

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4601628号
(P4601628)

(45) 発行日 平成22年12月22日(2010.12.22)

(24) 登録日 平成22年10月8日(2010.10.8)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 G
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 E
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 Z

請求項の数 6 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2006-553765 (P2006-553765)	(73) 特許権者	505220114
(86) (22) 出願日	平成17年2月21日(2005.2.21)		デパートメント オブ バイオテクノロジー
(65) 公表番号	特表2007-523342 (P2007-523342A)		ー
(43) 公表日	平成19年8月16日(2007.8.16)		インド国 1 1 0 0 0 3 ニューデリー
(86) 国際出願番号	PCT/IN2005/000063		、ロディー ロード、シージーオー コン
(87) 国際公開番号	W02005/080987		プレックス、ブロック 2、セブンス フ
(87) 国際公開日	平成17年9月1日(2005.9.1)		ロアー
審査請求日	平成19年8月24日(2007.8.24)	(73) 特許権者	506282034
(31) 優先権主張番号	226/DEL/2004		マーダヴ インスティテュート オブ テ
(32) 優先日	平成16年2月19日(2004.2.19)		クノロジー アンド サイエンス
(33) 優先権主張国	インド (IN)		インド国、グワリオル
		(74) 代理人	100066692
			弁理士 浅村 皓
		(74) 代理人	100072040
			弁理士 浅村 肇

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺及び肺以外の結核を検出するための診断キット並びに結核を検出するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疎水性材料でコーティングしたカードと、リボソーム抗原懸濁液と、陽性対照と、陰性対照とを含む、肺の及び肺以外の結核を検出するための診断キット。

【請求項 2】

前記抗原懸濁液は、Mycobacterium tuberculosis に特異的な精製グリコリピッド抗原が直接リボソームに挿入された、リボソーム抗原を含み、前記試験カードが疎水性材料でコーティングされたプラスチックシートである、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

前記 M. tuberculosis に特異的な精製グリコリピッド抗原が、
該 M. tuberculosis を増殖し、該 M. tuberculosis のバイオマスを回収し、超音波処理を行い、

該 M. tuberculosis に由来する抗原を抽出、単離し、
該 M. tuberculosis の粗製グリコリピッド抗原を精製する、プロセスにより得られる、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 4】

前記 M. tuberculosis に特異的な精製グリコリピッド抗原が、リガンドを使用することなしに直接リボソームに挿入された、リボソーム抗原を含む、請求項 3 に記載のキット。

10

20

【請求項 5】

前記陽性対照が、Mycobacterium 抗原で免疫されて周期的に採血される 4 から 6 ヶ月齢のウサギから調製される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 6】

疎水性材料でコーティングした試験カード上に陽性対照、陰性対照及び試験検体をそれぞれ円運動しながら塗布し、抗原懸濁液を、該陽性対照、該陰性対照及び該試験検体のそれぞれに加え、該陽性対照及び活動性結核感染を有する該試験検体で特異的な抗原と抗体の凝集塊を観察する、工程を含み、

該抗原懸濁液は、Mycobacterium tuberculosis に特異的な精製グリコリピッド抗原が直接リボソームに挿入された、リボソーム抗原を含み、

該試験検体中の抗体と該 M. tuberculosis に特異的な精製グリコリピッド抗原との架橋の結果として該凝集塊を生じ、これが、活動性結核感染の存在を示し、他方、該凝集塊の不存在は、活動性結核感染の不存在を示す、結核を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肺及び肺以外の結核を検出するための診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

結核を検出する従来の方法は時間と労力を要する AFB 染色法であり、感度が低いと考えられている（100X 顕微鏡を使用して塗抹標本の陽性結果を得るには、結核菌 10,000 個/ml 痰を必要とする。Todar's Text Book of Bacteriology Online 参照）。ELISA-KP90 もまた感度及び特異性の低いことが知られており（カットオフ値 > 1.0 + ve、及び < 0.8 - ve 試験結果）、BCG ワクチン接種をした患者において感度及び特異性を欠く過敏性に基づくツベルクリン皮膚試験（Montaux 試験）と同様に複雑な設備が必要である（Constantin P. et al., Inf & Imm 1998; 66）。同様に、MYCODOOT は HIV 関連患者には不都合であり（G. R. Somi et al., Int J Tubercle and Lung Disease, 1999, vol 3 参照）、Bactec-460 及び Roche molecular system (PCR に基づく製品) は、感度は高いが、非常に高価な装置及び専門的技術を必要とする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の目的：

