スクリーニングは、感染している可能性のあるネコを選ぶことを防ぐことによって、免疫低下している飼い主にとって、または、小さい子供を有する飼い主にとって有益であり得る。これは、ネコひっかき病が、ヒトでは、特に、小さい子供および免疫低下者では、重篤になり得る疾患を生じさせ得るからである。従って、ネコをバルトネラ感染についてスクリーニングすることは望ましい。

#### 【0011】

上記で議論された市販の診断ツールのうち、最も一般的なものが免疫蛍光アッセイ（IFA）である（疑われるネコひっかき病における「ロシャリメア・ヘンセラエ（Rochalimaea henselae）」抗原に対する応答、Regnery他、Lancet、1992、339：1443頁～1445頁）。IFAには多くの制限がある。このアッセイは、非常に多数のサンプルを用いて行うことが困難であり、時間および費用がかかり、また、蛍光光源を備えた顕微鏡を必要とする。それ以外の一般的に使用されている免疫アッセイであるELISAは、迅速で、無害で、かつ高感度である傾向を有する。従って、技術分野は、操作が比較的容易であり、また、簡便かつ無害である、バルトネラに対する抗体を検出するための方法および/または診断キットを求めることにおいてである。本発明は、1つの実施態様において、そのような方法および診断キットを提供する。

30

40

#### 【発明の開示】

#### 【0012】

本発明の様々な実施態様により、生物におけるバルトネラ感染に対する抗体応答を正確かつ迅速に高感度でアッセイするための方法および診断キットが提供される。

#### 【0013】

本発明の様々な他の実施態様により、現場にとどまりながら使用され得るバルトネラ感染用のELISA診断キットが提供される。本発明のELISA診断キットの新規性および独創性は、少なくとも部分的には、使用される抗原の新規な調製方法と、関連するキットの新規な方法との特定の組合せにある。

#### 【0014】

50

一般に、本発明の実施態様では、細菌抗原抽出の可溶性画分が素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) の固相における被覆抗原として利用されるが、これに対して、先行技術の抗原は、一般には、不溶性画分またはペレット化画分、すなわち、外膜タンパク質 (以降、「OMP」と呼ばれる) に由来する。本発明の実施態様では、先行技術の免疫診断技術と比較して、高まった感度、および種特異性がより大きい反応が明らかにされる。

【0015】

本発明の様々な実施態様のさらなる局面では、サンプル中の抗体を測定するために、遠心分離機、超音波処理器および/または吸光度読み取り装置が含まれる。

【0016】

本明細書中で使用される用語「集める」およびその任意の活用変化形は、回収することおよび回収を意味し、回収することおよび回収を示す。本明細書中で使用される用語「被覆するために十分な体積で」は、少なくとも実質的にすべての結合した抗原 (または場合により抗体) と反応するための十分な結合性成分を提供するために十分な体積を意味し、そのような体積を示す。

10

【0017】

本発明の実施態様により、バルトネラ属 (*Bartonella*) の細菌細胞から得られたバルトネラ抗原の新規な溶解物が提供される。さらなる実施態様では、本発明の溶解物をバルトネラ属細菌から抽出するための新規な方法が提供される。他の実施態様では、本発明の新規な溶解物が、サンプル (例えば、血清サンプルまたは他の体液など) におけるバルトネラ属細菌に対する抗体を検出するための診断キットおよび/または免疫アッセイにおいて利用される。

20

【0018】

本発明の実施態様は、バルトネラ・ヘンセラエ (*Bartonella henselae*)、バルトネラ・キンタナ (*Bartonella quintana*)、バルトネラ・バチリホルミス (*Bartonella bacilliformis*)、バルトネラ・ビンソニイ (*Bartonella vinsonii*)、バルトネラ・クラリドゲイアエ (*Bartonella claridgeiae*) およびその他 (これらに限定されない) を含むすべてのタイプのバルトネラについて溶解物を調製するために使用することができる。

30

【0019】

溶解物を調製するための本発明の実施態様は一般には、下記の工程を含む、バルトネラ抗原を抽出するための新規な方法を構成する：

- (a) バルトネラ属細菌細胞を集める工程、
- (b) バルトネラ属細菌細胞を分離する工程、
- (c) 懸濁されたバルトネラ細菌細胞を超音波処理する工程、および
- (d) 可溶性画分を抽出する工程。

本発明の抽出された可溶性画分、溶解物または上清の様々な実施態様が、様々な免疫アッセイにおいて、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) などの酵素結合免疫アッセイにおいて利用され得る。

40

【0020】

細菌を集めること：

細菌を数多くの供給源から得ることができる。様々な実施態様において、細菌抗原が、細菌細胞などの細胞から抽出される。細胞から抗原を単離または抽出するために知られている方法は極めて多様である。異なる様々な細菌種の成分はかなり異なっているので、広範囲に適用される方法はほとんどない。細菌抗原は、1) 細胞外タンパク質、鞭毛および菌体外多糖などの細胞外成分、2) 細胞壁の一部、3) 細胞膜の一部、および/または、4) 細胞内成分であり得る。しかしながら、精製された抗原の懸濁物から得ることができる抗原は、混入する宿主物質をほとんど含んでいない。このことは、他の抗原および大きく妨害する妨害物を含まない抗原をもたらすと考えられる。

【0021】

50

1つの実施態様において、バルトネラ属細菌は血液寒天フラスコで成長させられる。1つの実施態様において、バルトネラ属細菌は人口的な環境で成長させられる。人工的な環境は、バルトネラ属細菌の周りの雰囲気構成要素の一部またはすべての濃度を変化させることによって、例えば、温度および/またはその他を変化させることによって得ることができる。

【0022】

成長させられたバルトネラ属細菌は、この分野で一般的な任意の方法によって、例えば、スパチュラを用いてかき取ることなどによって集めることができる。別の実施態様において、細胞はガラスビーズとともに集められる。

【0023】

細菌を集めた後、細菌抗原が抽出される。

【0024】

抗原の抽出：

バルトネラ属細菌からの抗原の本発明の抽出では、抗原が可溶性画分（すなわち、上清）に保持される。1つの実施態様において、抽出は、バルトネラ細胞の第1の分離、生理的食塩水溶液における細胞の第1の懸濁、懸濁物を超音波処理すること、超音波処理された懸濁物を分離すること、および可溶性画分を抽出することによって行われる。これらの工程は、この分野で一般的な様式によって行うことができる。さらに、本発明の様々な実施態様において、バルトネラ細胞の第2の分離を行う工程および/または界面活性剤溶液におけるバルトネラ細胞の第2の懸濁を行う工程が含まれることがある。他の実施態様では、上記で示された工程のすべてが、抗原を抽出する際に行われなければならないことがある。そのような示された工程は例であり、また、例示のためだけであって、必須ではない。

【0025】

1つの実施態様において、バルトネラ細胞が遠心分離によって第1の分離物中に分離される。そのような実施態様において、細胞は、ペレットを形成させるために十分な時間にわたって遠心分離され得る。ペレットを形成させることにより、サンプルが沈降特性に基づいて分離されることが意味される。分離物のペレットは、典型的には、より大きい密度を有する部分である。ペレット部分は固体部分により定義される場合があり、かつ/または、分離物の一部分として定義される場合がある。ペレットは、このプロセスのこの段階では、細胞の抗原の一部を少なくとも含有し得る。しかしながら、他の実施態様において、ペレットは、このプロセスのこの段階では、細胞の抗原を全く含有しない。他の実施態様では、分離方法は重要でないため、他の分離方法を利用することができ、例えば、ホモジネーション、圧搾、窒素キャピテーション、浸透圧分離、低張圧分離、超音波処理、凍結-解凍、界面活性剤分離、カオトロピック剤および/または酵素処理などを利用することができる。

【0026】

バルトネラが第1の分離物中に分離された後、分離物は第1の懸濁物中に懸濁される。1つの実施態様において、分離された細胞の第1の懸濁は生理的食塩水溶液においてであり、例えば、pH 9.0でのホウ酸塩生理的食塩水溶液などにおいてである。しかしながら、他の生理的食塩水溶液を使用することができ、例えば、例として、また、限定としてではなく、リン酸塩緩衝化生理的食塩水、tris緩衝化生理的食塩水などを使用することができる。同様に、生理的食塩水溶液のpHは変化し得るが、最良の結果を得るためには、より塩基性の溶液を使用することが望ましい。第1の懸濁の後、第1の懸濁物はボルテックス処理または渦流処理され得る。溶液をボルテックス処理することにより、細菌細胞集塊物の均一な分散が助けられる。

【0027】

懸濁された溶液は、上記のような遠心分離などによって、もう一度、第2の分離物中に分離される。上清が取り出され、廃棄され、ペレットおよび/またはペレット部分が第2の懸濁における懸濁のために保持される。好ましい実施態様において、第2の懸濁は非イオン性界面活性剤溶液においてである。界面活性剤溶液により、抗原の少なくとも一部が

10

20

30

40

50

ペレットから上清に抽出される。

【0028】

特定の実施態様において、第2の懸濁物は、その後、凝集している細胞をさらに分離するために破壊される。好ましい実施態様において、破壊処理は、Bransonモデル450 Sonifierなどの超音波処理器を用いて行われる。好ましい実施態様において、懸濁は、溶液の過度な加熱を防止するために、超音波処理の間、氷浴で冷却される。水冷カップホーンのようなデバイスを、場合により、懸濁物を冷却するために使用することができる。破壊処理された溶液は、その後、上記のような遠心分離などによって第3の分離物中に分離され得る。しかしながら、この分離の上清が保持され、これに対して、ペレットは廃棄される。

10

【0029】

本発明の範囲には、バルトネラ属細菌の抗原を可溶性画分（すなわち、上清）に分離するために、より少ない工程および/またはより多い工程の両方を含むプロセスが含まれる。例えば、多段階の分離および/または多段階の懸濁の両方を含むプロセスを使用することができる。

【0030】

様々な実施態様において、上清は個々のサンプルに小分けされる。これらの個々のサンプルは、必要とされるまで、凍結および/または他の場合には保存され得る。サンプルの凍結および/または保存は、本発明の溶解物に悪影響を及ぼすことが示されていない。本発明の溶解物は、サンプルの分解を経ることなく、並はずれて安定であることが見出されており、特定の実施態様では、少なくとも4年の期間にわたって持続し得る。

20

【0031】

抽出された抗原は、その後、免疫アッセイにおいて直ちに使用されるか、または、そうでない場合には所望されるようにされる。

【0032】

免疫アッセイにおける溶解物の使用：

様々な免疫アッセイ、例えば、酵素結合免疫アッセイ、免疫蛍光アッセイおよび放射免疫アッセイなどを、本発明の溶解物とともに使用することができる。好ましい実施態様において、免疫アッセイは、バルトネラ属細菌抽出物に対する液性免疫（抗体）応答を測定するための酵素結合免疫吸着（ELISA）アッセイである。

30

【0033】

ELISAでは、一般に、基本的な装置が要求されるだけである。典型的に、しかし、限定としてではなく、ELISAでは、抗原（または抗体）を結合させるためのプレート、試薬、サンプル（例えば、血清サンプルなど）、酵素標識に連結されており、かつ、上記工程において結合抗体に結合することができる二次抗体、酵素基質、および分光光度測定読み取り装置が要求される。しかしながら、ELISA法は多様であること、および、より多くの装置またはより少ない装置を利用する様々なELISA法が本発明の実施態様とともに使用され得ることが理解される。

