

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 533700

(P2003 - 533700A)

(43)公表日 平成15年11月11日(2003.11.11)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード* (参考) |
|--------------------------|------|----------------|----------------|
| G 0 1 N 33/53 | | G 0 1 N 33/53 | P 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 Q 1/68 | | C 1 2 Q 1/68 | A |
| G 0 1 N 33/543 | 501 | G 0 1 N 33/543 | 501 A |
| 33/577 | | 33/577 | B |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 20数)

| | | | |
|-------------|---------------------------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願2001 - 584889(P2001 - 584889) | (71)出願人 | ユニヴェルシテ ルネ デカルト - パリ ヴェ UNIVERSITE RENE DE SCARTES - PARIS V フランス、エフ - 75006 パリ、リュ ドゥ レコール ドゥ メドゥシーヌ、12 |
| (86)(22)出願日 | 平成13年5月18日(2001.5.18) | (72)発明者 | バトー、フレデリック フランス、エフ - 75015 パリ、リュ デス ヌエット、17 |
| (85)翻訳文提出日 | 平成14年11月15日(2002.11.15) | (72)発明者 | クラレ、エマニュエル フランス、エフ - 25000 ブザンソン、シュ マン ドラ セル、37 |
| (86)国際出願番号 | PCT/FR01/01537 | (74)代理人 | 弁理士 野河 信太郎 |
| (87)国際公開番号 | W001/088545 | | |
| (87)国際公開日 | 平成13年11月22日(2001.11.22) | | |
| (31)優先権主張番号 | 00/06359 | | |
| (32)優先日 | 平成12年5月18日(2000.5.18) | | |
| (33)優先権主張国 | フランス(FR) | | |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 早期産の危険性予知のための I L - 6 の検知

(57)【要約】

本発明は、頸腔分泌物検体中にIL6が存在するかまたは存在しないかを検知することによって、特にPCTによるIL6 mRNAの検知または免疫-クロマトグラフィーによる直接的なIL6の検知をすることによって切迫早期産を予知する方法に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検査される患者から得た頸腔分泌物検体中にIL6が存在するかを検知することからなることを特徴とする、切迫早期産を予知する方法。

【請求項2】 IL6 mRNAが、検知されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 IL6が、直接検知されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】 IL6が、免疫クロマトグラフィーにて検知されることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 BE-4 (C.N.C.M I-911)、BF-6 (C.N.C.M I-912) およびBE-8 (C.N.C.M I-913) から選択される、少なくとも2つの抗-IL6モノクローナル抗体を使うことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】 捕獲抗体が、BE-8抗体であることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】 暴露抗体が、BE-4抗体であることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項8】 切迫早期産を予知することを目的とした、頸腔分泌物中のIL6を検知するための免疫クロマトグラフィーによる検知装置の使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、頸膈分泌物中のIL6を検知することによって、切迫早期産を診断する方法に関するものである。

【0002】

本発明の記載で、「早期産」とは無月経34週目以前の出産と定義し、「早々期産(very preterm delivery)」は無月経32週目以前の出産と定義し、そして「切迫(impending)出産」とは診断検査後14日以内、好ましくは7日以内の出産と定義する。

【0003】

早期産は妊娠のおおよそ10%で発生し、先天的に異常がない新生児での罹患率および致死率の75%~90%にあたる。産科および新生児のモニタリングがここ数十年で進歩したにもかかわらず、早産の数は一定のままであるか、または増加している。

【0004】

特に、早期産の前兆の診断および治療法は、臨床上未解決な問題のままである。危険性がある患者を素早く同定するのは、困難である。産科の歴史、人口統計上の要因および予兆となる症状の解析を基にした従来の子知法は、客観的でもなく、感度も高くなく、特異的でもない。さらに、出産を遅らせることができる子宮収縮抑制剤の大量使用に基づいた提唱されている予防処置は、比較的效果が無いことが証明されているため、早期産の前兆を診断する場合に、早産児の生存を確保するように新生児集中治療の全ての処置を計画するために、切迫出産を予知することも不可欠なものである。

