

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4667453号
(P4667453)

(45) 発行日 平成23年4月13日(2011.4.13)

(24) 登録日 平成23年1月21日(2011.1.21)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/577 (2006.01) GO 1 N 33/577 B

請求項の数 3 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2007-512119 (P2007-512119)	(73) 特許権者	502302721
(86) (22) 出願日	平成17年5月13日 (2005.5.13)		ブリオニクス アーゲー
(65) 公表番号	特表2007-537431 (P2007-537431A)		スイス国, ツェーハー—8952 シュリ
(43) 公表日	平成19年12月20日 (2007.12.20)		ーレン, バーギシュトラーセ 27アー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/005279	(74) 代理人	100099139
(87) 国際公開番号	W02005/114214		弁理士 光来出 良彦
(87) 国際公開日	平成17年12月1日 (2005.12.1)	(72) 発明者	ピュロ・マリオ
審査請求日	平成20年1月7日 (2008.1.7)		スイス国, ツェーハー—8004 チュー
(31) 優先権主張番号	04011470.4	(72) 発明者	ツバルト・ダニエル
(32) 優先日	平成16年5月14日 (2004.5.14)		スイス国, ツェーハー—5430 ベッチ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ンゲン, レーベルグシュトラーセ 55ベ
			ー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾病関連プリオンの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトを含む哺乳動物からの血漿試料中のプリオン蛋白質の T S E - 関連アイソフォーム (Pr P^D) の検出方法であって、ここに、該 Pr P^D はプロテアーゼ感受性アイソフォームとしてまたはプロテアーゼ抵抗性のアイソフォームとして何れかで存在しているものであり、該検出方法は、

a . Pr P^C の非特異結合を防止するために 0 . 0 5 - 1 % 濃度の界面活性剤で血漿試料を処理すること、

b . マイクロタイタープレートのウエルあるいはビーズに被覆した捕獲抗体であって、且つ Pr P^D 上の立体配置的エピトープを認識することができる捕獲抗体と、血漿試料を接触させること、

ここに於いて、該エピトープはプロテアーゼ感受性 T S E - 関連アイソフォームの Pr P^D に特異的であるか、又は、該エピトープはプロテアーゼ感受性とプロテアーゼ抵抗性の両方の T S E - 関連アイソフォームの Pr P^D に特異的であり、且つ、該捕獲抗体は、D S M A C C 2 2 9 8 のもとに寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体 1 5 B 3 であり、

c . 洗浄による汚染性タンパク質を除去すること、及び

d . 可能な Pr P^D ・ 捕捉抗体複合体を検出すること、
 を包含する検出方法。

【請求項 2】

該血漿が Pr P^D をプロテアーゼ感受性アイソフォームとしてのみ含有している請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該抗体 / Pr P^D 複合体を免疫検定法によって直接または間接的に検出する請求項 1 または 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物およびヒトにおけるプリオン病の検出方法に関する。

【背景技術】

10

【0002】

伝染性海綿状脳症 (TSE) またはプリオン病は、動物およびヒトにおける致命的な神経変性疾患である。臨床的疾患の発症に先立って、数か月ないし数十年間の長い潜伏期間が先行する。TSE の臨床症状には、痴呆および運動協調喪失を含む。1980 年代に、TSE の共通した顕著な特徴が、罹患動物およびヒトにおける宿主によってコードされているプリオン蛋白質 (Pr P^C) の異常なプロテアーゼ抵抗性アイソフォーム (Pr P^{Res} または Pr P^{Sc}) の蓄積であることが見出された。Pr P^{Sc} の発見は、すべてのプリオン病に特異的であるとともに、プリオンと呼ばれる感染粒子の主要な、おそらくは唯一の構成成分であることが示された分子マーカーをもたらした。

【0003】

20

Pr P²⁷⁻³⁰ と呼ばれる Pr P^{Sc} のプロテアーゼ抵抗性の核は、シリアンハムスターの脳からの見掛け分子量 27 - 30 kDa のプロテイナーゼ K 処理画分のスクレーピー感染力を解析することによって発見された。Pr P - 27 - 30 の N 末端配列決定は、宿主によってコードされている Pr P 遺伝子のクローニングおよび無感染動物におけるプリオン蛋白質 (Pr P^C) のプロテアーゼ感受性アイソフォームの同定へと導いた。TSE において重要な病因となる事象は、宿主によりコードされているプリオン蛋白質 (Pr P^C) のコンフォメーション (立体配座) が (実験的にスクレーピーに感染させたげっ歯類において最初に同定された後で) Pr P^{Sc} と呼ばれる病原性アイソフォームへと変化することである。このコンフォメーションの変化は、Pr P^C のヘリックスが Pr P^{Sc} のシートへとたたみ直されることを含む。このたたみ直された蛋白質 Pr P^{Sc} は、その三次構造が Pr P^C と異なるのみであり、従って、N 結合型糖付加および GPI アンカーのような翻訳後修飾と同様に同じアミノ酸配列を有する。Pr P^{Sc} は凝集して、アミロイドフィブリルを形成し、神経組織中に、また相対的に軽度ではあるがリンパ細網組織中に、蓄積する。

