

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4934729号  
(P4934729)

(45) 発行日 平成24年5月16日 (2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日 (2012.2.24)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04 C
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 E
C 1 2 R 1/445 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A

請求項の数 7 外国語出願 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-18353 (P2010-18353)	(73) 特許権者	596005333
(22) 出願日	平成22年1月29日 (2010.1.29)		ブラッコ エッセ ビア
(62) 分割の表示	特願2000-530802 (P2000-530802) の分割		イタリア国 ミラノ ヴィア エ. フォッ リ 50
原出願日	平成11年2月1日 (1999.2.1)	(74) 代理人	100078662
(65) 公開番号	特開2010-145416 (P2010-145416A)		弁理士 津国 肇
(43) 公開日	平成22年7月1日 (2010.7.1)	(74) 代理人	100116919
審査請求日	平成22年2月4日 (2010.2.4)		弁理士 齋藤 房幸
(31) 優先権主張番号	M198A000197	(74) 代理人	100146422
(32) 優先日	平成10年2月3日 (1998.2.3)		弁理士 田中 聖
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)	(72) 発明者	タレル, マリア クリスティーナ イタリア国、イー20134 ミラノ、ヴ ィア・エ・フォッリ、50

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ感染の決定のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一つのスタフィロコッカス (Staphylococcus) 株が関与しているプロテアーゼ感染の決定のための方法であって、

a) スタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermidis) 又はスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) から選ばれる病原性ブドウ球菌株 (Staphylococcal strain) により産生される多糖を、以下の工程、

i) 4 ~ 6 日間改変 H H W 培地中で該ブドウ球菌株を培養する工程、

ii) 生理学的緩衝液中で細菌細胞をホモジナイズする工程、

iii) 15 分間 13,000 × g で遠心分離し、上清を分離する工程、

iv) 12 kDa のカットオフ値を有する膜を用いて上清を透析する工程、

v) iv) で得られた溶液を凍結し、凍結乾燥する工程、

vi) 凍結乾燥した材料を脱タンパク質溶液中に懸濁する工程、

vii) vi) で得られた溶液を 30,000 × g で遠心分離し、エタノールの添加により上清を分離する工程、

viii) 多糖を得るため、工程vii) の上清を 20,000 × g で遠心分離する工程、

ix) 沈降した多糖を洗浄し、場合により真空下で脱水し、それを無菌 H<sub>2</sub>O 中に懸濁する工程

により調製すること、

b) 血液試料又はその他の生物学的流体と a) で調製された多糖とを反応させることによ

り、I g M抗体を検出することを含む方法。

【請求項2】

病原性ブドウ球菌株が、D S M Z N o . 1 1 9 4 2である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

E L I S A、ゲル免疫沈降、免疫拡散、向流免疫電気泳動 (contro-immunoelectrophoresis)、ラジオイムノアッセイ、補体結合の形態である、請求項1～2のいずれか一項記載の方法。

【請求項4】

スタフィロコッカス培養物から多糖を調製するための方法であって、

a) 4～6日間改変HHW培地中でスタフィロコッカス・エピデルミディス又はスタフィロコッカス・アウレウスを培養する工程、

b) 生理学的緩衝液中で細菌細胞をホモジナイズする工程、

c) 15分間13,000×gで遠心分離し、上清を分離する工程、

d) 12kDaのカットオフ値を有する膜を用いて上清を透析する工程、

e) d)で得られた溶液を凍結し、凍結乾燥する工程、

f) 凍結乾燥した材料を脱タンパク質溶液中に懸濁する工程、

g) f)で得られた溶液を30,000×gで遠心分離し、エタノールの添加により上清を分離する工程、

h) 多糖を得るため、工程g)の上清を20,000×gで遠心分離する工程、

i) 沈降した多糖を無水エタノールで洗浄し、真空下で脱水し、それを無菌H<sub>2</sub>O中に懸濁する工程

を含む方法。

【請求項5】

請求項4の方法により得られる多糖調製物。

【請求項6】

請求項5に記載の多糖、抗体及び検出試薬を適当な容器中に、媒体、賦形剤、添加剤、保存料又は安定剤と組み合わせて含む、請求項1～3記載の方法における使用のためのキット。

【請求項7】

該多糖が、陽性対照血清及び陰性対照血清と共に予め感作されたマイクロタイター・ストリップ上へ存在する、請求項6記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、少なくとも一つのスタフィロコッカス (Staphylococcus) 株が関与しているプロテゼ感染の決定のための方法に関する。その方法は、血液試料又はその他の生物学的液体試料からの、病原性ブドウ球菌株 (Staphylococcal) により産生される粘液 (slime) 多糖と反応する抗体の検出に基づいている。

【0002】

本発明は、病原性ブドウ球菌株の培養物から出発して、前記方法において用いるための多糖を調製するための方法を提供し、さらに、引用された方法により得られる多糖自体も提供する。

