

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-17449

(P2007-17449A)

(43) 公開日 平成19年1月25日(2007.1.25)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A D	4 B O 6 3
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531	B	
C 1 2 Q 1/37	(2006.01)	C 1 2 Q 1/37		

審査請求 有 請求項の数 31 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2006-244361 (P2006-244361)	(71) 出願人	599019694
(22) 出願日	平成18年9月8日 (2006.9.8)		エンファー テクノロジー リミテッド
(62) 分割の表示	特願2002-558019 (P2002-558019) の分割		ENFER TECHNOLOGY LIMITED
原出願日	平成14年1月18日 (2002.1.18)		アイルランド国 ダブリン 2, アール スフォート テラス, アールスフォート センター, ブロック エイ (番地なし)
(31) 優先権主張番号	S20010042		Block A, Earlsfort Centre, Earlsfort T errace, Dublin 2, I reland
(32) 優先日	平成13年1月19日 (2001.1.19)	(74) 代理人	100105647
(33) 優先権主張国	アイルランド (IE)		弁理士 小栗 昌平

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 伝達性の海綿状脳症

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】伝達性海綿状脳症 (TSE) を担う感染因子について動物、薬品、およびヒトを試験する方法を提供する。

【解決手段】TSEを検出する方法であって、(a)試験被験体からの組織、血液、または血液派生物のサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、(b)正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤を添加する工程、(c)異常なプリオンタンパク質を変性する薬剤を添加する工程、(d)プリオン特異的抗体を添加する工程、ならびに(e)サンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含する。また記載されるのは、異常なプリオンタンパク質を基質に固定する方法であり、(a)アルコールおよびアニオン性洗浄剤で異常なプリオンタンパク質を含むことが疑われるタンパク質またはサンプルを処理する工程、ならびに(b)基質の存在下で、プロテアーゼを添加する工程を包含する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TSEを検出する方法であって、(a)試験被験体からの組織、血液、または血液派生物のサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、(b)正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤を添加する工程、(c)異常なプリオンタンパク質を変性する薬剤を添加する工程、(d)プリオン特異的抗体を添加する工程、ならびに(e)サンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

異常なプリオンタンパク質を基質に固定する方法であって、(a)前記異常なプリオンタンパク質、または前記異常なプリオンタンパク質を含むことが疑われるサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、ならびに(b)その基質の存在下で、プロテアーゼを添加する工程を包含する、方法。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、ここで工程 (a) がさらにタンパク質を添加を包含する、方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、前記タンパク質が高分子量タンパク質、好ましくは、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、動物起源の正常な血清、Prionex (商標) のようなアルブミン基質、またはそれらの誘導体から選択される、方法。

【請求項 5】

請求項 3 または 4 に記載の方法であって、前記タンパク質が 5 % 以下の、好ましくは 0.05 ~ 0.4 % のタンパク質を含有する緩衝液中に処方される、方法。

20

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程 (a) において使用されるアルコールが、C₁ ~ C₂₄ のアルコール、好ましくは C₁ ~ C₅ アルコールである、方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、ここでアルコールが、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、ペンタデカノール、セチルアルコール、ヘプタデカノール、ステアリルアルコール、ノナデカノール、エイコサノール、ドカサノール、ドデシルアルコール、ラウリルアルコール、オクタデカノール、および一次、二次、および三次誘導体を含む、それぞれの誘導体、好ましくはメタノールまたはエタノールから選択される、アルコールである、方法。

30

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法であって、前記アルコールが 30 % (重量基準) 以下の、好ましくは 10 ~ 20、より好ましくは 8 ~ 12 % のアルコールを含有する緩衝液中に処方される、方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程 (a) のアニオン性洗浄剤が、ドデシル硫酸ナトリウム、サルコシル、ドデシル硫酸リチウム、コール酸、デオキシコール酸、Triton X-100、オクタン酸、Brij (商標) 35 溶液、N-セチル-N,N,N-トリメチル臭化アンモニウム、CHAPS、CHAPSO、ジギトニン、ノナノイル-N-メチルグルクアミド、n-オクチル-B-D-グルコピラノシド、アルキル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、1,2,3-オクタントリオール, 3-ジメチルアミノ-1プロピン、コンドロイチナーゼABC、ナトリウムInophore 1、およびそれぞれの誘導体、最も好ましくはドデシル硫酸ナトリウムから選択される、方法。

40

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法であって、前記洗浄剤が 5 ~ 30 %、より好まし

50

くは10～20%の洗浄剤を含有する緩衝液中に処方される、方法。

【請求項11】

請求項1～10のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(b)において、正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤がプロテアーゼである、方法。

【請求項12】

請求項11に記載の方法であって、前記プロテアーゼが広い範囲のプロテアーゼ、好ましくはプロテイナーゼK、サブチリシン、カールスバーグ、ペプシン、およびそれぞれの誘導体から選択される、方法。

【請求項13】

請求項11に記載の方法であって、前記プロテアーゼが10mg/ml以下、好ましくは0.05mg/ml～4mg/ml、より好ましくは0.2mg/ml～0.6mg/mlのタンパク質を含有する緩衝液中に処方される、方法。 10

【請求項14】

請求項1～13のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(c)において異常なプリオンタンパク質を変性する薬剤が、変性化塩溶液である、方法。

【請求項15】

請求項14に記載の方法であって、前記薬剤がグアニジン、尿素、例えばMerck変性化溶液のような標準変性化溶液、およびそれぞれの誘導体から選択される、方法。

【請求項16】

請求項1～15のいずれかに記載の方法であって、前記変性化薬剤がさらに0.5M以下の水酸化ナトリウムを含む、方法。 20

【請求項17】

請求項1～16のいずれかに記載の方法であって、前記変性化塩が0.1～10M、好ましくは2～8M変性化塩を含有する緩衝液中に処方される、方法。

【請求項18】

請求項1～17のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(a)の緩衝液(ホモジナイズ緩衝液)が、5.0～11.0の最終pH、好ましくはpH7.0～9.0、より好ましくはpH7.5～8.5を有するように作製される、方法。

【請求項19】

請求項1～18のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(b)の緩衝液(特異的緩衝液)が、2.0～11.0の最終pH、好ましくはpH2.0～8.5、より好ましくは7.5～8.5に作製される、方法。 30

【請求項20】

請求項1～19のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(c)の緩衝液(アッセイ誘発緩衝液)が、1～14、好ましくは9～12、最も好ましくは少なくとも11のpHを有する、方法。

【請求項21】

請求項1～20のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(b)に続いて、反応混合物が、10%以下の、好ましくは4～6%の緩衝化溶液を含有する第1の洗浄緩衝液で洗浄される、方法。 40

