

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4471844号
(P4471844)

(45) 発行日 平成22年6月2日(2010.6.2)

(24) 登録日 平成22年3月12日(2010.3.12)

(51) Int.Cl. F I
 GO 1 N 33/68 (2006.01) GO 1 N 33/68
 GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

請求項の数 8 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2004-563298 (P2004-563298)	(73) 特許権者	505226644
(86) (22) 出願日	平成15年12月19日 (2003.12.19)		アジェンス フランセーズ ドゥ セキュ リテ サニタイル デ アリメント-アフ ザー
(65) 公表番号	特表2006-510913 (P2006-510913A)		AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS-AFSSA
(43) 公表日	平成18年3月30日 (2006.3.30)		-
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/003856		フランス、メゾン-アルフォルト エフ- 94701、アベニューデュ ジェネラル ルクラレク 27-31
(87) 国際公開番号	W02004/059321		27-31, avenue du Gen eral Leclerc, f-9470 1 Maisons-Alfort Fr ance
(87) 国際公開日	平成16年7月15日 (2004.7.15)		
審査請求日	平成18年9月28日 (2006.9.28)		
(31) 優先権主張番号	02/16382		
(32) 優先日	平成14年12月20日 (2002.12.20)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノグリコシド抗生物質を使用するPRP検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ウシの脳若しくはそのホモジェネート、又はヒトの頭脊柱液をストレプトマイシンと接触させることを特徴とするPrP^SCの検出方法。

【請求項2】

a) ストレプトマイシンをウシの脳ホモジェネート、又はヒトの頭脊柱液の懸濁液に添加し、溶液を生成し、

b) 前記溶液に緩衝液を添加して、加熱し、次に得られた溶液を遠心分離し、上清から残渣を分離し、

c) 電気泳動ゲル上での遊走、転移及び免疫検出後にPrP^SCを検出することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

a) プロテイナーゼKをウシの脳ホモジェネート、又はヒトの頭脊柱液の懸濁液に添加し、

b) ストレプトマイシンを前記懸濁液に添加し、

c) 得られた懸濁液を緩衝液に添加して、加熱し、次に得られた溶液を遠心分離し、上清から残渣を分離し、

d) 電気泳動ゲル上での遊走、転移及び免疫検出後にPrP^SCを検出することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

10

20

前記ストレプトマイシンと接触させる前に、ウシの脳ホモジェネート、又はヒトの頭脊柱液をブドウ糖溶液中で均質化させることを特徴とする請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】

加熱ステップは、60～150の温度上昇に相当することを特徴とする請求項2から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

ウシの脳若しくはそのホモジェネート、又はヒトの頭脊柱液中のPrP^{Sc}を沈降又は検出するための薬剤であって、ストレプトマイシンを含有することを特徴とする薬剤。

【請求項7】

ウシの脳ホモジェネート、又はヒトの頭脊柱液中のPrP^{Sc}を除去するための薬剤であって、ストレプトマイシンを含有することを特徴とする薬剤。

10

【請求項8】

ウシの脳若しくはそのホモジェネート、又はヒトの頭脊柱液中のPrP^{Sc}を沈降又は検出するためのキットであって、ストレプトマイシンを含有することを特徴とするキット

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、硫酸ストレプトマイシンによる全PrP^{Sc}沈降法、及び液体又は溶液からのPrP^{Sc}免疫検出又は除去のためのその使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

PrP又は細胞プリオン蛋白に関してPrP^Cと示される天然又は正常プリオン蛋白は、哺乳動物のリンパ系及びニューロン細胞中で広く発現する糖タンパクである。

【0003】

PrP^Cの構造変化は、プロテイナーゼKに耐性を有する病原蛋白PrP^{Sc}の出現及び増殖に至らせる。この病原蛋白は、PrP^{Sc}又はPrP^{Res}と差別なく呼ぶことができる。動物器官中にPrP^{Sc}が蓄積することは、多数の疾病、特に小型反芻動物の振戦病、大鹿及び羚羊の慢性消耗病（又はchronic wasting disease「CWD」）、ウシ海綿状脳症（BSE）及びヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病の原因である。

30

【0004】

BSEに感染した家畜において、2～6年の潜伏期後に遅発出現すること、及び症状発展が遅いことにより、疫学的モデルの発展は、著しく遅れた。BSEは、摂取によってヒトに伝染可能であり、かつクロイツフェルト・ヤコブ病の新規な形状（vMCJ）の出現に至らせた。

【0005】

病原蛋白PrP^{Sc}の検出は、感染した健康な動物において、疾病の発展前には困難であり、かつ特に病気の動物において血液及び尿中では困難である。現在のところ、ヒトの食料用の動物において存在するPrP^{Sc}は、感染した組織の摂取時にヒトに伝達することが明らかである。従って公衆衛生の主要な目標は、ヒトの消費用の動物において、それらを食物連鎖から取り出すために、PrP^{Sc}を検出して、この伝染を回避することである。