【0003】

プロテゼ感染は、一般的な外科、心臓血管外科、整形外科、眼科、及び歯科、生体材料 (biomaterials) の導入が日常的に行われている全ての分野において重大な問題となっている。プロテゼ装置は、人工栄養及び化学療法のため腫瘍学においても広く用いられている。

【0004】

プロテゼ感染の最も重要な面は、以下の通りである。

10

20

30

40

50

- 生体材料の最初の導入後の罹患率は、症例の2から6%であると一般的に報告されている。

- 感染の結果として生体材料が新しいものと交換された場合、再感染の罹患率は約60%である。

- 感染は、症例の25から45%において、臓器もしくはそれらの一部の機能的損失、又は患者の死亡すらも引き起こす可能性があるが、心臓外科のようないくつかの特定の症例においては死亡率はそれよりもはるかに高く、例えば歯科のようないくつかの医学領域においては死亡率は通常プロテアーゼ感染と関連していない。

- 患者の入院は非常に長く高価であることが多い。

- 特異的な臨床的徴候がほぼ全く存在しないため、これらの感染の診断は困難である。

- これらの感染の最大部分(85%超)は、コアグララーゼ(coagulase)陰性ブドウ球菌により(そして、それよりも少ない程度で、コアグララーゼ陽性ブドウ球菌により)引き起こされるが、腸内細菌、シュードモナス属の種、及び腸球菌のようなその他の微生物も(しばしば少なくとも一つのブドウ球菌株と関連して)様々な症例において単離されうる。

#### 【0005】

これらの感染を引き起こす間、細菌は生体材料の表面に強力に接着し、生体材料の表面をほぼ完全に覆い、時間の経過と共に、その組織の統合性を偏らせる可能性があるバイオフィーム(biofilm)へと進展するコロニーを形成する。

#### 【0006】

吸着後、細菌は、重要な代謝的改変を受け、その複製速度を減少させるが、高い生合成活性は維持している。この活性の主生成物は、化学物質、放射線、貪食細胞、及び抗体から細菌細胞を防御する厚い高密度線維質層を形成する細胞外多糖である(一般的に粘液と表示される)。

#### 【0007】

生体材料上で増殖する粘液に埋め込まれた細菌は、抗生物質に曝されたとき、細菌が生体材料の非存在下で増殖した場合に得られる対応する値よりも数百倍も高い可能性がある、最少阻止濃度及び最少殺菌濃度を示す。

#### 【0008】

バイオフィームが一定の臨界量に達すると、それは、生体材料の新たな表面に移動してコロニーを形成する可能性がある、小さな細菌細胞塊を、周囲の液体環境に放出する。

#### 【0009】

プロテアーゼ感染は、軽症のウイルス性エピソードと混同されることが最も多く、通常の抗生物質治療後に消失した後、ある時間の後に再び出現する、稀少かつ非特異的な臨床的徴候により特徴付けられることが多い。これらのエピソードは、一般的に、血中を循環している間は宿主の免疫防御により容易に認識されて発熱を引き起こし、プランクトン様の形態で通常の抗生物質により容易に殺傷されるため、感染の根絶に類似している、バイオフィームからの小さな細菌塊の放出による。臨床的徴候は、感染の進行期に、移植片周囲の柔組織の大きな腫脹もしくはフィステルの形成、又は一般的なコンプロミッション(compromission)の明白な徴候により明白となる。

#### 【0010】

この独特の特徴のため、固着細菌がin vitroの培養条件に迅速に適合することができないという事実により、培養微生物学的分析の後の偽陰性の高い発生率の結果としてすら、初期の診断は極めて困難である。

#### 【0011】

現在までのところ、血管移植片感染の診断は、客観的な臨床的パラメータ、血液パラメータ、並びに超音波検査、コンピュータ連動断層撮影、磁気共鳴、食道胃十二指腸検査、及び放射性標識白血球の注入後のシンチグラフィにより得られる機器データの分析に基づいている。このように、不十分な感度、又はデータ及び画像の解釈のよく定義された基準の欠如のため、ほとんどの症例において、感染の初期を明らかにすることは不可能である。

。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

全般的に、実際の診断可能性は、治療の成功にとってより好適な疾患の初期においては特に、絶対的に不十分である。

## 【 0 0 1 3 】

血清試料又はその他の生物学的液体に容易に適用されうる信頼性のある安価な方法が、進展の初期においてすら、プロテアーゼ装置が関与する感染の存在を明らかにすることができるが見出され、これが、本発明の目的である。この方法は、任意の種類のプロテアーゼ装置の導入により治療された、特にブドウ球菌により引き起こされる感染のリスクが高い患者の継続的なモニタリングのため、日常的に実施されうる。