【0005】

早期産の前兆と関連し、危険性のある患者をモニタリングするのに使用されえる、確実に素早い診断を可能にする生物学的な目印を調べるため、多くの研究が行われてきた。

【0006】

子宮内感染は早期産について同定された原因の1つであるが、しかし、それは

観察された事例のたった10%～40%にしか相当しない。満期であろうと早期であろうと、出産のきっかけにおける、炎症の役割および特定のサイトカイン（IL8、IL1、I16およびTNF）の関与が、今日明らかに立証されている。例えば最近の報告では、子宮頸管の細胞外マトリクスが妊娠の維持において不可欠な役割を担っていると、Winklerら [J.Perinat.Med.,27,45-60(1999)] は報告している。出産に先立つ頸管の素早い拡張は、局部炎症反応で誘導されるプロテアーゼによる、このマトリクスの素早い劣化と関連していると考えられ、それは好中球および白血球の溢血、ならびに特定のサイトカイン（IL8、IL1、I16およびTNF）の濃度の増加も伴うと考えられる。

【0007】

早期および/または切迫出産の危険性を診断するために、羊水中のこれらサイトカイン、および炎症タンパク質（フィブロネクチン）もアッセイすることが提唱されている。例えば、羊水中のIL6の値が高ければ、85%の感度で切迫（7日以内の）出産を判断できると、HILLIERらは [Obstetrics &Gynecology,6,941-948,(1993)] 報告している。

【0008】

しかし、羊水穿刺は危険な状態の患者の医学的なモニタリングにはあまり適していない、侵襲性かつ潜在的に危険な技術であり、規則的な試験（毎週）を行う必要がある。それゆえ、これらの目印が頸腔分泌物中にも存在するかどうか、および、それらのアッセイによって早期産および/または切迫出産の危険性を評価できるかどうかを決定するために研究が行われてきた。

報告された結果は互いに異なるものである。フィブロネクチンの事例では、INGLSらは [Am.J.Obst Gynecol.,171,5-10,(1994)]、腔分泌物中の総フィブロネクチンおよび/または胎児フィブロネクチンの免疫酵素アッセイを研究した。得られた結果は、総フィブロネクチンのアッセイによって、2～3週間目（臨床医にとって有利な、十分に長い期間）以内での出産の発生を予知できること、そしてそれが早期産には特異的でないことを示している。通常羊水および胎盤にのみ存在する頸腔分泌物中でのそのアッセイは、膜が破損されたか傷害を受けた早期産の前兆の胎児フィブロネクチンに関する事例でのみ使用することができる。

【0009】

IL8の事例では、TANAKAらは[Am.J.Obstet.Gynecol.,179,644-649,(1998)]、頸腔分泌物中のIL8、およびIL1の増加は早期産の危険性と関連していると考えている。しかし、頸腔分泌物中でのIL-8の相当量によって、高感度(80%)で子宮内感染を診断できることも報告されている[RIZZOら,J.Perinat.Med.,25,461-468,(1997);RIZZOら,Ultrasound Obstet.Gynecol.,12,86-92,(1998)]。しかし、それが早期産を予測するための信頼できる目印になっているとは思われない[RIZZOら,1997,上記引用]。

【0010】

IL6に関しては、様々な研究[LOCKWOODら,Am.J.Obst.Gynecol.,171,1097-1102,(1994);INGLISら,Am.J.Obst.Gynecol.,171,5-10,(1994)]が、選択された閾値に関して互いに異なる以外は、早期産の事例では頸腔分泌物中でのIL6の量が増すという結論と一致している。さらに、RIZZOらは[Am.J.Obstet.Gynecol.,175,812-817,(1996)]、頸腔分泌物中のIL6の量が羊水の感染にとっての目印に当たると考えている。頸腔分泌物中のIL6の量と切迫出産との関連は立証されていない。あらゆる事例において、対照患者から得た検体でIL6の量が変化し、時には高く検知されるという事実が、結果の解釈を困難にしている。