【請求項22】

請求項1～21のいずれかに記載の方法であって、前記アッセイ誘発緩衝液が、約5～30分間、好ましくは10～20分間、反応混合物とともにインキュベートすることを許容される、方法。

【請求項23】

請求項1～22のいずれかに記載の方法であって、前記アッセイ誘発緩衝液での処理後に、5.0～11.0の最終pH、好ましくはpH7.0～8.0を有する第2の緩衝液で、混合物が洗浄される、方法。

【請求項24】

請求項21に記載の方法であって、前記第1の洗浄緩衝液が、塩化ナトリウム、塩化カ 50

ルシウム、塩化亜鉛を含む、方法。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の方法であって、前記第 2 の洗浄緩衝液が、0 ~ 5 % の Tween 20 の選択的な添加を伴う、リン酸緩衝化生理食塩水を含む、方法。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 25 のいずれかに記載の方法であって、前記血液または組織サンプルが支持体、適切にはマイクロタイタートレイ上に懸濁される、方法。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 26 のいずれかに記載の方法であって、ここでプリオン特異的抗体が、プリオン配列のアミノ酸番号 60 の 5' 側にあるプリオン配列に対して反応する、方法。

10

【請求項 28】

請求項 1 ~ 27 のいずれかに記載の試験方法であって、試験被験体から血液、または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物のサンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、前記抗体を添加する前に、組織、血液、または血液派生物のサンプルが、約 0.1 M (TRIS/HCL) またはリン酸緩衝液、最終 pH 7.0 ~ 9.0 を有する緩衝液中の用量に対して作製される、0 ~ 30 % の C₁ ~ C₅ アルコール、5 ~ 30 % のドデシル硫酸ナトリウム、または 5 ~ 30 % のドデシル硫酸ナトリウムおよび 0 ~ 5 % サルコシル、ならびに 0 ~ 5 % ウシ血清アルブミンを含有する第 1 の緩衝液とともに混合される、試験方法。

20

【請求項 29】

伝達性海綿状脳症のための試験方法であって、試験被験体からの血液、または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、ならびに標準的なイムノアッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、血液または組織サンプルは、不活性な支持体上に分注され、そして抗体との反応の前に、2.0 ~ 11.0、好ましくは 2.0 ~ 8.5、より好ましくは 7.5 ~ 8.5 の最終 pH を伴う緩衝液中に 10 mg/ml 以下の、好ましくは 0.05 mg/ml ~ 4 mg/ml の、より好ましくは 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml の、広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する緩衝液とともにインキュベートされる、試験方法。

30

【請求項 30】

伝達性海綿状脳症のための試験方法であって、試験被験体から血液、血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物のサンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的なイムノアッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、サンプルは、抗体との反応の前に、室温にて、少なくとも pH 11 で、逆浸透圧蒸留水中で作製される、0.1 ~ 10 M 変性化溶液、好ましくは 3 ~ 6 M、より好ましくは 0.5 ~ 3 M グアニジン (選択的範囲は 2 ~ 4 M) または 2 ~ 8 M 尿素 (選択的範囲は 4 ~ 6 M)、および 0.5 M 以下の、好ましくは 0.1 ~ 0.2 M 水酸化ナトリウムを含有する緩衝液とともにインキュベートされる、試験方法。

【請求項 31】

(1) 5.0 ~ 11.0 (選択的範囲は 7.5 ~ 8.5) の最終 pH を有する緩衝液中の容量に対して作製される、0 ~ 30 % の C₁ ~ C_{2,4} アルコール (選択的範囲は 10 ~ 20 %)、5 ~ 30 % 洗浄剤 (選択的範囲は 10 ~ 20 %)、および 0 ~ 5 % プロテイナーゼ (選択的範囲は 0.05 ~ 0.4 %);

40

(2) 2.0 ~ 11.0 (選択的範囲は 2.0 ~ 8.5) の最終 pH を有する緩衝液中の 0.05 mg/ml ~ 4 mg/ml (選択的範囲は 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml) のプロテアーゼ酵素;

(3) 0.1 ~ 10 M 変性化溶液 (選択的範囲は 2 ~ 8 M)

から選択される緩衝液。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、伝達性海綿状脳症を検出する方法に関し、および特にTSEを同定するために、生存するまたは死亡した動物またはヒトに対して行われ得る試験に関する。

【背景技術】

【0002】

海綿状脳症は、退行性神経学的疾患の1つの群である。BSE(ウシ海綿状脳症)、スクレイピー(Scrapie)、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン-シエトロイスラー-シャインカー疾病、クールー(Kuru)、伝達性ミンク脳症、シカの慢性疲労性症候群、猫海綿状脳症、およびヘラシカ、naya、より大きなシマカモシカ、ゲムスポック、およびトラのような動物において見出される他の海綿状脳症を含む海綿状脳症の多くの例がある。BSEが、実験室条件下で、マウスおよびブタに伝達され得ることがまた報告されている。感染因子による種の境界のこの交差は、ヒトへの移行が生じ得るといふ益々の懸念を導いた。

10

【0003】

ウシ海綿状脳症(BSE)は、「狂牛病」として一般に知られる牛の脳異常である。これは4または5年間までの、ゆっくりした潜伏期間を有し、ウシにおいて、協調性の喪失および千鳥足、それらの周囲への興味の喪失、食餌および水への無関心を含む、精神状態の漸進性退行の症状、または攻撃を含む予測できない挙動を伴う。罹患されたウシはそれらが3~10歳である場合に症状を示す。

20

【0004】

1986年11月、英国において最初に同定され、10,000を超える症例がそれ以来報告された。罹患されたウシの検死は、神経細胞の破壊に起因する脳組織における空胞形成の特徴的なパターン、および異常なタンパク質繊維の沈着を示し、これは脳をスポンジ(海綿状)組織にする。類似の疾患が、100年にわたってヒトにおいて(例えば、クロイツフェルト-ヤコブ病あるいは(CJD))、および200年にわたってヒツジにおいて報告されている。伝達性の海綿状脳症を担うと考えられる因子は、プリオンとして知られる感染性タンパク質である。プリオンは感染性粒子であり、タンパク質のみを含み、および核酸は何ら含まない感染性粒子であり、核酸の存在は、従来ウイルスの症例において必要とされる。スクレイピーにおいて、特にプリオンタンパク質またはPrP^{Sc}として知られる1つのタンパク質が、感染力を伴って精製されることが見出され、そして実験室条件下でハムスターのような他の動物からの脳細胞クラスターにおいてスクレイピー様状態を生じ得る。PrP^{Sc}はスクレイピーが感染されたヒツジの脳組織において沈着される特徴的なタンパク質繊維の唯一知られる成分である。このタンパク質、PrP^{Sc}は、構造的改変を受けるようであるが、用語PrP^{Sc}は、PrP^{Sc}の通常細胞対応物に関して使用される。PrP^{Sc}の天然の機能は知られていないが、器官において必要不可欠な構造または機能的な役割を有するようである。

