

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 286295

(P2001 - 286295A)

(43)公開日 平成13年10月16日(2001.10.16)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08			C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 16/12			C 0 7 K 16/12	
G 0 1 N 33/531			G 0 1 N 33/531	A
	33/569		33/569	F
	33/577		33/577	B
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 13数) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願2001 - 24749(P2001 - 24749)

(22)出願日 平成13年1月31日(2001.1.31)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 62685(P2000 - 62685)

(32)優先日 平成12年1月31日(2000.1.31)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000000033

旭化成株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 ラーマン・モンズール

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成株式会社
社内

(72)発明者 江藤 高志

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成株式会社
社内

(74)代理人 100090941

弁理士 藤野 清也 (外 2 名)

(54)【発明の名称】 クラミジア・トラコマチス検出用抗体

(57)【要約】

【課題】 クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物を特異的、かつ高感度に迅速に検出する方法、その検出に用いる検出用抗体、検出用試薬キット、及び検出に用いる検出用抗体の製造方法を提供する。

【解決手段】 クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であって、該微生物を特異的に反応する抗体。該抗体を用いるクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物の検出方法、検出用試薬キット。該抗体の製造方法。リボソーム蛋白質としては、Ribosomal Protein L7/L12蛋白質があり、STD の原因微生物の感染検出に用いられる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であって、該微生物に特異的に反応する抗体。

【請求項2】 クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物のリボソーム蛋白質がRibosomal Protein L7/L12である、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 抗体がモノクローナルまたはポリクローナルである、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】 抗体が酵素と結合した抗体である、請求項1～3のいずれかに記載の抗体。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とするクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物の検出方法。

【請求項6】 a) 検体を溶解液と接触せしめて微生物からリボソーム蛋白質を抽出すること、b) 抽出した検体を、捕捉抗体、すなわち請求項1～4のいずれかに記載の抗体が固体表面上に固定された抗体、と接触せしめることによりリボソーム蛋白質と捕捉抗体との間に抗原抗体複合体を形成せしめること、およびc) 検出用抗体、すなわち請求項1～4のいずれかに記載の抗体、を用いて抗原抗体複合体を検出することからなる、検体中のクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物の検出方法。

【請求項7】 検出用抗体が酵素と結合した抗体であり、抗原抗体複合体が該酵素の特異的基質によって検出されるものであることを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】 請求項1～4のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とするクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物の検出用試薬キット。

【請求項9】 遺伝子操作手法によりあるいは微生物からの単離精製により得られたクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物のRibosomal Protein L7/L12 蛋白質、その部分ペプチド、またはその部分ペプチドに相当する合成ペプチドを免疫源とすることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、最も一般的な性行為感染症 (sexually transmitted disease STD)の原因微生物であるクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物を検出する抗体、該微生物の検出方法、該微生物の検出用試薬キット、及び該微生物検出用抗体の製造方法に関する。本発明は、医療上、特にクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)によって惹起される典型的な STDの診断に重要である。本発明は、検体、例えば、膣の採取分泌物、尿サン

ル、組織サンプル、および体液から採取された検体中に含まれる微生物クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)を検出するのに有用である。

【0002】

【従来の技術】微生物感染症の診断は通常感染部位などでの原因菌の検出か、血清、体液中の原因菌に対する抗体の検出により確定される。この中でも原因菌の検出が患者への迅速な治療を可能にする意味で重要である。感染症原因菌の検出は、一般に、培養・同定法 (原因菌を分離、培養してその生理学的、生化学的あるいは構造的な特性に基づきこれを同定する方法)、遺伝子の診断法 (原因菌の遺伝子を PCR法または特異的核酸ハイブリダイゼーションにより増幅させて、これを検出する方法)、および免疫学的方法 (抗体と原因菌の抗原マーカーとの特異的反応を利用して原因菌を検出する方法)に分類される。しかしながら、培養・同定法または遺伝子の診断法を用いる場合には、結果を得るのに長時間を要する。従って、原因菌を短時間、高感度で検出することができ、迅速かつ確に患者を処置することのできる免疫学的方法による診断法が多用される。

【0003】従来免疫法による感染症原因菌の検出には、菌種によって様々なマーカー抗原と抗体の組み合わせが使われている。クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)はヒトに特有な原因菌であり、最も一般的な性行為感染症の原因菌となる。この菌は小さな、非運動型のグラム陰性菌である。この菌により男女ともに直腸炎および結膜炎 (トラコーマ - 細菌由来の病名) を発症する。女性はクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)により子宮頸管炎、尿道炎、子宮内膜炎、卵管炎、肝周囲炎、LGVに感染する。卵管炎は、女性の不妊症と子宮外妊娠の最も普通の原因の1つである骨盤炎症性疾患 (PID) を引き起すおそれがある (Much and Yeh 1991; Kligman, Grifo et al. 1997)。また、新生児にトラコーマ (封入体性結膜炎) を発症させることもある。発展途上国の盲人の40%以上はトラコーマによるものである。

【0004】この菌は、非常に微小の、偏性寄生物であり、光学顕微鏡では観察し難く、宿主細胞の細胞質中で成長する。組織培養液中でのクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の成長は非常に緩慢であり、培養液中に菌を同定するまでに少なくとも3～5日間を要する。更に、試験室での組織培養で生体外感染を起こすことは容易でない (Thomas, Evans et al. 1978; Poussin, Fuentes et al. 1997; Okadome, Notomi et al. 1999)。従って、迅速に病原菌として検出する診断法としては、グラム染色法と培養法などを適用することができない。

【0005】いくつかのクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)検出用 PCR法または分子生物学的手法が最近になって開発された (US pat. No. 6,010,857