【0011】

本発明者は、患者の細胞免疫の局所的な活性化の研究に着手し、特に頸腔分泌物内に存在する特異的なサイトカインが、局所的に生産されるかどうかを決定するため、早期産の前兆を、危険性がない正常に妊娠している対照患者と比較した。特に、腔分泌物は、剥離した上皮細胞と白血球、および頸管ムチンと細菌に分泌される重合された糖タンパク質をも含む固体層、ならびに電解質、および漏出または分泌されたタンパク質(免疫グロブリン、糖タンパク質(サイトカイン)、アルブミンおよびラクトフェリン)も含む液層から構成される[BELECら,Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,2,57-61,(1995)]。

【0012】

この目的で、本発明者は、患者の2群の頸腔分泌物から得た細胞ペレット中のサイトカインIL6、IL8、IL10およびIL13のmRNAの存在をRT-PCRにて探索した。そ

の結果、IL8およびIL10のmRNAは、対照の患者（33.3%および16.7%）と早期産の前兆の危険性がある患者（40.3%および48.1%）の双方で検知されるが、他方、IL6とIL13のmRNAはそれぞれ患者の10.9%及び6.2%に存在し、但し対照群の患者では検知されなかったことが認められた。本発明者は、頸腔分泌物内でのIL6発現が早産（妊娠34週目以前の出産 $p=0.02$ ）および極端な早産（妊娠32週目以前の出産 $p=0.049$ ）と関連する目印であり、14日未満の期間内（ $p=0.001$ ）または7日未満の期間内（ $p=0.036$ ）ですら、切迫早期産の診断が可能であることも認めた。一方、IL8は母体感染および新生児感染と関連しているが、切迫出産とは関連していない。

【0013】

これらの結果、特に対照群の患者でIL6が存在しないことは、正常に妊娠している患者の事例を含む頸腔分泌物中でIL6が存在すると報告している従来技術の知見とは一致していないので、本発明者はこの不一致の理由を研究した。本発明者は、従来技術ではELISA型の免疫酵素アッセイ法を使用したためであろうと推測した。特に、腔分泌物は、複雑で比較的非均質な媒体を構成しており、特に検体の濁度から生ずる「バックグラウンドノイズ」はELISAアッセイに干渉する可能性がある。

【0014】

それゆえ、本発明者はELISA技術とは異なって、バックグラウンドノイズの問題に起因する干渉がない、固形支持体上での免疫検知法を用いた頸腔分泌物中でのIL6の探索を選択した。得られた結果は、患者の頸腔分泌物中のIL6の不在は早期産の前兆がないことを示し、およびIL6の存在と切迫出産とは関連していることを立証するものである。

【0015】

本発明者は、IL6の羊水から頸腔分泌物への通過を引き起こす胎盤膜の破損がない場合でさえも、IL6が頸腔分泌物内で検知されることも認めている。したがって、驚いたことに、切迫早期産の前兆と関連して、腔の粘膜および子宮頸管の白血球によって、IL6が局所的に生産することが認められた。これらの結果から、早期産および特に切迫早期産の危険性を予測するための新規な方法を提供する

ことができる。

【0016】

本発明の対象は、検査される患者から得た頸腔分泌物検体中で、IL6の発現が存在するかまたは存在しないかを検知することからなることを特徴とする、切迫早期産の予知方法である。従来、頸腔分泌物は外頸および後部円蓋で得られる。

【0017】

本発明によれば、頸腔分泌物中でIL6が存在するか、またはしないかの検知は、特に：

- IL6 mRNAを検知することによって、または
- IL6を直接的に検知することによって

行うことができる。

【0018】

IL6 mRNAの検知は、IL6をエンコードする配列に特異的なオリゴヌクレオチド、例えば頸腔分泌物の遠心分離によって得た細胞ペレットから抽出したmRNAを用いて、従来の分子生物学的な方法で行うことができる。有利には、逆転写後、IL6 mRNAの特異的な増幅を含む検知方法が選択されるであろう。

【0019】

IL6の直接的な検知は、特に免疫検知によって、好ましくは頸腔分泌物の遠心分離からの上清を用いて行うことができる。従来技術で記載されるELISA型の免疫酵素アッセイ技術は、先に記載したバックグラウンドノイズの理由から、信頼できる検知とは認められない。