30

【0005】

再利用される動物組織は、タンパク質補足物質としてウシに日常的に給餌されており、感染源として同定された。BSEは元来、スクレイピーで感染されたヒツジ脳から伝播されたこと、そしてその伝播がBSEで感染されたウシから採集された脳組織の摂取によっ

40

【0006】

てはからずも加速されたと考えられる。それゆえ、英国政府は、1988年の初頭から、疑わしい動物およびそれらの屠体の強制的な破棄を導入した。ウシに対する動物組織の給餌は1988年6月、英国において禁止された。

クールー、関連性疾患が、ニューギニア部族民間の葬儀の際の人食い習慣によって伝播されることが知られるので、疾患の最初の報告以来、消費者は牛乳または牛製品を介してヒトに伝達されるかもしれないことを恐れた。1990年後半、ヒトへのBSEの伝達を上回る消費者の懸念が、牛市場における崩壊を誘発した。類似の恐慌が1994年半ば、ドイツを襲った。

50

【 0 0 0 7 】

1996年、致死性CJD（異型CJD）の新しく記載されるタイプの10症例が同定された。罹患者は、異なる脳組織徴候を有し、全て42歳以下であり、および疾患の遺伝的記録を何ら有しなかった。疑わしい動物の根絶が効果を有する前に、罹患者はBSE感染されたウシとの接触を介して疾患と接触し得ることが提案された。異型CJDの同定は、英国において、牛消費の劇的な暴落に、ならびに世界中の種々の国において、英国のおよびいくつかの例においてアイルランドの牛輸入の禁止に導く。

【 0 0 0 8 】

それゆえ、獣医学的および経済学的な両方の理由のために、生存ストック、動物屍体、および食肉において一般的に、ならびに薬品およびヒトにおいて、BSE、スクレイパー、異型CJD、および他の関連性の海綿状脳症での感染を診断するための方法、および検出するための診断キットを提供する緊急の必要性がある。

10

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

発明の目的

従って、本発明の目的は、TSEを担う感染因子について動物、薬品、およびヒトを試験する方法を提供することである。血液または血液由来の物質および固体組織の両方において使用され得る複数組織の試験系を提供することはまた目的である。方法が迅速であり、結果が数時間で利用可能であること、これが安価で、信頼性があり、および使用者に親しみがあるべきであることは、本発明のさらなる目的である。

20

【 0 0 1 0 】

今回まで、血液または血液派生物に対して行われ得るTSEを検出する方法は何らなかった。今まで、動物がTSEを被るか否か、ヒトが関連性の疾患を被るか否かを検出する唯一の方法は、脳組織の病理学的な検死試験を行うことであった。従って、血液に対して行われ得る試験は、これが生存する動物またはヒトに対して行われ得るという莫大な利点を有する。このことは、集団中の他の動物への感染の伝播を防ぐ試みにおいて、感染された動物が集団から除去され得、そして屠殺され得るという可能性を生じる。これはまた、感染されたヒトが同定され得ることを意味し、医薬処置が導入され得、そして疾患についての可能性のある治癒が見出され得るという可能性を伴う。試験はまた、ヒト食物連鎖への感染された食肉の介入を防ぎ、従って、ヒトが、異型CJDまたは感染された食肉の摂食によって伝達され得る他の関連性の疾患を請け負う可能性を減少する。これはまた、食肉または食肉由来の製品における消費者信頼を回復し、これは概して農業社会および食肉産業の両方に対して有利である。

30

【 0 0 1 1 】

TSEについての試験が血液または血液由来の産物に対して行われ得ることが驚くべき事に今や見出された。試験は、これがまた固体組織サンプルに対して行われ得るという利点を有する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、TSEを検出する方法が提供され、(a)試験被験体からの組織、血液、または血液派生物のサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、(b)正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤を添加する工程、(c)異常なプリオンタンパク質を変性する薬剤を添加する工程、(d)プリオン特異的抗体を添加する工程、ならびに(e)サンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含する。

40

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、異常なプリオンタンパク質を基質に固定する方法を提供し、(a)前記異常なプリオンタンパク質、または前記異常なプリオンタンパク質を含むことが疑われるサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、ならびに(b)その基質の存在下で、プロテアーゼを添加する工程を包含する。

50

【0014】

工程(a)はさらにタンパク質、好ましくは、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、動物起源の正常な血清、Prionex(商標)のようなアルブミン基質、またはそれらの誘導体などのような高分子量タンパク質の添加を包含し得る。タンパク質は、5%以下の、好ましくは0.05~0.4%タンパク質を含有する緩衝液中に処方され得る。

【0015】

好ましくは工程(a)において使用されるアルコールは、 $C_1 \sim C_{24}$ アルコール、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、テトラデカノール、ペンタデカノール、セチルアルコール、ヘプタデカノール、ステアシルアルコール、ノナデカノール、エイコサノール、ドカサノール、ドデシルアルコール、ラウリルアルコール、オクタデカノール、および一次、二次、および三次誘導体を含む、それぞれの誘導体などである。より好ましくはアルコールは、 $C_1 \sim C_5$ アルコールであり、最も好ましくは、メタノール/エタノールである。アルコールは、30%(重量基準)以下の、好ましくは10~20%、より好ましくは8~12%アルコールを含有する緩衝液中に処方され得る。

10

【0016】

好ましくは工程(a)の洗浄剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、サルコシル、ドデシル硫酸リチウム、コール酸、デオキシコール酸、Triton X-100、オクタン酸、Brj(商標)35溶液、N-セチル-N,N,N-トリメチル臭化アンモニウム、CHAPS(3-[-(コールアミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-プロパン-スルホネート)、CHAPSO(3-[-(コールアミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-ヒドロキシプロパン-スルホネート)、ジギトニン、ノナノイル-N-メチルグルクアミド、n-オクチル-B-D-グルコピラノシド、アルキル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハクサンナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、1,2,3-オクタントリオール、3-ジメチルアミノ-1プロピン、コンドロイチナーゼABC(Flukaから入手可能)、ナトリウムInophore 1(Flukaから入手可能)、およびそれぞれの誘導体など、最も好ましくはドデシル硫酸ナトリウムから選択される。洗浄剤は、5~30%、より好ましくは10~20%の洗浄剤を含有する緩衝液中に処方される。洗浄剤はアニオン性洗浄剤であり得る。