【0034】

本発明の免疫アッセイを行う際に使用され得る好適なプレートおよび/またはトレーが図1に例示される。この例示的な区切られたプレート1（この実施態様では12の区域を有するプレート）は、12の区域を有するプレートから商業的に得ることができる。区域は一般にはウエル2と呼ばれる。望ましくは、プレートは複数の識別可能なウエルに分けられる。例えば、トレーは、区域（この場合には96区域）を示すために底面に印を付けることができる。これは、プレート1において、12個のセルを、「A」、「B」、「C」、「D」などとして印を付け、垂直にほぼ等間隔で、数字（「1」、「2」、「3」、「4」など）を付けることによって行うことができる。従って、この実施態様の96個の区域は、A-1セル、A-2セルなどとして示される。ウエル2は、この分野では一般的であるように清浄化され得る。あるいは、ペトリ皿およびマルチウエル微量滴定プレートなどを使用することができる。

40

50

## 【0035】

バルトネラ抗原については、バルトネラ抗原の供給源（例えば、B. henselae 抗原など）が、1ミリリットルあたり約0.5 µgから10 µgのタンパク質またはリポ多糖の濃度の希釈溶液でプレートの各ウエルに加えられ、抗原をトレー表面に結合させるために十分な時間インキュベーションされる。しかしながら、他の実施態様では、抗原溶液が希釈されない場合がある。

## 【0036】

図1を参照すると、結合した抗原3を有するプレート1のウエル2が例示される。使用され得る他の結合溶液には、バルトネラおよび緩衝液（例えば、生理的食塩水溶液など）が、分析におけるバックグラウンド結合および偽陽性を減少させるために最適な濃度の抗原を結合させるために含まれる。多くの抗原は、結合を行わせるために室温で約2時間から4時間インキュベーションされ得る。他の抗原は、異なる条件で、例えば、37℃で3時間、その後、4℃で一晩で、あるいは、温度および/または時間の他の組合せで優先的に結合する。

10

## 【0037】

好ましい実施態様において、プレート1は、緩衝液溶液で、例えば、界面活性剤（例えば、ツイーン-20など）および保存剤（例えば、チメロサルなど）を伴うPBSなどで洗浄される。しかしながら、他の実施態様では、プレート1は、被覆の前に、緩衝液で洗浄されないことがある。ELISA希釈液（ツイーン-20および5% Carnation 脱脂スキムミルクを含む）を、被覆するために十分な体積で、ELISA希釈液として使用することができる。抗原を結合させた後、過剰な溶液は廃棄される。トレーの各区画は、このときには結合した抗原を有しており、抗原とのインキュベーションの後で露出したままにされていたプラスチックの結合部位に不活性な物質を結合させる目的で、ブロッキング剤（例えば、アルブミン、脱脂乳、オバルブミン、ゼラチン、血清など）の溶液で再び満たされる。この工程は、特定の抗原に向けられていない抗体分子の非特異的な吸着を減少させ、また、比色測定工程において重要であるコンジュゲートの非特異的な吸着を減少させる。溶液は室温でさらに45分間インキュベーションされ、廃棄される。

20

## 【0038】

その後、血清サンプルが、所定の濃度で、少なくとも1つのウエルに、被覆するために十分な体積で加えられる。1つの実施態様において、濃度は既知である。好ましい実施態様において、多数の濃度が、例えば、ELISAプレート1における血清サンプルを連続希釈することなどによって使用される。1つの実施態様では、プレート1において、12個のサンプル（A~L）を処理することができる。それぞれのサンプルが、例えば、1:1Kの希釈~1:128Kの希釈（すなわち、1、2、4、8、16、32、64、128）まで連続希釈され得る。プレート1は、結合している抗原3に対する血清サンプル中の抗体4の少なくともある程度の結合を行わせるために十分な時間インキュベーションされ得る（図2を参照のこと）。好ましい実施態様において、血清が、約37℃で約1時間、ウエル2でインキュベーションされた。

30

## 【0039】

インキュベーション後、血清および希釈液が捨てられ、ウエルが、ウエル2のいずれかに残留している血清を除くために十分に洗浄される。好ましい実施態様において、プレート1は、少なくとも4回、緩衝剤溶液（例えば、PBSなど）で洗浄される。

40

## 【0040】

次に、種特異的な酵素結合の抗免疫グロブリンの形態でのコンジュゲートが試験プレートに加えられる。様々なコンジュゲートが市販されている。ほとんどがヤギまたはウサギで作製されている。しかしながら、この分野で一般的な他のコンジュゲートを使用することができる。西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）とコンジュゲート化されたヤギ抗ネコ免疫グロブリンを、Jackson Immunological Co. またはSigma Chemical Company などから得ることができる。バルトネラ属細菌を診断する場合、コンジュゲートは、いくつかの実施態様では、酵素が化学的に結合し

50

ている（コンジュゲート化されている）抗ネコ免疫グロブリンである。好ましい実施態様において、西洋ワサビペルオキシダーゼが、抗原 3 に対する抗体 4 の存在または非存在を確認するために、抗ネコの Ig G 画分にカップリングさせられる。一般に、特定の希釈度（例えば、1 : 2 K など）でのコンジュゲートが各ウエルに加えられ、（抗体 4 が存在する場合には）コンジュゲート 5 の少なくとも一部が抗体 4 に結合することを可能するために所定の時間および特定の条件のもとでインキュベーションされる。

【0041】

インキュベーション後、血清および希釈液が捨てられ、ウエルが、ウエル 2 のいずれかに残留している血清を除くために十分に洗浄される。好ましい実施態様において、プレート 1 は、少なくとも 4 回、緩衝剤溶液（例えば、ツイーン - 20 を伴う PBS など）で洗浄される。

10

【0042】

工程 b) の溶液の安定化が、酵素標識された抗体を安定かつ実質的に純粋に保つ HRP コンジュゲート安定化溶液において溶液を 4 で保存することによって達成され得る。特定の実施態様において、HRP コンジュゲート安定化溶液は 50%（体積 / 体積）の蒸留水およびグリセロールを含有する。

【0043】

特定の実施態様において、基質は、コンジュゲートを抗体に結合させる前では、コンジュゲートとの反応に供されていない。そのような場合、TMB 基質（これは、Kirkgaard and Perry Laboratories から市販されている）などの基質を、被覆するために十分な体積で、ウエル 2 に加えることができる。基質は、結合した抗体 4 の可視化を可能にするために、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンなどのクロモゲン、例えば、TMB（これは Kirkgaard and Perry によって販売されている）（米国特許第 5, 013, 646 号を参照のこと；これは参照して本明細書により組み込まれる）などであり得る。

20

【0044】

様々な実施態様において、基質 6 は、コンジュゲート 5 と反応する種類のいずれかの基質であり得る。特定の実施態様において、基質 6 は有色化合物をもたらす。例えば、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビから得られるペルオキシダーゼなど）は、アミノサリチル酸および過酸化水素と反応したとき、または p - フェニレンジアミンおよび過酸化水素と反応したとき、またはテトラメチルベンジジンおよび過酸化水素と反応したとき、青色をもたらす。ウリックオキシドのような他の物質を、アクセプターとして、過酸化水素の代わりに使用することができる。アルカリホスファターゼは、ジニトロフェニルホスファートと反応したとき、黄色をもたらす。 - ガラクトシダーゼは o - ニトロフェニル - D - ガラクトピラノシドと反応して、紫色を与える。

30

【0045】

本発明の方法を行う際に有用な酵素標識を有するいくつかの一般的なコンジュゲートには、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコアミラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ウレアーゼおよび - ガラクトシダーゼがある。他の酵素、例えば、米国特許第 4, 275, 149 号に見出される列挙された酵素なども許容され得る。

40

【0046】

様々な基質および発色団を、これらの酵素との使用のために利用することができる。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼでは、有色生成物を生じさせるために、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、および下記の例示的なクロモゲンの 1 つまたは複数を用いられる：5 - アミノサリチル酸、2, 2' - アジノ - ビス（3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルファミン酸）、o - ジアニシジン、o - フェニレンジアミンおよび 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンなど。この酵素および他の酵素に対する他の例が米国特許第 4, 299, 916 号（これは参照して本明細書により組み込まれる）に示されている。好適な発色団のさらなる例には、ペルオキシダーゼ（これは、発色性基質およびアクセプター（例えば、過酸化水素

50

またはウリックオキシドなど)を要求する)およびヒドロラーゼ(これは発色性基質のみを要求する)がある。

【0047】

本発明の方法ではさらに、サンプル中の抗体を測定するためのコンピューター化された読み取りプロトコルが含まれ得る。許容され得る読み取り装置の一例が、Trottier、Y.L.他(1992、J.Clin.Microbiol.、30:46~53)によって記載されるタイプに類似するものである。他の実施態様では、Elx808BioTekなどの二波長読み取り装置が使用される。しかしながら、読み取り装置はこの分野では広く知られており、任意の好適な読み取り装置で十分である。

【0048】

様々な実施態様において、本発明の読み取り装置は携帯型の読み取り装置である。携帯型の読み取り装置により、本発明の様々な実施態様が操作時に現場に持ち出されることが可能になる。他の実施態様では、この分野では一般的であるように、視覚的に読み取ることができるカラーチャートが利用される。

【0049】

本発明の別の実施態様によれば、ネコなどの生物の血清においてバルトネラ抗体をアッセイするためのELISA診断キットが提供される。本発明のELISA診断キットは、別個のパッケージにおいて、下記の少なくとも1つを含む：

- a) ネコの血清に存在する抗バルトネラ抗体に対して特異的な結合を生じさせるための精製されたバルトネラ抗原が結合しているプレートまたは固体担体；
- b) 陽性コントロールとして使用される、バルトネラ属の種、亜種および/または菌株が実験的に接種されたネコから得られた血清；
- c) 陰性コントロールとして使用される、特定の病原体を含まない集団から得られたネコ血清；および
- d) プレートまたは他の固相に結合しているネコ抗体に結合する酵素標識されたコンジュゲート。

【0050】

工程a)の抗原は、固体担体に結合したとき、被覆緩衝液中において4で保存することによって安定化され得る。しかしながら、他の安定化法を利用することができる。

【0051】

本発明のELISA診断キットはさらに、

- e) 検出可能に標識されたコンジュゲートの可視化を可能にする基質を含むことができる。

【0052】

本発明の別の実施態様によれば、下記の工程を含む、本発明のキットを調製するための方法が提供される：

- a) 前記抗原細菌粗抽出物の遠心分離によってバルトネラ抗原を精製する工程；b) 工程a)の抗原を固体担体に固定し、前記固定された抗原を安定化させる工程；c) バルトネラ属細菌の菌株で哺乳動物を免疫化し、陽性コントロール血清として使用するための血清を回収する工程；およびd) 陰性コントロール血清として使用するためのバルトネラ非含有集団由来の血清を回収する工程。

【0053】

本発明の診断キットのさらなる実施態様は、事前にパッケージされた陽性血清(現在、これは市販されていない)および/または陰性血清を含む。

【0054】

本発明のキットは、新規な溶解物が利用され、また、動物病院または研究室などの現場での簡便かつ迅速な試験が可能であるという点で新規である。本発明のキットは、約3ヶ月の貯蔵安定性を有するという点で十分に安定である。改善された感度および貯蔵安定性は本発明の新規な溶解物調製の産物である。

【0055】

10

20

30

40

50

本発明のキットは容易に使用され、迅速な結果をもたらす。単純な工程のみを行うことが必要とされるだけであるので、本発明のキットは、経験が非常に少ない獣医師によって使用することができ、また、動物が飼育されている現場で使用することができ、実験上の技術を必要としない。さらに、本発明のキットは、非常に信頼でき、かつ再現性のある結果をもたらすことが明らかにされた。