【0020】

免疫クロマトグラフィーによる固形支持体上での検知技術が、それゆえ選択されるであろう。それ自体公知の一般的な原理は、次のようなものである：

【0021】

検知される分析物を含むと思われる検体を、分析物に対して割り当て、そして（一般に着色された微粒子を用いて）ラベルした一次抗体（暴露抗体(revealing antibody)）と接触させる。このようにして形成した混合物を、分析物に対しても割り当てられる二次抗体（捕獲抗体(capture antibody)）が付着するクロマト

グラフィーの支持体上に沈積させる。分析物が検体中に存在すれば、分析物/ラベルした暴露抗体複合体は、捕獲抗体と二次複合体を形成することにより、その移動が停止する部分で検知される。

【0022】

本発明を実施するためには、IL6分子の異なるエピトープを認識する2つの抗-IL6抗体が、各々暴露抗体および捕獲抗体として選択されるであろう。特に最も適した抗体は、BesanconのCENTER NATIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE[France輸血センター]およびBIOTEST PHARMA GMBHの名前で、ヨーロッパ出願0 043 193号に記載されているモノクローナル抗体BE-4 (C.N.C.M I-911)、BF-6 (C.N.C.M I-912) およびBE-8 (C.N.C.M I-913) から選択される。有利には、BE-8抗体が捕獲抗体として選択され、BE-4抗体が暴露抗体として選択されるであろう。

【0023】

暴露抗体のラベル化およびクロマトグラフィー支持体への捕獲抗体の付着は、当業者にそれ自体公知の方法に従って行われる。

【0024】

例えば、暴露抗体は、着色したゼラチンの微粒子、リポソーム、金属の微粒子、特にコロイド状の金などでラベルされてもよい。

【0025】

本発明に関連して、免疫クロマトグラフィーによる先に記載の検知における、様々な変形および様々な改良型が使用されてもよい。例えば免疫クロマトグラフィーでの検知では、市販されており、所定の分析物を検知するために選択される抗体と組合せできる、用時調整型装置を使用することができる。一般に、これらの装置は、捕獲抗体が付着できるクロマトグラフィー支持体（例えばニトロセルロース膜）および解析される検体を受ける沈着領域；捕獲抗体が付着する領域と沈着領域の間であって、後着に隣接している、ラベルされた暴露抗体を受ける領域からなる小さなスリップの形態である。捕獲抗体をクロマトグラフィー支持体へ付着させ、そして、それを受ける領域を暴露抗体で飽和した後、装置は解析に使われるように準備される。このことは、この目的のために提供される領域上で、解析される検体を沈積させることで容易に行われる。分析物/暴露抗体複合体

の形成は、検体がこの暴露抗体で飽和した領域を通過して移動する時に起こりえる；そしてこの複合体は、クロマトグラフィー支持体を洗浄した後、捕獲抗体が付着した着色したバンドの形態で目視で検知される。検知は、このようにして数分で行うことができる。

【0026】

上記の方法に従った、免疫クロマトグラフィーによるIL6の検知は、特に危険な状態の患者のモニタリングに適した本発明を具体化したものに相当し、かさ高く高価な装置を必要としないため、患者の枕もとで、医師または治療関係者によって簡単に行うことができ、そして素早く応答を得ることが可能であり、そのため切迫出産が予知される場合には必要な処置をすることができる。

【0027】

上の組合せ以外に、本発明は本発明の対象である方法の実施例を言及する次に挙げる説明から明らかになるであろう他の組み合わせも含む。しかし、これらの実施例が本発明の対象の例示としてのみ示されるものであり、決して本発明に制限を加えるものではないことは明確に理解されるべきである。

【0028】

実施例1：早期産の前兆がある患者の頸膈分泌物中の炎症性サイトカインmRNAの発現

A-材料と方法

1-調査される個体群の説明

調査される個体群は、Maternite Port Royal [Port Royal Maternity Hospital] (Paris) に入院している無月経13～35週目(WA)の早期産の前兆が認められる307人の患者から成る。対照群は、早期産の前兆がない30人の妊婦(3ヶ月を超える)で構成される。