## 【 0 0 1 4 】

この方法は、病原性ブドウ球菌株から抽出された細胞外多糖に対する特異的な抗体の存在の定量的測定にある。

## 【 0 0 1 5 】

さらに、本発明は、適切に増殖したブドウ球菌細胞から、これらの細胞外多糖を調製及び精製するための方法を提供する。

## 【 0 0 1 6 】

この方法のために用いられうるブドウ球菌株は、コアグラーゼ陰性及び陽性両方の、病原性であるか、又はとにかく粘液を産生することができる株である。特に、病原性のスタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*) 株又はスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 株が好ましい。

## 【 0 0 1 7 】

これらの株は、プロテアーゼ感染に罹患した患者、又は参照株の標準的なカルチャー・コレクション (culture collection) のいずれかから直接的に得られうる。そのような典型的な株の特徴は、下記の実施例 1 に報告されている。DSMZ No. 11942 で本出願人により寄託されたスタフィロコッカス・アウレウス株を用いて実施された実験も示されている。

## 【 0 0 1 8 】

細菌は、下記の実施例 2 に報告されたようないくつかの改変を有する、Hussain et al., *J. Med. Microbiol.* 34:143 - 147, 1991 に記載された液体培地 (HHW 培地) 中で増殖させる。

## 【 0 0 1 9 】

本発明に係る多糖を調製するための手法は、以下の工程を実質的に含む。

- a) 4 ~ 6 日間改変 HHW 培地中でブドウ球菌株を培養する工程、
- b) 生理学的緩衝液中で細菌細胞をホモジナイズする工程、
- c) 15 分間 13,000 × g で遠心分離し、上清を分離する工程、
- d) 12 kDa のカットオフ値を有する膜を用いて透析により上清を脱塩する工程、
- e) d) で得られた溶液を凍結させ、凍結乾燥させる工程、
- f) 凍結乾燥した材料を脱タンパク質溶液、例えばトリクロロ酢酸中に懸濁する工程、
- g) f) で得られた溶液を 30,000 × g で遠心分離し、エタノールの添加により上清を分離する工程、
- h) 多糖を得るため、工程 g) の上清を 20,000 × g で遠心分離する工程、
- i) 沈降した多糖を無水エタノールで洗浄し、真空下で脱水し、それを無菌 H<sub>2</sub>O 中に懸濁する工程。

## 【 0 0 2 0 】

精製された多糖の定量は、例えば、Pelkonen et al., *Journal of Bacteriology* 170, 2646, 1988 により記載された方法に従い実施されうる。

## 【 0 0 2 1 】

前記の方法に従い得られる多糖は、プロテアーゼ装置が挿入された患者由来の血清又はその他の生物学的液体中の抗体の決定のためのアッセイにおいて用いられる。

## 【 0 0 2 2 】

好ましくは、アッセイは、例えば酵素結合イムノソルベント・アッセイ (E L I S A)、ゲル免疫沈降、免疫拡散もしくは向流免疫電気泳動 (counter-immunoelectrophoresis)、ラジオイムノアッセイ、補体結合、及び受動血球凝集のような従来免疫化学的手法後に、I g Gクラス及び/又はI g Mクラスの抗体の存在を決定する。

【0023】

多糖が、例えばマイクロタイター・ウェルのような固体表面に固定化され、次に、免疫複合体の形成にとって適当な条件下で試料と反応させる固相法が、好ましい。免疫複合体が形成された後、それは、例えば、放射性同位体、化学発光物質もしくは色原性物質で標識された、又は比色定量反応を触媒する酵素及びその他の類似の物質とカップリングした、抗体又はそれらの免疫能を有する断片のような適当な分子との反応により、明らかにされうる。

10

【0024】

本発明により開示される方法の有効性は、以下の実験により確認された。

【0025】

第一の実験セットにおいては、血管移植片感染を有する15人の患者由来の血清を分析した。これらの患者におけるプロテアーゼ感染の存在は、プロテアーゼ周囲組織から採取された試料及び外科的交換後の移植片自体の試料両方の微生物学的分析により確認された。各試料から少なくとも一つのブドウ球菌株が単離された。

【0026】

これらの15人の患者のうち11人が、感染の明確な臨床的徴候を示し、4人は、感染の非特異的な臨床的徴候しか有しなかったが、<sup>99m</sup>Tc標識白血球の注入後のシンチグラフィにおいては陽性であった。