20

30

【0017】

工程(b)において、正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤は適切にはプロテアーゼ、適切には広い範囲のプロテアーゼであり得る。好ましくはプロテアーゼは、プロテイナーゼK、サブチリシンCarlsberg、ペプシン、およびそれぞれの誘導体などから選択される。プロテアーゼは、10mg/ml以下の、好ましくは0.05mg/ml~4mg/ml、より好ましくは0.2mg/ml~0.6mg/mlタンパク質を含有する緩衝液中に処方され得る。

【0018】

好ましくは、工程(c)において異常なプリオンタンパク質を分解する薬剤は、変性化塩溶液である。適切には、薬剤は、グアニジン、尿素、標準変性化溶液、例えば、Merck変性化溶液(Merckから市販される)、およびそれぞれの誘導体などから選択される。特に好ましい実施態様において、変性化剤はさらに0.5M以下の水酸化ナトリウムを含み得る。変性化塩は、0.1~10M、好ましくは2~8M変性化塩を含有する緩衝液中に処方され得る。

40

【0019】

工程(a)の緩衝液(ホモジナイズ緩衝液)は、5.0~11.0の最終pH、好ましくはpH7.0~9.0、より好ましくはpH7.5~8.5を有するように作製され得る。工程(b)の緩衝液(特異的緩衝液)は、2.0~11.0の最終pH、好ましくはpH2.0~8.5、より好ましくは7.5~8.5に作製され得る。工程(c)の緩衝液(アッセイ誘発緩衝液)は、1~14のpH、好ましくはpH9~12、最も好ましく

50

は少なくとも 11 を有するのがよい。

【0020】

好ましくは、工程 (b) に続いて、反応混合物は、蒸留水、または 10% 以下の、好ましくは 4 ~ 6% の緩衝化溶液を含有する第 1 の洗浄緩衝液で洗浄される。

【0021】

アッセイ誘発緩衝液は、約 5 ~ 30 分間、好ましくは 10 ~ 20 分間、反応混合物とともにインキュベートすることを許容される。適切には、混合物は次いで、5.0 ~ 11.0 の最終 pH、好ましくは pH 7.0 ~ 8.0 を有する第 2 の洗浄緩衝液で洗浄される。

【0022】

第 1 の洗浄緩衝液は、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化亜鉛などを含み得る。第 2 の洗浄緩衝液は、0 ~ 5% の Tween 20 などの任意の添加を伴う、リン酸緩衝化生理食塩水などを含む。

10

【0023】

好ましくは、血液または組織サンプルは、支持体、適切にはマイクロタイタートレイ上に分注され、次いで好ましくは、さらなるプロセッシングのためにサンプルを澄清化または「洗浄」するために作用する遠心分離工程に任意に供され得る。

【0024】

プリオン特異的抗体は、プリオン配列のアミノ酸番号 60 の 3' 側にあるプリオン配列に対して反応する。

【0025】

20

プリオン特異的抗体は、適切には、以下のプリオンペプチドに対して結合する。：

- プリオン配列 N-末端

M V K S H I G S W I L V L F V V A M W S D V G L C K K R P K P G G G W N T G G S
R Y P G Q - 4 4

G S P G G N R Y P P Q G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W
G Q P - 8 7

G G G G W G Q G G S H S Q W N K P S K P P K T N M K H V A G A A A A G A V V G G
L G G Y - 1 3 1

M L G S A M S S P L I H F G N D Y E D R Y Y T R E N M Y R Y P N Q V Y Y R P V D
R Y S Q N N - 1 7 7

30

【0026】

ここで、1文字アミノ酸コードが本明細書中で規定され、ならびに、誘導体および配列のフラグメント (当業者によって十分に理解されるような D 異性体アミノ酸を含み得るものを含む)、アミノ酸の置換、欠失、挿入によるこの配列の修飾は、同じ活性を伴うペプチドを生じ得る。

【0027】

血液サンプルは全血サンプルであり得るか、または血清サンプル、または白血球もしくはリンパ球を含む軟膜調製物のような血液由来のサンプルであり得るかのいずれかである。試験が、固体組織サンプルに対して使用される場合、約 0.3 ~ 1.5 g のサンプルが使用される。

40

【0028】

適切には、血液または組織サンプルはホモジナイズされる。血液サンプルがゼラチン状である場合、酵素分解工程が含まれ得る。酵素分解工程は、DNアーゼ、RNアーゼ、プロテアーゼ、またはリパーゼの添加を包含し得る。

【0029】

プリオン特異的抗体は、任意の種における多様な種特異的プリオン配列に対して惹起され得る。抗体は、例えば、ウサギにおいて惹起され得、そして免疫アッセイは二次抗体、適切には西洋ワサビペルオキシダーゼと結合されたヤギ (種) 抗ウサギ抗体の使用を包含し得る。

【0030】

50

欠失法は適切には、増強された化学発光アッセイであるが、比色検出、蛍光検出、または放射免疫アッセイ検出がまた使用され得る。

【0031】

特に好ましい実施態様において、伝達性の海綿状脳症についての試験が提供され、試験被験体からの血液または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、ここでは組織、血液、または血液誘導体サンプルは、抗体の添加の前に、約0.1M TRIS/HCLまたはリン酸緩衝液中の容量に対して作製される0~30%のC₁~C₅アルコール、5~30%ドデシル硫酸ナトリウム、または5~30%ドデシル硫酸ナトリウムおよび0~5%サルコシル、および0~5%ウシ血清アルブミンを含有する第1の緩衝液と混合され、緩衝液は、7.0~9.0の最終pHを有する。

10

【0032】

好ましくは、血液または組織サンプルは、支持体、より好ましくは不活性なプラスチック支持体上に、適切にはマイクロタイタートレイ上に懸濁され、そして7.5~8.5の最終pHを有する約0.1M TRIS/HCLまたはリン酸緩衝液中に1~10mg/mlの広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する第2の緩衝液が添加される。緩衝液は適切には5分の1に希釈されて、0.2mg/ml~2mg/mlの作用強度を与える。次いで、サンプルは、好ましくは10~180分間、約37~70にて、より好ましくは60にてインキュベートされる。

20

【0033】

インキュベーション後、支持体は適切には、0~10%塩溶液を含有する第1の洗浄緩衝液のある容量で洗浄される。好ましくは、室温にて少なくとも11のpHを有する、逆浸透蒸留水中で作製される0.5~3Mグアニジン、または2~8M尿素のいずれか、および0.1~0.2M水酸化ナトリウムを含有する第3の緩衝液が、支持体に添加される。適切には、支持体および第3の緩衝液は、約15分間のインキュベーションを許容され、そして0.1Mリン酸緩衝化生理食塩水および0.5%Tween 20(商標)を含有する洗浄緩衝液で洗浄される。