Lee, Helen H. 2000; US pat. No. 5,846,785 Burczak et al. 1998; US pat. No. 5,837,469 Harris; James M. 1998 など)。これらの方法は特異的、かつ高感度であり、検出に時間がかかる。クラミジア (*Chlamydia*) 属の場合、属特異的抗原であるリポ多糖(LPS)の抗原決定基としての存在が知られており、様々な診断用キットにおいて特にクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の検出用試薬抗体に利用されている (Mearns, Richmond et al. 1988; Bishop, Tullo et al. 1991; Thiele, Karo et al. 1992)。更に、Petersonら (Peterson, Alexander et al. 1987)、およびその他の研究者 (Barsoum, Goodman et al. 1989; Mohanty, Satpathy et al. 1996)はクラミジア (*Chlamydia*) 属の主要外膜蛋白質(MOMP)に対するモノクローナル抗体を報告している。クラミジア病原体を検出する商業的に利用可能なモノクローナル抗体および分析用キットの数はごく僅かであり、十分というには程遠い。最近になって、いくつかのクラミジア病原体の血清型が報告された。LPS またはMOMPは菌株によって異なり、一つの血清型に対する抗体がすべてをカバーするものではない (Tekgul, Aktepe et al. 1992; Matthews, Pandit et al. 1993; Mohanty, Satpathy et al. 1996)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記のような課題を解決するためになされたものである。すなわち、本発明は、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に属する微生物を特異的、かつ高感度に迅速に検出する方法、その検出に用いる検出用抗体、検出用試薬キットを提供することを課題とする。さらに、本発明は、その検出に用いる検出用抗体の製造方法を提供

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、全ての微生物において同一の機能が保存されている蛋白質を有用な抗原蛋白質として見出した。通常、このような蛋白質の構造変化はきわめて少ないと予想される。しかし驚くべきことに、該蛋白質に対する抗体は、微生物の種あるいは属特異的であり、該蛋白質に対する抗体は、微生物の種あるいは属特異的な識別に用いることが可能な多様性を持つとともに、対象となる微生物についてはその全

【0008】本発明者らは全ての微生物細胞に同一機能の分子として存在し、しかもそのアミノ酸構造が微生物間である程度の相違点をもつ細胞内分子、特にリボソーム蛋白質の一種である Ribosomal Protein L7/L12蛋白質に着目した。Ribosomal Protein L7/L12蛋白質は分子

量約13キロダルトンの蛋白質であり、蛋白質合成に必須のリボソーム蛋白質として存在することが知られている。クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)を含むいくつかの微生物では Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の完全なアミノ酸配列が解明された。

【0009】本発明者らはこの分子が微生物間で類似しているにもかかわらずその一部に各微生物固有の構造部分を持つことに着目し、このクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の Ribosomal Protein L7/L12蛋白質に対する抗体を利用することで様々な微生物、細菌の種特異的であつ全ての同一菌種内の血清型について検出が可能であることを見いだした。本発明者等は、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の該蛋白質に特異的な抗体が得られること、および該抗体を用いることによりクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の特異的な検出が可能であることを見出し、本発明を完成した。本発明により、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の Ribosomal Protein L7/L12蛋白質に対して特異的なモノクローナル抗体が見出され、開発された。この抗体は新規であり、従来公知のいかなる抗体とも異なり、上記蛋白質と特異的に反応する性質を有する。

【0010】

【発明の実施の形態】配列表において配列番号1及び2はクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA配列及び対応するアミノ酸配列である。完全なゲノム配列が公表され (Stephens, Kalman et al. 1998; Kalman, Mitchell et al. 1999)、World Wide Webで入手可能である (NCBI data base, accession # AE001304 & 1AE001273)。なお、配列表に記載されたアミノ酸配列の左端および右端はそれぞれアミノ基 (以下、N 末) およびカルボキシル基末端 (以下、C 末) であり、また塩基配列の左端および右端はそれぞれ5' 末端および3' 末端である。クロスマッチテストのアミノ酸配列のアミノ酸は1文字略字で表している。また、クロスマッチテストにおける「+」の表記は、異なるアミノ酸であるが、疎水性などの性質が類縁のアミノ酸であること、「」のブランクは性質も含めて全く異なるアミノ酸であることを示す。また、本発明で述べられる遺伝子操作の一連の分子生物学的な実験は通常の実験書の記載方法によって行うことができる。前記の通常の実験書としては、例えば Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J.ら (1989) を挙げるができる。

【0011】

【表1】

クロスマッチ：

Ct: 1 MTTESLETLVEQLSGLTVLELSQLKLLBEKWDVTAAPVVAVAGAAAAGDAPASAEPT 60
+TTESLETLVE+LS LTVLELSQLKLLBEKWDVTA+APVVAVA A G+AP +AEPTE

Cp: 1 VTTESLETLVEKLSNLTVELSQLKLLBEKWDVTASAPVVAVA-AGGGGBAPVAAEPT 59

Ct:61 FAVILEDVPSDKKIGVLKVVREVTGLALKEAKEMTEGLPKTVKEKTSKSDAEDTVKKLQE 120

FAV LEDVP+DKKIGVLKVVREVTGLALKEAKEMTEGLPKTVKEKTSKSDAEDTVKKLQ+

Cp:60 FAVTLEDVPADKKIGVLKVVREVTGLALKEAKEMTEGLPKTVKEKTSKSDAEDTVKKLQD 119

Ct:121 AGAKAVAKGL 130

AGAKA KGL

Cp:120 AGAKASFKGL 129

Ct= Chlamydia trachomatis

Cp= Chlamydia pneumoniae

【0012】本発明において“微生物”とは、クラミジア・トラコマチス (Chlamydia trachomatis)を意味し、特に、STD の病原性を有しクラミジア (Chlamydia)

感染症の原因菌として診断の意義の高い微生物をいう。本発明において、“微生物と特異的に反応する抗体”とは、或る種または属の微生物と特異的に反応する抗体を意味する。或る種の微生物と特異的に反応する抗体は、特に、微生物感染症の診断に有用である。本発明において抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を指し、Ribosomal Protein L7/L12蛋白質の全長あるいはその部分ペプチドを用いて作成することができる。抗体を作成するためのペプチドの長さは特に限定されないが Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体の場合、この蛋白質を特徴づけられる長さがあれば良く、好ましくは5アミノ酸以上、特に好ましくは8アミノ酸以上のペプチドを用いれば良い。

【0013】このペプチドあるいは全長蛋白質をそのまま、または KLH(keyhole-limpet hemocyanin) や BSA(bovine serumalbumin) といったキャリア蛋白質と架橋した後必要に応じてアジュバントとともに動物へ接種せしめ、その血清を回収することでRibosomal Protein L7/L12 蛋白質を認識する抗体 (ポリクローナル抗体) を含む抗血清を得ることができる。また抗血清より抗体を精製して使用することもできる。接種する動物としてはヒツジ、ウマ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット等であり、特にポリクローナル抗体作製にはヒツジ、ウサギなどが好ましい。また、ハイブリドーマ細胞を作製する公知の方法によりモノクローナル抗体を得ることも可能であるが、この場合はマウスが好ましい。