20

【0027】

10人の男女の成人健常対象由来の血清を陰性対照として用いた。

【0028】

以下のものに対する血清の反応性をE L I S Aフォーマットでアッセイした。

- a - 小さなポリプロピレン・シリンダー (0.5 × 1mm) 上に形成された異なるブドウ球菌株 (臨床的単離物及び参照株の両方) により形成された単一特異的なバイオフィルム
- b - 小さなポリプロピレン・シリンダー (0.5 × 1mm) 上に形成された異なるブドウ球菌株 (臨床的単離物及び参照株の両方) により形成された複数特異的 (polispecific) なバイオフィルム
- c - 異なるブドウ球菌株の培養物から抽出された表面タンパク質
- d - スタフィロコッカス・アウレウス D S M 1 1 9 4 2 及びスタフィロコッカス・エピデルミディス S A 1 5 4 5 (この株の特徴決定については実施例1を参照のこと) の培養物から抽出された、本発明において記載された多糖。

30

【0029】

実験は、以下の結果を与えた。

- a - 単一特異的又は複数特異的なブドウ球菌バイオフィルム又はブドウ球菌表面及び分泌タンパク質に対するI g G抗体力価及びI g M抗体力価はいずれも、感染患者と非感染患者とで有意に異なっていなかった。
- b - 本発明のブドウ球菌多糖に対するI g G抗体力価及びI g M抗体力価はいずれも、感染患者と非感染患者とで有意に異なっていた。それらは、さらに、明確に症候性の感染患者と乏症候性 (pauci-symptomatic) シンチグラフィ陽性患者とを区別することも可能にした。

40

【0030】

表1. マイクロタイター・ウェルを感作するためS. アウレウス D S M 1 1 9 4 2 の培養物から抽出された多糖を用いて、症候性血管移植片感染を有する11人の患者、乏症候性血管移植片感染を有する<sup>99m</sup>Tc標識白血球の注入後のシンチグラフィは陽性であった4人の患者、及び10人の健常対照対象の血清試料に対して実施されたE L I S Aアッセイにおいて得られたI g G力価及びI g M力価両方の範囲、平均値、及び標準偏差。

50

## 【 0 0 3 1 】

## 【表 1】

表 1

患者カテゴリ (n)	D S M 1 1 9 4 2					
	IgG 1/160 範囲	IgG 1/160 平均	IgG 1/160 SD*	IgM 1/160 範囲	IgM 1/160 平均	IgM 1/160 SD*
症候性感染患者 (11)	0.262-1 .06	0.66	0.25	0.32-1. 032	0.66	0.27
非感染患者 (10)	0.177-0 .266	0.17	0.03	0.101-0 .195	0.14	0.04
乏症候性シンチ グラフィ陽性感 染患者 (4)	0.251-0 .457	0.32	0.09	0.332-0 .56	0.47	0.09

\*標準偏差

## 【 0 0 3 2 】

表 2 . マイクロタイターウェルを感作するため S . エピデルミディス S A 1 5 4 5 の培  
養物から抽出された多糖を用いて、症候性血管移植片感染を有する 1 1 人の患者、乏症候  
性血管移植片感染を有するが<sup>99m</sup>T C 標識白血球の注入後のシンチグラフィは陽性であっ  
た 4 人の患者、及び 1 0 人の健常対照対象の血清試料に対して実施された E L I S A アッ  
セイにおいて得られた I g G 力価及び I g M 力価両方の範囲、平均値、及び標準偏差。

## 【 0 0 3 3 】

## 【表 2】

表 2

患者カテゴリ (n)	S A 1 5 4 5					
	IgG 1/160 範囲	IgG 1/160 平均	IgG 1/160 SD*	IgM 1/160 範囲	IgM 1/160 平均	IgM 1/160 SD*
症候性感染患者 (11)	0.173-0. 971	0.47	0.21	0.31-1.07 1	0.56	0.2
非感染患者 (10)	0.11-0.2 65	0.15	0.05	0.126-0.2 43	0.16	0.03
乏症候性シンチグ ラフィ陽性感 染患者 (4)	0.202-0. 445	0.29	0.11	0.287-0.4 83	0.37	0.06

\*標準偏差

## 【 0 0 3 4 】

第二の実験セットにおいては、マイクロタイター・ウェルを感作するため本発明の多糖  
のみを用いて実施された E L I S A 試験において、I g G 力価及び I g M 力価両方を決定  
するため、より多数の血清をアッセイした。これらの全ての試験において、(実施例 1 に  
記載されている) S A 1 5 4 5 株の培養物から抽出された多糖を用いた。

## 【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

50

これらの実験においては全部で97個の血清を試験した。これらの97個の血清のうち19個は感染しておらず血管移植片を保有しない対照患者から得られ、3個は感染はしていないが血管移植片を保有している対照患者から得られ、5個はグラム陰性細菌に感染した血管移植片を保有している患者から得られ、13個は感染はしていないが血管移植片を保有しておりスタフィロコッカス spp. により引き起こされた血管移植片感染の過去の履歴を有する患者から得られ、57個はスタフィロコッカス spp. に感染した血管移植片を保有している患者から得られた。