【0056】

本発明のキットとともに含まれ得る他の付属物には、スパチュラ、バイアル、脱イオン水、事前に混合された緩衝液、および/またはブロッキング剤などが含まれる。しかしながら、他の試験キット設計が当業者には明らかであり得る。そのようなキットのすべてが本発明によって包含されることが意図される。

10

【0057】

本発明は下記の実施例によってさらに例示される。

【0058】

(実施例)

実施例では、当業者に知られていると見なされる多数の微生物学的技術および免疫学的技術が含まれることに留意しなければならない。そのような技術の開示が、例えば、Prescott他、Microbiology (第3版、Wm. C. Brown and Company)、およびHarlow他、1988、Antibodies, a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Labs Press; これは参照して本明細書により組み込まれる)に見出され得る。同様に、本明細書中に記載されている検出方法および類似する間接的な免疫細胞化学的方法において使用される具体的な試薬およびプロトコルは、Antibodies: A Laboratory Manual (HarlowおよびLane、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.、1988; その本文は参照して本明細書により組み込まれる)に見出される基準などの確立された基準に基づいて、この分野で利用できる試薬およびプロトコルから選択することができる。これらの実施例は単なる例示にすぎず、他の手順が使用され得ることもまた、当業者によって理解される。本特許の範囲を理解するために、実施例に続く請求項に留意しなければならない。

20

【実施例1】

30

【0059】

サンプルの定義

本発明の新規な溶解物アッセイを比較するために、29個のサンプルが本発明の新規な溶解物調製に従って処理され、29個のサンプルが先行技術の外膜タンパク質(OMP)調製に従って処理された。これらのサンプルは下記のように定義される：

【0060】

【表 1】

サンプル番号	サンプル説明
1	祀 1、抗原投与前
2	祀 2、抗原投与前
3	祀 3、抗原投与前
4	祀 4、抗原投与前
5	祀 5、抗原投与前
6	祀 6、抗原投与前
7	祀 1、抗原投与後 4 週間
8	祀 2、抗原投与後 4 週間
9	祀 3、抗原投与後 4 週間
10	祀 4、抗原投与後 4 週間
11	祀 5、抗原投与後 4 週間
12	祀 6、抗原投与後 4 週間
13	祀 1、抗原投与後 12 週間
14	祀 2、抗原投与後 12 週間
15	祀 3、抗原投与後 12 週間
16	祀 4、抗原投与後 12 週間
17	祀 5、抗原投与後 12 週間
18	祀 6、抗原投与後 12 週間
19	祀 7、クラミアによる抗原投与
20	祀 8、クラミアによる抗原投与
21	祀 9、クラミアによる抗原投与
22	祀 10、クラミアによる抗原投与
23	祀 11、クラミアによる抗原投与
24	祀 12、クラミアによる抗原投与
25	祀 13、クラミアによる抗原投与
26	祀 14、クラミアによる抗原投与
27	祀 15、クラミアによる抗原投与
28	陰性の <i>B. henselae</i> 血清
29	陽性の <i>B. henselae</i> 血清

10

20

30

## 【実施例 2】

## 【0061】

バルトネラ属細菌を成長させること

## a. トリトン溶解物の場合

本実施例では、本発明の実施態様において使用されるバルトネラ・ヘンセラエ (*Bartonella henselae*) 抗原 (Ag) の調製および配合が記載される。

## 【0062】

実験において、Columbia血液寒天の10個の150 cm<sup>3</sup> フラスコに、*B. henselae* の1:6希釈物の1.5 mlが接種された。だが、他のバルトネラ種を使用することができる。接種されたフラスコは、10% CO<sub>2</sub> の雰囲気中37℃で、Forma Scientific社の水冷ジャケット付インキュベーターでインキュベーションされた。培養物を72時間成長させた。培養物を、直径が2 mmの滅菌ガラスビーズおよび約3 ml / フラスコの10 mM HEPES (Sigma) とともに集めた。取り除かれた細菌はピペットによってフラスコから回収された。ガラスビーズを10 ml / フラスコのHEPESで洗浄して、残留している取り除かれた細菌を回収した。

40

## 【0063】

回収された細菌を、その後、Oakridgeチューブにまとめ、4℃の環境で3, 0

50

00RPMにおいて10分間、Mistral3000i遠心分離機で遠心分離した。その後、遠心分離から得られたペレットを25mlのホウ酸塩生理的食塩水溶液(pH9)に再懸濁した。ホウ酸塩生理的食塩水溶液は、80mlの1.5M NaCl、100mlの0.5M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、24mlの1.0N NaOH、および796mlの蒸留H<sub>2</sub>Oからなる組成を有した。その後、ホウ酸塩生理的食塩水溶液に再懸濁されたペレットをボルテックス処理して、上記のように遠心分離した。

【0064】

得られたペレットを除くすべての物質が廃棄された。その後、ペレットを、1%のトリトンX-100(これはTritonによって販売されている)を含む6mlのホウ酸塩生理的食塩水溶液(pH9)に再懸濁した。その後、ペレットを、液体部分の中に挿入された超音波処理器のプロープにより、50%の負荷サイクル、最大出力レベルで5分間、Branson Sonifierモデル450で超音波処理した。超音波処理は温度抑制のために氷上で行われた。その後、超音波処理された部分を上記のように遠心分離した。その後、得られた上清を1mlのサンプルに小分けし、使用まで-20で凍結した。

10

【0065】

b. OMPの場合

本実施例のこの部分では、本発明の実施態様において使用されるバルトネラ・ヘンセラエの外膜タンパク質の調製および配合が記載される：

1) B. henselaeをColumbia血液寒天において成長させた(5個の175cm<sup>2</sup>フラスコ)。

20

2) B. henselaeを、滅菌ガラスビーズ、10ml/フラスコの10mM HEPESとともに集めた。

3) 細胞を、20で20分間、遠心分離機(Mistral3000i)において3000RPMでペレット化した。上清を捨て、4で一晩保存する。

4) ペレットを10mlの10mM HEPESに再懸濁した。再懸濁物を、20で10分間、遠心分離機(Mistral3000i)において3000RPMでペレット化する。上清を捨て、ペレットを10mlの10mM HEPESに再懸濁する。その後、懸濁されたペレットを氷上に置いた。

5) その後、懸濁されたペレットを、45秒の休止間隔を伴って15秒間隔で15分間、70%の負荷サイクル、出力=6(6/10)で、沈められたマイクロチップを使用してBranson450Sonifierで超音波処理した。

30

6) その後、超音波処理されたペレットを1mlの小分け物に分けて、Eppendorf遠心分離機5402で2分間、4において13,000RPMで遠心分離した。その後、上清を清浄なチューブに移し、30分間、上記のように遠心分離した。

7) その後、それぞれのペレットを、2%のサルコシルを含む200ulの10mM HEPESに再懸濁した。その後、それぞれの再懸濁されたペレットを、ときどき混合しながら1時間、氷上に置いた。

8) その後、再懸濁されたペレットを、30分間、上記のように遠心分離した。その後、上清を取り出した。

9) ペレットを200ulの10mM HEPESに再懸濁し、-20で凍結した。

40

【0066】

C. 抗血清の調製 - 陽性コントロール

好適な陽性の抗血清コントロールを、この分野では一般的であるように、供給者から購入することができる。

【0067】

D. 抗血清の調製 - 陰性コントロール

好適な陰性の抗血清コントロールを、この分野では一般的であるように、供給者から購入することができる。

【実施例3】

【0068】

50

## プレートの被覆

## A. バルトネラ・ヘンセラエに関するトリトン溶解物

## 1. 適切な希釈度の決定

表1には、Greinerプレートが、実施例2に従って調製されたB. henselaeのトリトン溶解物を用いて4で一晚被覆された実験から得られた吸光度値が例示される。既知の陽性(コントロール)血清が、新規なトリトン溶解物の適正な被覆希釈度を決定するために、B. henselaeのトリトン溶解物に対して交差力価測定された。表2には、4で一晚被覆されたGreinerプレートを使用して、実施例1に従って調製されるように被覆された別のプレートにおける抗原に対して交差力価測定された既知の陰性(コントロール)血清についての吸光度値が例示される。プレートを被覆するために、抗原(Ag)を、1~6の縦列で、プレート全体で1:500から始まって2倍ずつ連続希釈した。7~12の縦列はPBSのみを含有した。

10

## 【0069】

プレートを、5%のCarnation乾燥脱脂乳、0.1%のツイーン-20および0.01%のチメロサルを含むPBSからなる血清希釈液を用いて、ウエルあたり200 $\mu$ lで、37で1時間ブロッキング処理した。その後、プレートを、0.1%のツイーン-20および0.01%のチメロサルを含むPBSからなる洗浄緩衝液で1回洗浄した。表1に記載されるプレートについては、B. henselaeに対する陽性の血清が、1:1Kから始まってプレートの下に向かって2倍ずつ血清希釈液で連続希釈された。表2に記載されるプレートについては、B. henselaeに対する陰性の血清が、1:1Kから始まってプレートの下に向かって2倍ずつ血清希釈液で連続希釈された。プレートを、その後、37で60分間インキュベーションして、洗浄緩衝液で4回洗浄した。その後、血清希釈液において1:2Kで希釈されたヤギ抗ネコIgGの西洋ワサピベルオキシダーゼ標識された二次抗体を加え、プレートを37で45分間インキュベーションした。その後、プレートを4回洗浄して、2成分TMB基質を加えた。その後、プレートを暗所において室温で10分間インキュベーションし、発色を100 $\mu$ l/ウエルの2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させた。吸光度を二波長においてマイクロタイタープレート読み取り装置(ICN Titer tek Multiscan Bichromatic)で読み取った。参照波長(540nm)での吸光度が、それぞれのウエルについて、主波長(450nm)での吸光度から引かれた。

20

30

## 【0070】

## 表1

1から6までの数字が付けられた縦列には、溶解物被覆抗原の連続希釈物の吸光度値が例示される。7~12の縦列には、ベースラインを明らかにするための緩衝液だけの被覆抗原コントロールの吸光度値が例示される。横列の値は、陽性血清の連続希釈物の吸光度値に対する連続希釈度である。

## 【0071】

## 【表2】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
溶解物の希釈度	1:500	1:1K	1:2K	1:4K	1:8K	1:16K	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1:1K	2.765	2.853	2.669	2.506	2.293	2.312	0.017	0.018	0.042	0.026	0.026	0.014
2K	2.760	2.616	2.559	2.452	2.221	1.906	0.014	0.024	0.008	0.009	0.008	0.008
4K	2.554	2.391	2.230	2.045	1.775	1.486	0.006	0.007	0.010	0.017	0.009	0.008
8K	2.311	2.128	1.966	1.655	1.406	1.063	0.017	0.031	0.004	0.006	0.003	0.004
16K	1.887	1.652	1.446	1.214	0.947	0.725	0.016	0.006	0.003	0.024	0.005	0.006
32K	1.299	1.086	0.945	0.698	0.559	0.373	0.004	0.005	0.003	0.009	0.003	0.004
64K	0.778	0.627	0.497	0.446	0.327	0.236	0.006	0.004	0.002	0.002	0.007	0.005
128K	0.459	0.358	0.310	0.242	0.181	0.104	0.005	0.003	0.035	0.002	0.003	0.010