【0014】また該蛋白質の全長または5残基以上、望ましくは8残基以上のアミノ酸配列をGST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)などとフュージョン蛋白としたものを精製して、または未精製のまま、抗原として用いることもできる。成書(Antibodies a laboratory man

ual, E.Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory)に示された各種の方法ならびに遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて培養した細胞に発現させた遺伝子組み換え抗体によっても作製することができる。

【0015】本発明のマーカー抗原として用いることができる Ribosomal Protein L7/L12蛋白質に対する抗体は、以下の方法あるいはその他の類似の方法によって取得することができる。

a) Ribosomal Protein L7/L12蛋白質の遺伝子配列およびアミノ酸配列が既知の微生物については、他の微生物における該蛋白のアミノ酸配列との類似性の少ない領域についてペプチド断片を合成し、それを免疫原としてポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体を作製することにより目的の抗体を取得することができる。また、既知の該遺伝子の両端部位における DNA配列をプローブとした PCR手法による遺伝子増幅、相同部分配列を鋳型プローブとしたハイブリダイゼーション法など通常の遺伝子操作手法を用いることにより該遺伝子の全長配列を取得することができる。

【0016】次いで、他の蛋白質遺伝子とのフュージョン遺伝子が作成され、フュージョン遺伝子は大腸菌を宿主細胞として用いて通常の遺伝子挿入法により宿主に挿入され、大量に発現せしめられる。所望の蛋白質抗原は、発現した蛋白質をアフィニティカラム法によって精製することによって、フュージョン蛋白質として用いられた蛋白質の抗体とともに、得ることができる。この場合 Ribosomal Protein L7/L12 の全長蛋白が抗原となるため微生物間で保存されているアミノ酸部分に対する抗体を取得しても本発明の目的に合致しない。従って、本法によって取得した抗原に対しては公知の手法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得し、該当する微生物とのみ反応する抗体を産生するクローンを選択することにより目的の抗体を取得することができ

る。

【0017】b) Ribosomal Protein L7/L12蛋白質のアミノ酸配列が未知の微生物については1つにはRibosomal Protein L7/L12蛋白質のアミノ酸配列が菌種間で50~60%相同であることにより、そのアミノ酸配列の相同部分の配列を基にしてPCR法による特定配列部分の遺伝子増幅や相同部分配列を錫型プローブとしたハイブリダイゼーション法など通常の遺伝子操作手法を用いることにより該蛋白質遺伝子を容易に取得することができる。その後他の蛋白質遺伝子とのフュージョン遺伝子が作成され、フュージョン遺伝子は大腸菌を宿主細胞として用いて通常の遺伝子挿入法により宿主に挿入され、大量に発現せしめられる。所望の蛋白質抗原は、発現した蛋白質をアフィニティカラム法によって精製することによって、フュージョン蛋白質として用いられた蛋白質の抗体とともに、得ることができる。この場合 Ribosomal Protein L7/L12の全長蛋白が抗原となるため微生物間で保存されているアミノ酸部分に対する抗体を取得しても本発明の目的に合致しない。従って、本法によって取得した抗原に対しては公知の手法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得し、該当する微生物とのみ反応する抗体を産生するクローンを選択することにより目的の抗体を取得することができる。

【0018】c)あるいは Ribosomal Protein L7/L12蛋白質のアミノ酸配列が未知な場合の別な方法として、既知のRibosomal Protein L7/L12蛋白質のアミノ酸配列のうち微生物間で保存されている共通配列部分に相当する5~30アミノ酸の合成ペプチドを作製し、そのペプチド配列に対し公知の方法でポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を作製する。該抗体を用いたアフィニティカラムクロマトによって目的の微生物細胞破砕液を精製することにより高度に精製された Ribosomal Protein L7/L12蛋白質を取得することができる。該抗体を用いたアフィニティカラムクロマトによって破砕した微生物から所望の蛋白を取得することができる。蛋白の精製度が不足している場合は公知の精製手法であるイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過などの手法により精製したのち作製した抗体によるウェスタンブロットなどの方法により Ribosomal Protein L7/L12蛋白質の溶出フラクションを同定し精製画分を得ることができる。得られた精製 Ribosomal Protein L7/L12蛋白質抗原を基にして公知の方法によりハイブリドーマを取得し、目的の微生物に特異的に反応するハイブリドーマを選択することにより目的の抗体を取得することができる。

【0019】上記の方法a)、b)およびc)によって得られた、種々の微生物に特異的な本発明の抗体は、微生物に特異的な各種の診断試薬およびキットを利用する、種々の免疫学的分析法に用いることができる。例えば、この抗体は、公知の測定手法であるポリスチレンラ

テックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術であるELISA法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに捕捉(Capture)抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなど既知の全ての免疫測定手法に利用できる。抗体を用いる微生物診断方法とは、ポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術であるELISA法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに捕捉抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなど既知の全ての免疫測定手法を利用する診断方法を意味する。

【0020】また、特に抗体を用いる有用な微生物診断方法として特表平7-509565号公報に記載されているシリコン、窒化珪素などにより形成された光学薄膜上で抗体反応をおこない光干渉原理等により検出するいわゆるオプティカルイムノアッセイ(OIA, Optical Immunoassay)などが高感度な診断方法として有用である。

【0021】また該検出方法において必要となる微生物からの細胞内マーカー抗原の抽出方法としては、Triton X-100, Tween-20をはじめとする種々の界面活性剤を用いた抽出試薬による処理法、適当なプロテアーゼなどの酵素を用いる酵素処理法、物理的方法による微生物細胞の破砕をはじめ既知の細胞構造の破砕手法が用いられる。界面活性剤等の組み合わせにより微生物ごとに試薬による最適な抽出条件を設定することが望ましい。

【0022】また、本発明における、抗体を用いる微生物検出用試薬キットとは、当該検出方法を用いた検出用試薬キットに相当する。

【0023】クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の Ribosomal Protein L7/L12蛋白質のアミノ酸配列及びDNA配列を配列表に示す。従って、この微生物の場合は Ribosomal protein L7/L12蛋白質のアミノ酸配列を、配列表に「クロスマッチ」と記した類似の微生物の同種の蛋白質と比較することが可能である。相同性の低いセグメントのペプチドを合成し、これに対するポリクローナルあるいはモノクローナル抗体を作成することは、微生物に対する特異性を有するものを選択を省略することを可能とする。