【0036】

血清の1/160希釈物及び1/320希釈物を用いて、これらの血清全てにおいて、IgG力価及びIgM力価両方を決定した。アッセイの実験内及び実験間の再現性を調査するため、2重の測定を2セット実施した。ELISAアッセイは実施例4に記載のよう

10

にして実施した。

【0037】

この第二の実験セットにおいて得られた結果を表3に要約する。

【0038】

表3. S. エピデルミディス SA1545 の多糖調製物を用いて実施された酵素結合免疫ソルベント・アッセイ (ELISA) の結果。

【0039】

統計的評価に用いられた各血清試料のIgM力価は、2つの異なる実験において得られた4つの異なる測定の平均値であった。統計的評価に用いられた各血清試料のIgG力価は、1つの実験において得られた2つの異なる測定の平均値であった。

20

【0040】

【表 3】

表 3

患者カテゴリ	平均 IgM 力価 (1:160) (範囲)	平均 IgM 力価 (1:320) (範囲)	平均 IgG 力価 (1:160) (範囲)	平均 IgG 力価 (1:320) (範囲)
A1) 感染しておらず 血管移植片を保有し ない対照患者 (n = 19)	0.189±0.037 (0.148-0.250)	0.136±0.024 (0.116-0.155)	0.923±0.18 (0.744-1.469)	0.692±0.21 (0.293-1.198)
A2) 感染はしてい ないが血管移植片を 保有している対照患 者 (n = 3)	0.153±0.018 (0.134-0.167)	0.111±0.006 (0.105-0.116)	1.083±0.410 (0.706-1.585)	0.823±0.356 (0.476-1.243)
A) 感染していない全 対照患者 (n = 7)	0.184±0.037 (0.134-0.250)	0.133±0.024 (0.105-0.155)	0.945±0.022 (0.076-1.585)	0.709±0.23 (0.293-1.243)
B) グラム陰性細菌に 感染した血管移植片 を保有している患者 (n = 5)	0.227±0.063 (0.128-0.291)	0.142±0.038 (0.084-0.174)	1.041±0.265 (0.763-1.480)	0.700±0.259 (0.420-1.117)
C) 感染はしてい ないが血管移植片を 保有しておりスタフィ ロコッカス spp. によ り引き起こされた血 管移植片感染の過去 の履歴を有する患者 (n = 13)	0.254±0.076 (0.185-0.379)	0.169±0.055 (0.107-0.325)	1.152±0.424 (0.513-1.689)	0.894±0.527 (0.317-1.652)
D) スタフィロコッカ ス spp. に感染した血 管移植片を保有して いる患者 (n = 57)	0.642±0.516 (0.258-2.5)	0.377±0.396 (0.127-2.448)	1.532±0.278 (0.765-1.976)	1.303±0.332 (0.522-2.013)

10

20

30

## 【 0 0 4 1 】

血清希釈 = 1 : 1 6 0 で測定された I g M 力価の比較のための、スチューデント T 検定の結果 :

$$A ( A 1 + A 2 ) \text{ vs. } D : p = 1 . 7 \times 1 0 ^ { - 1 5 }$$

$$B \text{ vs. } D : p = 2 . 0 \times 1 0 ^ { - 4 }$$

$$C \text{ vs. } D : p = 7 . 2 \times 1 0 ^ { - 8 }$$

$$A + B + C \text{ vs. } D : p = 5 . 3 \times 1 0 ^ { - 2 3 }$$

$$A + C \text{ vs. } B : p = 0 . 1 4 2$$

$$A \text{ vs. } C : p = 2 . 0 7 \times 1 0 ^ { - 1 1 }$$

## 【 0 0 4 2 】

血清希釈 = 1 : 3 2 0 で測定された I g G 力価の比較のための、スチューデント T 検定の結果 :

$$A ( A 1 + A 2 ) \text{ vs. } D : p = 4 . 5 \times 1 0 ^ { - 2 1 }$$

$$B \text{ vs. } D : p = 7 . 5 \times 1 0 ^ { - 8 }$$

$$C \text{ vs. } D : p = 8 . 0 \times 1 0 ^ { - 7 }$$

40

50

A + B + C vs. D :  $p = 3.1 \times 10^{-21}$

A + C vs. B :  $p = 0.265$

A vs. C :  $p = 0.024$

【0043】

注釈：

S . エピデルミディス SA 1545 の粘液多糖 (SP) に対して検出可能な抗体力価は、病歴が異なる患者群において有意差を示した。

【0044】

スタフィロコッカス spp . に感染した血管移植片を保有している患者においては、i ) 血管移植片を保有していても、又はしていなくても、そのような感染の履歴がない対照患者、ii ) グラム陰性細菌に感染した血管移植片を保有している患者、iii ) 感染していない血管移植片を保有しているが、スタフィロコッカス spp . による血管移植片感染の過去の履歴を報告している患者と比較して、SA 1545 - SP に対する有意に高い抗体力価が見出された。これらのデータは、全体として、スタフィロコッカス spp . により引き起こされる血管移植片感染が、SP に対する特異的な体液性免疫反応を誘導すること、及びこの反応が、本特許出願において記載されたような SA 1545 SP 調製物で感作された固相を用いた酵素イムノアッセイにより検出されうること、を示している。