封入規準 (inclusion criteria) は、臨床および超音波試験に従って定義される。

これらの患者のうち、258人(84%)が無傷な膜を有している。

【0029】

2-調査される個体群の分娩特徴

- 検体採取日から出産日までの期間、
- 早産(無月経32週目未満(極端な早産)または無月経34週目未満(早産))

を決定するため、これらの患者は出産に至るまでモニタリングした。

調査した個体群において、患者の30.9%が入院後早々に出産し(34WA以下)、10.7%が7日以内に出産した。18.9%が、入院から14日以内に出産した。

【0030】

3-頸腔検体採取

頸腔分泌物は、フォームチップのついた滅菌したプラスチック採取ピペットを使って、外頸および後部円蓋を吸引することにより収集した。肉眼で見て出血している検体は、この段階で除外した。細胞を1500rpm/5分で遠心分離し、PBSバッファーにて2回洗浄した。上皮細胞および白血球を、マラセジア細胞上で数えた。そして細胞ペレットを、総RNAを抽出する目的で、500 μ lのTRI-REAGENTに(EUROMEDEX, Souffelmeierheim, France)に再懸濁した。

【0031】

4-総RNAの抽出および逆転写

腔分泌物細胞の総RNAを、グアニジンイソチシアナート-フェノール手法によって抽出し、そして、ゲノムDNAの全残渣を取り除くためにDNaseI (BOEHRINGER MANNHEIM, Meylan, France)で処理した。最終量40 μ l中、6IUの逆転写酵素(PROMEGA, Charbonnieres, France)存在下で、3 μ gのRNAを42 $^{\circ}$ C、2時間でcDNAに転写した。

【0032】

5-PCR

次に、100ngのcDNAを2IUのTag DNAポリメラーゼ(ATGC, Noisy le Grand)およびヒトアクチンに、IL6に、IL8に、IL10にまたはIL13に特異的なオリゴヌクレオチドの存在下で、PCRにて増幅した。94 $^{\circ}$ Cで5分の初期変性および57 $^{\circ}$ Cで3分のハイブリダイゼーションの後、35回の増幅サイクルを次の条件下(伸長: 72 $^{\circ}$ Cで30秒、変性: 94 $^{\circ}$ Cで30秒およびハイブリダイゼーション: 57 $^{\circ}$ Cで30秒)で行い、次いで72 $^{\circ}$ Cで7分伸長させ、そして生産物を4 $^{\circ}$ Cで維持した。

ポジティブな検体については、既知コピー数の競合血漿(IL6に対してはPQA1ま

たはアクチンに対してはPQB2)を用いて、メッセンジャーRNAを競合PCRにて定量する。エチジウムブロマイドの存在下で2%アガロースゲル電気泳動にて生産物を分画した後、ゲルを写真に撮り、バンドの強度を濃度計(Vilbert-Loumat、Marne la Vallee、France)を使って測定する。

【0033】

6-母親および子供の感染調査

母親の感染は、温度、尿、血清CRP、完全血液計数(complete blood count) (白血球増加)および膣検体の細胞細菌学的な試験を基にして評価する。新生児の感染は、発熱、血清CRP、完全血液計数および細菌学的な調査のためのオリフィスで得られる検体を基にして評価する。

【0034】

7-炎症パラメータ (CRPおよび総フィブロンクチン)のアッセイ

血清CRPはを比濁計にて評価し、胎児のフィブロンクチンを、従来の免疫酵素手法(ELISA)を使い、市販のキットにて頸腔内で定量する。

【0035】

8-統計解析

頸腔分泌物サイトカインの早産と、検体採取日から出産日までの期間との関連性は、多重回帰によって行った。群間の違いは、²検定およびフィッシャー正確(Fischer's exact)検定を使って決定した。

【0036】

B-結果

1-早期産の前兆に特異的な目印の実証

サイトカインIL6、IL8、IL10およびIL13の生産物は、早期産の前兆の危険性がある129人の患者、および早期産の前兆の危険性がない30人の対照患者の膣分泌物中で、RT-PCRにて解析した。これら2群の検体中で、これらサイトカインが存在するか存在しないかを決定し、得られた結果を百分率として、下の表1に示す。