【0024】特にポリクローナル抗体の場合、免疫した動物の抗血清を Protein Aカラム等で精製しIgG画分を取得したのち、さらに動物の免疫に用いた合成ペプチドによるアフィニティ精製を実施することが望ましい。

【0025】更に、当該微生物の Ribosomal Protein L7/L12のDNA配列からN末端とC末端の配列に基づいてPCRプライマーが作成された。このPCRプライマーの相同性を利用して、ゲノムDNAを用いてPCR法によりDNA断片を増幅させ、これを抽出し、常法によりクラミジア・

トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)を取得することができる。クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12遺伝子の全長はこれらの断片の DNA配列情報を分析することにより知ることができる。

【0026】取得したクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12遺伝子は、例えば GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) などとフュージョン蛋白質遺伝子を構成し、適当な発現用プラスミドを用いて発現ベクターを構築後、大腸菌等を形質転換して該蛋白質を大量発現させる。形質転換した大腸菌を適当量培養し、菌体破砕液を GSTを用いたアフィニティカラムで精製することにより、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12蛋白質と GSTのフュージョン蛋白質が得られる。この蛋白質をそのまま、あるいは GST部分を切断後、抗原蛋白質として公知の手法により、複数のハイブリドマクローンを確立し、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)菌体あるいは菌体破砕液またはクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachom*

20 *atis*)の Ribosomal Protein L7/L12蛋白質に特異的な反応を示す抗体を選択することにより目的の特異的モノクローナル抗体を取得することも可能である。

【0027】本発明に基づき作製された抗体は、公知の測定手法であるポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術である ELISA法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに捕捉抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセ

30 イなど既知の全ての免疫測定手法に利用できる。

【0028】また本発明に基づき作製された抗体は全ての免疫測定手法において当該抗原蛋白質を固相あるいは液相中で捕獲するいわゆる捕捉(capture)抗体として機能しうると同時にパーオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素を公知の方法により修飾していわゆる酵素標識抗体とすることにより、検出用抗体としても機能しうる。

【0029】以下の例は本発明を具体的に説明するためのものであって本発明について何らその範囲を限定する

40 ものではない。

【0030】

【実施例1】クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子のクローニング

クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) (ATCC VR-885ATCC から分譲、購入)をHL細胞のモノレイヤー上で培養した。クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の詳細な培養方法は Reed らおよび Kuo ら (Reed, Anderson et al.1981; Kuo and Grayston

1990)の記載に従った。CO₂ インキュベータ内にて37℃、5% CO₂の条件下で微生物を5日間培養した。感染した細胞を遠心分離により集め、最終的に5×10⁷個/ml前後の濃度となるようにTE Buffer (和光純薬工業製)に懸濁した。この懸濁液約1.5mlを微量遠心チューブに移し取り10,000rpmで2分間遠心した。上澄み液を棄てた。沈殿部分を567μlのTEバッファーに再懸濁した。さらに30μlの10% SDSと3μlの20mg/ml ProteinaseK溶液を加えて良く混合し、37℃で1時間インキュベートした。懸濁液を56℃で更に1時間インキュベートした。次に10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl溶液を80μl加え、よく混合したのち65℃で10分間インキュベートした。同一体積の24:1のクロロホルム-イソアミルアルコール混合液を700μl加えよく攪拌した。この溶液を微量遠心機で12,000rpm、5分間、4℃で遠心処理したのち、水層画分を新しい微量遠心管に移した。そこに0.6倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振ってDNAの沈殿を形成した。白いDNA沈殿をガラス棒ですくって1mlの70%エタノール(-20℃に冷却したもの)が入った別の微量遠心管に移した。その後チューブを10,000rpmで5分間遠心し、上清を静かに除去した。1mlの70%エタノールを追加し、混合物を更に5分間遠心した。

【0031】再び上澄みを除去したのち沈殿を100μlのTEバッファーに溶解しDNA溶液を得た。このゲノムDNA溶液の濃度をMolecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory PressのE5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNAに従って定量した。

【0032】このゲノムDNAのうち10ngを用いてPCR(polymerase chain reaction)を行った。PCRはTaqポリメラーゼ(宝酒造社製、コードR001A)を用いた。5μlのバッファー、4μlのdNTP混合物、および各200pmolのオリゴヌクレオチド(配列表配列番号:3および4に示すもの)を酵素に加えた。全体の容量が50μlとなるように精製水を加えた。

【0033】この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用いて、95℃1分、50℃2分、72℃3分を5サイクル行ったのち、95℃1分、60℃2分、72℃3分を25サイクル行った。このPCR生成物の一部を用いて、1.5%アガロースゲル中にて電気泳動を実施した。エチジウムブロマイド(日本ジーン社製)にて染色後、紫外線下で観察し、約400bpのcDNAが増幅されていることを確認した。制限酵素BamHIおよびXhoIを用いて切断後、1.5%アガロースゲル中にて電気泳動とエチジウムブロマイドによる染色を行った。ゲルから約400bpのバンドを切り取った。このバンドをSuprec01(宝酒造株式会社製)で精製し、一般的なベクターであるpGEX-6P-1(Pharmacia社製)に挿入した。同ベクターは目的の遺伝子断片を

適当な制限酵素サイトに組み込むことにより GST蛋白質とのフュージョン蛋白質を発現しうる目的分子の発現ベクターとして機能することができる。

【0034】具体的にはベクターpGEX-6P-1 と先の DNA とをそのモル比が1:3となるように混ぜ合わせて、T4 DNA リガーゼ(Invitrogen 社製)にてベクターに DNA を組み込んだ。DNAを組み込んだベクターpGEX-6P-1 は大腸菌のワンショットコンピテントセルに遺伝子学的手法により導入し、ついで50 μ g/mlのアンプシリン(シグマ社)を含む半固体状の培養プレートであるL-プロス寒天(宝酒造株式会社製)に接種した。プレートを37 $^{\circ}$ Cで12時間インキュベートし、成長したコロニーを無差別に選択し、同じ濃度のアンプシリンを含むL-プロス培養液に接種した。37 $^{\circ}$ Cで8時間振とう培養・集菌後、Wizard Miniprep を用い、添付の説明書に従ってプラスミドを分離した。プラスミドは制限酵素BamHI/XhoIにて切断処理した。約370bpのDNAを切断することによってPCR生成物の挿入を確認した。挿入されたDNAの塩基配列を上記クローンをを用いて決定した。