【0034】

次いでサンプル調製物は完成し、そして免疫アッセイに備える。

30

【0035】

本発明はまた、伝達性の海綿状脳症についての試験を提供し、試験被験体からの血液または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルへの抗体の結合を検出する工程を包含し、ここでは血液または組織のサンプルは、不活性な支持体上に懸濁され、そして2.0~11.0の最終pH、好ましくはpH2.0~8.5、より好ましくは7.5~8.5を有する緩衝液中に10mg/ml以下の、好ましくは0.05mg/ml~4mg/ml、より好ましくは0.2mg/ml~0.6mg/mlの広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する緩衝液とともに、抗体との反応の前に、インキュベートされる。好ましくは不活性な支持体は、サンプルの懸濁後、およびプロテアーゼ(特異的緩衝液)の添加の前に遠心分離される。プロテアーゼは0.1M TRISまたはリン酸を含有する緩衝液中に処方され得る。

40

【0036】

本発明のさらなる局面は、伝達性の海綿状脳症についての試験を提供し、試験被験体からの血液または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルへの抗体の結合を検出する工程を包含し、ここではサンプルは、室温にて少なくとも11のpHを有する、逆浸透蒸留水中に作製される0.1~10M変性化溶液、好ましくは3~6M、より好ましくは0.5~3Mグアニジン(選択的範囲は2~4M)または2~8M尿素(選択的範囲は4~6M)、および0.5M以下の、好ましくは

50

0.1 ~ 0.2 M 水酸化ナトリウムを含有する緩衝液とともに、抗体との反応の前に、インキュベートされる。

【0037】

本発明はまた、以下から選択される緩衝液を提供する：

1. 5.0 ~ 11.0 (選択的範囲は7.5 ~ 8.5) の最終 pH を有する緩衝液中の容量に対して作製される、0 ~ 30% の C₁ ~ C₂₄ アルコール (選択的範囲は10 ~ 20、好ましくは8 ~ 12%)、5 ~ 30% 洗浄剤 (選択的範囲は10 ~ 20%)、および0 ~ 20% タンパク質 (選択的範囲は0.05 ~ 0.4%)。

2. 2.0 ~ 11.0 (選択的範囲は2.0 ~ 8.5) の最終 pH を有する緩衝液中の、0.05 mg/ml ~ 4 mg/ml (選択的範囲は0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml) のプロテアーゼ酵素を含む緩衝液。

3. 0.1 ~ 10 M 変性化溶液 (選択的範囲は2 ~ 8 M) を含有する緩衝液。

【0038】

全ての緩衝液は、Enfer Scientific Ltd によって製造および供給される。

【0039】

【表1】

ホモジナイズ緩衝液：

成分	作用範囲	選択濃度
メタノールまたはエタノール	0 ~ 30%	16%
ドデシル硫酸ナトリウム	5 ~ 30%	15%
ウシ血清アルブミン	0 ~ 5%	0.1%

【0040】

この緩衝液は必要とされる容量に作製され、0.1 M TRIS / HCL 緩衝液、8.0 ± 1 の最終 pH 中で攪拌する。

【0041】

【表2】

特異的緩衝液：

成分	作用範囲	選択濃度
プロテイナーゼK	0.05 ~ 4 mg/ml	0.4 mg/ml

【0042】

この緩衝液は、0.1 M TRIS / HCL 緩衝液、8.0 ± 1 の最終 pH 中で、必要とされる濃度に作製される。

【0043】

【表3】

アッセイ誘発緩衝液：

成分	作用範囲	選択濃度
グアニジン	0.5 ~ 6 M	3 M
水酸化ナトリウム	0 ~ 0.5 M	0.15 M

【0044】

10

20

30

40

【表 4】

OR

成分	作用範囲	選択濃度
尿素	2～8M	6M
水酸化ナトリウム	0～0.5M	0.15M

【0045】

この緩衝液は、逆浸透蒸留水中で必要とされる濃度に作製され、そして11よりも大きいべきであるpHを確認する前に室温に達せられる。

10

【0046】

【表 5】

洗浄緩衝液1:

成分	作用範囲	選択濃度
塩化ナトリウム	0～10%	5%

【0047】

この緩衝液は、逆浸透蒸留水中で必要とされる濃度に作製され、pHは無関係である。

20

【0048】

【表 6】

洗浄緩衝液2:

成分	作用範囲	選択濃度
リン酸緩衝化生理食塩水	0～5M	0.1M
Tween20	0～5%	0.5%

30

【0049】

この緩衝液は、逆浸透蒸留水中で必要とされる容量に作製され、 7.6 ± 1 のpHを有する。

【0050】

本発明はさらに以下から選択される緩衝液を提供する:

1. 0～20%のC₂～C₅アルコール、15～30%ドデシル硫酸ナトリウム、または5～30%ドデシル硫酸ナトリウムおよび0～5%サルコシル、0～0.5%ウシ血清アルブミン、約0.1M TRISまたはリン酸緩衝化生理食塩水中の容量に対して作製され、緩衝液は7.0～9.0の最終pHを有する;
2. 7.5～8.5の最終pHを有する、約0.1M TRISまたはリン酸緩衝液中に1～10mg/mlの広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する緩衝液;
3. 室温にて少なくとも11のpHを有する、逆浸透蒸留水中に作製される、0.5～3Mグアニジンまたは2～8M尿素有ずれか、および0.1～0.2M水酸化ナトリウムを含有する緩衝液。

40

【実施例 1】

【0051】

本発明は今や、以下の実施例を参照してより詳細に記載される。

TSE免疫アッセイについての要件は以下のものである:

- a) 固体組織、血液、または血液由来の調製物のサンプル。

50

b) 一連の調製用サンプルの処理物

c) プリオン特異的抗体

d) 検出の感度の高い方法

a) 血液のサンプルは、抗凝固薬でコート化された管またはコードされていない血管のいずれかを使用して採取される。2つの選択肢が試験について利用可能である：

i) 全血サンプル

ii) 血液由来のサンプル-血清サンプルまたは軟膜（白血球、リンパ球など）調製物。

【0052】

固体組織のサンプルは、適切な方法、例えばバイオプシーまたは切開によって、動物またはヒトから採取される。

【0053】

b) 実験室に届くと、サンプルはバーコードを使用して同定される。各サンプルに割り当てられたバーコードは、サンプルの起源の場所（屠殺設備、診療所、病院）、サンプルが採取された日付、および追跡可能な識別サンプル番号に対する情報を組込む。各サンプルのある量が、取出され、秤量され、そしてホモジナイズ（消化、超音波処理、またはボルテックス）のためにサンプルボトル/チューブ/ストマッカーバッグに置かれる。サンプルが特にゼラチン状である場合、酵素分解工程-供給社の指示に従って使用されるDNアーゼ、RNアーゼ、プロテアーゼ、またはリパーゼの添加が包含され得る。ホモジナイズされた元来のサンプルを含有するこのサンプルボトルまたはバッグは、元来のサンプルに同一のバーコードを割り当てられる。このことは、システムにわたる十分な追跡可能性を可能にする。ホモジナイズ緩衝液の固定された容量：重量比（1:1～1:25）は、Enfer Products、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給され、サンプルボトルに添加され、そしてサンプルは、消化、ボルテックス、または超音波処理によってホモジナイズされる。サンプルが特にゼラチン状である場合、酵素分解工程-供給社の指示に従って使用されるDNアーゼ、RNアーゼ、プロテアーゼ、またはリパーゼの添加が包含され得る。次いでサンプルは、ポリプロピレン96ウェルマイクロタイタープレート上に2連で懸濁される（200 μ l）。獣医学研究所（Veterinary Research Laboratories、Abbotstown、Dublinによって提供されるブランク、ネガティブ、およびポジティブコントロールがまた、このプレートに添加される。このプレートはプレート遠心分離回転器において、4000rpmにて10分間、遠心分離される。Enfer Scientific、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給される、20 μ lの特異的緩衝液が、好ましくは、プラスチック性の、全く不活性のマイクロタイタープレート（例えば、イムロン1プラスチックから作製されるDYNEX Microlite 1プレート）に添加される。プレートは、任意のアッセイの完了のために不活性であるのがよい。荷電されたプレートの使用は成果を低減する。遠心分離されたサンプルおよびコントロールのそれぞれの100 μ lは次いで、ポリレンの遠心分離されたプレートから特異的緩衝液の容量を含有する不活性なアッセイマイクロライトプレートに移され、そしてプレートカバーガラスがウェル上に置かれる。次いで、プレートは37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートされ、カバーガラスが除去され、そしてプレートは、Enfer Scientific、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給される、洗浄緩衝液1中で洗浄される。Enfer Scientific、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給される、アッセイ誘発緩衝液が200 μ lの容量にて各ウェルに添加される。プレートはカバーガラスで覆われ、そして37 $^{\circ}$ Cにて15分間インキュベートされる。カバーガラスは、インキュベーションの完了の際に除去され、そしてEnfer Scientific、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給される、洗浄緩衝液2が次いでプレート上のサンプルに添加されて、洗浄される。この工程はサンプル調製手順を完了する。

10

20

30

40

50

【0054】

c) サンプルは今や、イムノアッセイに備える。これはプリオン特異的抗体を必要とする。このような抗体についての例は、オポアルブミン結合化合物合成プリオンペプチド、Proteus International UKによってEnfer Scientificに認可されるペプチドでのウサギの注射によって惹起されるウサギ抗-PrPである。このペプチドは、分子モデリング技術、続いてウェスタンブロットおよびELISA分析を使用してProteus International UKによって同定された。ペプチドは、固相ペプチド合成を使用して、大量に合成される。多様な種、任意の種における特異的なプリオン配列に対して惹起される他の抗PrP抗体の使用はまた、このアッセイにおける満足の行く結果を生じる。本明細書中に記載されるペプチドは、アッセイにおいて成功した抗体のただ1つの例にすぎない。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方がアッセイについて使用され得る。洗浄緩衝液2中、至適な作用強度希釈にて、この特異的抗体の固定された容量(150 μl)が、マイクロライトプレートに添加され、37にて40分間インキュベートされ、そして洗浄緩衝液2を使用して洗浄される。洗浄緩衝液2中、至適な作用強度希釈にて、DAKO、USAによって供給される種抗ウサギ(種)-HRPの固定された容量(150 μl)が、プレートに添加され、37にて30分間インキュベートされ、そして洗浄液2を使用して洗浄される。結果の検出が今や可能である。

10

【0055】

d) 検出は、増強された化学発光の手段による。Johnson & Johnson、UKによって供給される化学発光試薬-Amerlite試薬(150 μl)が、マイクロタイタープレートに添加され、そして37にて3分間インキュベートされる。光シグナルが、Labsystems Chemiluminometerを使用して読取られ、結果は対応するバーコードに割り当てられ、そして結果報告が印刷される。

20

【0056】

詳細な調製プロトコル

1. ホモジナイズ化

1.1 血液または血液派生物または組織サンプルは、サンプルボトル/チューブ/バッグ中に置かれる。

1.2 1~25、好ましくは10~15倍のサンプル重量のホモジナイズ緩衝液がサンプルに添加される。

30

1.3 この混合物は、2分間またはサンプルが完全にホモジナイズされるまで、ホモジナイズ(消化、超音波処理、ボルテックス)される。

1.4 酵素分解選択が、操作者の判断で、ここで適用され得る。

1.5 粒子物質がサンプル中に残存する場合、得られるホモジネートは濾過され得る。

【0057】

2. プレーティング

2.1 V-96-ウェルマイクロタイターポリプロピレンプレートは、200 μlの各サンプルの遠心分離のために使用される。

40

2.2 プレート上の200 μlのブランクコントロールは、遠心分離プレートのA1、2に位置する。

2.3 獣医学研究所、Abbotstown、Castleknock、Dublin、Irelandによって供給される200 μlのネガティブコントロール(公知のネガティブBSEホモジネート)は、プレート上、B1、2およびC1、2の位置に、4複製物に懸濁される。

2.5 獣医学研究所、Abbotstown、Castleknock、Dublin、Irelandによって供給される200 μlのポジティブコントロール、(公知のポジティブBSEホモジネート)は、プレート上、D1、2およびE1、2の位置に、4複製物に懸濁される。

50

2.6 200 μ l の各 (濾過された、酵素処理された) ホモジネートは、プレート上、残りの位置に、2 連に懸濁される。

2.7 プレートは、4000 rpm にて10 分間遠心分離される。

2.8 20 μ l の特異的緩衝液が、不活性なアッセイマイクロタイタープレート、例えば、DYNEX マイクロライト1 プレートの各ウェルに添加される。

2.9 100 μ l の各遠心分離されたサンプルおよびコントロールが、遠心分離プレートから取出され、そして不活性なアッセイマイクロライトプレート上の同じ位置に懸濁され、ウェル容量を120 μ l にする。

2.10 プレートはマイクロタイタープレートシーラーで覆われ、そして37 $^{\circ}$ C にて60 分間インキュベートされる。

10

2.11 次に、プレートは、洗浄緩衝液1で4回洗浄される。

2.11 Enfer Products、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperary、Ireland によって供給される200 μ l のアッセイ誘発緩衝液は、マイクロタイタープレートの各ウェルに添加され、そしてプレートは15 分間、37 $^{\circ}$ C にてインキュベートされる。