【表1】

| | 早期産の前兆 | 対照 |
|------|--------|------|
| IL6 | 10.9 | 0 |
| IL8 | 40.3 | 33.3 |
| IL10 | 48.1 | 16.7 |
| IL13 | 6.2 | 0 |

これらの結果は、IL6およびIL13が早期産の前兆に特異的なサイトカインであり、それらは診断に使用されえることを示している。

IL13を用いてRT-PCRによって認められたシグナルがIL6で認められたシグナルよりはるかに弱かったため、それゆえIL6を、より感度が高く、そのため、診断での利用上、潜在的により有利な目印として選択した。IL6のメッセンジャーの数は定量PCRにて決定した。ポジティブ検体当たり平均230000のコピー数が観察された。それは、アクチンと比べて100～1000倍のコピーに相当する。

【0037】

2-種々のサイトカインの早期産との関連

結果を、下の表2に示す；著しい関連性は、それらの有意閾値とともに太字で示している。

【表2】

| サイトカイン | < 無月経 32 週目 | 無月経 32 週目 < < 34 週目 | > 無月経 34 週目 |
|--------|------------------------|------------------------|----------------|
| IL6 | 31.1% (p=0.001) | 26.3% (p=0.001) | 4.25% |
| IL8 | 75.4% (p=0.004) | 64.2% | 56.6% |
| IL10 | 73.7% (p=0.029) | 48.7% | 60.4% |
| IL13 | 14.75% | 18.9% | 17.9% |

結果は、頸腔分泌物内のIL6、IL8およびIL10の存在と極端な早産(32WA未満)との著しい関連性を示している。一方、IL6のみの存在は極端な早期産(32WA未満)および早期産(34WA未満)の両方と関連している。

【0038】

3-サイトカインと、入院7日目または14日目以内の出産との関連

結果を下の表3に示す；著しい関連性は、それらの有意閾値とともに太字で示している。

【表3】

| サイトカイン | < 7 日 | 7 日 < < 14 日 | > 14 日 |
|--------|------------------------|------------------------|--------|
| IL6 | 33.3% (p=0.001) | 39.7% (p=0.001) | 4.4% |
| IL8 | 81.2% (p=0.005) | 75.8% (p=0.004) | 55% |
| IL10 | 72.7% | 68.9% | 59.8% |
| IL13 | 21.2% | 18.97% | 18.1% |

結果は、頸腔分泌物中のIL6の存在と、入院後7日目または14日目以内の出産との著しい関連性を示している。

加えて、無傷な膜を有する258人の患者の個体群では、頸腔分泌物中のIL6の存在は14日未満(p=0.003)の出産期間と著しく関連している。

それゆえ、これら全ての結果は、早期産の前兆の危険性がある患者の頸腔分泌物中でのRT-PCTによるIL6 mRNAの検知は、切迫早期産[7日未満 (p=0.001) ; 14日未満(p=0.001)]を予知するための確実な方法となることを実証している。

【0039】

実施例2：早期産の診断のための、免疫クロマトグラフィーによるIL6の検知

A-材料と方法

1-免疫クロマトグラフィー装置の調製

GELMAN SCIENCESが販売している免疫クロマトグラフィー装置を使った。クロマトグラフィー支持体は、ポリエーテルスルホンで作られた膜から成り、従来使われているニトロセルロースよりも耐性が高く、より優れた検知感度を示す。

試薬リスト

- 膜(PREDATOR、PALL Gelman Sciences)
- グラスウール(PALL Gelman Sciences)
- 吸収紙(PALL Gelman Sciences)
- 暴露抗体(BE-4、C.N.C.M.I-911)
- 捕獲抗体(BE-8、C.N.C.N.I-913)

- ヤギ抗-マウスIgG抗体(対照)
- クエン酸ナトリウム
- ホウ砂バッファー(20mMまたは2mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、pH9.3)
- BSA
- Tween 20