【0045】

上記患者群における抗 SA 1545 SP のアイソタイプ反応の分析は、IgG 抗体力価及び IgM 抗体力価両方の有意差を示した。IgM 力価は、スタフィロコッカス spp . により引き起こされる活動性感染の状態と最も密接に関連していた。

【0046】

感染患者の力価と非感染患者の力価との間の統計的有意差の存在は、感染過程の存在の高い確率を定義することが可能なブレイクポイント値を確立することを可能にする。さらに、追跡における特異的参照値として移植時に測定された抗体力価を用いて、移植片の挿入後に患者をモニターするため、この方法を用いることが可能である。

【0047】

前記の方法は、実施が容易であり、安価であり、そして他の全ての利用可能な方法がしばしば明瞭な診断的情報を与えることができない感染の初期においてすら ( 侵襲的手法の必要なしに ) 信頼性のある結果を得ることを可能にするため、この領域における従来の診断法と比較して、いくつかの利点を有することは明らかであると考えられる。さらに、この方法は、潜伏感染の発生に関する患者の定期的モニタリングを可能にし、治療結果に関する信頼性のある情報を与えることができる。

【0048】

本発明は、最後に、媒体、賦形剤、並びに保存料及び安定剤のような添加剤と共に、適切な容器中に多糖調製物、標準抗体、及び検出のための試薬を含む、アッセイを実施するためのキットを提供する。

【0049】

好ましくは、キットは、( 元の力価を有する ) 陽性対照血清及び陰性対照血清と共に抗原で予め感作されたマイクロタイター・ストリップを含むであろう。

【0050】

以下の実施例は、本発明をより明解にするためのものである。

【0051】

#### 実施例 1

アッセイにとって適切な細菌株の特徴決定

API 20 STAPH 同定システムを用いて同定のため試験されたとき数字コード 6704773 を与える、SA 1545 と表示されるスタフィロコッカス・エピデルミディス株を、成人男性から外植された大動脈・両側大腿動脈 (aorto-bifemoral) 移植片から単離した。

【0052】

10

20

30

40

50

単離物は、5%脱線維ヒツジ血液を追加されたコロムビア寒天 (Columbia Agar) プレート上で増殖させたとき、コロニーの明白な二形性を示した。それは、マンニトール塩寒天上で増殖させたとき、マンニトール発酵に関して陰性であり、コロニーは37で18hのインキュベーションの後1mm未満の直径を示した。

【0053】

単離物は、キルビー・パウエル (Kirby Bauer) アッセイを用いて調査したとき、以下の抗生物質：ゲンタマイシン、バンコマイシン、オフロキサシン、エритроマイシン、イミペネム、セファロチン、アモキシシリン (Amoxicillin) + クラブラン酸、セフォパゾン (cefoperazone) に対して感受性であった。

【0054】

単離物の生化学的パターンは以下の通りであった。

発酵	グルコース	+	
発酵	フルクトース	+	
発酵	マルトース	+	
発酵	ラクトース	+	
発酵	トレハロース	-	
発酵	マンニトール	-	
発酵	キシリトール	-	
発酵	メリピオース	-	
発酵	ラフィノース	-	20
発酵	キシロース	-	
発酵	サッカロース	+	
産生	硝酸塩	-	
産生	アルカリホスファターゼ	-	
産生	アセトイン	-	
産生	N - アセチル - グルコサミニダーゼ	-	
産生	アルギニンヒドロラーゼ	+	
産生	ウレアーゼ	+	

【0055】

他の多くの症例において、類似の特徴を示し、本発明のアッセイに用いるのに適した株が単離されている。

【0056】

実施例 2

培養培地の調製

培養培地は1リットル当たり以下の化合物を含む。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$	10 g	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g	
L - アスパラギン酸	150 mg	
L - アラニン	100 mg	
L - アルギニン	100 mg	40
L - シスチン	50 mg	
グリシン	100 mg	
L - グルタミン酸	150 mg	
L - ヒスチジン	100 mg	
L - イソロイシン	150 mg	
L - リジン	100 mg	
L - ロイシン	150 mg	
L - メチオニン	100 mg	
L - フェニルアラニン	100 mg	
L - プロリン	150 mg	50