30

【0004】

感染宿主においては、Pr P^{Sc} の濃度は、プリオンタイター (力価) に正比例する。げっ歯類に TSE 惹起因子を実験的に接種したのち、疾患発現より何週間か前に、Pr P^{Sc} が中枢神経系中に検出されるのが普通であり、その濃度は上昇していき、動物が死亡する数か月前に極大に達する。症候期の間は、感染性および Pr P^{Sc} はともにリンパ細網組織において容易に検出される。最近、Pr P^{Sc} は、スクレーピーに経口感染させたハムスターの筋組織において、また実験的に感染させた遺伝子導入マウスにおいて、蓄積することも見出されている。

40

【0005】

すべてのプリオン病、ヒツジおよびヤギのスクレーピーの原型は、2 世紀以上も前から知られているが、ウシ海綿状脳症 (BSE) と呼ばれる新しい形の動物プリオン病が、1986 年に英国で初めて認知されて以来、人畜共通感染症に発展するに至っている。BSE 感染ウシがどの程度までヒトの食物連鎖に入っているかは、依然として論議的であり、多くの研究の主題となっている。ロンドンのインペリアルカレッジによって発表された最近の研究 (Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Ghani, A. C. および Anderson, R. M., Statistical Methods

50

in Medical Research 12, 177 - 190 (2003))は、新しい疫学データに基づけば、160万頭のBSE感染ウシが既に英国の消費者の血に達していたかもしれないことを示唆している。

【0006】

ヒトのプリオン病には、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)およびクールーが包含される。これらの疾患は、プリオン病一般の3つの症状発現、すなわち疾患の散発性形態(すべてのCJD症例の80-90%)、ヒトPrP遺伝子の変異に関連した遺伝性形態(家族性GSS、家族性CJDおよびFFI)およびプリオン汚染組織由来の製品の移植、注入または摂取によって獲得される感染性形態(医原性CJD、vCJDおよびクールー)を例証するものである。1996年の英国での新しい形のクロイツフェルト・ヤコブ病の出現とともに、食品媒介性病原体によって惹起されるヒトの疾患に対する戦いの新規な一コマが始まった。今日まで、146例の変異型CJD(vCJD)が英国で報告されており、説得力のある科学的証拠が、BSEとvCJDとの間の因果関係を示している。これらの患者では明瞭な危険因子は確認されないが、BSE汚染食品の曝露との因果関係がおそらくあるのであろうと思われる。患者らが臨床症状を示す前にvCJDを検出することが、緊急に優先すべきことである。それによって、供給血液および病院用機器の汚染のリスクを劇的に減少させようであろう。最近、英国で1患者が、供血から3.5年後にvCJDの症状を発現したドナーから輸血を受けて6.5年後にvCJDを発症した(Llewelynら、The Lancet 363, 417 - 421 (2004))。この例は、vCJDが輸血によって伝染する可能性を示したものであり、血液およびその画分中のプリオンを検出する診断試験の必要性を強調している。本発明では、TSE感染哺乳動物血漿中の疾患関連形態のPrPを検出する方法を開示する。

【0007】

PrP^{Sc}がプリオン病の唯一の信頼できる分子マーカーであるから、PrP^{Sc}のプロテアーゼ抵抗性部分を脳組織内で免疫学的に検出することが、BSEおよびスクレーピーの積極的な監視に現在用いられている迅速診断試験の基礎となっている。当該疾患の症状発現前段階でのPrP^{Sc}の蓄積の速度が遅いため、現行の診断能力は、潜伏期の初期に当該疾患を検出することに関しては、きわめて限られている。ここに開示する本発明は、症状発現前段階でプリオン病を検出する方法を提供する。

【0008】

PrP^{Sc}は、もともと、PrPの部分的にプロテアーゼ抵抗性で、界面活性剤に不溶性のアイソフォームであると定義されたのであるが、古典的プロテアーゼ抵抗性を欠如した異常PrPと関連したいくつかのプリオン病が確認されている。これらのプリオン病と関連したPrPの形態は「プロテアーゼ感受性」PrP^{Sc}と名づけられて、プロテアーゼ抵抗性形態のPrP^{Sc}と区別されている。