【0035】挿入DNA断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の蛍光シークエンサーを用いて実施した。シークエンスサンプルの調製はPRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems 社製)を用いて行なった。先ず、9.5 μ lの反応液、4.0 μ lの0.8pmol/ μ lのT7プロモータープライマー(Gibco BRL)、および6.5 μ lの0.16 μ g/ μ lテンプレートDNAを0.5mlのマイクロチューブに加え、混合した。混合物を2層の100 μ l 鉱油で覆ったのち、25サイクルPCR増幅処理を行った。ここで、1サイクルは、96 $^{\circ}$ Cでの30秒間の処理、55 $^{\circ}$ Cでの15秒間の処理、および60 $^{\circ}$ Cでの4分間の処理からなる。生成物を4 $^{\circ}$ Cで5分間保持した。反応終了後、80 μ lの無菌精製水を加え、攪拌した。生成物を遠心分離し、水層をフェノールクロロホルム混合液で3回抽出した。10 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)と300 μ lのエタノールを100 μ lの水層に加え、攪拌した。その後14,000rpm、室温で15分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿を75%エタノールで洗浄後、真空下に2分間静置して乾燥させ、シークエンス用サンプルとした。シークエンスサンプルは、4 μ lの10mMのEDTAを含むホルムアミドに溶解して90 $^{\circ}$ Cで2分間で変性した。このものは氷中で冷却してシークエンスに供した。無差別に選択した5個のクローンのうち2個はPCRに用いたプローブと配列上の相同性を有していた。また、Ribosomal Protein L7/L12の遺伝子配列と一致したDNA配列が明白であった。その構造遺伝子部分の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号1及び2に示すような配列であった。この遺伝子断片は、明らかにクラミジア・トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12蛋白質の遺伝子をコードするものである。

【0036】

【実施例2】クラミジア・トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)からのRibosomal Protein L7/L12遺伝子の

大腸菌での大量発現と精製
発現ベクターを組み込んだ大腸菌をLB培地中で50ml 37 $^{\circ}$ C、一昼夜培養した。500mlの2倍濃度のYT培地を37 $^{\circ}$ Cで1時間加熱した。1晩培養した大腸菌液50mlを500mlの前述の培地に入れた。1時間後、550 μ lの100mMイソプロピル-D(-)-チオガラクトピラノシド(IPTG)を導入し、4時間培養した。生成物を回収し、250mlの遠心チューブに移し、7000rpmで10分間遠心した。上澄みを棄てて50mM Tris-HCl pH7.4、25% Sucroseを含むLysisバッファー25mlずつに溶解した。さらに10%NP-40 1.25ml、1M MgCl₂ 125 μ lを加えてプラスチックチューブに移した。氷冷下、1分間の超音波処理を5回行った。その後、12,000rpmで15分間遠心し、上清を回収した。

【0037】次に、PBSでコンディショニングしたグルタチオンアガロースカラムに前記の上澄み液を吸着させた。次に、20mM Tris バッファー pH7.4、4.2mM MgCl₂、1mM ジチオスレイトール(DTT)を含む洗浄液でカラムを2ベッドボリューム分洗浄した。5mMのグルタチオンを含む50mMトリスバッファー(pH9.6)中で溶離処理をした。溶出画分の蛋白質含有量をピグメント結合法(Bradford法; BioRadCo.)で決定し、主画分を取得した。得られた精製Ribosomal Protein L7/L12/GSTフュージョン蛋白質の純度は電気泳動法により確認したところ約75%であり免疫源として十分な純度を確保できた。

【0038】

【実施例3】クラミジア・トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12の蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製

まずマウスの免疫については、クラミジア・トラコマチス(*Chlamydia trachomatis*)のGST フュージョンRibosomal Protein L7/L12蛋白質抗原100 μ gを200 μ lのPBSに溶解後フロイントのコンプリートアジュバントを200 μ l 加え混合した。エマルジョン化したのち200 μ lを腹腔内に注射した。同じエマルジョン化抗原を2週間後、4週間後、および6週間後に腹腔内に注射した。2倍濃度のエマルジョン化抗原を10週間後および14週間後に腹腔内に注射した。最終の免疫化終了の3日後に脾臓を摘出し、細胞融合した。無菌的に取り出したマウスの脾細胞108個に対し骨髓腫細胞2 \times 10⁷個をガラスチューブに取り良く混合したのち1500rpmで5分間遠心し上澄みを棄た。その後細胞をよく混合した。

【0039】細胞融合に使用した骨髓腫細胞は、NS-1系の細胞株を用い10%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地で培養し、細胞融合の2週間前から0.13mMのアザグアニン、0.5 μ g/mlのMC-210、10%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地で1週間培養後、さらに10%の牛胎児血清を

含むRPMI1640培地で1週間培養したものをを用いた。

【0040】37 に保持したRPMI 1640 培養液50mlを混合細胞試料に加え、1,500rpmで遠心分離した。上澄み液を除去後、37 に保持した50%ポリエチレングリコール1mlを加え、1分間攪拌した。37 に保持したRPMI 1640 培養液10mlを加え、混合液を殺菌したピペットで約5分間吸引・排出する事により激しく攪拌した。5分間、000rpmで遠心分離し、上澄み液を除去したのち、細胞濃度が 5×10^6 /mlとなるように30ml HAT培養液を加えた。この混合物を均一になるまで攪拌し、0.1mlずつを9 10 6穴の培養プレートに注ぎ、37 、7%の炭酸ガス雰囲気下で培養した。HAT培地を、第1日、第1週、および第2週にそれぞれ0.1ml ずつ加え、ELISA 法により所望の抗体を産生する細胞をスクリーニングした。

【0041】0.05%のアジ化ソーダを含む PBS中に溶解したRibosomal Protein L7/L12/GST蛋白および GST蛋白をそれぞれ10 µg/ml濃度で希釈した液を 100 µl ずつ96穴プレートに別々に分注し4 で1晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS中) 200 µl 添加し室温で1時間反応しプロッキングした。上澄み液を 20 除去後、生成物を洗浄液(0.02% Tween20,PBS)で洗浄した。これに融合細胞の培養液 100mlを加え、室温にて2時間反応させた。上澄み液を除去し、沈殿を洗浄液で洗浄した。次いで、濃度 50ng/mlのペルオキシダーゼでラベルしたgoat anti-mouse IgG 抗体溶液 100 µl を加え、室温にて1時間反応させた。上澄み液を除去し、生成物を再び洗浄液で洗浄した。TMB 溶液(KPL社製)を 100 µl ずつ加え、混合物を室温にて20分間反応させた。着色したところで1N の硫酸 100 µl を加えて反応を停止し、450nm の吸光度を測定した。