40

## 【0072】

## 表2

50

1 から 6 までの数字が付けられた縦列には、溶解物被覆抗原の連続希釈物の吸光度値が例示される。7 ~ 12 の縦列には、ベースラインを明らかにするための緩衝液だけの被覆抗原コントロールの吸光度値が例示される。横列の値は、陰性血清の連続希釈物の吸光度値に対する連続希釈度である。

【0073】

【表3】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
溶解物の希釈度	1:500	1:1K	1:2K	1:4K	1:8K	1:16K	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1:1K	0.018	0.010	0.014	0.005	0.099	0.008	0.004	0.213	0.005	0.013	0.101	0.004
2K	0.011	0.006	0.009	0.004	0.003	0.012	0.089	0.115	0.060	0.003	0.003	0.001
4K	0.005	0.017	0.011	0.096	0.003	0.013	0.003	0.034	0.024	0.005	0.054	0.002
8K	0.003	0.004	0.002	0.007	0.004	0.011	0.004	0.054	0.004	0.004	0.003	0.002
16K	0.005	0.005	0.005	0.007	0.009	0.011	0.012	0.005	0.004	0.002	0.009	0.003
32K	0.004	0.004	0.003	0.010	0.003	0.008	0.003	0.004	0.002	0.003	0.003	0.002
64K	0.003	0.002	0.003	0.021	0.009	0.007	0.003	0.006	0.002	0.003	0.003	0.002
128K	0.003	0.006	0.008	0.003	0.004	0.007	0.002	0.031	0.017	0.003	0.003	0.009

10

【0074】

これらの結果から、本発明の溶解物調製物は、ゼロに近いバックグラウンドを有する非常に明快なアッセイをもたらしていることが例示される。被覆のための最適な濃度は1Kから2Kの間であるようである。

【0075】

20

2. *B. henselae* またはクラミジアのいずれかが感染したネコからのスクリーニング

6枚のGreiner Microlonプレートを、1:2Kの濃度で、実施例1に従って調製された*B. henselae*のトリトン溶解物で被覆し、プレートの左側においてPBS (pH 7.4)にて4 (以前のプレートから決定された値)で一晩インキュベーションした(+)。プレートの右側はPBSのみで被覆された(-)。プレートを1回洗浄し、0.1%ツイーン-20、0.01%のチメロサルおよび5%のCarnation乾燥脱脂乳を伴うPBSを含む200 $\mu$ l/ウエルの血清希釈液を用いて37で45分間ブロッキング処理した。その後、プレートを1回洗浄し、その後、1:1Kから始まり、プレートの下に向かって2倍ずつ下げて、プレートの+側および-側の両方で連続希釈した。その後、プレートを37で1時間インキュベーションして、4回洗浄した。その後、100 $\mu$ l/ウエルのヤギ抗ネコIgG-HRPを、(上記で規定されたように)血清希釈液での1:2Kの希釈度で、プレートにおいて37で45分間インキュベーションした。その後、プレートを4回洗浄して、100 $\mu$ lのK+P TMB基質をウェルあたり加えた。プレートを、上記のように、室温で10分間、暗所に放置し、その後、100 $\mu$ lの2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させ、直ちに450nmから540nmで読み取った。

30

【0076】

表1

溶解物調製サンプルの調整前の吸光度値が、最初の採血の前に*B. henselae*生菌で抗原投与された6匹のネコ(1~6)について下記に示される。縦列の見出し部は下記のような血清定義である: サンプル1~6は、抗原投与されたネコ1~6に由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル1a~6aは、ベースラインを明らかにするためのコントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度である。これらの定義は、実施例1に示されるサンプル定義を参照する。

40

【0077】

【表 4】

サンプル	1	2	3	4	5	6	1a	2a	3a	4a	5a	6a
希釈度	ネコ1	ネコ2	ネコ3	ネコ4	ネコ5	ネコ6	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	0.023	0.017	0.019	0.022	0.015	0.034	0.022	0.003	0.003	0.006	0.032	0.003
2K	0.006	0.008	0.015	0.020	0.042	0.019	0.008	0.003	0.001	0.003	0.003	0.004
4K	0.008	0.015	0.045	0.022	0.003	0.013	0.001	0.001	0.003	0.004	0.013	0.002
8K	0.003	0.006	0.002	0.038	0.024	0.017	0.003	0.007	0.003	0.039	0.014	0.012
16K	0.013	0.006	0.010	0.006	0.008	0.013	0.005	0.018	0.004	0.005	0.010	0.003
32K	0.006	0.001	0.007	0.009	0.002	0.006	0.002	0.007	0.000	0.040	0.052	0.002
64K	0.005	0.005	0.001	0.009	0.006	0.023	0.003	0.058	0.001	0.004	0.002	0.005
128K	0.026	0.003	0.009	0.031	0.044	0.010	0.002	0.034	0.062	0.006	0.002	0.029

10

【0078】

表 2

溶解物調製物の調整前の吸光度値が、抗原投与後の4週間での上記の6匹のネコについて下記に示される。縦列の見出し部は下記のような血清定義である：サンプル7～12は、抗原投与後4週間目の抗原投与されたネコ1～6に由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル7a～12aは、ベースラインを明らかにするためのコントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は血清希釈度である。これらの定義は、実施例1に示されるサンプル定義を参照する。

【0079】

【表 5】

サンプル	7	8	9	10	11	12	7a	8a	9a	10a	11a	12a
希釈度	ネコ1	ネコ2	ネコ3	ネコ4	ネコ5	ネコ6	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	1.64	0.021	0.051	1.525	0.283	1.957	0.007	0.004	0.013	0.01	0.011	0.003
2K	0.926	0.042	0.016	1.176	0.113	1.435	0.004	0.016	0.029	0.004	0.003	0.003
4K	0.739	0.005	0.016	0.696	0.071	0.973	0.001	0.003	0.009	0.014	0.006	0.001
8K	0.422	0.005	0.004	0.415	0.031	0.598	0.003	0.015	0.006	0.002	0.002	0.002
16K	0.228	0.007	0.012	0.245	0.052	0.315	0.014	0.004	0.002	0.011	0.003	0.003
32K	0.115	0.005	0.006	0.126	0.007	0.179	0.001	0.006	0.001	0.000	0.002	0.001
64K	0.056	0.004	0.004	0.076	0.021	0.091	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.003
128K	0.029	0.008	0.002	0.03	0.005	0.056	0.000	0.009	0.044	0.025	0.02	0.012

20

【0080】

表 3

溶解物調製物の調整前の吸光度値が、抗原投与後の12週間での上記の6匹のネコについて下記に示される。縦列の見出し部は下記のような血清定義である：サンプル13～18は、抗原投与後12週間目の抗原投与されたネコ1～6に由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル13a～18aは、ベースラインを明らかにするためのコントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度である。これらの定義は、実施例1に示されるサンプル定義を参照する。

【0081】

【表 6】

サンプル	13	14	15	16	17	18	13a	14a	15a	16a	17a	18a
希釈度	ネコ1	ネコ2	ネコ3	ネコ4	ネコ5	ネコ6	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	2.144	0.035	0.093	2.261	0.237	2.727	0.010	0.030	0.023	0.014	0.017	0.003
2K	1.440	0.013	0.056	1.765	0.111	2.275	0.007	0.003	0.013	0.003	0.043	0.001
4K	0.977	0.008	0.031	1.125	0.060	1.728	0.003	0.002	0.005	0.013	0.005	0.003
8K	0.544	0.007	0.015	0.640	0.033	1.081	0.005	0.003	0.004	0.002	0.002	0.003
16K	0.302	0.008	0.020	0.334	0.027	0.652	0.009	0.004	0.002	0.003	0.014	0.056
32K	0.161	0.005	0.017	0.167	0.008	0.353	0.008	0.004	0.003	0.002	0.002	0.003
64K	0.076	0.001	0.003	0.085	0.006	0.181	0.005	0.005	0.003	0.002	0.006	0.003
128K	0.039	0.002	0.053	0.071	0.004	0.084	0.004	0.003	0.028	0.003	0.004	0.013

40

【0082】

表 4

溶解物調製物の調整前の吸光度値が、クラミジアで抗原投与された6匹のネコについて下記に示される。縦列の見出し部は下記のような血清定義である：サンプル19～24は

50

、抗原投与されたネコに由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル 19a ~ 24a は、ベースラインを明らかにするためのコントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度である。これらの定義は、実施例 1 に示されるサンプル定義を参照する。

【 0 0 8 3 】

【表 7】

サンプル	19	20	21	22	23	24	19a	20a	21a	22a	23a	24a
希釈度	ネコ7	ネコ8	ネコ9	ネコ10	ネコ11	ネコ12	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	0.013	0.025	0.081	0.011	0.018	0.033	0.004	0.021	0.006	0.011	0.081	0.003
2K	0.006	0.011	0.018	0.011	0.062	0.017	0.003	0.094	0.002	0.004	0.004	0.003
4K	0.007	0.008	0.011	0.007	0.007	0.032	0.002	0.005	0.002	0.010	0.006	0.004
8K	0.007	0.010	0.004	0.026	0.003	0.011	0.006	0.008	0.003	0.002	0.001	0.004
16K	0.003	0.013	0.017	0.009	0.009	0.013	0.008	0.003	0.002	0.002	0.005	0.005
32K	0.003	0.009	0.002	0.015	0.002	0.011	0.007	0.002	0.005	0.010	0.002	0.003
64K	0.005	0.004	0.002	0.021	0.009	0.029	0.003	0.008	0.002	0.001	0.016	0.016
128K	0.003	0.015	0.013	0.003	0.002	0.007	0.004	0.006	0.054	0.003	0.006	0.084

10

【 0 0 8 4 】

表 5

溶解物調製物の調整前の吸光度値が、クラミジアで抗原投与された 3 匹のネコ ( 1 3 ~ 1 5 ) について下記に示される。さらに、陽性の血清サンプルおよび陰性の血清サンプルが処理された。縦列の見出し部は下記のような血清定義である：サンプル 2 5 ~ 2 7 は、抗原投与されたネコ 1 3 ~ 1 5 に由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル 2 8 は陰性の血清コントロールである。サンプル 2 9 は陰性の血清コントロールである。サンプル 3 0 ~ 3 4 は、ベースラインを明らかにするためのコントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度である。これらの定義は、実施例 1 に示されるサンプル定義を参照する。

20

【 0 0 8 5 】

【表 8】

サンプル	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
希釈度	ネコ13	ネコ14	ネコ15	血清 -	血清 +	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	0.017	0.007	0.044	0.027	2.932	0.004	0.005	0.007	0.007	0.04
2K	0.007	0.013	0.014	0.022	2.948	0.008	0.003	0.004	0.011	0.018
4K	0.068	0.012	0.007	0.009	2.720	0.005	0.004	0.009	0.018	0.039
8K	0.009	0.013	0.009	0.041	2.185	0.008	0.008	0.009	0.003	0.010
16K	0.004	0.017	0.025	0.013	1.672	0.009	0.024	0.019	0.008	0.008
32K	0.002	0.003	0.005	0.024	1.143	0.006	0.028	0.006	0.003	0.005
64K	0.011	0.009	0.011	0.031	0.687	0.016	0.017	0.003	0.019	0.011
128K	0.002	0.009	0.005	0.004	0.381	0.031	0.002	0.010	0.004	0.001

30

【 0 0 8 6 】

B . O M P

比較のために、B . h e n s e l a e の外膜タンパク質 ( O M P ) 抗原 ( A g ) 調製物を被覆抗原として用いるアッセイが、上記の新規な溶解物に対する手順に従って行われた。