【0009】

動物またはヒトの組織中のプリオン蛋白質の疾患関連コンフォメーションを検出することは、プリオン病を診断することになると考えられる。疾患関連PrPをその細胞内前駆物質PrP^Cから区別するためには、PrP^Cを完全に分解するプロテアーゼ処理であって、PrP^{Sc}のプロテアーゼ感受性のN末端部を除去するだけのためのプロテアーゼ処理が必要であるか、或いは、PrP^CとPrP^{Sc}とを区別できる抗体が使用され得る。ネイティブなPrP^{Sc}とのみ反応するがPrP^Cとは反応しないことが示されている抗体の1つが、我々の特許出願WO98/37210およびKorthら(Nature 390: 74 - 77 (1997))、表題「プリオンの免疫学的検出」の中で開示されており、後者を引用によりここに挿入し、かかる抗体を開示、記述する。

【0010】

プリオン病の診断のために現在用いられている試験法のほとんどは、臨床症状を呈するかまたは当該疾患に罹患していることが疑われる動物またはヒトから死後に得られる中枢神経系組織について行なわれる。それらの試験法は、プロテアーゼ感受性形態のプリオン

10

20

30

40

50

蛋白質を加水分解するための前処理とそれに続いての免疫学的検定によるプロテアーゼ抵抗性形態のプリオン蛋白質の検出を用いることに頼っている。しかし、かかる検定法は、プロテアーゼ感受性形態のPrP^{Sc}を検出しない。たとえば、特許出願WO00/52197は、TSE感染動物の血清中のPrP^{Sc}を検出する方法を請求している。この方法の主たる欠点は、プロテアーゼ感受性PrPを加水分解するためのプロテアーゼによる前処理を用いていることである。

【0011】

TSEに関連するプロテアーゼ抵抗性およびプロテアーゼ感受性形態のPrPを検出する簡易かつ強固な方法および生きている哺乳動物における当該疾患の検出を可能にする診断キットを提供することは、緊急に必要なことである。

10

【特許文献1】WO98/37210

【特許文献2】WO00/52197

【特許文献3】WO98/37210

【非特許文献1】Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Ghani, A. C. および Anderson, R. M., *Statistical Methods in Medical Research* 12, 177 - 190 (2003)

【非特許文献2】Llewellynら、*The Lancet* 363, 417 - 421 (2004)

【非特許文献3】Korthら、*Nature* 390: 74 - 77 (1997)

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、先行技術の欠点及び障害を克服し、生きている動物およびヒトにおいてプリオン病を検出するための方法および診断キットを提供することである。

【0013】

かかる方法は、血液を疾病関連PrPの存在について検診することによって伝染性海綿状脳症の保因者を検出するという有利な効果を与えるであろうし、たとえばvCJDが輸血によって偶然に伝染することを予防することができるであろう。

【課題を解決するための手段】

【0014】

30

定義

「PrP」なる語は、異なるコンフォメーションよりもプリオン蛋白質アイソフォームの共通したアミノ酸配列を言うものとする。

【0015】

「PrP^C」なる語は、正常な哺乳動物に豊富に存在し、TSEには関連しないプリオン蛋白質アイソフォームを言うものとする。

【0016】

「PrP^D」なる語は、正常な宿主プリオン蛋白質のコンフォメーションが変化したアイソフォームとして定義される疾患(TSE)関連形態のPrPを言うものとする。PrP^Dは、プロテアーゼ抵抗性およびプロテアーゼ感受性の形態の疾患関連PrPを包含する。PrP^Dなる語は、若干の例だけを挙げれば、トリ、ウシまたはヒトのコンフォメーションの変化したPrPと同義的に使用される。

40

【0017】

「抗体」なる語は、動物の免疫処置によって、あるいはインビトロでの選択/パンニング操作によって生じるいかなる抗体をも言う。該抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよく、Fabなどのその断片あるいは一本鎖抗体をも包含する。該抗体は、キメラあるいはヒト化抗体などの遺伝子操作されたものであってもよい。

【0018】

発明の要約

本発明によれば、動物またはヒトにおいてPrP^Dを検出する方法であって、生きてい

50

る哺乳動物から容易に得られる試料、好ましくは血液または他の体液を採取し、つぎに該試料を Pr P^D のみを認識する抗体と接触させ、最後に、免疫検定法を用いて抗体 / Pr P^D 複合体の量を検出することからなる前記方法が提供される。