【0042】この結果、GST フュージョンRibosomal Protein L7/L12蛋白質にのみ反応しGST には反応しない陽性ウェルが見いだされ Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体が含まれていることが判明した。そこで陽性ウェル中の細胞をそれぞれ回収し24穴プラスチックプレート中、HAT 培地で培養した。培養した融合培地を細胞数が約20個/ml になるようにHT培地で希釈し50 µl を、HT培地に懸濁した6週齢のマウス胸腺細胞106 個と96穴培養プレート中で混合した。混合後、7% C 02 条件下、37 で2週間培養した。培養上澄み中の抗 40 体活性を前述のELISA 法にて同様に検定し、Ribosomal Protein L7/L12蛋白との反応陽性の細胞を回収した。さらに、同様の希釈検定、クローニング操作を繰り返し、ハイブリドーマCTRB-1~5 の計5クローンを取得した。

【0043】

【実施例4】クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12蛋白質を検出するモノクローナル抗体の選択

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞を用いて定法にしたがってモノクローナル抗体を生産回収し 50

た。具体的には、RPMI 1640 培地 (10% FCS入り)を用いて継代培養した細胞をあらかじめ2週間前に0.5ml のプリスタンを腹腔内に注射したBalb/Cマウスの腹腔内に 5×10^6 個(PBS中)注射した。3週間後腹水を回収し、その遠心上澄みを取得した。得られた抗体を含む溶液をProtein A カラム(5ml bed, Pharmacia 製)に吸収させ、3倍量の PBSで洗浄した。次いで、クエン酸バッファー(pH3) で溶出した。抗体画分を回収し、各ハイブリドーマによって産生されたモノクローナル抗体を取得した。この5株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体を用いてELISA 法により評価した。モノクローナル抗体の評価にはサンドウィッチ分析法を用いた。作成されたモノクローナル抗体をペルオキシダーゼに結合せしめることにより検出用の抗体として用いた。

【0044】酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ(SigmaグレードVI) を用い結合には試薬S-アセチルチオ酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Bio-chemistry132(1983), 68-73 に述べられている方法に従って行った。ELISA 反応においては市販の抗クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)ポリクローナル抗体(Biodesign社、ウサギ)を10 µg/ml濃度で希釈した液を 100 µl ずつ96穴プレートに別々に分注し4 で1晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS中) 200 µl 添加し室温で1時間反応しプロッキングした。上澄み液を除去後、生成物を洗浄液(0.02% Tween20,PBS)で洗浄した。これに各微生物の培養液に濃度 0.3%となる量の TritonX-100 を加え、常温で5分間抽出することにより得られた抗原溶液 100 µl を加え、室温で2時間反応させた。上澄み液を 30 除去し、生成物を再び洗浄液で洗浄した。次いで、濃度 5 µg/mlのペルオキシダーゼ標識抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗体溶液 100 µl を加え、室温にて1時間反応させた。上澄み液を除去し、生成物を再び洗浄液で洗浄した。TMB 溶液(KPL社製)を 100 µl ずつ加え、混合物を室温にて20分間反応させた。着色したところで1N の硫酸 100 µl を加えて反応を停止した。450nm の吸光度を測定した。

【0045】酵素標識抗体としてハイブリドーマCTRB-1由来のモノクローナル抗体を用いた場合、試験したクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の全ての株を106 個/ml の感度で検出すると同時に他の *Hae* *mophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*および*Neisseria meningitides*等の微生物について108 個/mlの高濃度でも反応性を示さずRibosomal Protein L7/L12蛋白に対するモノクローナル抗体を用いることでクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。この抗体はAMCT-1と名付けられた。表2はAMCT-1を用いた結果のみを示す。別の微生物と交差反応を示す他の抗体を使用した結果はここ

で言及しない。

【0046】

*【表2】

検出結果 (10 ⁶ cells/ml)	
<u>C. trachomatis</u>	+
検出結果 (10 ⁸ cells/ml)	
<u>C. pneumoniae</u>	-
<u>M. pneumoniae</u>	-
<u>H. influenzae</u>	-
<u>B. catarrharis</u>	-
<u>N. gonorrhoeae</u>	-
<u>E. coli</u>	-
<u>K. pneumoniae</u>	-

(+; ポジティブ、-; ネガティブ)

【0047】

【実施例5】Ribosomal Protein L7/L12蛋白質固定化アフィニティカラムを用いたクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) Ribosomal Protein L7/L12蛋白質と特異的に反応するポリクローナル抗体の取得
 実施例1に記載の方法により取得したクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) Ribosomal Protein L7/L12蛋白質またはTriton X-100処理した菌体の上清を抗原として使用した。100μgの抗原を含む生理食塩水約1.2mlをフロイントアジュバント1.5mlとともに乳化した。エマルジョンをSPF日本白色ウサギに皮下注射してウサギを免疫化した。2週間おきに5~6回免疫し、抗体価を確認した。抗体価の確認はELISA法により実施した。0.05%のアジ化ソーダを含むPBS中に溶解したクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12蛋白質を10μg/ml濃度に希釈した液を100μlずつ96穴プレートに分注し4で1晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液 (PBS中) 200μl添加し室温で1時間反応しブロッキングした。上澄み液を除去後、生成物を洗浄液 (0.02% Tween 20, PBS) で洗浄した。正常のウサギ血清および免疫化したウサギの抗血清を希釈して得られた溶液100μlを加え、室温にて2時間反応させた。上澄み液を除去し、生成物を再び洗浄液で洗浄した。次いで、濃度50ng/mlのペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体溶液100μlを加え、室温にて1時間反応させた。上澄み液を除去し、生成物を再び洗浄液で洗浄した。OPD溶液 (Sigma社製) を100μlずつ加え、混合物を室温にて20分間反応させた。着色したところで1Nの硫酸100μlを加えて反応を停止した。492nmの吸光度を測定した。