40

【0006】

従って、生体試料又は動物におけるPrP^{Sc}の存在検出は、極めて重要になっており、幾つもの研究者チームが、免疫学的検出方法を発展させている（国際公開第02/086511号パンフレット）。その上、vMCJ治療のためにペプチド、小分子又は阻害物質のPrP^{Sc}での複合体生成方法が、活発な研究の対象となっている。しかしながら、先行技術の方法は、PrP^{Sc}が、生体試料中で少量である時、PrP^{Sc}を信頼に値するように同定するという困難な問題に絶えず遭う。

50

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明者らは、アミノグリコシド、及び特にI I群のアミノグリコシド、及び更に特にハストレプトマイシンの新規な特性を明らかにし、かつPrP^{Sc}により複合体を生成し、かつそれを沈降させるこれら抗生物質の能力を証明した。

【0008】

このようにして、発明者らは、種々の動物起源に由来し、かつプリオンを含む生体試料中にアミノグリコシドを添加することは、結果として、プリオンの3つのバンドの見かけ分子量の増大をもたらすことを観察した。この観察及び続く実験によって、アミノグリコシドが、PrP^{Sc}により複合体生成すること、かつこの複合体生成が、結果として当業者が従来使用した方法と比べ、PrP^{Sc}の沈降、及びPrP^{Sc}を検出する可能性の著しい増加をもたらすことを、発明者らが証明することが可能になった。

【0009】

従って、本発明は、プリオンによる疾病の診断の際に使用する、又は生物学的液中に存在するプリオンを除去するためのPrP^{Sc}沈降による濃縮方法であって、動物又はヒト生体に由来する、又はそれから得られた組織又は生物学的流体の懸濁液を、好ましくはアミノグリコシド系から選択された抗生物質、好ましくはハストレプトマイシンと接触させることを特徴とする方法を対象とする。

【0010】

より正確には、本発明による方法は、次のステップを含む：

a) アミノグリコシドを動物又はヒト生体に由来する、又はそれから得られた組織又は生物学的流体の懸濁液に添加し、溶液を生成し、

b) 前記溶液に緩衝液を添加して、加熱し、次に得られた溶液を遠心分離し、上清から残渣を分離し、

c) 電気泳動ゲル上での遊走、転移及び免疫検出後にPrP^{Sc}を検出する。

【0011】

本発明の方法は、プロテイナーゼ、及び特にプロテイナーゼKによって定量する試料の消化による追加のステップを含むことも同様である。このようにして、本発明の方法は、次のステップを含む：

a) プロテイナーゼ、例えばプロテイナーゼKを動物又はヒト生体に由来する、又はそれから得られた組織又は生物学的流体の懸濁液に添加し、

b) アミノグリコシドを前記懸濁液に添加し、

c) 得られた懸濁液を緩衝液に添加して、加熱し、次に得られた溶液を遠心分離し、上清から残渣を分離し、

d) 電気泳動ゲル上での遊走、転移及び免疫検出後にPrP^{Sc}を検出する。

【0012】

より正確には、本発明による方法は、次のステップを含む：

a) 5%のブドウ糖溶液での動物又はヒト生体から得られた生物学的流体又は組織の均質化による10%の懸濁液の調製をし、

b) プロテイナーゼKを得られた100 µlの懸濁液に添加し、次に37 °Cで1時間インキュベートし、

c) アミノグリコシドを懸濁液に添加し、次に37 °Cで2時間目にインキュベートし、

d) 得られた懸濁液を緩衝液に添加して、加熱し、次に得られた溶液を遠心分離し、上清から残渣を分離し、

e) Laemmli、Nature 227 (1970)、680-685によって記載されたように、Laemmliの変性緩衝液及び50% v/vの尿素8Mの溶液50 µl中で残渣を懸濁する。強い渦状の攪拌後、5分間100 °Cで加熱し、12000 gで遠心分離し、上清をSDS PAGEに対して遊走させるために、上清を回収する。

f) Laemmli、Nature 227 (1970)、680-685によって記

10

20

30

40

50

載されたように、電気泳動ゲルに対する遊走、特にドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル 15% (SDS PAGE) に対する一次元電気泳動後、蛋白は、ニトロセルロース膜上の電気泳動によって転移し、かつアミノ酸 126 - 160 からなる特異エピトープを認識するモノクローナル抗体により、周囲温度で 60 分間、免疫プロットされる。二次抗体 (1/5000) は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (IgG H+L) と結合したマウス免疫グロブリンの重及び軽鎖に向けられるヤギ抗体である。プロットは次に洗浄され、かつ信号が、フィルム (Biomedex light, Kodak) 上に ECL キット (Amersham) によるか、super Signal Ultra (Pierce)、及び Fluor S. Multimaget (BioRad) 上の視覚化による化学発光で検出される。