【0019】

本発明の方法は、TSEに関連するアイソフォーム Pr P^D がプロテアーゼ感受性アイソフォームとしてあるいはプロテアーゼ抵抗性アイソフォームとして存在しうることを考慮に入れている。これに関連して、当該試料を、TSE関連アイソフォーム Pr P^D 上のコンフォメーション依存エピトープを認識できる特別な捕捉抗体で処理することが規定される。該エピトープは、TSE関連アイソフォーム Pr P^D に特異的であるように選ばれるが、必ずしも該プリオン蛋白質のプロテアーゼ抵抗性アイソフォームを示すものではない。上記コンフォメーション依存エピトープを認識する捕捉抗体を使用することによって、とりわけ、TSE関連 Pr P^D をプロテアーゼ感受性あるいはプロテアーゼ抵抗性アイソフォームとして含有しているかもしれない試料において、最善の結果が得られる。

10

【0020】

好ましい一実施態様では、プロテアーゼ感受性アイソフォームの形でのみ Pr P^D を含有する試料を分析するのに、該方法を用いる。かかる試料は、本発明に従った捕捉抗体を用いてはじめて処理することができる。

【0021】

本発明の好ましい一実施態様では、該 Pr P^D 検出法を、本発明の一部である操作法に従って血液試料から調製した血漿について実施する。

20

【0022】

他の好ましい一実施態様では、該血漿試料を、抗体 / Pr P^D 複合体を得るための最適結合条件を可能ならしめるべく化学薬品で処理する。

【0023】

本発明の他の好ましい一実施態様では、抗体 15B3を用いて、Pr P^D のみを検出し、正常な形態の Pr Pは検出しない。該抗体 15B3は、スイス国チューリヒのプリオニクス株式会社 (Prionics AG) から入手でき、かかる抗体の産生方法は、WO 98 / 37210に開示されている。抗体 15B3を産生できるハイブリドーマ細胞は、WO 98 / 37210に関連して、DSMZ - ドイツ微生物・細胞培養コレクション (株) に受入れ番号 DSM ACC 2298のもとに寄託されている。

30

【0024】

本発明のさらに別の好ましい一実施態様では、該抗体 / Pr P^D 複合体を、免疫検定法によって直接または間接的に検出する。

【0025】

本発明の他の好ましい一実施態様は、プリオン蛋白質のN - 末端を認識する標識抗体を用いてのサンドイッチ ELISA法を用いて該抗体 / Pr P^D 複合体を検出する方法を提供する。

【0026】

本発明の好ましい一実施態様は、ヒト血液試料を試験して、当該血液が輸血に安全であるかどうかを判定するのに、該 Pr P^D 検出法を使用することである。

40

【0027】

本発明の他の好ましい一実施態様では、生きている哺乳動物におけるTSEの診断のための診断キットが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明に従えば、TSEの診断における当該 Pr P^D 検出方法は、
1) 動物またはヒトからの血液試料の採取、
2) 血液試料からの全血、血漿、血清、赤血球 (RBC) または白血球 (WBC) の調製および分析対象物質 Pr P^D と抗体との結合のための血漿の処理、
3) 血液試料と捕捉抗体としての Pr P^D 特異性抗体とのインキュベーション、

50

- 4) 汚染性蛋白質を除去するための抗体 / PrP^D 複合体の洗浄、
 5) 高感度な免疫検定法による該抗体 / PrP^D 複合体の検出
 を包含する。

【0029】

以下に、特定の例に言及しながら、個々の段階をより詳細に記述する。開示される方法および成分は、変更できるものであって、特定の、試料、化学薬品、抗体、標識あるいは検定法に限定されるものではないことを了解されたい。とくに改めて定義しない限り、本明細書で使用する技術用語、科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるところと同じ意味を有する。

【0030】

哺乳動物から血液試料を採取し、EDTA、クエン酸ナトリウム、ヘパリンなどの抗凝固剤の入った容器に入れる。好ましい抗凝固剤はEDTAであるが、他のものを用いても、同様の結果が得られる。血球からの血漿の分離は、1000×gでの遠心分離によって行なう。他の好ましい試料は、唾液、尿、脳脊髄液などの体液である。血清を用いる場合には、血液を抗凝固剤の入っていない容器中へ取出し、血液を室温で少なくとも30分間凝固するにまかせ、つぎに、1000×gで遠心分離して、血清から血餅を分離する。

【0031】

血漿試料は、抗体へのPrP^Cの非特異的結合を防止するために、等体積の界面活性剤含有緩衝液と混合する。非特異的結合を阻止するのに適したきわめて多種の界面活性剤が存在し、当業者に知られている。好ましい界面活性剤は、ラウリルサルコシナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、スルホベタイン、トライトンX-100、NP-40、ツウィッタージェント(Zwittergent)、トウイーン20、トウイーン80である。特定の検定フォーマットにおいて特定の種のために使用するのに好ましい界面活性剤は異なりうる。好ましい濃度は、0.05~1%の間である。