【0048】抗体価上昇を確認後、大量採血を実施した。耳動脈から血液をガラス製遠心管に採取し、37で

1時間放置後、4で1晩静置した。その後3000rpm 5分間遠心し、上清を回収した。得られた抗血清は4で保存した。クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12蛋白質を固定化したアフィニティカラムを調製した。HiTrap NHS活性化カラム (1ml, Pharmacia社製) を用いた。カラムを1mM HClで置換後直ちにRibosomal Protein L7/L12蛋白質のPBS溶液 (1mg/ml) を加えた。カラムを30分間静置後、ブロッキング試薬を加え、PBSで平衡化した。このクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12蛋白質固定化アフィニティカラムを使用して、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のTriton X-100処理した菌体の上清を抗原として得られた抗血清中のポリクローナル抗体の精製を行った。この抗血清をPBSで5倍に希釈し、0.45μmのフィルターを通した後、流速0.5ml/minでクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12蛋白質固定化カラムに吸着させた。その後0.1MグリシンpH2.1でカラムから溶出し、直ちに1MTris-HCl pH9.0で中和した後、抗体価測定法と同様のELISA法により目的とする抗体の溶出画分を回収した。

【0049】このようにして得られたポリクローナル抗体は特表平7-509565号公報に記載されているOIA法により評価した。精製した抗体はOIA法の捕捉 (capture) 抗体として使用した。また検出 (detect) 抗体としては実施例4に記載したAMCT-1モノクローナル抗体をパーオキシダーゼで酵素標識したものを使用した。酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ (SigmaグレードVI) を用い結合には試薬S-アセチルチオ酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミドを使用しAnalytical Bio-chemistry132(1983), 68-73に述べられている方法に従って行った。OIA反応においては0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS中の

精製ポリクローナル抗体を10 µg/ml濃度に0.1M HEPES pH8.0で希釈した液を50 µl ずつシリコンウエハー上に添加し室温で30分反応させた後、蒸留水で洗浄し、サッカロース及びアルカリ処理カゼインを含むコーティング溶液でコーティング後、使用した。

【0050】上記操作で得られた各微生物の培養液に濃度0.5%となる量の TritonX-100を加え常温で5分間抽出することにより得られた抗原溶液15 µl を上記シリコンウエハー上に添加し、室温で10分間反応させた。次いで、20 µg/mlペルオキシダーゼ標識化モノクローナル抗体を15 µl 加え、10分間反応させた。蒸留水で洗浄後、TMB 溶液 (KPL 社製) を15 µl ずつ加え、混合物を室温にて5分間反応させた。生成物を蒸留水で洗浄し、酵素*

*反応により生成した青色を肉眼で観察した。この結果、表3に示すように、精製ポリクローナル抗体APCT-1を捕捉抗体として用いることにより、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)を 108 bacteria/mlの感度で検知できること、および他の微生物の反応性は検知できないことが明らかである。このようにしてクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)のRibosomal Protein L7/L12蛋白質を固定化したアフィニティカラムにより、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)に特異的に反応するポリクローナル抗体を取得したことを確認した。

【0051】

【表3】 検出結果 (10⁶ cells/ml)

<i>C. trachomatis</i>		+
<i>H. influenzae</i>	ATCC10211	-
<i>E. coli</i>	ATCC25922	-
<i>E. faecalis</i>	ATCC19433	-
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC13883	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	IID821	-
<i>N. lactamica</i>	ATCC23970	-
<i>N. meningitidis</i>	ATCC13090	-
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC27853	-
GroupB <i>Streptococcus</i>	ATCC12386	-
<i>S. aureus</i>	ATCC25923	-
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC27336	-
<i>S. pyogenes</i>	ATCC19615	-

(+ ; ポジティブ、- ; ネガティブ)

【0052】

【発明の効果】本発明によると微生物の進化の過程で機能的に保持された細胞内分子に対する抗体を用いて特定の種の微生物を特異的に検出できるだけでなく、同一種内の全ての血清型の微生物を精度よく検出することができる。このような抗体として微生物のリボソーム蛋白質、Ribosomal Protein L7/L12蛋白質に対する抗体を用い、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の検出を精度良く行うことができる。また、このような抗体を構成要素とする微生物検出用試薬キットを用いることで、微生物の検出をより汎用的に精度良く行うことができる。

【0053】引用文献

(1) 米国特許

No.6,010,857; Helen H.2000「子宮頸管のクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)感染検出」
No.5,846,785; Burczak, et al.,1998「MOMP遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドおよびクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の検出法」

No.5,837,469; Harris; James M.1998「増殖によるクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の分析およびクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)核酸の検出」

(2) その他の特許文献

特表平7-509565

(3) その他の文献

Barsoum, I.S., T.A. Goodman, et al., (1989)「ヒトの上皮様細胞の非増殖的クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)血液型A感染モノクローナル抗体の中和」*Presse Med*18(1),17-20.

Bishop, P.N., A.B. Tullo, et al., (1991)「クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)感染の眼科的診断のための免疫ドット法試験」*Apmis* 99(1),69-74、
Kalman, S., W. Mitchell, et al., (1999)「*Chlamydia pneumoniae*およびクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)の比較ゲノム」*Nat Genet* 21(4),385-9
Kligman, I., J.A. Grifo, et al., (1997)「子宮内膜症婦人の腹膜液中での60kDa熱ショック蛋白質の発現、子宮内

膜症関連不妊症に関する示唆」J Clin Lab Anal 11(1), 45-52

Kuo, C.C. and J.T. Grayston (1990)、「細胞培養液中の *Chlamydia pneumoniae* の成長に必須のアミノ酸、リジンまたはメチオニン枯渇による増殖促進」J Clin Microbiol 28(6), 1098-100

Matthews, R.S., P.G. Pandit, et al., (1993)「男性の尿サンプル中のクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) 検出のための酵素ラベルイムノアッセイおよび確認試験の評価」Genitourin Med 69(1), 51-3

Mearns, G., S.J. Richmond, et al., (1988)「クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) 感染の診断のための免疫ドット法試験の感度」Eur J Clin Microbiol Infect Dis 7(5), 635-8、

Mohanty, S., G. Satpathy, et al., (1996)「臨床試料中の *Chlamydia* 検出用属特異的モノクローナル抗体を用いる抗原捕捉酵素免疫分析法の開発」Rinsho Byori 44(2), 153-8

Much, D.H. and S.Y. Yeh (1991)「妊娠中の患者におけるクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) 感染率」Int J STD AIDS 2(5), 359-61

Okadome, A., T. Notomi, et al., (1999)「クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) の異種血液型での二重増殖 *Chlamydia* 免疫分析の反応性」Int J STD AIDS 10(7), 460-3

Peterson, E.M., R. Alexander, et al., (1987)「生殖器の *Chlamydia* 感染検出用の直接的モノクローナル蛍光抗体の染色法評価」J Clin Pathol 40(2), 194-9