10

【0013】

本発明による方法は、超遠心分離を必要としないという利点を有する。本発明による方法は、プリオン蛋白によるアミノグリコシド複合体生成、及びアミノグリコシドによるプリオン蛋白の沈降にも同様に関する。

【0014】

本発明の実施態様によれば、生物学的組織は、脳、又は他の動物若しくはヒトの組織、又は頭脊柱液若しくは血清のような生物学的流体に由来するか、又はそれから得られる。

【0015】

本発明による方法において使用されるプロテイナーゼは、プリオン蛋白の正常形状を含む、存在する蛋白を消化することが可能であること、及びこの蛋白の病理学的形状を消化することが不可能であることのために選択されたプロテイナーゼである。好適には、プロテイナーゼ K のことである。

20

【0016】

本発明の好ましい実施態様に従えば、前記アミノグリコシドと接触させる前に組織は、ブドウ糖溶液中で均質化される。好ましくは、5%のブドウ糖溶液を使用する。

【0017】

プロテイナーゼ K 及びアミノグリコシドと生体試料を接触させた結果生じる懸濁液に、100 µl の Laemmli の緩衝液を加えた後の、加熱ステップは、60 ~ 150、好ましくは約 100 の温度上昇に相当する。

【0018】

本発明の好ましい実施態様に従えば、アミノグリコシドは、II 群のアミノグリコシド、及び好ましくはストレプトマイシン又はその誘導体の 1 種である。

30

【0019】

本発明は、PrP^{Sc} の沈降、検出、免疫組織化学での検出でさえも、及び/又は診断のためのかかるアミノグリコシドの使用も同様に対象とする。

【0020】

本発明は、生物学的流体からの PrP^{Sc} 除去のためのかかるアミノグリコシドの使用を更に対象とする。

【0021】

最後に、本発明は、PrP^{Sc} の存在に関連する疾患の診断キットであって、かかるアミノグリコシドを含むことを特徴とするキットに同様に関する。

40

【0022】

本発明のその他の利点及び特徴は、生体試料がアミノグリコシドと接触する時の PrP^{Sc} 検出増大に関する以下に続く実施例を読めば現れるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】**【0023】**

以下の実施例 2 及び 3 が行われた生体試料は、5%のブドウ糖溶液中に置かれたウシの脳のホモジェネートから得られた。10 mg の脳組織に対応する、この懸濁液の 100 µl の容量が、以下に続く実験で使用される。従って各試料は、プロテイナーゼ K を添加する 100 µl からなる。37 で 1 時間後、ストレプトマイシンを添加する又は添加しな

50

い。溶液は渦状に攪拌され、かつ更に1時間37 でインキュベートされる。100 µl の Laemmli の変性緩衝液を添加した後、5分間100 で加熱し、かつ5分間12000 g で遠心分離し、次に上清を SDS PAGE に対して遊走させるために、上清を回収する。残渣は、同様に回収され、かつそれらに、50% v/v の尿素 8 M の溶液 50 µl 及び Laemmli の緩衝液を添加する。強い渦状の攪拌後、5分間100 で加熱し、かつ5分間12000 g で遠心分離し、次に上清を SDS PAGE に対して遊走させるために、上清を回収する。

【実施例1】

【0024】

実施例1は、漸増濃度(0 µg ; 62.5 µg ; 125 µg ; 500 µg 及び 2000 µg) のストレプトマイシンが、振戦病に罹患したヒツジの脳当量 920 µg から抽出された一定量の PrP^{Sc} に添加され、次に混合物が遠心分離される、テストに関する図1A 及び 1B を参照する。上清が、ウェスタンブロットによる免疫検出(図1A) 及び PrP^{Sc} のバンドの平均分子量測定(図1B) に関して使用される。結果は、ストレプトマイシンの増加、すなわち 0 ; 62.5、5、125、500、1000 及び 2000 µg の添加により、最低のストレプトマイシン濃度で、非グリコシル化蛋白のバンドが、見かけ分子量の増大を最初に示すことを確認することが可能になることを示している。次に、複合体生成は、モノグリコシル化蛋白のバンドに関し、かつ最後にビグリコシル化蛋白は、ストレプトマイシン濃度が、より高い時に複合体生成される。

【0025】

一定濃度での PrP^{Sc} の各バンドに関連したストレプトマイシン分子数は、各バンドの分子量を測定して、算定される。発明者らは、2000 µg のストレプトマイシン存在下での PrP^{Sc} の各バンドの見かけ分子量の増大が、PrP^{Sc} のバンド当たり 10 ~ 12 個のストレプトマイシン分子の引っ掛かり (ac cro ch a g e) に対応すると評価した。