【0032】

血漿試料を、抗体と接触させる。本発明の好ましい一実施態様では、疾患関連形態のPrP^Dに特異的な抗体を使用する。好ましい抗体は、PrP^Dに対して特異的であることが既に示されている抗体15B3であるが、他の抗体も同様に使用してよい。とくに好ましい一実施態様では、抗体をマイクロタイタープレートのウェルあるいはビーズの表面に被覆して、試料中のPrP^Dを捕捉する。つぎに、抗体とPrP^Dとの複合体を、PrPを認識する検出用抗体を用いての免疫検定法で検出する。検出は、任意の免疫学的方法によって達成できる。かかる検定法は当業者には周知であり、ウェスタンブロッティング(免疫ブロッティング)、固相酵素免疫検定(ELISA)、免疫PCRあるいは蛍光活性化セルソーティング(FACS)を包含しうる。直接検出は、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの酵素、蛍光性の分子または核酸と結合するプリオン蛋白質に対する抗体を用いることによって実施できる。別法として、無標識一次抗体(抗プリオン蛋白質抗体)および標識二次抗体を用いて、検出を間接的に行なうこともできる。

【実施例】

【0033】

以下の非排他的実施例および添付の図面において、本発明を説明する。

実施例1: BSE陰性および陽性ウシ由来血漿中のPrP^Dの測定。

実施例2: スクレーピー陰性および陽性ヒツジ由来血漿中のPrP^Dの測定。

実施例3: スクレーピー陰性および陽性ヒツジ由来脳ホモジネート中のPrP^Dの測定。

。

実施例4: スクレーピー陰性および陽性ヒツジ由来血清中のPrP^Dの測定。

実施例5: スクレーピー陰性および陽性ヒツジ由来白血球中のPrP^Dの測定。

【0034】

[実施例1]

図1のグラフは、第一の実験の結果を示している。そこに示されているデータは、サンドイッチ免疫検定法を用いて、BSE陽性血漿試料を陰性試料から区別できることを明示

10

20

30

40

50

している。2回ずつの測定の平均値を示したが、誤差を示すバーは高い方の値との差を示している。

【0035】

96ウエルのプレートを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.4)、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)で希釈した $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗IgM抗体により、室温で1時間かけて被覆した。0.05%のトゥイン20を含有するPBS(pH7.4)でプレートを3回洗って、未結合抗体を除去した。その後、プレートを2時間ブロックし、0.05%トゥイン20含有PBS(pH7.4)で3回洗った。PBS(pH7.4)中濃度 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のコンフォメーション特異性抗体15B3を、室温で1時間、抗IgMに結合させた。0.05%トゥイン20含有PBS(pH7.4)でプレートを3回洗ったのち、0.4%デオキシコレート(DOC)含有トリス緩衝生理食塩液(TBS)で1:1希釈したBSE陰性および陽性ウシ由来血漿 $110\mu\text{l}$ をプレートに加え、室温で1.5時間インキュベートした。未結合蛋白質を、0.2%DOC含有TBSで洗い去った。PrPのアミノ酸25-40を認識するペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体805を、PBS(pH7.4)、0.02%カゼイン、0.1%トゥイン20含有緩衝液で $10\text{ng}/\text{ml}$ に希釈し、ウエルに1時間加えた。未結合抗体を、0.05%トゥイン20含有PBS(pH7.4)で3回洗って除去した。化学発光性基質溶液 $100\mu\text{l}$ をウエルに加え、プレートルミノメーターで読取った。それらの値を相対光単位値として示す。

10

【0036】

[実施例2]

図2のグラフは、第二の実験の結果を示している。そこに示したデータは、サンドイッチ免疫検定法によって、ヒツジスクレーピー陽性血漿試料を陰性試料から区別できることを明示している。2回ずつの測定の平均値を示したが、誤差を示すバーは高い方の値との差を示している。

20

【0037】

15B3抗体によるプレートの被覆は実施例1に記載の通りに行なった。0.2%サルコシル含有TBSで1:1希釈したスクレーピー陰性および陽性ヒツジ由来の血漿 $110\mu\text{l}$ をプレートに加え、室温で1.5時間インキュベートした。0.1%サルコシル含有TBSで未結合蛋白質を洗い去った。PrPのアミノ酸25-40を認識するPOD標識モノクローナル抗体805を、PBS(pH7.4)、0.02%カゼイン、0.1%トゥイン20を含有する緩衝液で $10\text{ng}/\text{ml}$ に希釈し、ウエルに1時間加えた。未結合抗体を、0.05%トゥイン20含有PBS(pH7.4)で3回洗って除去した。化学発光性基質溶液 $100\mu\text{l}$ をウエルに加え、プレートルミノメーターで読取った。それらの値を相対光単位値として示す。