40

【 0 0 8 7 】

6 枚の Greiner Microlon プレート を、プレートの左側において、0 . 0 5 M 炭酸塩緩衝液 ( p H 9 . 6 ) における 1 8 7 m g / m l の濃度で、実施例 2 に従って調製された B . h e n s e l a e の O M P を用いて 4 で一晩被覆した。プレートの右側は 0 . 0 5 M 炭酸塩緩衝液のみで被覆された。プレートを 1 回洗浄して、2 0 0 μ l / ウェルの血清希釈液でブロッキング処理し、3 7 で 1 時間インキュベーションした。その後、プレートを 1 回洗浄し、その後、血清を、1 : 1 K から始まり、プレートの下に向

50

かって2倍ずつ下げて、プレートの+側および-側の両方で連続希釈した。その後、プレートを37で1時間インキュベーションして、4回洗浄した。次いで、100 $\mu$ l/ウエルのヤギ抗ネコIgG-HRPを、(上記で規定されたように)血清希釈液での1:2Kの希釈度で、プレートにおいて37で45分間インキュベーションした。その後、プレートを4回洗浄して、100 $\mu$ lのK+P TMB基質を各ウエルに加えた。プレートを、上記のように、10分間、室温で暗所においてインキュベーションし、その後、100 $\mu$ l/ウエルの2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させ、直ちに450nm-540nmで読み取った。

【0088】

表1

OMP調製物の調整前の吸光度値が、最初の採血の前に上記の抗原投与されたネコについて下記に示され、これらは、最初の採血の前に得られた溶解物調製物に対する血清に対応する。縦列の見出し部は下記のようなサンプルである：サンプル1~6は、抗原投与されたネコ1~6に由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル1b~6bは、コントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度である。これらの定義は、実施例1に示されるサンプル定義を参照する。

【0089】

【表9】

サンプル	1	2	3	4	5	6	1b	2b	3b	4b	5b	6b
希釈度	ネコ1	ネコ2	ネコ3	ネコ4	ネコ5	ネコ6	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	0.270	0.118	0.121	0.200	0.172	0.203	0.012	0.081	0.010	0.021	0.013	0.008
2K	0.148	0.076	0.085	0.140	0.145	0.121	0.011	0.056	0.008	0.009	0.008	0.008
4K	0.090	0.047	0.147	0.076	0.112	0.162	0.027	0.049	0.008	0.014	0.011	0.009
8K	0.042	0.028	0.025	0.054	0.030	0.049	0.029	0.036	0.026	0.009	0.130	0.008
16K	0.023	0.019	0.029	0.028	0.025	0.034	0.033	0.012	0.008	0.009	0.015	0.009
32K	0.017	0.018	0.013	0.023	0.017	0.082	0.012	0.012	0.008	0.009	0.009	0.009
64K	0.252	0.019	0.012	0.104	0.015	0.026	0.010	0.026	0.008	0.008	0.075	0.015
128K	0.017	0.010	0.010	0.012	0.012	0.142	0.010	0.010	0.010	0.009	0.009	0.018

【0090】

表2

OMP調製物の調整前の吸光度値が、抗原投与後の4週間での上記の6匹のネコについて下記に示され、これらは、抗原投与後の4週間目に得られた溶解物調製物に対する血清に対応する。縦列の見出し部は下記のようなサンプルである：サンプル7~12は、抗原投与後4週間目の抗原投与されたネコに由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル7b~12bは、コントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度である。これらの定義は、実施例1に示されるサンプル定義を参照する。

【0091】

【表10】

サンプル	7	8	9	10	11	12	7b	8b	9b	10b	11b	12b
希釈度	ネコ1	ネコ2	ネコ3	ネコ4	ネコ5	ネコ6	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	2.290	0.126	0.441	2.156	0.208	2.382	0.012	0.139	0.010	0.017	0.015	0.010
2K	1.792	0.070	0.294	1.909	0.195	2.610	0.061	0.010	0.010	0.012	0.009	0.009
4K	1.525	0.051	0.223	1.592	0.118	1.829	0.008	0.046	0.009	0.021	0.083	0.008
8K	0.987	0.039	0.082	1.305	0.053	1.522	0.015	0.010	0.009	0.013	0.009	0.009
16K	0.652	0.025	0.052	0.864	0.033	1.174	0.038	0.010	0.010	0.035	0.013	0.010
32K	0.323	0.018	0.024	0.520	0.017	0.732	0.012	0.009	0.009	0.008	0.008	0.010
64K	0.156	0.012	0.014	0.284	0.017	0.432	0.010	0.053	0.060	0.008	0.012	0.012
128K	0.090	0.011	0.138	0.138	0.011	0.208	0.016	0.010	0.037	0.008	0.009	0.025

【0092】

表3

OMP調製物の調整前の吸光度値が、抗原投与後の12週間での上記の6匹のネコ(1

～ 6 ) について下記に示され、これらは、抗原投与後の 1 2 週間目に得られた溶解物調製物に対する血清に対応する。縦列の見出し部は下記のようなサンプルである：サンプル 1 3 ～ 1 8 は、抗原投与後 1 2 週間目の抗原投与されたネコに由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル 1 3 b ～ 1 8 b は、ベースラインを明らかにするためのコントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度である。これらの定義は、実施例 1 に示されるサンプル定義を参照する。

【 0 0 9 3 】

【 表 1 1 】

サンプル	13	14	15	16	17	18	13b	14b	15b	16b	17b	18b
希釈度	ネコ1	ネコ2	ネコ3	ネコ4	ネコ5	ネコ6	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	1.945	0.115	0.188	2.177	0.210	2.285	0.010	0.014	0.025	0.009	0.009	0.009
2K	1.540	0.071	0.100	1.641	0.297	2.520	0.012	0.009	0.008	0.009	0.008	0.013
4K	1.113	0.045	0.057	1.158	0.130	1.726	0.009	0.010	0.007	0.014	0.010	0.008
8K	0.682	0.029	0.027	0.677	0.070	1.380	0.011	0.010	0.007	0.009	0.009	0.009
16K	0.364	0.016	0.035	0.428	0.060	0.987	0.019	0.010	0.008	0.010	0.010	0.009
32K	0.176	0.013	0.013	0.220	0.021	0.650	0.010	0.010	0.009	0.009	0.009	0.009
64K	0.089	0.010	0.011	0.119	0.019	0.394	0.012	0.008	0.008	0.009	0.026	0.010
128K	0.049	0.008	0.009	0.059	0.013	0.198	0.009	0.007	0.031	0.090	0.008	0.017

10

【 0 0 9 4 】

表 4

OMP 調製物の調整前の吸光度値が、クラミジアで抗原投与された 6 匹のネコ ( 7 ～ 1 2 ) について下記に示され、これらは、ネコ 7 ～ 1 2 について上記で得られた溶解物調製物に対する血清に対応する。縦列の見出し部は下記のようなサンプルである：サンプル 1 9 ～ 2 4 は、抗原投与されたネコ 7 ～ 1 2 に由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル 1 9 b ～ 2 4 b は、ベースラインを明らかにするためのコントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度である。これらの定義は、実施例 1 に示されるサンプル定義を参照する。

【 0 0 9 5 】

【 表 1 2 】

サンプル	19	20	21	22	23	24	19b	20b	21b	22b	23b	24b
希釈度	ネコ7	ネコ8	ネコ9	ネコ10	ネコ11	ネコ12	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	0.043	0.112	0.063	0.034	0.067	0.017	0.010	0.010	0.010	0.025	0.021	0.009
2K	0.018	0.055	0.040	0.018	0.035	0.017	0.008	0.009	0.007	0.010	0.017	0.008
4K	0.027	0.045	0.024	0.012	0.025	0.020	0.009	0.008	0.008	0.017	0.016	0.009
8K	0.011	0.026	0.014	0.016	0.015	0.015	0.019	0.009	0.009	0.008	0.009	0.008
16K	0.007	0.019	0.029	0.013	0.030	0.026	0.028	0.011	0.014	0.008	0.029	0.009
32K	0.008	0.013	0.009	0.016	0.009	0.013	0.011	0.008	0.008	0.008	0.007	0.008
64K	0.007	0.010	0.008	0.020	0.010	0.014	0.013	0.008	0.007	0.008	0.016	0.011
128K	0.009	0.011	0.011	0.010	0.009	0.010	0.010	0.011	0.036	0.009	0.009	0.015

20

30

【 0 0 9 6 】

表 5

OMP 調製物の調整前の吸光度値が、クラミジアで抗原投与された 3 匹のネコ ( 1 3 ～ 1 5 ) について下記に示され、これらは、ネコ 1 3 ～ 1 5 について上記で得られた溶解物調製物に対する血清に対応する。さらに、対応する陽性の血清サンプルおよび陰性の血清サンプルが処理された。縦列の見出し部は下記のようなサンプルである：サンプル 2 5 ～ 2 7 は、抗原投与されたネコ 1 3 ～ 1 5 に由来する血清から得られた吸光度値である。サンプル 2 8 は陰性の血清コントロールである。サンプル 2 9 は陰性の血清コントロールである。サンプル 2 5 b ～ 2 9 b は、ベースラインを明らかにするためのコントロールとして使用された緩衝液のみの縦列から得られた吸光度値である。横列の見出し部は希釈度で

40

50

ある。これらの定義は、実施例 1 に示される定義である。

【 0 0 9 7 】

【 表 1 3 】

サンプル	25	26	27	28	29	25b	26b	27b	28b	29b
希釈度	ネコ 13	ネコ 14	ネコ 15	血清 -	血清 +	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール	コントロール
1:1K	0.023	0.092	0.128	0.100	2.792	0.023	0.011	0.009	0.018	0.026
2K	0.02	0.057	0.058	0.066	2.723	0.009	0.015	0.009	0.008	0.013
4K	0.014	0.031	0.029	0.059	2.481	0.008	0.026	0.008	0.013	0.018
8K	0.013	0.03	0.015	0.051	2.179	0.011	0.013	0.012	0.008	0.012
16K	0.009	0.018	0.021	0.02	1.728	0.018	0.011	0.008	0.008	0.011
32K	0.009	0.039	0.01	0.019	1.265	0.014	0.013	0.007	0.008	0.008
64K	0.008	0.009	0.014	0.021	0.730	0.021	0.008	0.007	0.016	0.019
128K	0.016	0.01	0.01	0.014	0.444	0.012	0.01	0.014	0.008	0.033

10

【 実施例 4 】

【 0 0 9 8 】

調整された生データ値

A . 溶解物調製物の調整後の値

下記の表における値は、本発明の新規な溶解物調製物に対する調整された光学濃度値である。調整された値は、プレートの緩衝液のみ（右）側の調整前の OD 値をプレートの Ag 被覆（左）側における対応するウェルから引くことによってコンピューター処理された。

【 0 0 9 9 】

カットオフ光学濃度値が、プレートの緩衝液のみ（右）側の平均値 + プレートの緩衝液のみ（右）側の 3 標準偏差を採用することによって計算された。サンプル 1 ~ 6 に対するカットオフ値は 0 . 0 5 8 であった。サンプル 7 ~ 1 2 に対するカットオフ値は 0 . 0 3 2 であった。サンプル 1 3 ~ 1 8 に対するカットオフ値は 0 . 0 4 0 であった。サンプル 1 9 ~ 2 4 に対するカットオフ値は 0 . 0 7 4 であった。サンプル 2 5 ~ 2 9 に対するカットオフ値は 0 . 0 3 7 であった。