本発明の目的の一つは、結核を検出するための診断キットを提案することである。

【0004】

本発明のその他の目的は、経済的で取り扱いが容易な診断キットを提案することである。

【0005】

本発明のさらに他の目的は、リボソーム凝集に基づく診断キットを提案することである。

【0006】

本発明の他の目的は、特異的な抗原抗体反応に基づいているので、感度が高くそして特異的な診断キットを提案することである。

【0007】

本発明のさらに他の目的は、結核の速やかな検出に役立つ診断キットを提案することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の要約

本発明により、疎水性材料でコーティングされた試験カード「T B S c r e e n」と、抗原懸濁と、陽性及び陰性対照とを含む、肺及び肺以外の結核を検出するための診断キットが提供される。

【 0 0 0 9 】

本発明により、陽性対照、陰性対照及び試験検体をそれぞれ円運動しながら疎水性材料によりコーティングされた試験カード上に適用し、該抗原懸濁を陽性、陰性及び試験検体のそれぞれに加えて結果を判定することを含み、ダークブルーの凝集として特異的抗原と抗体の凝集塊が陽性対照及び活動性結核感染を含む試験検体に観察される、キットを使用する結核を検出する方法が提供される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 0 】

発明の詳細な説明

Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv (ATCC - 27294) 株を対数期後期まで (2 ~ 3 ヶ月) Sauton培地上で増殖し、細胞を4 ~ 10 で遠心分離して (5,000 ~ 10,000 g 10 ~ 20 分間) 回収し、ペレットをPBS (pH 7.2 ~ 7.5) で洗い、TEN緩衝液pH 8.0 ~ 8.5 (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) に再懸濁し、70 ~ 80 (水浴) で30 ~ 45 分間加熱不活化し、次いで超音波処理した。グリコリピド抗原を文献に記載された方法に従い、若干の修正を加えた方法で抽出した (Reggiard 20
o et al., 1974; Bisen P. S. et al., 2003)。脂肪分解 *Mycobacterium* の粉末 (10 ~ 15 g) をガラス試薬壺に入れ、これに100 ~ 150 ml のクロロホルム及びメタノールの混合物 (2 : 1) を加えた。これを室温で50 ~ 60 分間攪拌し、Whatman濾紙No. 1で濾過した。1 / 5 容量の0.7 % KCl (20.0 ml) を濾液に加え、5 ~ 6 回振とうした。この懸濁液を分液ロートに移し、2 層がはっきりと分離するまで終夜2 ~ 8 に維持した。下の有機層を1 / 5 容量の洗浄溶媒 (C : M : W : 3 : 48 : 47) で同様に終夜2 ~ 8 に維持することにより洗浄した。上の水層を除去し、下の有機層を濾過した後保存した。有機層は、ロータリー溶媒エバポレーター中で40 ~ 50 において溶媒を蒸発させて乾燥した。水分は、窒素ガスを乾燥混合物に吹き付けて除去した。中性脂肪は、300 ~ 500 ml の冷却 30
アセトンを加え、10 ~ 20 分間渦巻き攪拌し、Whatman No. 1を通して濾過することにより、乾燥混合物から除去した。このステップは、フラスコ内の脂質が白っぽく又は無色になるまで繰り返した。これをWhatman No. 1を通して濾過し、濾液を廃棄した。濾紙上に存在する脂質をC : M (2 : 1) で溶解し、R. Bフラスコに移した。溶媒は、減圧下に40 ~ 50 においてロータリーエバポレーターで除去した。粗精製調製品は10 ~ 15 ml のC : M (2 : 1) に溶解し、使用まで - 20 で保存した。

【 0 0 1 1 】

抗原の精製：

100 ~ 110 において1 ~ 1.30 時間 (加熱オーブン) 活性化したシリカゲルH 40
を、手操作でガラスカラム (2.5 X 30 cm) に充填し、そして既知量の粗製物質 (1 g / 5 ml、保存液) をカラムのいずれか一方の側に装填した。カラムをクロマトグラフジャー (4.5 X 25 cm) の上で、65 : 25 : 4 (C : M : W) ^{7, 8} の比の精製用溶媒150 ~ 200 ml (移動相) により上方向に室温において展開し、他端に達するまで展開した。カラムをクロマトグラフジャーから取り外し、ヒュームフードに置き、カラムから溶媒を蒸発させた。クリーンな棒を使用して1 cmの長さの各フラクションを注意深く掻き出して、個々の分子の移動度と遅延係数 (R F) 値 (46.6、53.4、58.3、67.2 及び72.4 %) にしたがってシリカゲルに吸着したそれぞれの分子を得た。それぞれのフラクションをそれぞれのフラクション番号を表示したクリーンな乾燥ガラス試験管の中に集めた。10 ml の抽出溶媒 (クロロホルム : メタノール 2 : 1 の混合 50