L - セリン	1 0 0 mg	
L - トレオニン	1 5 0 mg	
L - トリプトファン	1 0 0 mg	
L - チロシン	1 0 0 mg	
L - バリン	1 5 0 mg	
グルコース	1 0 g	
M g S O <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O)	5 0 0 mg	
ビオチン	0 . 1 mg	
ニコチン酸	2 mg	
D - パントテン酸	2 mg	10
ピリドキサル	4 mg	
ピリドキサミン	4 mg	
リボフラビン	2 mg	
チアミン	2 mg	
アデニン	2 0 mg	
グアニン	2 0 mg	
C a C l <sub>2</sub> (6 H <sub>2</sub> O)	1 0 mg	
M n S O <sub>4</sub>	5 mg	
( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> F e S O <sub>4</sub> (6 H <sub>2</sub> O)	6 mg	
【 0 0 5 7 】		20

培地の組成は、調製に関して以下の改変を有する、Hussain, Hastings, White, J. Med. Microbiol. 34:143 - 147, 1991に記載のものに相当する。全ての培地成分を計量した後、M g S O<sub>4</sub>(7 H<sub>2</sub>O)を蒸留水に溶解し、次に絶えず振とうしながら残りの全ての成分を一度に添加した。L - シスチンは、培地への添加の前に、2 ~ 3 滴の5 N N a O H に溶解させなければならない。

#### 【 0 0 5 8 】

(少量の沈殿物が残存していてもよいが)全ての成分が溶解した後、蒸留水で容量を1 lに調整し、0 . 2 μmの多孔性膜を通す濾過により滅菌する。

#### 【 0 0 5 9 】

##### 実施例 3

##### 多糖の調製

1 0 0 0 mlの改変H H W培地中で3 7 で6日間、振とうしながら株を増殖させた。

#### 【 0 0 6 0 】

細菌ペレットを、4 で1 5分間1 3 , 0 0 0 × gでの遠心分離により収集し、2 0 mlの無菌氷冷生理食塩水(N a C l 0 . 9 %)中に懸濁し、- 2 0 で2 h凍結した。次に、細菌懸濁液を室温にて解凍し、3 0秒間隔で3 0秒間1 0回ホモジナイズした。

#### 【 0 0 6 1 】

次に、ホモジネートを、4 で1 5分間1 3 , 0 0 0 × gで遠心分離した。得られた上清を4 で保存し、得られたペレットを、2 0 mlの無菌氷冷生理食塩水中に再び懸濁させ、前記と同様にホモジナイズした。第二のホモジナイゼーション工程から得られた上清を、先に得られたものに添加し、1 2 kDaのカットオフ値を有する透析膜を用いて、4 で2 h、1 , 0 0 0 容量の蒸留水に対する透析により脱塩した。次に、試料を- 8 0 で凍結し、凍結乾燥し、5 % ( W / V )トリクロロ酢酸中に懸濁し、4 で1 5分間インキュベートした。

#### 【 0 0 6 2 】

次に、試料を、4 で3 0分間3 0 , 0 0 0 × gで遠心分離した。次に、4 容量の氷冷無水エタノールを上清に添加し、それをさらに4 8 h 4 でインキュベートした。次に、バルクの多糖を、4 で3 0分間2 0 , 0 0 0 × gでの遠心分離により収集し、0 . 5 容量の氷冷無水エタノールで洗浄し、真空下で脱水し、最後に2 mlの無菌蒸留水に懸濁させた。前記のようにして得られた多糖を、適切な希釈の後、マイクロタイター・ウェルを感

作するために用いた（典型的には50 µlずつ）。

【0063】

実施例 4

ELISA アッセイの実行

マイクロタイター・プレートのウェルを、実施例3に従い調製し、無菌蒸留水で1/80に希釈した50 µlの多糖で感作し、適切に密封し、4℃で18~24hインキュベートした。インキュベーション後、ウェルを空にし、100 µlの0.05%トウイーン20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で5回洗浄した。

【0064】

次に、ウェルを空にし、200 µlの10%豆乳を含むPBSで飽和し、適切に密封し、37℃で1時間インキュベートした。次に、ウェルを空にし、前記と同様に洗浄し、希釈された血清を50 µlずつ添加した。一つの陽性対照及び一つの陰性対照を含む血清を、典型的には、1/160及び1/320にPBSで希釈した。血清の添加後、ウェルを適切に密封し、37℃で1時間インキュベートした。次に、ウェルを空にし、前記と同様に洗浄し、50 µlの「ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヒトIgG」（例えば、DAKO cod. P0214）（10%豆乳を含むPBSで1/15,000に希釈）又は「ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヒトIgM」（例えば、DAKO cod. P0215）（10%豆乳を含むPBSで1/1,500に希釈）のいずれかを添加した。次に、ウェルを適切に密封し、37℃で1時間インキュベートし、空にし、前記と同様に洗浄した。