20

【 0 1 0 0 】

【表 1 4】

表 1

希釈度	1:1K	2K	4K	8K	16K	32K	64K	128K
SX 1	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02
SX 2	0.01	0.01	0.010	0.00	-0.01	-0.01	-0.05	-0.03
SX 3	0.02	0.04	0.04	0.00	0.01	0.01	0.00	-0.05
SX 4	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	-0.03	0.01	0.03
SX 5	-0.02	0.04	-0.01	0.01	0.00	-0.05	0.00	0.04
SX 6	-0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	-0.02
SX 7	1.63	0.92	0.74	0.42	0.21	0.11	0.05	0.03
SX 8	0.02	0.03	0.00	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
SX 9	0.04	-0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	-0.04
SX 10	1.52	1.17	0.68	0.41	0.23	0.13	0.08	0.00
SX 11	0.27	0.11	0.06	0.03	0.05	0.01	0.02	-0.02
SX 12	1.95	1.43	0.97	0.60	0.31	0.18	0.09	0.04
SX 13	2.13	1.43	0.97	0.54	0.29	0.15	0.07	0.04
SX 14	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SX 15	0.07	0.04	0.03	0.01	0.02	0.01	0.00	0.03
SX 16	2.25	1.76	1.11	0.64	0.33	0.17	0.08	0.07
SX 17	0.22	0.07	0.06	0.03	0.02	0.01	0.00	0.00
SX 18	2.72	2.27	1.73	1.08	0.60	0.35	0.18	0.07
SX 19	0.01	0.00	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.00	0.00
SX 20	0.00	-0.08	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01
SX 21	0.08	0.02	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	-0.04
SX 22	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.02	0.00
SX 23	-0.06	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.00
SX 24	0.03	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	-0.08
SX 25	0.01	0.00	0.06	0.00	-0.01	0.00	-0.01	-0.03
SX 26	0.00	0.01	0.01	0.01	-0.01	-0.03	-0.01	0.01
SX 27	0.04	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	-0.01
SX 28	0.02	0.01	-0.01	0.04	0.01	0.02	0.01	0.00
SX 29	2.89	2.93	2.68	2.18	1.66	1.14	0.68	0.38

10

20

## 【0101】

アッセイは非常に明快であった。プレートの右側におけるバックグラウンドODシグナルは、存在する場合でも、ほとんどない程度であった。

## 【0102】

B. OMP調製物の調整後の値

下記の表における値は、本発明の先行技術のOMP調製物に対する調整された光学濃度値である。調整された値は、プレートの緩衝液のみ(右)側の調整前のOD値をプレートのAg被覆(左)側における対応するウエルから引くことによってコンピューター処理された。

30

## 【0103】

カットオフ光学濃度値が、プレートの緩衝液のみ(右)側の平均値+プレートの緩衝液のみ(右)側の3標準偏差を採用することによって計算された。サンプル1~6に対するカットオフ値は0.088であった。サンプル7~12に対するカットオフ値は0.092であった。サンプル13~18に対するカットオフ値は0.049であった。サンプル19~24に対するカットオフ値は0.030であった。サンプル25~29に対するカットオフ値は0.029であった。

40

## 【0104】

## 【表 15】

表2

希釈度	1:1K	2K	4K	8K	16K	32K	64K	128K
SX 1	0.26	0.14	0.06	0.01	-0.01	0.01	0.24	0.01
SX 2	0.04	0.02	0.00	-0.01	0.01	0.01	-0.01	0.00
SX 3	0.11	0.08	0.14	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00
SX 4	0.18	0.13	0.06	0.05	0.02	0.01	0.10	0.00
SX 5	0.16	0.14	0.10	-0.10	0.01	0.01	-0.06	0.00
SX 6	0.20	0.11	0.15	0.04	0.03	0.07	0.01	0.12
SX 7	2.28	1.73	1.52	0.97	0.61	0.31	0.15	0.07
SX 8	-0.01	0.06	0.00	0.03	0.02	0.01	-0.04	0.00
SX 9	0.43	0.28	0.21	0.07	0.04	0.02	-0.05	0.10
SX 10	2.14	1.90	1.57	1.29	0.83	0.51	0.28	0.13
SX 11	0.19	0.19	0.03	0.04	0.02	0.01	0.01	0.00
SX 12	2.37	2.60	1.82	1.51	1.16	0.72	0.42	0.18
SX 13	1.94	1.53	1.10	0.67	0.35	0.17	0.08	0.04
SX 14	0.10	0.06	0.04	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00
SX 15	0.16	0.09	0.05	0.02	0.03	0.00	0.00	-0.02
SX 16	2.17	1.63	1.14	0.67	0.42	0.21	0.11	-0.03
SX 17	0.20	0.29	0.12	0.06	0.05	0.01	-0.01	0.01
SX 18	2.28	2.51	1.72	1.37	0.98	0.64	0.38	0.18
SX 19	0.03	0.01	0.02	-0.01	-0.02	0.00	-0.01	0.00
SX 20	0.10	0.05	0.04	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
SX 21	0.05	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00	-0.03
SX 22	0.01	0.01	-0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
SX 23	0.05	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	-0.01	0.00
SX 24	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	-0.01
SX 25	0.00	0.01	0.01	0.00	-0.01	-0.01	-0.01	0.00
SX 26	0.08	0.04	0.01	0.02	0.01	0.03	0.00	0.00
SX 27	0.12	0.05	0.02	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00
SX 28	0.08	0.06	0.05	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01
SX 29	2.77	2.71	2.46	2.17	1.72	1.26	0.71	0.41

10

20

30

## 【0105】

OMP調製物では、血清濃度がより大きい場合、バックグラウンドノイズが増大していることが明らかにされる。

## 【実施例5】

## 【0106】

## 終点の比較

29個のサンプルの比較により、本発明の新規な溶解物調製物は、血清濃度がより高い場合でもバックグラウンドノイズがほとんどないことが例示される。アッセイにおいてバックグラウンドがほとんどないことは、より少ない偽陽性をもたらし、かつ、全体的により正確なアッセイをもたらす。

## 【0107】

先行技術のOMP調製物と比較して本発明の新規なアッセイをさらに分析するために、前記の29個のサンプルの終点滴定値が下記の表で比較された。

## 【0108】

40

【表 1 6】

表1

サンプル	新規な溶解物の 滴定終点	先行技術OMPの 滴定終点
SX 1	< 1K	2K
SX 2	< 1K	< 1K
SX 3	< 1K	1K
SX 4	< 1K	2K
SX 5	< 1K	4K
SX 6	< 1K	2K
SX 7	64K	64K
SX 8	< 1K	<1K
SX 9	1K	4k
SX 10	64K	128K
SX 11	4K	2K
SX 12	128K	128K
SX 13	64K	64K
SX 14	< 1K	2K
SX 15	1K	2K
SX 16	128K	64K

SX 17	4K	8K
SX 18	128K	128K
SX 19	< 1K	<1K
SX 20	< 1K	4K
SX 21	< 1K	1K
SX 22	< 1K	<1K
SX 23	< 1K	1K
SX 24	< 1K	<1K
SX 25	< 1K	<1K
SX 26	< 1K	2K
SX 27	< 1K	2K
SX 28	< 1K	8K
SX 29	>128K	>128K

## 【 0 1 0 9 】

2つのアッセイの比較により、本発明の新規な溶解物調製物のバックグラウンドノイズがほとんどないバックグラウンドノイズをもたらしたという予想外の結果が得られた。このことは、それにより、偽陽性があるかに少なくなっていることを示している。サンプル1～6は、すべてがネコからの採血前であり、本発明の新規な溶解物のもとでは予想されたように陰性であった。しかしながら、サンプル1～6は、OMP調製物のもとで処理されたとき、6例中5例で陽性の結果を示した。サンプル7～12を参照することにより、抗原の濃度が増大するに従い、新規な溶解物調製物およびOMP調製物から得られた結果がより匹敵し得るほどであることが例示される。この観測結果はサンプル13～18によってさらに確認される。サンプル19～27は、B. henselaeに対して陰

10

20

30

40

50

性な抗体であると予想されるサンプルであるが、先行技術のOMP調製物のもとでは9例中5例で陽性の結果が明らかにされ、しかし、新規な溶解物調製物のもとでは9例中9例で陰性の結果が明らかにされた。

【0110】

先行技術の調製物のもとでのさらなる誤った結合（偽陽性）がサンプル28の陰性血清ウエルによって明らかにされた。先行技術のOMP調製物は陽性の読み取りをもたらし、これに対して、本発明の新規な溶解物調製物は、予想されたように陰性の読み取りをもたらした。

【0111】

従って、本発明の新規な溶解物調製物は、先行技術のOMP調製物と比較したとき、より低いバックグラウンド、および特異的な結合をもたらしている。 10

【実施例6】

【0112】

低希釈度での比較

さらなる実験が行われた。この実験では、3枚のプレート（プレート1、2および3）が炭酸塩緩衝液（pH 9.6）において187 μg/mlでのB. henselaeのOMP調製物で被覆され、別の3枚のプレート（プレート4、5および6）がPBS（pH 7.4）において1:2Kの濃度でのB. henselae溶解物で被覆された。プレートの上側半分が抗原で被覆され、一方、下側半分がコントロールとして緩衝液のみで被覆された。すべてのプレートは4で一晚被覆され、その後、洗浄緩衝液で1回洗浄された。プレートを200 μl/ウエルの血清希釈液でブロッキング処理し、37で1時間インキュベーションした。その後、プレートを洗浄緩衝液で1回洗浄した。 20

【0113】

上記からの血清サンプル1~29を、1:100から始まって、プレートの上側半分および下側半分の両方で血清希釈液において4倍ずつ連続希釈した。プレートを37で1時間インキュベーションして、4回洗浄した。二次抗体コンジュゲート（HRP標識されたヤギ抗ネコIgG）を血清希釈液で1:2K希釈して加え、プレートを37で1時間インキュベーションした。プレートを4回洗浄して、K+P T M P基質を加えた。反応を、上記のように、100 μl/ウエルの2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で10分後に停止させ、読み取りを450 nm - 540 nmで直ちに行った。下記の表1、表2および表3には、生データが含まれる： 30

A. 生データ

表1

表1は、サンプル1~12に対する先行技術OMP調製物のアッセイから得られた生データである。

【0114】

【表 17】

	SX 1	SX 2	SX 3	SX 4	SX 5	SX 6	SX 7	SX 8	SX 9	SX 10	SX 11	SX 12
1:100	0.67 4	0.47 3	0.44 4	0.29 2	0.51 0	0.52 6	1.97 6	0.39 9	0.34 2	1.84 0	0.46 0	1.80 5
1:400	0.48 4	0.21 7	0.21 5	0.41 8	0.34 1	0.33 7	2.23 3	0.13 6	0.14 2	2.10 7	2.29 5	2.29 7
1:160 0	0.21 4	0.09 0	0.07 4	0.16 6	0.11 3	0.08 6	1.62 6	0.12 6	0.06 5	1.57 2	0.11 0	1.93 3
1:640 0	0.06 3	0.03 5	0.02 2	0.05 1	0.03 9	0.04 4	0.87 3	0.02 5	0.01 4	0.95 4	0.02 6	1.23 6
1:100	0.01 0	0.01 8	0.01 6	0.01 2	0.01 3	0.00 7	0.01 1	0.01 5	0.01 0	0.01 0	0.00 9	0.01 9
1:400	0.00 5	0.01 0	0.00 9	0.02 7	0.00 5	0.00 4	0.00 5	0.00 7	0.00 5	0.00 7	0.00 5	0.01 0
1:160 0	0.00 4	0.00 7	0.01 4	0.01 1	0.00 8	0.01 3	0.00 6	0.00 3	0.00 4	0.00 3	0.00 4	0.01 5
1:640 0	0.00 4	0.00 6	0.00 7	0.00 7	0.00 9	0.00 5	0.00 6	0.00 4	0.02 3	0.00 4	0.00 4	0.01 7