2.12 プレートは洗浄緩衝液2で4回洗浄される。

【0058】

3. 免疫アッセイ

3.1 150 μ l の一次抗体、ウサギ (種) 抗-PrP、ポリクローナル/モノクローナル抗体は、至適な希釈にて、プレート上に懸濁される。

20

3.2 プレートは37 $^{\circ}$ C で40 分間インキュベートされる。

3.3 プレートは洗浄緩衝液2で4回洗浄される。

3.4 150 μ l の二次抗体、種-抗-ウサギ (種) -HRP が、至適な希釈にて、プレート上に懸濁され、そしてプレートは37 $^{\circ}$ C にて30 分間インキュベートされる。至適な希釈は、格子アッセイ、例えば、至適な光シグナルを決定するために多様な濃度の一次および二次抗体をプロットングすることによって決定される (以下を参照のこと) 。

3.5 プレートは洗浄緩衝液2で4回洗浄される。

【0059】

4. 検出

4.1 150 μ l の増強された化学発光試薬-Johnson & Johnson、Clinical Diagnostics、UK によって供給されるAmerlite 試薬が、プレートに添加される。

30

4.2 プレートは37 $^{\circ}$ C にて3 分間インキュベートされる。

4.3 光シグナルは、Medical Supply Company、Dublin、Ireland によって供給されるLabsystems Chemiluminometer を使用して読み取られ、これは完全なIR-Visible-Wスペクトルを走査し、そして結果を外挿することによってプレートの各ウェルからの発光を読み取る。

4.4 プレートからの光シグナルが、G.K.S. Software、Dublin Ireland によってカスタマイズされたソフトウェアパッケージに移される。

4.5 各光シグナルは、対応するバーコードに割り当てられ、そして結果がプリントされる。

40

4.6 結果が、化学発光光単位-L.U において引用される。

【0060】

試薬の供給源

1. プリオン特異的抗体-抗-PrP-は、Enfer Scientific Ltd. によって供給され、そしてポリクローナル抗体は以下の合成ペプチドに対して惹起される：

【0061】

プリオン配列

N-末端

50

M V K S H I G S W I L V L F V V A M W S D V G L C K K R P K P G G G W N T G G S
 R Y P G Q - 4 4
 G S P G G N R Y P P Q G G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W
 G Q P - 8 7
G G G G W G Q G G S H S Q W N K P S K P P K T N M K H V A G A A A A G A V V G G
 L G G Y - 1 3 1
 M L G S A M S S P L I H F G N D Y E D R Y Y T R E N M Y R Y P N Q V Y Y R P V D
 R Y S Q N N - 1 7 7

【0062】

1文字アミノ酸コード：

A -アラニン、C -システイン、D -アスパラギン酸、E -グルタミン酸、F -フェニルアラニン、G -グリシン、H -ヒスチジン、I -イソロイシン、K -リジン、L -ロイシン、M -メチオニン、N -アスパラギン、P -プロリン、Q -グルタミン、R -アルギニン、S -セリン、T -トレオニン、V -バリン、W -トリプトファン、Y -チロシン。

【0063】

この29アミノ酸ペプチドは、ELISA技術について抗-PrP抗体を十分に惹起するために使用される。この配列は、Proteus Internathional UKによって、分子技術を使用して、TSE検出に首尾良く使用され得る抗-PrP抗体の産生に潜在的に有用なペプチドであるとして、同定された。強調された配列は、ウサギ抗-PrP抗体を惹起するために使用される。ペプチド(ポリペプチド、タンパク質)は、活性化オボアルブミン、BSA、またはKLHに結合され、そしてFreund完全アジュバント中で筋肉内または皮下に注射される。ブースター注射は皮下であり、およびFreund不完全アジュバントが使用される。ウサギは、免疫化後30および50日目で、または十分な力価が活性されるまで、採血される。次いで、モノクローナル抗体が必要である場合に産生され得る。

【0064】

2. Enfer 緩衝液1~3が、Enfer Scientificによって製造および供給される。

【0065】

ホモジナイズ化緩衝液1：16%メタノール/エタノール
 15%ドデシル硫酸ナトリウム
 0.1%ウシ血清アルブミン

【0066】

緩衝液は、必要とされる容量に作製され、0.1M TRIS/HCL緩衝液、8.0 + 0.1最終pH中で攪拌される。この緩衝液は、16~25にて保存され、1年間の使用期限をとまなう。

【0067】

特異的緩衝液2：プロテイナーゼK

【0068】

この緩衝液は、0.1M TRIS/HCL緩衝液、8+0.1の最終pH中で必要とされる濃度(0.1~10mg/ml)に作製される。この緩衝液は、-20にて保存され、1年間の使用期限をとまなう。

【0069】

アッセイ誘発緩衝液：3Mグアニジン、0.1M水酸化ナトリウムまたは6M尿素、0.1M水酸化ナトリウム

【0070】

この緩衝液は、ROH₂O(逆浸透蒸留水)中で必要とされる濃度に作製され、そしてpHを確認する前に室温に達せられ、このpHは好ましくは11よりも大きいべきである。この緩衝液は、16~25にて保存され、1年間の使用期限を伴なう。

【0071】

10

20

30

40

50

3. 洗浄緩衝液 1 ~ 2 は、E n f e r S c i e n t i f i c によって製造および供給される。

【0072】

洗浄緩衝液 1 : 5 % 塩化ナトリウム

この緩衝液は、ROH₂O 中で必要とされる容量に作製される。pHは無関係である。この緩衝液は室温にて保存され、1年間の使用期限を伴なう。

【0073】

洗浄緩衝液 2 : 0 . 1 M リン酸緩衝化生理食塩水、0 . 5 % T w e e n 2 0

この緩衝液は、ROH₂O 中で必要とされる容量に作製され、7 . 6 + 0 . 1 の pH を伴なう。この緩衝液は室温にて保存され、1年間の使用期限を伴なう。

【0074】

4. 化学発光試薬は、J h o n s o n a n d J h o n s o n 、 C l i n i c a l D i a g n o s t i c s 、 U K によって供給され、そして結果は、M e d i c a l S u p p l y C o m p a n y 、 D u b l i n 、 I r e l a n d から入手可能である L a b s y s t e m s C h e m i l u m i n o m e t e r を使用して、読み取られる。

【0075】

抗体濃度の測定 - G r i d アッセイ

ネガティブおよびポジティブコントロールは、ウェルの第 2 のセット毎に 2 連でおかれる。一連の抗体希釈物が、表 7 において示されるように 1 / 5 0 0 ~ 1 / 2 0 0 0 まで作製され、そして試験が実行される。一次抗体添加段階にて、一次抗体の希釈物がネガティブおよびポジティブなサンプルウェル上におかれる。試験の終了時に、最も高いポジティブなコントロール値を与える抗体濃度が、高いネガティブコントロール結果を与えることを伴わずに、使用される。