【0040】

2-暴露抗体(コロイド状金に結合した抗体)の調製

a-コロイド状金の調製

溶液を、500mlのエrlenmeyerフラスコに調製する。4mlの1%金コロイド溶液を200mlの沸騰している蒸留水に加える。そして、12mlの1%クエン酸ナトリウム溶液を強く攪拌しながら加える。得られた溶液を、ワインと似た色が得られるまで(約3分)、再び加熱して沸騰させる。そして、溶液を暗所で環境温度に保管する。

b-コロイド状金に結合した抗体(暴露抗体)の調製

BE-4抗体を一晩蒸留水に透析し、そして、そのタンパク質含量を評価し、-80で保管する。

c-コロイド状金に対する抗体の結合

そして、BE-4抗体25 μg および20mM BORAXバッファー100 μl を1mlのコロイド状金に加える。得られた溶液を環境温度下で1時間保温する。1%BSAを含む20mM BORAXバッファー100 μl を加え、溶液を1500rpmで15分間遠心分離する。上清を取り除いた後、ペレットを0.1%BSAを含む2mM BORAXバッファー1mlに懸濁し、溶液を1500rpmで50分間遠心分離する。上清を取り除いた後、0.1% BSAを含む2mM BORAXバッファー250 μl 中にペレットを採取する。コロイド状金に結合した抗体を4で暗所で保管する。

【0041】

3-免疫クロマトグラフィー装置の組み立て

a-暴露抗体を含むガラスウールの調製

コロイド状金に結合したBE-4抗体250 μl を、1mlの100mMトリス塩酸バッファー、pH8.0 ; 0.5% BSA ; 0.1% Tween20および5%サッカロースに加える。

長方形のグラスウール (L : 20mm × W : 5mm) をコロイド状金に結合した抗体の溶液に浸し、そして58 のオープンで30分間乾燥させ、環境温度下、乾燥空気、減圧下で保管する。

b-装置の組み立て

2枚の長方形の吸収紙を切り抜く (L : 16mm × W : 4mm および L : 18mm × W : 4mm)。

膜の小さなスリップを切り抜き (L : 59mm × W : 25mm)、捕獲抗体 (BE-8) 8 μ l および対照抗体 (抗-マウス IgG) 8 μ l を 1mg/ml で膜に対して垂直に線上に沈積し、そして膜を乾燥器で乾燥させる。幅4mmの小さなスリップを切り取り、免疫クロマトグラフィー装置の様々な部品を製造取扱説明書に従って組み立てる。

【0042】

4-免疫クロマトグラフィーによる頸腔分泌物中のIL6の検知

調査された個体群、解析された臨床パラメータおよび頸腔分泌物検体を得る方法は、上記実施例1に記載されている。

分泌物を300 μ l の pH7.4 の PBS バッファーで希釈し、混合物を攪拌し、そして2500 rpm で5分間遠心分離する。200 μ l の上清を、本目的に供される免疫クロマトグラフィー装置の領域に沈積する。

60分間移動させる；膜を洗浄した後、捕獲抗体が付着した部位で茶色のバンドが出現するのは、検体中にIL6が存在することを示している。

【0043】

B-結果

IL6の存在は、実施例1の調査に含まれた早期産の前兆がある患者からの41検体で解析された。これらの患者のうち、37人は無傷の膜を有しており、4人は膜の破損を呈している。

膜の破損を呈している患者から得た4検体は、RT-PCRではネガティブな結果を、免疫クロマトグラフィーではポジティブな結果を示す。

これらの結果は、免疫クロマトグラフィーとRT-PCRとの間で95%の相関を示している。

膜が破損していない場合には、頸腔分泌物中でのIL6の検知において、免疫クロマトグラフィーは、RT-PCRと同程度の感度である。

この結果、本発明の免疫クロマトグラフィーによる頸腔分泌物中のIL6の検知方法は、RT-PCRによるIL6 mRNAの検知方法と同程度の感度である。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 01/01537