30

【0038】

[実施例3]

図3のグラフは、第三の実験の結果を示している。そこに示したデータは、FACS分析法を用いて、スクレーピー陽性脳ホモジェネートを陰性試料から区別できることを明示している。ヒストグラムが示されているが、y軸は事象回数を、x軸はFL-2検出器によって測定された相対蛍光強度を示す。

40

【0039】

0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝生理食塩液(PBS)(pH7.4)中において、 $3\mu\text{l}$ の磁性抗IgMダイナビーズ(ダイナル110.15)上に、モノクローナル15B3抗体またはアイソタイプ対照IgM抗体(ベクトン・ディッキンソン550963) 60ng を、室温で1時間、回転ホイール上で被覆した。0.1%BSA含有PBS(pH7.4)で3回ビーズを洗って、未結合抗体を除去した。それらのビーズを、0.25%サルコシル含有トリス緩衝生理食塩液(TBS) 1ml および10%スクレーピー陽性または陰性脳ホモジェネート $10\mu\text{l}$ に加え、回転ホイール上、4で一夜インキュベートした。その後、0.2%サルコシル含有TBSでビーズを3回洗っ

50

て、未結合蛋白質を除去した。その後、それらのビーズを、 $2\ \mu\text{g}$ のビオチニル化モノクローナル抗体805を含有する $200\ \mu\text{l}$ のPBS (pH 7.4)、0.1%トウイン20、0.02%カゼインに加え、回転ホイール上、室温で15分間インキュベートした。0.1%のトウイン20および0.02%のカゼインを含有するPBS (pH 7.4) $200\ \mu\text{l}$ で3回洗ったのち、PBS (pH 7.4)、0.1%トウイン20、0.02%カゼイン $200\ \mu\text{l}$ 中のストレプトアビジン・フィコエリトリン結合体(ベクトン・ディッキンソン554061) $2.5\ \mu\text{g}$ を加え、室温でさらに5分間インキュベートした。未結合の結合体を洗浄、除去したのち、ビーズを、PBS (pH 7.4)、0.1%トウイン20、0.02%カゼイン $400\ \mu\text{l}$ 中へ取上げ、FACS (蛍光活性化セルソーティング) (モフロー)によって分析した。捕捉は、FSC/SSCについては線形モードで、FL2についてはログモードで行なった。データ取得は、リストモードで行なった。FL2の基線は、試料の予備インキュベーションなしの15B3ビーズに基づいて設定した。

【0040】

[実施例4]

図4のグラフは、第四の実験の結果を示している。そこに示したデータは、FACS分析を用いて、スクレーパー陽性血清(B)を陰性試料(A)から区別できることを明示している。ドットプロットが示されているが、y軸は粒子の寸法(前方散乱)を示し、x軸は、FL2検出器により測定した相対蛍光強度を示している。

【0041】

0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝生理食塩液(PBS) (pH 7.4)中で、 $3\ \mu\text{l}$ の磁性抗IgMダイナビーズ(ダイナル110.15)上に、モノクローナル15B3抗体 $60\ \text{ng}$ を、室温で1時間、回転ホイール上で、被覆した。0.1%BSA含有PBS (pH 7.4)で3回ビーズを洗って、未結合抗体を除去した。それらのビーズを、0.2%サルコシル含有トリス緩衝生理食塩液(TBS) $500\ \mu\text{l}$ およびスクレーパー感染ないしはスクレーパー未感染動物由来の血清 $250\ \mu\text{l}$ に加え、回転ホイール上、4で一夜インキュベートした。その後、0.2%サルコシル含有TBSでビーズを3回洗って、未結合蛋白質を除去した。その後、それらのビーズを、 $2\ \mu\text{g}$ のビオチニル化モノクローナル抗体805を含有する $200\ \mu\text{l}$ のPBS (pH 7.4)、0.1%トウイン20、0.02%カゼインに加え、回転ホイール上、室温で15分間インキュベートした。0.1%のトウイン20および0.02%のカゼインを含有するPBS (pH 7.4) $200\ \mu\text{l}$ で3回洗ったのち、PBS (pH 7.4)、0.1%トウイン20、0.02%カゼイン $200\ \mu\text{l}$ 中のストレプトアビジン・フィコエリトリン結合体(ベクトン・ディッキンソン554061) $2.5\ \mu\text{g}$ をビーズに加え、室温でさらに5分間インキュベートした。未結合の結合体を洗浄、除去したのち、ビーズを、PBS (pH 7.4)、0.1%トウイン20、0.02%カゼイン $400\ \mu\text{l}$ 中へ取上げ、FACS (モフロー)によって分析した。捕捉は、FSC/SSCについては線形モードで、FL2についてはログモードで行なった。データ取得は、リストモードで行なった。FL2の基線は、試料の予備インキュベーションなしの15B3ビーズに基づいて設定した。