【0065】

最後の洗浄後、ペルオキシダーゼの色原性基質（例えば、BM Blue POD Substrate Boehringer Mannheim, cod 1484281）を50 µl、各ウェルに添加した。

【0066】

次に、ウェルを、37℃で10分間インキュベートし、次に、50 µlの0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加することにより反応を停止させた。次に、ブランクとして100 µlの0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を含む未処理の1ウェルを用いて、マイクロタイター・プレート・リーダーを用いて、各ウェルのOD<sub>450nm</sub>を評価した。

【0067】

概して、陽性対照のOD<sub>450nm</sub>は、1.5という値を超えるべきではない。

【0068】

これが起こった場合には、ペルオキシダーゼ基質のインキュベーション時間を減少させ、アッセイを繰り返さなければならない。

【0069】

10

20

30

【表 4】

## INTERNATIONALES FORMBLATT

BRACCO S.p.A.  
Via Folli, 50  
I-20134 Milano

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG.  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: 6538P	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 11942
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde  <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung  eingereicht. (Zureichendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1998-01-20 (Datum der Erstinneuerung)* eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erstinneuerung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Erstinneuerung in eine Hinterlegung gemäß Budapest-Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschrift: Mascher Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle benannten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  <i>V. Wechs</i> Datum: 1998-01-22

\* Falls Regel 6A Buchstabe a zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Stamm einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

Formblatt DSMZ-OP/4 (einziges Setzt) 0196

10

20

30

40

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 R 1:445

- (72)発明者 ロッソリーニ, ジャンマリア  
イタリア国、イ - 2 0 1 3 4 ミラノ、ヴィア・エ・フォッリ、5 0
- (72)発明者 セラン, ラウラ  
イタリア国、イ - 2 0 1 3 4 ミラノ、ヴィア・エ・フォッリ、5 0
- (72)発明者 パッサリエット, クラウディオ  
イタリア国、イ - 2 0 1 3 4 ミラノ、ヴィア・エ・フォッリ、5 0

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 英国特許出願公開第0 0 9 9 2 1 3 2 ( G B , A )  
特表平0 4 - 5 0 1 7 1 8 ( J P , A )  
ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS Vol.342, No.2(1997) p.389-395  
J.Med.Microbiol. , 1 9 9 1 年 , 34 , 143-147  
Journal of Hospital Infection , 1 9 9 2 年 , 20 , 173-184

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3  
C 1 2 N 1 / 2 0  
C 1 2 P 1 9 / 0 4  
G 0 1 N 3 3 / 5 6 9  
C 1 2 R 1 / 4 4 5  
CA/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	測定假体感染的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4934729B2</a>	公开(公告)日	2012-05-16
申请号	JP2010018353	申请日	2010-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	伯拉考成像股份公司		
申请(专利权)人(译)	布拉科爱喜同行		
当前申请(专利权)人(译)	布拉科爱喜同行		
[标]发明人	タレルマリアクリスティーナ ロツソリーニジャンマリア セララウラ パッサリエツロクラウディオ		
发明人	タレル,マリア クリスティーナ ロツソリーニ,ジャンマリア セラン,ラウラ パッサリエツロ,クラウディオ		
IPC分类号	G01N33/53 C12P19/04 C12N1/20 G01N33/569 C12R1/445 C12Q1/14		
CPC分类号	C12P19/04 G01N33/56938		
FI分类号	G01N33/53.N C12P19/04.C C12N1/20.A G01N33/569.E C12R1/445		
F-TERM分类号	4B064/AF11 4B064/CA02 4B064/CE02 4B064/CE03 4B064/CE06 4B064/CE17 4B064/DA13 4B065/AA53X 4B065/AC14 4B065/BA22 4B065/BB01 4B065/CA22 4B065/CA27 4B065/CA46		
代理人(译)	津国 肇 田中 圣		
优先权	101998900653433 1998-02-03 IT		
其他公开文献	JP2010145416A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种测定假体感染的方法，其包括从血液样品或其他生物液体样品中检测与毒性葡萄球菌菌株产生的多糖反应的抗体的步骤。ŽSOLUTION：描述了一种实验室测定假体感染的方法。对从患者分离的生物流体进行的该方法基于检测由细菌定植假体装置产生的多糖特异性的抗体。Ž

患者カテゴリ (n)	SA 1545					
	IgG 1/160 範囲	IgG 1/160 平均	IgG 1/160 SD*	IgM 1/160 範囲	IgM 1/160 平均	IgM 1/160 SD*
症候性感染患者 (11)	0.173-0.971	0.47	0.21	0.31-1.07 1	0.56	0.2
非感染患者 (10)	0.11-0.265	0.15	0.05	0.126-0.2 43	0.16	0.03
乏症候性シンチグラフィ陽性感染患者 (4)	0.202-0.445	0.29	0.11	0.287-0.4 83	0.37	0.06