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12Q1/68 | | |
|---|---|---|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q | | |
| 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 practical, search terms used) EPD-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 5 516 702 A (SENYEI ANDREW E ET AL) 14 May 1996 (1996-05-14) the whole document --- | 1-8 |
| X | LOCKWOOD CHARLES J ET AL: "Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery." AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, vol. 171, no. 4, 1994, pages 1097-1102, XP000992995 ISSN: 0002-9378 cited in the application the whole document --- -/-- | 1-8 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but 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 | | *J* 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. *Z* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 7 August 2001 | | Date of mailing of the international search report 17/08/2001 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Pellegrini, P |

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/FR 01/01537 |
|---|

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | EP 0 754 946 A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD) 22 January 1997 (1997-01-22) the whole document --- | 1-8 |
| X | BEAZLEY D ET AL: "Cervico-vaginal IL-6 and latency in gravidas with preterm labor and pPROM." AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, vol. 178, no. 1 PART 2, January 1998 (1998-01), page S200 XP000992918 18th Annual Meeting of the Society of Perinatal Obstetricians; Miami Beach, Florida, USA; February 2-7, 1998 ISSN: 0002-9378 abstract --- | 1-8 |
| A | EP 0 430 193 A (BIOTEST PHARMA GMBH ;CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION (FR)) 5 June 1991 (1991-06-05) cited in the application the whole document ----- | 1-8 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01537

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 5516702 A | 14-05-1996 | CA 2121680 A | 13-05-1993 |
| | | DE 69231636 D | 15-02-2001 |
| | | DE 69231636 T | 23-05-2001 |
| | | EP 0642667 A | 15-03-1995 |
| | | JP 7500911 T | 26-01-1995 |
| | | WO 9309438 A | 13-05-1993 |
| EP 0754946 A | 22-01-1997 | CA 2187348 A | 19-10-1995 |
| | | JP 7325082 A | 12-12-1995 |
| | | WO 9527900 A | 19-10-1995 |
| | | US 6027908 A | 22-02-2000 |
| EP 0430193 A | 05-06-1991 | DE 3939706 C | 21-03-1991 |
| | | BR 9006128 A | 24-09-1991 |
| | | JP 3232485 A | 16-10-1991 |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 クラレ, エマニュエル
フランス、エフ - 25000 ブザンソン、シ
ュマン ド ラ セル、37

(72)発明者 トルブダン, エレーヌ
フランス、エフ - 92130 イシ - レ - ムリ
ノー、リュ デュ ジェネラル エブエ、
28

(72)発明者 ヴェルモ - デスロシュ, クロード
フランス、エフ - 25000 ブザンソン、リ
ュメルモ、4シー

(72)発明者 ヴェイル, ベルナール
フランス、エフ - 95600 オボンヌ、アレ
モシャン、7

(72)発明者 ヴィジュデーヌ, ジョン
フランス、エフ - 25720 ラルノール、シ
ュマン ド ラ グラット(番地なし)

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ53 QR08
QR48 QR62 QS16 QS25 QX01

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测IL-6用于早期生产的风险预测 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003533700A | 公开(公告)日 | 2003-11-11 |
| 申请号 | JP2001584889 | 申请日 | 2001-05-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 单威赛引用笛卡尔巴黎公约 | | |
| 申请(专利权)人(译) | RenéDescartes大学 - 巴黎公约 | | |
| [标]发明人 | バトーフレデリック クラレエマニュエル トルブダンエレーヌ ヴェルモデスロシュクロード ヴェイルベルナール ヴィジュデーヌジョン | | |
| 发明人 | バトー,フレデリック クラレ,エマニュエル トルブダン,エレーヌ ヴェルモ-デスロシュ,クロード ヴェイル,ベルナール ヴィジュデーヌ,ジョン | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6869 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.P C12Q1/68.A G01N33/543.501.A G01N33/577.B | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QX01 | | |
| 优先权 | 2000006359 2000-05-18 FR | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

通过检测宫颈阴道分泌物样品中IL6的存在或不存在，特别是通过PCT检测IL6 mRNA或通过免疫色谱法检测直接IL6，本发明是紧急的。它涉及预测早产的方法。

| | 早期産の前兆 | 対照 |
|------|--------|------|
| IL6 | 10.9 | 0 |
| IL8 | 40.3 | 33.3 |
| IL10 | 48.1 | 16.7 |
| IL13 | 6.2 | 0 |