物)を各試験管に加え、30～40分間室温に保った。溶出した物質の純度をTLCにより分析し、選択したフラクションをさらにWhatman濾紙No. 1を通して濾過して検体からシリカゲルを除去した。純粋なフラクションを集め、通常の方法でこれらの特徴を分析した(TLC上の免疫染色、ELISA及びリポソームにより)。

【0012】

リポソーム抗原の構築方法：

リポソームは、わずかの改良を加えて、以前に記述したように(Bangham A. D. et al. 1965)調製したが、簡単に記述すると、ホスファチジルコリン100～150mg；コレステロール450～500mg(Sigma, USA)；抗原の懸濁液(カクテル)10～20mg；及び色素50～100 μ l(1.0%スーダンブラックBのクロロホルム液)を予め乾燥した丸底フラスコに入れた。溶媒をロータリー真空エバポレーターにより減圧下で蒸発させた。乾燥した内容物を40～50mlの無水アルコール(99.9% Hyman, ドイツ)に溶解し、4～10で1～1.30時間保持した。スクロース溶液(4～8ml；150mM)をポリプロピレン遠心試験管(容量35ml)に入れ、渦巻き攪拌しながらそれに予め調製した抗原のアルコール懸濁液4～5mlを徐々に加えた。試験管を終夜4～10に保ってリポソームを膨張させ、10～15mlのPBS緩衝液(pH6.5)を加えて渦巻き攪拌し、10,000gにおいて10～20分間遠心分離した(Beckman, USA)。上清を捨て、ペレットを20～30mlのB2緩衝液、pH7.2($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10mM； KH_2PO_4 , 10mM；EDTA, 10mM；塩化コリン10%及びチオメルゾール0.1%)で再懸濁した。これを次の使用まで4～10で保存し、キットの抗原試薬として使用した。

【0013】

ホスファチジルコリンの調製：

ホスファチジルコリン(PC)は検査のコストを下げるために施設内で調製した。当業者は卵黄からのPCの精製法及びその最終評価法を知っている(Sunamoto, J. et al. 1978)。簡単に記述すると、25個の卵からアルブミン部分を除いた。集めた卵黄を750mlのクロロホルム：メタノール(2：1)で30分間攪拌して抽出した。Whatmann No. 1を通して濾過した。5分の1容量の0.7%KC1で濾液を脱タンパクした。こうして得られた有機層を3：48：47のクロロホルム：メタノール：水で洗浄した。ベンゼンを使用して水分を除いた。溶媒をロータリー真空エバポレーターにより蒸発させて、脂質の乾燥フィルムを得た。中性脂質は記述したようにアセトンで除去した。空の丸底フラスコの重量を測定した(Wa)。乾燥した脂質フィルムと共にフラスコの重量を測定した。37.5gの粗製脂質が単離された。この粗製製品はさらにシリカゲルHクロマトグラフィーにより精製され、精製PCは薄層クロマトグラフィーにより分析され、PCの評価は先行技術(Sunamoto, J. et al. 1978)で知られているように行った。

【0014】

試験の陽性対照の調製：

Sautonの培地中でのMycobacterium増殖物を遠心分離した後に、1mgのMycobacterium tuberculosisのペレットを採取した。このペレットを2回1X PBSで洗い、残る培地を除いた。次いでペレットを4mlの1Xリン酸緩衝食塩液に懸濁した。酸で洗った5mm直径のビーズの4～8個を上記懸濁液に加えた。この検体を10分間渦巻き攪拌機上で激しく振とうした。得られた懸濁液を等容量のFreundの不完全アジュバントと混合した。この混合物を、必要レベルに達するまで繰り返し22g注射針を通して搾り出した。100 μ lの懸濁を2～8ヶ月齢の若いウサギに接種した。多数のウサギに同様に接種した。

【0015】

1ヵ月後にウサギから採血し、血清を得た。血清の反応性は、次のパラグラフに示す試験方法に記述されているように、抗原懸濁でチェックした。反応性力価をチェックした。

抗原のブースター投与（50 μ l）を再度繰り返した。ブースター投与の約7日後に約1：64から1：128の増強された力価が得られた。最良の反応性力価が得られた。この血清は最適の反応性力価に1X PBSで希釈され、含まれるいずれかの汚染物質に対する保存剤として0.1%アジドを加えた。使用/バイアルへの分注まで凍結保存した。