Poussin, M., V. Fuentes, et al., (1997)「Capture-ELISA-*Chlamydia trachomatis* 抗原を用いるイムノグロブリン M アイソトープ抗体検出のための新規な分析法」Rinsho Byori 81(2), 497-500

Reed, S.I., L.E. Anderson, et al., (1981)「無血清培地中*

*で培養されたマウス L 細胞中のクラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) 脂質代謝研究におけるシクロヘキシミンの使用」Infect Immun 31(2), 668-73

Stephens, R.S., S. Kalman, et al., (1998)「真正細胞間病原菌のゲノム配列 - クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)」Science 282(5389), 754-9

Tekgul, S., O. Aktepe, et al., (1992)「クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) による男性の生殖器の感染症」Dermatology 185(1), 27-31

10 Thiele, D., M. Karo, et al., (1992)「獣医臨床試料中の *Chlamydia psittaci* 検出のためのモノクローナル抗体捕捉 ELISA/ELIFA 法」Eur J Clin Microbiol Infect Dis 11(6), 527-34

Thomas, B.J., R.T. Evans, et al., (1978)「シクロヘキシミド処理 McCoy 細胞と免疫蛍光染色を組み合わせた *Chlamydia* の初期検出」J Immunol 121(1), 204-8

Harlow, E., and D. Lane (1988)「抗体、実験室マニュアル」New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Shambook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis., (1989)「モレキュラークローニング、実験室マニュアル、第 2 版」Cold Spring Harbor Laboratory Press

NCBI データベース #AE001304.1, Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C.J., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W.P., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., and Davis, R.W.

NCBI データベース #AE001273, 「クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) ゲノム」Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C.J., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W.P., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., and Davis, R.W.

【0054】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ASAHIKASEI KABUSHIKI KAI

SHA

<120> クラミジア・トラコマチス検出用抗体

<130> X13-75

<150> JP 2000-062685

<151> 2000-01-31

<160> 4

<210> 1

<211> 390

<212> DNA

<213> *Chlamydia trachomatis*

<400> 1

atg act act gaa tct tta gaa act tta gtt

gaa caa tta tct ggt tta 48

Met Thr Thr Glu Ser Leu Glu Thr Leu Val

Glu Gln Leu Ser Gly Leu

1

5

10

15

act gtt tta gaa tta tct caa tta aaa aaa

Thr Val Leu Glu Leu Ser Gln Leu Lys Lys
 Leu Leu Glu Glu Lys Trp
 20 25 30
 gat gtt act gct gct gct cct gtt gtt gct
 gtt gct ggt gct gct gct 144
 Asp Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Val Ala
 Val Ala Gly Ala Ala Ala
 35 40 45
 gct ggt gat gct cct gct tct gct gaa cct
 act gaa ttt gct gtt att 192
 Ala Gly Asp Ala Pro Ala Ser Ala Glu Pro
 Thr Glu Phe Ala Val Ile
 50 55 60
 tta gaa gat gtt cct tct gat aaa aaa att
 ggt gtt tta aaa gtt gtt 240
 Leu Glu Asp Val Pro Ser Asp Lys Lys Ile
 Gly Val Leu Lys Val Val
 65 70 75 80

 cgt gaa gtt act ggt tta gct tta aaa gaa
 gct aaa gaa atg act gaa 288
 Arg Glu Val Thr Gly Leu Ala Leu Lys Glu
 Ala Lys Glu Met Thr Glu
 85 90 95
 ggt tta cct aaa act gtt aaa gaa aaa act
 tct aaa tct gat gct gaa 336
 Gly Leu Pro Lys Thr Val Lys Glu Lys Thr
 Ser Lys Ser Asp Ala Glu
 100 105 110

 gat act gtt aaa aaa tta caa gaa gct ggt
 gct aaa gct gtt gct aaa 384
 Asp Thr Val Lys Lys Leu Gln Glu Ala Gly
 Ala Lys Ala Val Ala Lys
 115 120 125
 ggt tta
 390
 Gly Leu
 130
 <210> 2
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Chlamydia trachomatis
 <400> 2
 Met Thr Thr Glu Ser Leu Glu Thr Leu Val
 Glu Gln Leu Ser Gly Leu
 1 5 10 15
 Thr Val Leu Glu Leu Ser Gln Leu Lys Lys
 Leu Leu Glu Glu Lys Trp
 20 25 30
 Asp Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Val Ala
 Val Ala Gly Ala Ala Ala
 35 40 45

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Chlamydia trachomatis から
 のRibosomal Protein L7/L12遺伝子の取得
 に用いたPCR のプライマー DNA。
 <400> 3
 gggtgatcc gtgacaacag aaagtttga aact
 34

<210> 4
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Chlamydia trachomatis から
 のRibosomal Protein L7/L12遺伝子の取得
 に用いたPCR のプライマー DNA。
 <400> 4

フロントページの続き
 ccactcgag ttacagccct ttagcaacag cctt
 34

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト (参考)
// C 0 7 K 14/295		C 0 7 K 14/295	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A

专利名称(译)	用于检测沙眼衣原体的抗体		
公开(公告)号	JP2001286295A	公开(公告)日	2001-10-16
申请号	JP2001024749	申请日	2001-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	旭化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	旭化成株式会社		
[标]发明人	ラーマンモンズール 江藤高志		
发明人	ラーマン・モンズール 江藤 高志		
IPC分类号	G01N33/531 C07K14/295 C07K16/12 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/569 G01N33/577		
FI分类号	C12P21/08 C07K16/12 G01N33/531.A G01N33/569.F G01N33/577.B C07K14/295 C12P21/02.C C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/BA50 4B024/CA03 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA15 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2000062685 2000-01-31 JP		
其他公开文献	JP5351367B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于快速，特异性和高度灵敏地检测沙眼衣原体（衣原体a 追踪 homatis）微生物的方法，用于该检测的检测抗体，检测试剂盒和检测方法。提供了一种用于生产所使用的检测抗体的方法。一种针对沙眼衣原体（衣原体a 沙眼）微生物的核糖体蛋白的抗体，该抗体与该微生物特异性反应。TR）沙眼），用于检测属于沙眼）的微生物的方法，用于检测的试剂盒，生产抗体的方法以及核糖体蛋白L7 / L12蛋白作为核糖体蛋白，用于检测引起STD的微生物的感染。