【実施例2】

【0026】

実施例2は、漸増濃度(0 µl ; 5 µl ; 10 µl ; 20 µl) のストレプトマイシン 1 g/ml が、上記に示すように調製された一定量の生体試料に添加される、テストに関する図2を参照する。ストレプトマイシンの非存在下で、PrP^{Sc} の全バンドが、上清中にあるように同定された。かつ徐々に、それらは、残渣及び上清中で同時に検出されるようになる。上清中に存在する PrP^{Sc} 量は、沈降物中で量が徐々に増加する間に、徐々に減少する。20 µl のストレプトマイシンの添加により、その時には沈降物中でしか検出されない PrP^{Sc} を完全に沈降させる。

【実施例3】

【0027】

実施例3は、図3を参照する。

【0028】

実施例2の実験を反復するが、実施例2と比べて 1/25 に希釈された同一の脳試料により、かつ脳懸濁液へのプロテイナーゼ K 及びストレプトマイシンの同時添加後の1時間に、インキュベーション期間を減少させる。結果は、PrP^{Sc} のバンドが、ストレプトマイシンの非存在下で上清中で、かついかなる濃度であろうとストレプトマイシンの存在下で残渣中でしか検出されないということである。

【実施例4】

【0029】

実施例4は、図4A、4B 及び 4C を参照する。

【0030】

5% のブドウ糖溶液中の、BSE に感染したウシの脳の 10% のホモジェネートの一連の 1:2 の原希釈溶液から、各々が 100 µl の同じ希釈溶液を含む 3 セットの管を調製する。

10

20

30

40

50

【0031】

(純粋から1/64の)第1の希釈溶液セットの各管に、10 μ lの容量における1 μ gのプロテイナーゼKを添加する。

【0032】

(1/2から1/256の)第2のセットの各管に、10 μ lの容量における5 μ lのストレプトマイシン及び1 μ gのプロテイナーゼKを同時に添加する。

【0033】

(1/2から1/256の)第3のセットの各管に、10 μ lの容量における10 μ lのストレプトマイシン及び1 μ gのプロテイナーゼKを同時に添加する。

【0034】

全ての管は、1時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートされ、次に100 μ lのLaemmliの変性緩衝液を添加する。5分間100 $^{\circ}$ Cで加熱し、5分間12000gで遠心分離し、かつSDS PAGEに対し沈殿させるために、第1管セットから上清を回収する。第2及び第3管セットの管の上清は、除去され、かつ各管に50 μ lの50%v/vの尿素8M及びLaemmliの変性緩衝液を添加する。強い渦状の攪拌後、5分間100 $^{\circ}$ Cで加熱し、12000gで遠心分離し、かつ第2及び第3管セットに関して上清を回収する。

【0035】

図4Aは、ストレプトマイシン非存在下で検出されたPrP^{Sc}の検出限界が、1/16であることを示す。

【0036】

図4Bは、5 μ lのストレプトマイシン存在下で沈降したPrP^{Sc}量を示す。PrP^{Sc}は、1/128の希釈まで検出可能であり、このことは、検出閾値が著しく増加したことを示す。

【0037】

図4Cは、10 μ lのストレプトマイシン存在下で沈降したPrP^{Sc}量を示す。図4Cは、最も希釈した(1/256)試料に対しても、検出が可能であり、かつ代表的であることを示す。

【実施例5】

【0038】

比較例

基準技術は、1.2mlの脳ホモジェネートからのPrP^{Sc}抽出に基づく(Madec et al., Microbial Pathogenesis, 28(2000)353-362)。ホモジェネートは、100mgの脳組織当たり10 μ gのプロテイナーゼKにより37 $^{\circ}$ Cで1時間処理される前に、直径0.4mmの針を通して押し込められる。サルコシル(10%)及び10mMのトリス緩衝液(pH7.4)を添加した後、試料は、周囲温度で15分間インキュベートされ、次に10%のショ糖クッションに対し4時間20 $^{\circ}$ Cで245000gで遠心分離される(Beckman TL 100 ultracentrifuge use)。最終的に残渣は、50 μ lのLaemmliの変性緩衝液中で溶液懸濁状態に戻し、5分間100 $^{\circ}$ Cで加熱し、かつ更に5分間12000gで遠心分離する。SDS PAGEに対する遊走のために、上清を回収する。