【0042】

[実施例5]

図5のグラフは、第五の実験の結果を示している。そこに示したデータは、FACS分析を用いて、スクレーパー陽性ヒツジから抽出した白血球(B)をスクレーパー陰性のもの(A)と区別できることを明示している。ドットプロットが示されているが、y軸は粒子の寸法(前方散乱)を示し、x軸は、FL2検出器により測定した相対蛍光強度を示している。

【0043】

0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝生理食塩液(PBS) (pH 7.4)中で、 $3\ \mu\text{l}$ の磁性抗IgMダイナビーズ(ダイナル110.15)上に、モノク

10

20

30

40

50

ローナル15B3抗体60ngを、室温で1時間、回転ホイール上で、被覆した。0.1%BSA含有PBS(pH7.4)で3回ビーズを洗って、未結合抗体を除去した。それらのビーズを、0.2%サルコシル含有トリス緩衝生理食塩液(TBS)500 μ lおよびスクレール感染ないしはスクレール未感染動物由来の白血球200万個に加え、回転ホイール上、4で一夜インキュベートした。その後、0.2%サルコシル含有TBSでビーズを3回洗って、未結合蛋白質を除去した。その後、それらのビーズを、2 μ gのビオチニル化モノクローナル抗体805を含有する200 μ lのPBS(pH7.4)、0.1%トゥイン20、0.02%カゼインに加え、回転ホイール上、室温で15分間インキュベートした。0.1%のトゥイン20および0.02%のカゼインを含有するPBS(pH7.4)200 μ lで3回洗ったのち、PBS(pH7.4)、0.1%トゥイン20、0.02%カゼイン200 μ l中のストレプトアビジン・フィコエリトリン結合体(ベクトン・ディッキンソン554061)2.5 μ gを加え、室温でさらに5分間インキュベートした。未結合の結合体を洗浄、除去したのち、ビーズを、PBS(pH7.4)、0.1%トゥイン20、0.02%カゼイン400 μ l中へ取上げ、FACS(モフロー)によって分析した。捕捉は、FSC/SSCについては線形モードで、FL2についてはログモードで行なった。データ取得は、リストモードで行なった。FL2の基線は、試料の予備インキュベーションなしの15B3ビーズに基づいて設定した。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1は、実施例1の結果を示すグラフである。この実施例では、捕捉抗体として15B3を、検出抗体としてPrPのN末端を認識する抗体を用い、BSE感染ウシ(Pos1-Pos2)対正常ウシ(Neg1-Neg23)由来の血漿試料について、サンドイッチ免疫検定法を実施した。

【図2】図2は、実施例2の結果を示すグラフである。この実施例では、捕捉抗体として15B3を、検出抗体としてPrPのN末端を認識する抗体を用い、スクレール感染ヒツジ(Pos1-Pos6)対正常ヒツジ(Neg1-Neg16)由来の血漿試料について、サンドイッチ免疫検定法を実施した。

【図3】図3は、実施例3の結果を示すグラフである。そこに示したデータは、FACS分析法を用いて、スクレール陽性脳ホモジェネート(B)をスクレール陰性脳ホモジェネート(A)から識別できることを明示している。灰色の曲線は、抗体15B3で被覆したビーズを用いて受けた蛍光シグナルを示している。黒い線は、アイソタイプ対照ビーズを用いて得られた蛍光シグナルを示している。

【図4】図4は、実施例4の結果を示すグラフである。そこに示したデータは、FACS分析法を用いて、スクレール感染ヒツジ由来の血清(B)をスクレール未感染ヒツジ由来の血清(A)から識別できることを明示している。陰性試料(A)において5%に設定した右上象限を、陽性試料(B)において採用したが、5%から32%への移動を明瞭に示している。

【図5】図5は、実施例5の結果を示すグラフである。そこに示したデータは、FACS分析法を用いて、スクレール感染ヒツジ由来の白血球(B)をスクレール未感染ヒツジ由来の白血球(A)から識別できることを明示している。陰性試料(A)において5%に設定した右上象限を、陽性試料(B)において採用したが、5%から36.9%への移動を明瞭に示している。