10

20

【0115】

表 2

表 2 は、サンプル 13 ~ 24 に対する先行技術OMP調製物のアッセイから得られた生データである。

【0116】

【表 18】

	SX 13	SX 14	SX 15	SX 16	SX 17	SX 18	SX 19	SX 20	SX 21	SX 22	SX 23	SX 24
1:100	2.11 6	0.44 5	0.62 3	2.21 2	0.37 2	2.15 7	0.13 6	0.23 1	0.21 0	0.09 3	0.27 0	0.03 2
1:400	1.88 8	0.19 8	0.35 7	2.80 0	0.20 8	2.24 2	0.06 0	0.12 2	0.08 9	0.02 9	0.13 3	0.01 5
1:160 0	1.19 7	0.09 1	0.13 9	1.61 1	0.10 7	1.99 8	0.02 9	0.07 4	0.02 8	0.02 0	0.03 6	0.01 4
1:640 0	0.51 1	0.05 6	0.02 7	0.75 0	0.03 0	1.38 0	0.00 9	0.01 9	0.01 4	0.00 6	0.01 5	0.00 8
1:100	0.01 2	0.01 5	0.02 4	0.02 5	0.01 6	0.00 8	0.01 2	0.00 5	0.00 6	0.00 6	0.01 9	0.00 8
1:400	0.00 7	0.35 0	0.00 7	0.03 8	0.00 5	0.00 7	0.00 5	0.01 0	0.00 4	0.00 6	0.00 6	0.00 3
1:160 0	0.00 4	0.00 5	0.00 9	0.02 0	0.01 3	0.03 2	0.00 7	0.00 9	0.00 4	0.00 3	0.03 9	0.00 4
1:640 0	0.00 7	0.00 4	0.00 8	0.01 0	0.00 6	0.01 2	0.01 9	0.00 6	0.03 3	0.00 5	0.03 5	0.01 4

30

40

【0117】

表 3

表 3 は、サンプル 25 ~ 29 に対する先行技術OMP調製物のアッセイから得られた生データである。

【0118】

50

【表 19】

	SX 25	SX 26	SX 27	SX 28	SX 29
1:100	0.120	0.262	0.296	0.540	2.159
1:400	0.070	0.176	0.190	0.291	2.487
<del>1:1600</del>	<del>0.023</del>	<del>0.070</del>	<del>0.067</del>	<del>0.094</del>	<del>2.412</del>
1:6400	0.011	0.043	0.026	0.040	2.210
1:100	0.007	0.015	0.019	0.033	0.017
1:400	0.022	0.007	0.005	0.038	0.023
1:1600	0.005	0.004	0.005	0.026	0.008
1:6400	0.017	0.006	0.008	0.020	0.006

10

【0119】

表 4

表 4 は、サンプル 1 ~ 12 に対する新規な溶解物調製物のアッセイから得られた生データである。

【0120】

【表 20】

	SX 1	SX 2	SX 3	SX 4	SX 5	SX 6	SX 7	SX 8	SX 9	SX 10	SX 11	SX 12
1:100	0.08 5	0.17 9	0.17 0	0.24 0	0.21 7	0.44 7	2.71 8	0.23 6	0.30 8	2.68 4	1.18 7	2.74 0
1:400	0.04 2	0.07 1	0.07 0	0.10 2	0.04 7	0.16 4	2.38 3	0.06 2	0.06 9	2.38 4	0.74 9	2.55 2
1:160 0	0.01 4	0.02 8	0.02 1	0.03 0	0.02 0	0.04 8	1.68 2	0.02 5	0.02 0	1.82 0	0.27 3	2.15 0
1:640 0	0.01 0	0.00 8	0.00 8	0.02 2	0.01 0	0.01 3	0.67 2	0.01 3	0.01 0	0.70 9	0.06 3	1.04 4
1:100	0.04 6	0.02 0	0.02 4	0.02 6	0.03 9	0.00 6	0.07 5	0.01 3	0.04 2	0.01 3	0.03 1	0.01 4
1:400	0.02 7	0.00 8	0.01 0	0.02 8	0.02 0	0.00 5	0.01 3	0.00 7	0.03 5	0.00 9	0.01 3	0.00 7
1:160 0	0.00 6	0.00 5	0.00 5	0.08 6	0.00 9	0.01 6	0.00 6	0.00 5	0.01 0	0.00 5	0.00 8	0.01 5
1:640 0	0.00 6	0.00 5	0.00 6	0.00 5	0.00 5	0.00 4	0.00 5	0.00 5	0.02 2	0.00 4	0.00 6	0.00 9

20

30

【0121】

表 5

表 5 は、サンプル 13 ~ 24 に対する新規な溶解物調製物のアッセイから得られた生データである。

【0122】

【表 21】

	SX	SX	SX	SX	SX	SX	SX	SX	SX	SX	SX	SX
--	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

40

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1:100	2.70 9	0.14 6	0.17 2	2.68	0.52 4	2.80 3	0.02 4	0.10 6	0.12 5	0.02 6	0.10 8	0.08 1
1:400	2.47 4	0.06 5	0.08 0	2.35 2	0.21 3	2.79 2	0.01 8	0.05 6	0.02 2	0.01 0	0.05 3	0.02 5
1:1600	1.57 6	0.02 4	0.02 2	1.49 0	0.06 0	2.17 6	0.00 5	0.02 2	0.00 7	0.00 6	0.01 1	0.01 1
1:6400	0.67 4	0.02 5	0.00 7	0.63 8	0.04 2	1.23 9	0.00 9	0.00 7	0.00 4	0.00 5	0.00 6	0.00 7
1:100	0.02 8	0.01 4	0.04 0	0.01 9	0.01 6	0.00 8	0.007	0.00 5	0.00 7	0.00 5	0.01 1	0.01 4
1:400	0.01 9	0.00 7	0.08 9	0.04 4	0.01 6	0.00 6	0.00 6	0.00 5	0.00 5	0.00 4	0.00 6	0.00 9
1:1600	0.00 9	0.00 4	0.01 7	0.01 8	0.01 0	0.01 6	0.01 3	0.00 4	0.00 7	0.00 4	0.00 7	0.00 6
1:6400	0.00 6	0.00 5	0.00 7	0.03 2	0.00 5	0.00 5	0.00 7	0.02 5	0.04 3	0.00 6	0.00 5	0.00 9

10

## 【 0 1 2 3 】

表 6

表 6 は、サンプル 25 ~ 29 に対する新規な溶解物調製物のアッセイから得られた生データである。 20

## 【 0 1 2 4 】

【 表 2 2 】

	SX 25	SX 26	SX 27	SX 28	SX 29
1:100	0.033	0.112	0.051	0.057	2.752
1:400	0.017	0.057	0.028	0.036	2.702
1:1600	0.010	0.022	0.011	0.012	2.610
1:6400	0.008	0.009	0.007	0.022	2.179
1:100	0.005	0.032	0.016	0.023	0.033
1:400	0.005	0.005	0.006	0.036	0.027
1:1600	0.007	0.006	0.007	0.038	0.027
1:6400	0.008	0.007	0.006	0.008	0.011

30

## 【 0 1 2 5 】

C . 調整後の値

上記の生データは、陰性側（緩衝液側）の光学濃度を陽性側の光学濃度から引くことによって、調整された値に変換された。

## 【 0 1 2 6 】

カットオフ値が、コントロール（緩衝液）ウエルの平均値 + コントロールウエルの 3 標準偏差を採用することによって決定された。先行技術 OMP 調製物のサンプル 1 ~ 12 に対するカットオフ値は 0 . 0 2 5 であった。先行技術 OMP 調製物のサンプル 12 ~ 24 に対するカットオフ値は 0 . 0 4 1 であった。先行技術 OMP 調製物のサンプル 24 ~ 29 に対するカットオフ値は 0 . 0 3 9 であった。本発明の新規な溶解物調製物のサンプル 1 ~ 12 に対するカットオフ値は 0 . 0 6 8 であった。本発明の新規な溶解物のサンプル 13 ~ 24 に対するカットオフ値は 0 . 0 5 8 であった。本発明の新規な溶解物調製物のサンプル 25 ~ 29 に対するカットオフ値は 0 . 0 5 3 であった。 40

## 【 0 1 2 7 】

下記の表 1 から表 6 は、より低い濃度の光学濃度の生データの表 1 から表 6 に対応する。

50

【 0 1 2 8 】

【 表 2 3 】

表1: 先行技術OMP調製物

	SX 1	SX 2	SX 3	SX 4	SX 5	SX 6	SX 7	SX 8	SX 9	SX 10	SX 11	SX 12
1:100	0.66	0.46	0.43	0.58	0.50	0.52	1.97	0.38	0.33	1.83	0.45	1.79
1:400	0.48	0.21	0.21	0.39	0.34	0.33	2.23	0.13	0.14	2.10	2.29	2.29
1:1600	0.21	0.08	0.06	0.16	0.11	0.07	1.62	0.12	0.06	1.57	0.11	1.92
1:6400	0.06	0.03	0.02	0.04	0.03	0.04	0.87	0.02	-0.01	0.95	0.02	1.22

【 0 1 2 9 】

【 表 2 4 】

表2: 先行技術OMP調製物

	SX 1	SX 2	SX 3	SX 4	SX 5	SX 6	SX 7	SX 8	SX 9	SX 10	SX 11	SX 12
1:100	2.10	0.43	0.60	2.19	0.36	2.15	0.12	0.23	0.20	0.09	0.25	0.02
1:400	1.88	-0.15	0.35	2.76	0.20	2.24	0.06	0.11	0.09	0.02	0.13	0.01
1:1600	1.19	0.09	0.13	1.59	0.09	1.97	0.02	0.07	0.02	0.02	0.00	0.01
1:6400	0.50	0.05	0.02	0.74	0.02	1.37	-0.01	0.01	-0.02	0.00	-0.02	-0.01

【 0 1 3 0 】

【 表 2 5 】

表3: 先行技術OMP調製物

	SX 1	SX 2	SX 3	SX 4	SX 5	SX 6	SX 7	SX 8	SX 9	SX 10	SX 11	SX 12
1:100	0.11	0.25	0.28	0.51	2.14	2.09	0.31	1.75	1.57	1.77	0.55	0.80
1:400	0.05	0.17	0.19	0.25	2.46	1.92	0.12	1.23	1.26	1.47	0.34	0.49
1:1600	0.02	0.07	0.06	0.07	2.40	1.49	0.03	0.80	0.44	0.81	0.16	0.11
1:6400	-0.01	0.04	0.02	0.02	2.20	0.62	0.02	0.27	0.16	0.23	0.03	0.02

【 0 1 3 1 】

【 表 2 6 】

表4: 新規な溶解物調製物

	SX 1	SX 2	SX 3	SX 4	SX 5	SX 6	SX 7	SX 8	SX 9	SX 10	SX 11	SX 12
1:100	0.04	0.16	0.15	0.21	0.18	0.44	2.64	0.22	0.27	2.67	1.16	2.73
1:400	0.02	0.06	0.06	0.07	0.03	0.16	2.37	0.06	0.03	2.38	0.74	2.55