【0039】

本発明の技術によれば、基準技術に記載された脳の破碎後に得られた100 μ lの脳懸濁液を使用する。1 μ gのプロテイナーゼKを添加し、かつ1時間、最初にインキュベートする。次に20 μ lのストレプトマイシンを添加し、かつ1時間、2回目にインキュベートする。次に100 μ lのLaemmliの変性緩衝液を添加する。5分間100 $^{\circ}$ Cでの加熱後、2分間12000gで遠心分離する。上清を除去し、次に50 μ lの50%v/vの尿素8M、及びLaemmliの変性緩衝液を添加する。強い渦状の攪拌後、5分間100 $^{\circ}$ Cで加熱され、かつ更に2分間12000gで遠心分離する。SDS PAGEに対する遊走のために、上清を回収する。

【0040】

10

20

30

40

50

表1にある結果：結論として、硫酸ストレプトマイシンの使用は、僅かに陽性の場合のより良い検出を可能にし、かつその上、時間が掛かり、かつ高価な超遠心分離を回避することを可能にする。

【実施例6】

【0041】

recPrP（組み換えプリオン蛋白）の試料は、recPrP溶液（42 μM）を当量の水又はストレプトマイシン溶液（1 g/ml）で希釈して調製する。ストレプトマイシンのみに関する基準は、0.5 g/mlの溶液を使用して調製する。

【0042】

試料は、新たに分割された雲母に対する10 μlのこれらの溶液の沈殿及び24時間37 °Cでの乾燥によって調製される。

10

【0043】

非接触モードで、三脚スキャナ100 μmを備えた、1 Hzの走査周波数のシリコンプローブを有する、高い共振周波数（ $F_0 = 320 \text{ kHz}$ ）のピラミッド型カンチレバを使用するThermomicroscope Explorer AFMを用いた映像技術による解析を行う。映像処理は、ソフトウェアSPMLab 5.1によって行い、かつフィルタをかけずに示す。

【0044】

図6から、recPrPの映像のみが、特徴を示す円形凝集体の構造を示しているということになる。ストレプトマイシンフィルムのみが、擬似結晶質表面組織を示している。混合物を含むフィルムは、非晶質表面を示す。いかなる結晶質又は球形組織も確認されない。従ってストレプトマイシン及びPrPの間の相互作用は、混合物の2つの成分の表面組織の特性を阻害する。

20

【実施例7】

【0045】

好ましくは非溶血、かつ細胞片のない頭脊液（LCR）の死後採取試料を、MJCに罹患していない患者、及びMCJに罹患した患者において採取する。MJCに罹患していない患者のLCR試料、及びMCJに罹患した患者のLCR試料は、0.05 g/mL ~ 0.2 g/mL（0.05 - 0.1 ~ 0.2 g/mL）の広範囲な濃度により、ストレプトマイシン溶液と接触させる。渦での均質化後、試料を、1時間37 °Cでインキュベートし、次に5分間12000 gで遠心分離する。

30

【0046】

得られた残渣は、蛋白抽出緩衝液に取る。10分間100 °Cでの加熱後、試料は、再び5分間12000 gで遠心分離する。15 μLの各上清が、12%のビス-トリスアクリルアミドSDS PAGEゲルに対して沈殿する。並行して、変性緩衝液中で1/100に希釈した5 μLの脳PrP^{Sc}抽出物が、陽性対照で沈殿した。この抽出物は、クロイツフェルト・ヤコブ病の診断に使用する基準手順により調製した。電気泳動遊走は、一旦濃縮した遊走緩衝液中で40分間定電圧（200 V）で行われる。次に蛋白を、1時間定電力（1 W）で2つの黒鉛電極間の半乾燥系によって活性化したPVDF膜に転移する。次に直接的免疫学的表示は、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した0.5 μg/mlの（ヒトPrPのアミノ酸145 - 154によって定義される領域、及び動物PrPの相同的領域を認識する）抗プリオン抗体AC23によって確実に示される。

40

【0047】

図7Aは、ストレプトマイシンが、プロテイナーゼKによる消化の非存在下でプリオン蛋白に良好に結合されることを示す。実際、0.1 g/mL及び0.2 g/mLのストレプトマイシンによる処理後、唯一のバンドが観察され、かつその見かけ分子量は、ストレプトマイシン濃度に比例して変化する。このバンドの見かけの大きさは、0.1 g/mLのストレプトマイシンに関して約50 kDaであり、かつ0.2 g/mLのストレプトマイシンに関しておおよそ80 kDaである。その上、バンドのプロフィール（湾曲した外観、尾引き（trainage））は、分子凝集であることを示唆している。

50

【実施例 8】

【0048】

MJCに罹患していない患者のLCR、及びMCJに罹患した患者のLCRは、0.5 µg/mL又は1 µg/mLで使用するプロテイナーゼKによって消化される。並行して、各試料のアリコートは、プロテイナーゼKによる消化を受けない。消化は、緩やかに攪拌して、37 °Cで1時間行われる。消化後、試料は、最終濃度50 mg/mLのストレプトマイシンの存在下で、1時間37 °Cでインキュベートし、次に5分間12000 gで遠心分離を行う。