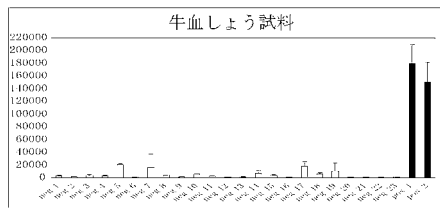
10

20

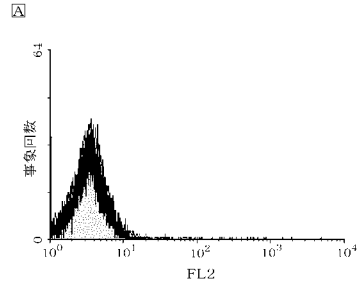
30

40

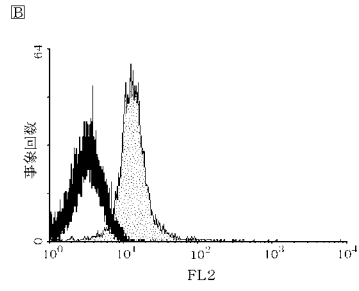
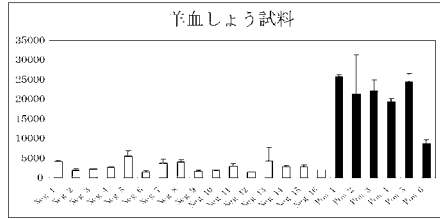
【図1】



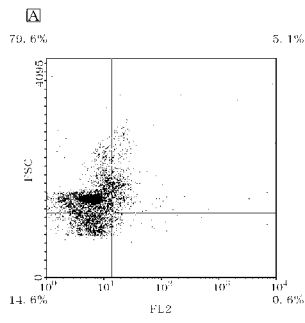
【図3】



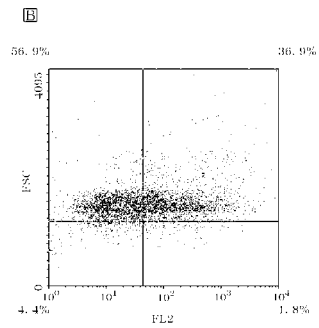
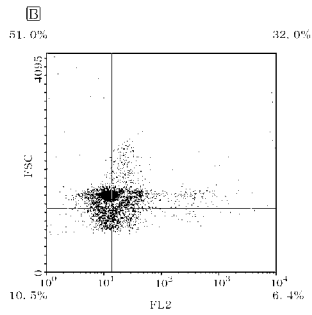
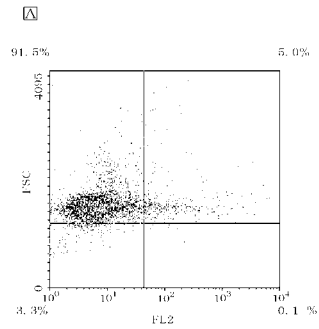
【図2】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

- (72)発明者 シュミット・ヤクリン
スイス国, ツェーハー - 8 1 4 3 ゼレンビュレン, レバヒャ 2
- (72)発明者 ビフィゲル・カーリン
スイス国, ツェーハー - 5 4 1 6 キルヒドルフ, ヒルシェンガッセ 1 7
- (72)発明者 クーン・フランツィスカ
スイス国, ツェーハー - 8 0 5 7 チューリヒ, アレンムースシュトラッセ 8 1
- (72)発明者 オエシュ・ブルノ
スイス国, ツェーハー - 5 2 3 3 シュチリ, ハルデンシュトラッセ 1 3
- (72)発明者 レーバー・アレックス
スイス国, ツェーハー - 8 0 4 6 チューリヒ, グラウプテンシュトラッセ 8 9

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特表2003-534000(JP, A)
特表2005-504320(JP, A)
特表2004-529314(JP, A)
特開2003-321498(JP, A)
特開2003-206300(JP, A)
特表2001-508866(JP, A)
特表2002-530649(JP, A)
特表2005-537463(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

专利名称(译)	检测疾病相关朊病毒的方法		
公开(公告)号	JP4667453B2	公开(公告)日	2011-04-13
申请号	JP2007512119	申请日	2005-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	普利奥尼克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	Prionics公司		
当前申请(专利权)人(译)	Prionics公司		
[标]发明人	ピュロマリオ ツバルトダニエル シュミットヤクリン ビフィゲルカーリン クーンフランツィスカ オエシュブルノ レーバーアレックス		
发明人	ピュロ・マリオ ツバルト・ダニエル シュミット・ヤクリン ビフィゲル・カーリン クーン・フランツィスカ オエシュ・ブルノ レーバー・アレックス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/577.B		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	2004011470 2004-05-14 EP		
其他公开文献	JP2007537431A JP2007537431A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于检测与associated病毒蛋白相关的疾病构象的方法，所述蛋白是可传播的海绵状脑病（TSE）的指示，包括临床前检测感染的活体动物和人类，以及验尸检测方法。在本发明的一方面，在非变性条件下，使测试对象的组织或体液样品与仅结合the病毒蛋白的疾病相关构象的抗体接触。

牛血しょう試料