【0076】

【表 7】

一次抗体 濃度		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/500	A	N e g											
	B	P o s											
1/1000	C	N e g											
	D	P o s											
1/1500	E	N e g											
	F	P o s											
1/2000	G	N e g											
	H	P o s											

【実施例 2】

【0077】

抗体至適化アッセイが、以下のように行われる：獣医学研究所によって裏づけされる、ポジティブおよびネガティブな組織が使用される。これは、アッセイにおいてコントロールに使用される同じ材料である。

【0078】

組織は、ホモジナイズ緩衝液中に 1 / 1 5 希釈され、そして 2 分間、ホモジナイズされる。次いで、200 μ l のネガティブなホモジネートは、A、C、E、および G 列に置かれる。200 μ l のポジティブなホモジネートは、B、D、F、および H に置かれる。プ

レートは10分間、400rpmにて遠心分離される。

【0079】

20 μ lの特異的緩衝液が、アッセイプレートに添加され、そして100 μ lの各サンプルが対応するウェルに移される。

【0080】

次いでプレートは密封され、そして1時間、37にてインキュベートされる。

【0081】

プレートは、洗浄緩衝液1で洗浄され、200 μ lの一次緩衝液が添加される。これは15分間、37にてインキュベートされる。

【0082】

一連の抗体溶液は、洗浄緩衝液中で作製され、すなわち、1/500、1/1000、1/1500、および1/2000、抗体が、この範囲よりも高い力価または低い力価を有する場合、より高い、または拡張される範囲が、最初のアッセイ後に試行され得る。

【0083】

誘発緩衝液中でのインキュベーション後、プレートは洗浄液2で洗浄される。次いで、150 μ lの各抗体濃度が適切なウェルに添加され、そして40分間、37にてインキュベートされる。プレートは洗浄緩衝液2で洗浄され、そして150 μ lの二次抗体が全てのウェルに、30分間37にて添加され、次いでプレートは再度洗浄緩衝液2で洗浄され、そして150 μ lの化学発光基質が全てのウェルに添加される。37での3分間のインキュベーション後、ウェルは化学発光測定器で読み取られる。

【0084】

最も良好な結果、すなわち低いネガティブな、好ましくは1.0未満であるが、良好なポジティブな結果、例えば500を与える抗体濃度が、選択される濃度である。

【0085】

以前に言及されるように、より高い希釈範囲が、抗体が使用される前に選択され得るが、このアッセイは抗体が使用され得ようがされ得なようが、良好な考えを与える。

【0086】

10

20

【表 8】

1/500	{	N	4.235	3.897	3.554	4.116	2.698	3.487	4.679	3.229	4.569	3.487	3.778	4.946
	{	P	724.5	759.4	811.6	792.4	772.5	851.3	764.2	844.2	793.4	882.4	816.7	799.2
1/100	{	N	2.987	2.897	2.378	2.556	2.446	2.791	3.016	1.945	2.069	2.449	2.164	2.310
	{	P	563.4	547.2	538.0	587.1	564.2	603.7	589.4	556.1	567.3	613.7	508.6	543.7
1/500	{	N	1.579	0.945	1.344	1.067	1.337	1.298	1.049	0.879	1.346	1.222	1.340	1.206
	{	P	457.6	476.5	503.0	402.1	449.5	432.8	463.7	433.0	492.7	409.7	430.9	443.1
1/2000	{	N	0.861	0.936	0.727	0.914	0.866	0.569	0.612	0.493	0.721	0.642	0.463	0.762
	{	P	366.9	322.3	390.1	377.5	376.1	349.4	346.7	334.8	329.4	367.4	329.4	337.9

10

20

30

40

50

異なる組織、すなわち、中枢神経系（CNS）、リンパ組織、および血液において、ならびに異なる種、ヒツジおよびウシにおいてTSEを検出する手段としてのEnfer TSEのアッセイの適切性に対する実験データ。

【0088】

2001年における本発明のTSEアッセイを使用する日常的な試験の結果。

【0089】

ウシCNS組織

試験された全サンプル： 664942

検出されたポジティブの数： 134

免疫組織化学によって確認されたポジティブの数： 134

10

【0090】

ヒツジCNS組織

試験された全サンプル： 16467

検出されたポジティブの数： 60

免疫組織化学によって確認されたポジティブの数： 60

【0091】

ヒツジリンパ組織

試験された全サンプル： 6974

検出されたポジティブの数： 10

免疫組織化学によって確認された： 9

20

【0092】

1つのリンパ組織サンプルを確認することが可能ではなかった。この組織は14週齢の仔ヒツジであり、および感染の非常に初期の段階にあった。これは確認の困難性を説明し得る。

【0093】

ヒツジ血液組織（1998）

試験された総数： 3

ポジティブの数： 3

【0094】

これは、臨床的なスクレイパー症例に由来する新鮮な血液であった。全ての症例は、弱くポジティブであることが見出され、そして追跡分析を行うための確認方法は何ら存在しない。

30

フロントページの続き

(74)代理人 100105474

弁理士 本多 弘徳

(74)代理人 100108589

弁理士 市川 利光

(74)代理人 100115107

弁理士 高松 猛

(74)代理人 100129160

弁理士 古館 久丹子

(72)発明者 オコーナー, マイケル

アイルランド国, ダブリン州, マウント メリオン, チェスナット ロード 11

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR16 QR41 QR48 QR50

QR72 QR77 QS03 QS28 QS33 QS36 QX01

专利名称(译)	传染性海绵状脑病		
公开(公告)号	JP2007017449A	公开(公告)日	2007-01-25
申请号	JP2006244361	申请日	2006-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	ENFER TECH		
申请(专利权)人(译)	Enfa科技有限公司		
[标]发明人	オコーナーマイケル		
发明人	オコーナー,マイケル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 C12Q1/37 G01N33/48 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 C12Q1/37 G01N2333/4709 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/531.B C12Q1/37 G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01		
优先权	S20010042 2001-01-19 IE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种测试动物，药物和人类中是否引起传染性海绵状脑病 (TSE) 的传染原的方法。一种检测TSE的方法，其包括：(a) 用酒精和去污剂处理来自测试对象的组织，血液或血液衍生物的样品；(b) 正常病毒蛋白。添加降解药物，(c) 添加使异常病毒蛋白变性的药物，(d) 添加a病毒特异性抗体和 (e) 检测抗体与样品结合的步骤。包括在内。还描述了将异常病毒蛋白固定到基质上的方法，该方法包括：(a) 用醇和阴离子去污剂处理怀疑含有异常病毒蛋白的蛋白质或样品；和 b) 在底物存在下添加蛋白酶。[选择图]无

成分	作用範圍	濃度
加チト-セク	0.05~4mg/ml	0.4mg/ml