【0049】

次に蛋白が抽出され、かつ蛋白変性緩衝液の存在下で、加熱によって変性され、次にそれらは、実施例7の手順に従い、ウェスタンブロットで解析される。直接的免疫学的表示は、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した(0.5 µg/mLで使用する)抗体AC23を用いて行われる。

【0050】

図8Aは、試料が、ストレプトマイシンによって処理される時、低い強度の唯一のバンドが、観察されることを示す。約35 kDaの見かけ分子量のこのバンドは、専らプロテイナーゼKによる消化の非存在下で(LCR(-)ゲルのトラック5)、陰性試料として見られ、他方で、使用するプロテイナーゼK濃度がどのようなものであろうと(LCR(+))ゲルのトラック5、6及び7)、陽性試料として見られ、プリオン蛋白の耐性形状の特徴を示す。

【0051】

LCR中でのプリオン蛋白検出は、ストレプトマイシンの使用によって可能になる。実際、プロテイナーゼKによる消化の非存在下で、(細胞及び病理学的)全PrP^{Sc}検出は、ストレプトマイシンの存在下で増大し、かつ予期せぬことに、PrP^{Sc}が、好ましくは検出される。プロテイナーゼKによる消化後、この技術により、クロイツフェルト・ヤコブ病に罹患していない患者由来のLCR、及びこの同じ疾病に罹患した患者由来のLCRの間で著しく異なる信号を明らかにすることが可能になる。従って、ストレプトマイシンは、生物学的流体中のPrP^{Sc}検出に関して、有用性を示す。

【0052】

その上、ストレプトマイシンのようなアミノグリコシドは、アミノグリコシドとの接触後にPrP^{Sc}が沈降するために、PrP^{Sc}の除去に使用され得る。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1A】振戦病に罹患し、かつ次第に多くなる量のストレプトマイシンと接触した、ヒツジの脳の試料におけるPrP^{Sc}の、15%のポリアクリルアミドゲルに対する電気泳動、転移及び免疫検出後の検出の比較例である。

【図1B】漸増量のストレプトマイシンとの混合前及び後の、図1BのPrP^{Sc}の各バンドの測定された平均分子量の比較グラフである。

【図2】可変量のストレプトマイシンの非存在下及び存在下での、PrP^{Sc}蛋白が非常に豊富な懸濁液の2時間目のインキュベーションの結果得られた、それぞれ上清及び沈降物におけるPrP^{Sc}の、15%のポリアクリルアミドゲルに対する電気泳動、転移及び免疫検出後の検出の比較例である。

【図3】少量のPrP^{Sc}を含む懸濁液への、プロテイナーゼK及びストレプトマイシンの同時添加が、結果として上清からのPrP^{Sc}消失及び沈降物中のその出現をもたらすことを示す。

【図4A】15%のポリアクリルアミドゲルに対する電気泳動、転移及び免疫抑制後の、漸増量のストレプトマイシン添加の際のPrP^{Sc}の検出閾値の増加を示す。

【図4B】15%のポリアクリルアミドゲルに対する電気泳動、転移及び免疫抑制後の、漸増量のストレプトマイシン添加の際のPrP^{Sc}の検出閾値の増加を示す。

【図4C】15%のポリアクリルアミドゲルに対する電気泳動、転移及び免疫抑制後の、

10

20

30

40

50

漸増量のストレプトマイシン添加の際のPrP^{Sc}の検出閾値の増加を示す。

【図5】表は、実施例5を参照し、かつ本発明による技術によって得られた97例の動物の脳に対するPrP^{Sc}診断結果の、基準技術によって得られたそれとの比較を示す。

【図6】組み換えプリオン蛋白(recPrP)のみ(A)、ストレプトマイシン存在下のrecPrP(B)及びストレプトマイシンのみ(C)の乾燥フィルムに関する非接触モードでの走査型プローブ顕微鏡(SPM)の映像を示す。

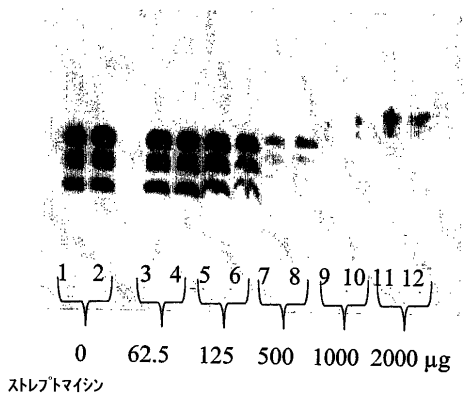
【図7A】広範囲のストレプトマイシンによって治療した、クロイツフェルト・ヤコブ病に罹患した患者(MCJ+)及びMCJに罹患していない患者(MJC-)の頭脊柱液(LCR)の試料におけるプリオン蛋白の、12%のビス-トリスアクリルアミドゲルに対する電気泳動、転移及び免疫検出後の検出の比較例である。