1:1600	0.01	0.02	0.02	-0.06	0.01	0.03	1.68	0.02	0.01	1.82	0.27	2.14
1:6400	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.01	0.67	0.01	-0.01	0.71	0.06	1.04

【 0 1 3 2 】

10

20

30

40

【表 2 7】

表5:新規な溶解物調製物

	SX 1	SX 2	SX 3	SX 4	SX 5	SX 6	SX 7	SX 8	SX 9	SX 10	SX 11	SX 12
1:100	2.68	0.13	0.13	2.66	0.51	2.80	0.02	0.10	0.12	0.02	0.10	0.07
1:400	2.46	0.06	-0.01	2.31	0.20	2.79	0.01	0.05	0.02	0.01	0.05	0.02
1:1600	1.57	0.02	0.00	1.47	0.05	2.16	-0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01
1:6400	0.67	0.02	0.00	0.61	0.04	1.23	0.00	-0.02	-0.04	0.00	0.00	0.00

【0 1 3 3】

【表 2 8】

表6:新規な溶解物調製物

	SX 1	SX 2	SX 3	SX 4	SX 5	SX 6	SX 7	SX 8	SX 9	SX 10	SX 11	SX 12
1:100	0.03	0.08	0.04	0.03	2.72	2.85	0.02	2.71	2.63	2.76	0.12	1.83
1:400	0.01	0.05	0.02	0.00	2.65	2.67	0.01	2.19	2.25	2.43	0.04	0.97
1:1600	0.00	0.02	0.00	-0.03	2.58	2.27	0.00	1.20	1.21	1.66	0.02	0.34
1:6400	0.00	0.00	0.00	0.01	2.17	1.30	0.00	0.45	0.36	0.69	0.05	0.08

【0 1 3 4】

D . 実施例 6

下記の表は、より低い血清希釈度におけるOMP調製物および本発明の新規な溶解物の直接的な比較である。

【0 1 3 5】

【表 2 9】

	OMP	溶解物	OMP	溶解物	OMP	溶解物	OMP	溶解物
希釈度	1:100	1:100	1:400	1:400	1:1600	1:1600	1:6400	1:6400
SX 1	0.68	0.04	0.48	0.02	0.21	0.01	0.06	0.00
SX 2	0.46	0.16	0.21	0.06	0.08	0.02	0.03	0.00
SX 3	0.43	0.15	0.21	0.06	0.06	0.02	0.02	0.00
SX 4	0.58	0.21	0.39	0.07	0.16	-0.06	0.04	0.02
SX 5	0.50	0.18	0.34	0.03	0.11	0.01	0.03	0.01
SX 6	0.52	0.44	0.33	0.16	0.07	0.03	0.04	0.01
SX 7	1.97	2.64	2.23	2.37	1.62	1.88	0.87	0.67
SX 8	0.38	0.22	0.13	0.06	0.12	0.02	0.02	0.01
SX 9	0.33	0.27	0.14	0.03	0.06	0.01	-0.01	-0.01
SX 10	1.83	2.67	2.10	2.38	1.57	1.82	0.95	0.71
SX 11	0.45	1.16	2.29	0.74	0.11	0.27	0.02	0.06
SX 12	1.79	2.73	2.29	2.55	1.92	2.14	1.22	1.04
SX 13	2.10	2.68	1.88	2.46	1.19	1.57	0.50	0.67
SX 14	0.43	0.13	-0.15	0.06	0.09	0.02	0.05	0.02
SX 15	0.60	0.13	0.35	-0.01	0.13	0.00	0.02	0.00
SX 16	2.19	2.66	2.76	2.31	1.59	1.47	0.74	0.61
SX 17	0.36	0.51	0.20	0.20	0.09	0.05	0.02	0.04
SX 18	2.15	2.80	2.24	2.79	1.97	2.16	1.37	1.23
SX 19	0.12	0.02	0.06	0.01	0.02	-0.01	-0.01	0.00
SX 20	0.23	0.10	0.11	0.05	0.07	0.02	0.01	-0.02
SX 21	0.20	0.12	0.09	0.02	0.02	0.00	-0.02	-0.04
SX 22	0.09	0.02	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
SX 23	0.25	0.10	0.13	0.05	0.00	0.00	-0.02	0.00
SX 24	0.02	0.07	0.01	0.02	0.01	0.01	-0.01	0.00
SX 25	0.11	0.03	0.05	0.01	0.02	0.00	-0.01	0.00
SX 26	0.25	0.08	0.17	0.05	0.07	0.02	0.04	0.00
SX 27	0.28	0.04	0.19	0.02	0.06	0.00	0.02	0.00
SX 28	0.51	0.03	0.25	0.00	0.07	-0.03	0.02	0.01

SX 29	2.14	2.72	2.46	2.65	2.40	2.58	2.20	2.17
-------	------	------	------	------	------	------	------	------

【0 1 3 6】

10

20

30

40

50

これらの調整後の値から、先行技術のOMP調製物では、プレートに対する（特異的および非特異的）結合が、本発明の新規な溶解物調製物が見すよりも大きいことが明らかにされ、それにより、より多数の偽陽性をもたらされていることが例示される。具体的には、1、2、3、4、5、6、8、9、14、15、19、20、21、22、23、24、25、26、27および28の各サンプルは、1：1600の希釈度で先行技術のOMP調製物を利用するカットオフよりも大きい光学濃度値をもたらした。これらのサンプルは、前の実施例から例示されるように、陰性であることが予想される。しかしながら、本発明の新規な溶解物は、これらのサンプルのすべてが1：1600の希釈度で陰性であることを明らかにしている。

【0137】

本発明がその具体的な実施態様に関連して記載されているが、さらなる改変が可能であること、および、本出願は、一般には本発明の原理に従い、かつ、本発明が関連する技術分野における知られている実施または慣例的な実施に含まれるような、また、本明細書中上記に示される本質的な特徴に適用され得るような、また、添付された請求項の範囲において従うような、本開示からの逸脱を含む任意の変化、使用または適合化を包含することが意図されることが理解される。さらに、本明細書中で言及された特許はすべて、本明細書により参照して組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0138】

【図1】本発明の方法および/または診断キットにおいて使用されるプレートの1つの実施態様を例示する。

【図2】本発明の方法および/または診断キットにおいて使用されるプレートの1つの実施態様に対する結合した抗原を例示する。

【図1】

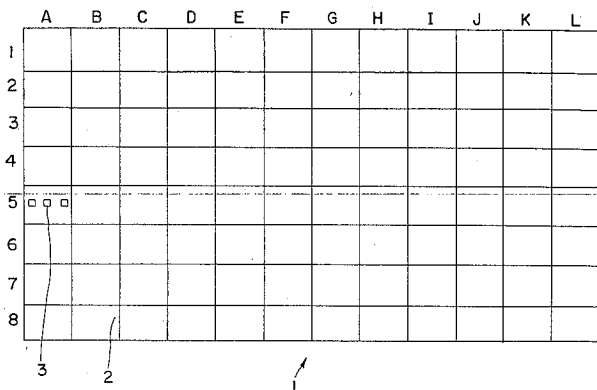


FIG. 1

【図2】

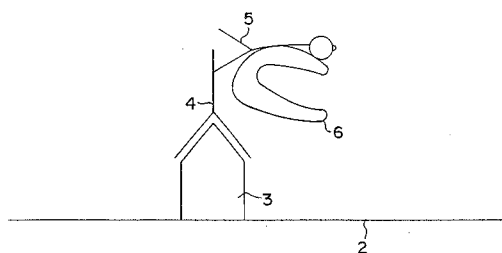


FIG. 2

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/17593		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC(7) : G01N 33/53, 33/537, 33/435, 33/554, 33/569; C12P 1/04; C12N 5/06, 5/16, 9/52 US CL : 435/4, 7.1, 7.2, 7.32, 7.92, 7.93, 7.94, 7.95, 170, 220, 340; 435/388.4 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4, 7.1, 7.2, 7.32, 7.92, 7.93, 7.94, 7.95, 170, 220, 340; 435/388.4				
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 practicable, search terms used) MEDLINE, CAPLUS, WFDIS, EPLUS, WEST, SCISEARCH, AGRICOLA, BIOSIS, BIOTECHNO				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	PUHRMANN et al. Bartonella henselae induces NF-kbeta-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: Possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. August 2001, Vol. 69, No. 8, pages 5088-5097, see entire document.	1-22		
Y	O'REILLY et al. Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of bartonella henselae (LSU16). Infection and Immunity. June 1999, Vol. 67, No. 6, pages 3066-3072, see entire document.	1-22		
Y	FREELAND, R.L. Identification of Bartonella-specific immunodominant antigens recognized by the feline humoral immune system. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. July 1999, Vol. 6, No. 4, pages 558-566, see entire document.	1-22		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           * Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "B" earlier application or patent 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         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           "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            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 13 December 2003 (13.12.2003)		Date of mailing of the international search report 18 DEC 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>John Bridges</i> Telephone No. 703-308-0196		

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 4 5 D
// C 1 2 Q 1/28	C 1 2 Q 1/28	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ03 QQ79 QR03 QR48 QR58 QX02  
 4B065 AA01X BD01 BD15 BD16 CA24 CA46  
 4H045 AA20 AA30 CA11 DA86 EA52 FA72 GA01 GA15

专利名称(译)	用于ELISA诊断的新型巴尔通体抗原裂解物提取物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005530998A</a>	公开(公告)日	2005-10-13
申请号	JP2004515733	申请日	2003-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克苏诺贝尔的基础		
[标]发明人	ベスキフレデリックランダル		
发明人	ベスキ,フレデリック・ランダル		
IPC分类号	C07K1/14 C07K14/195 C12N1/20 C12P1/04 C12Q1/28 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56911 C12P1/04		
FI分类号	G01N33/569.F C07K1/14 C07K14/195 C12N1/20.C G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/543.545.D C12Q1/28		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR03 4B063/QR48 4B063/QR58 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/BD01 4B065/BD15 4B065/BD16 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/GA01 4H045/GA15		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	10/176735 2002-06-21 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明的实施方案一般涉及新型细菌抗原提取物及其使用方法。在本发明的另一个实施方案中，本发明的新型细菌抗原用于诊断试剂盒中，用于检测血清或其他体液中的巴尔通体抗体。

サンプル番号	サンプル説明
1	対1, 抗原投与前
2	対2, 抗原投与前
3	対3, 抗原投与前
4	対4, 抗原投与前
5	対5, 抗原投与前
6	対6, 抗原投与前
7	対1, 抗原投与後 4 週間
8	対2, 抗原投与後 4 週間
9	対3, 抗原投与後 4 週間
10	対4, 抗原投与後 4 週間
11	対5, 抗原投与後 4 週間
12	対6, 抗原投与後 4 週間
13	対1, 抗原投与後 12 週間
14	対2, 抗原投与後 12 週間
15	対3, 抗原投与後 12 週間
16	対4, 抗原投与後 12 週間
17	対5, 抗原投与後 12 週間
18	対6, 抗原投与後 12 週間
19	対7, クラミジアによる抗原投与
20	対8, クラミジアによる抗原投与
21	対9, クラミジアによる抗原投与
22	対10, クラミジアによる抗原投与
23	対11, クラミジアによる抗原投与
24	対12, クラミジアによる抗原投与
25	対13, クラミジアによる抗原投与
26	対14, クラミジアによる抗原投与
27	対15, クラミジアによる抗原投与
28	陰性の B. henselae 血清
29	陽性の B. henselae 血清