【図7B】図7Aのトラックにおいて行われた沈殿を要約する。

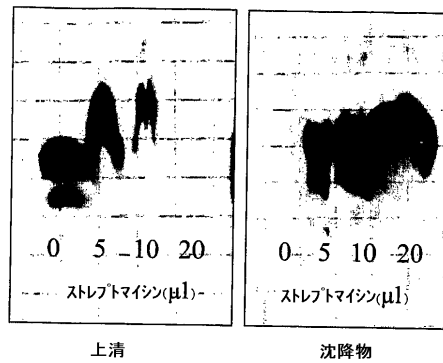
【図8A】広範囲の濃度に応じたプロテイナーゼKによって消化された又は消化されない、かつストレプトマイシンによって治療された又は治療されないMJCでのLCR(+)及びLCR(-)の試料の、ウェスタンブロットの結果を示す。免疫学的表示は、抗プリオン抗体によって確実にされる。

【図8B】図8Aのトラックにおいて行われた沈殿を要約する。

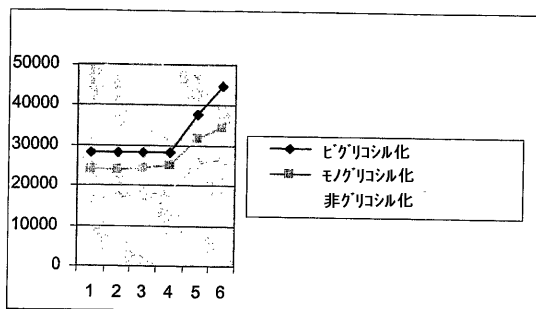
【図1A】



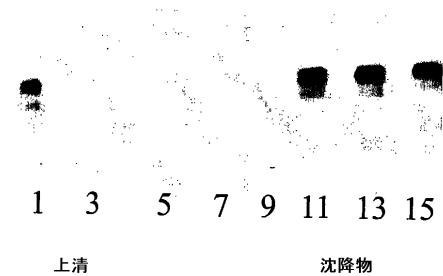
【図2】



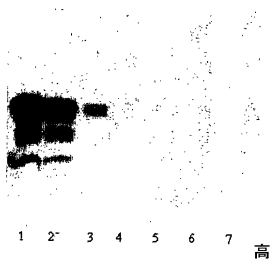
【図1B】



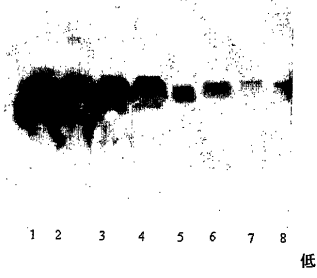
【図3】



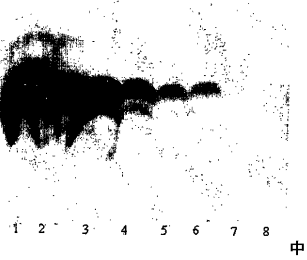
【図4A】



【図4C】



【図4B】

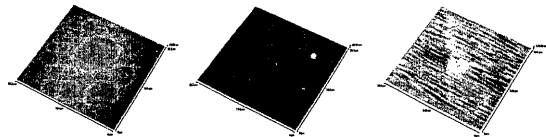


【図5】

動物	結果	ストレプトマイシン	標準的方法	ELISA又はIHCによる確認	完全に確認
ウシ	陽性	42	40	2 IHC*	42 例陽性
ウシ	陰性	14	14	0	14 例陰性
ウシ					56
ヒツジ	陽性	38	32	6 ELISA	38 例陽性
ヒツジ	陰性	3	3	0	3 例陰性
ヒツジ					41

IHC*: 免疫組織化学技術

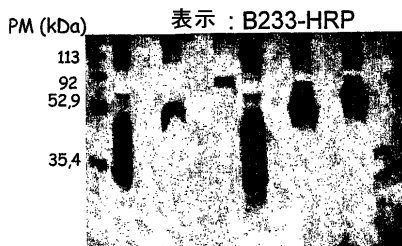
【図6】



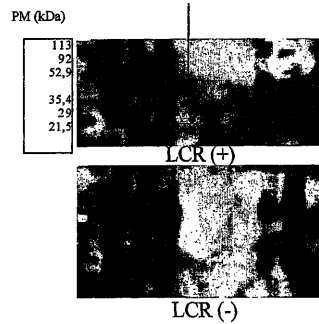
【図7B】

トラック	洗殿
1	分子量
2	LCR (-) + S (50 mg/mL)
4	LCR (-) + S (100 mg/mL)
6	LCR (-) + S (200 mg/mL)
7	LCR (+) + S (50 mg/mL)
9	LCR (+) + S (100 mg/mL)
11	LCR (+) + S (200 mg/mL)
12	陽性脳対照

【図7A】



【図8A】



【 図 8 B 】

トラック	沈殿	ストレプトマイシン
1	PM	
2	LCR ND	無
3	0.5 µg/mg で LCR D/pK	
4	1µg/mg で LCR D/pK	
5	LCR ND	
6	0.5 µg/mg で LCR D/pK	有
7	1µg/mg で LCR D/pK	
8	残渣 WB ND	
9	残渣 WB D/pK 0,5 µg/mg	

フロントページの続き

(73)特許権者 500525531

センター ナショナル デ ラ レシェルルシェ サイエントフィック - シーエヌアールエス
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- CNRS

フランス国、パリ セダー 16 エフ - 75794、ルー ミッシェル アンジュ 3
3, rue Michel Ange F - 75794 Paris Cedex 16 France

(73)特許権者 505226655

ユニベルシテ クロウドゥ ベルナルド リヨン

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON

フランス、セダー ヴィルボン エフ - 69622、ブールバード ドゥ 11 ノーヴェンブル
1918、43

43, boulevard du 11 Novembre 1918, F - 69622 Villeurbanne Cedex France

(73)特許権者 505226666

バイオメリユウ

BIOMERIEUX

フランス、マルシィ - レトワール エフ - 69280、シェマン ドゥ ローム

Chemin de l'Orme, F - 69280 Marcy-l'Etoile France

(74)代理人 100092897

弁理士 大西 正悟

(74)代理人 100115200

弁理士 山口 修之

(72)発明者 ムーザ アリイ

フランス、ウーリン エフ - 69600、シェミン ドゥ グラン ルボイユ、52

(72)発明者 コルマン アンソニィ ウィリアム

フランス、カリユイル - エ - キュイル エフ - 69300、リュ ドゥ マルニョル、55

(72)発明者 ベンクシク - レイニエール アンナ

フランス、チャーリー エフ - 69390、ラ プラトー

(72)発明者 シャガールディオン パトリック

フランス、リヨン エフ - 69003、リュ アンドレ フィリップ、223

(72)発明者 ペロン エルベ

フランス、セント - ジェニィ - レ - オリール エフ - 69290、アレ ドゥ ラ ギゴニール、
4

(72)発明者 マーティン アンブロワズ

フランス、チャーリー エフ - 69390、ルート ドゥ バ プリバ、605シー

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特表2003 - 514916 (JP, A)

特表2002 - 539081 (JP, A)

特表2002 - 501385 (JP, A)

特開昭64 - 086871 (JP, A)

TAGLIAVINI F. et al., Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrPsc in vitro, J. Mol. Biol., 2000年, Vol.300, P.1309-1322

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98
JSTPlus(JDreamII)
CAPlus(STN)

专利名称(译)	PRP检测方法采用氨基糖苷类抗生素		
公开(公告)号	JP4471844B2	公开(公告)日	2010-06-02
申请号	JP2004563298	申请日	2003-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心 生物Meryuu 生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	Ajensu法国文化安全Sanitairu去Arimento - Afuza - 中心国家德拉Resherurushe科学 - CNR居 Yuniberushite Kuroudu贝尔纳里昂 生物Meryuu		
当前申请(专利权)人(译)	Ajensu法国文化安全Sanitairu去Arimento - Afuza - 中心国家德拉Resherurushe科学 - CNR居 Yuniberushite Kuroudu贝尔纳里昂 生物Meryuu		
[标]发明人	ムーザアライ コルマンアンソニウイリアム ベンクシクレイニエールアンナ シャガールディオンパトリック ペロンエルベ マーティンアンブロワズ		
发明人	ムーザアライ コルマンアンソニウイリアム ベンクシクレイニエールアンナ シャガールディオンパトリック ペロンエルベ マーティンアンブロワズ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2828 Y10T436/104998		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
代理人(译)	大西省吾 山口修之		
优先权	2002016382 2002-12-20 FR		
其他公开文献	JP2006510913A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

检测或诊断病理性朊病毒蛋白 (PrPsc) 包括用抗生素 (I), 优选氨基糖苷 (Ia) 处理源自或获自人或动物的组织或流体样品, 是新的。还包括以下独立权利要求: (1) 使用 (Ia) 从组织或液体中消除PrPsc; (2) 用于诊断含有 (Ia) 的PrPsc相关疾病的试剂盒。

【 図 1 B 】