【0016】

4～6ヶ月齢のウサギを上記抗原で免疫し、周期的に採血して、キットに供給される陽性対照に使用し、一方正常若齢ウサギを陰性対照に使用した。

【0017】

試験方法：

陽性対照、陰性対照、抗原懸濁及び試験する検体などの成分は全て実験を行う前に室温に平衡させた。陽性対照、陰性対照及び試験検体（それぞれ25 μ l）を、試験カード上に示されているように円運動させながら加えた。これらの試料を別々の棒で十分に結合するように広げ、それに25 μ lのリポソーム抗原を加え、そしてカードを4分間ゆっくりと渦巻状に動かしした。

【0018】

新しく採取したかあるいは凍結した試験血清検体（25 μ l）を、疎水性材料でコートしたプラスチックスライドの円形の区域の内側に均一に広げた。結果を解釈するために、便宜上、区域1及び2にはそれぞれ、陽性対照（抗ウサギ血清）及び陰性対照（正常ウサギ血清）を広げた。区域1及び2を含む各円形区域に抗原懸濁（25 μ l）を加え、カードを手で4分間渦巻状に動かしした。ダークブルーの凝集として、特異的抗原及び抗体の凝集塊が、陽性対照並びに活動性結核感染による *Mycobacterium* グリコリピッドに対する抗体を含む検体において観察された。他方、カード上に凝集塊が無い場合は、陰性の結果を示した。円形区域の縁の乾燥により不明瞭な結果を示した場合には、この標本中に検出できないレベルの抗原濃度をこれらの検体が含まれているので、15～30日以内に、さらに確認する必要がある。

【実施例1】

【0019】

血清：

最大の母集団多様性をカバーするために、インドの種々の病院の外来患者部門（OPD）の患者血清をこの試験に登録した。患者は、臨床症状及びX線検査並びに塗沫標本染色及び検体の喀痰培養に基づいて診断された。患者は一人も完全な治療は行われていなかった。肺以外の結核並びに肺結核の両者の血清をこの試験に含めた。合計324検体の結核血清を試験した。

【0020】

この試験の特異性の基準を評価するために、TBの臨床症状の無い健康人の血清を陰性対照として含めた。これらの殆どはBCGワクチンを受けた被検者から得た。この非TB血清は、一般的に健康人か又は結核以外の種々の病気に罹患した患者から得たものである。血清は凍結保存され、採取されてから1年以内に使用された。結核陰性血清511検体もこの試験に含まれた。血清選択に使用された基準の詳細は次の通りである。

・塗沫標本陰性、培養陽性肺結核症例	52
・塗沫標本陽性、培養陽性、肺結核症例	180
・肺以外の培養陽性症例	35
・再発肺結核症例	57
・薬物治療、臨床症状の無い症例	60
・健康な家族接触者	50
・BCGワクチンを受けた子供	15
・B型肝炎陽性検体	15
・TB以外の一般的感染症の血清	27
・正常人血清	344

【実施例2】

【 0 0 2 1 】

施設内評価：

一連の 3 2 4 検体の結核血清を使用して総合的感度 9 8 . 6 8 % が得られ、そのうち血清 2 0 検体は不明瞭な結果であった。WHO により採用されている方法に従って、不明瞭な血清は感度及び特異性の計算に含めなかった。非結核血清 5 1 1 検体を使用して 9 8 . 7 8 % の総合的特異性が得られた。

【 0 0 2 2 】

最近 B C G で免疫された子供 1 5 例の血清について、この試験とワクチン接種の交差反応性を試験した。陽性結果を示す血清はなかったので、インド人及びその他の国の人の B C G ワクチンを受けた母集団にこの試験が適することが示された。

10

【 0 0 2 3 】

1 5 症例の B 型肝炎陽性検体が交差反応性について評価された。試験した血清のいずれにおいても反応はなかった。B 型肝炎 4 例の血清を H o p k i n s R e s e a r c h I n s t i t u t e , B o m b a y においてキットを使用して試験したが、無反応であった（施設内試験の表には含めなかった）。

【 0 0 2 4 】

他の一般的感染症の血清 2 7 検体のうち、2 5 検体は明白な陰性を示したが、残りの 2 検体は不明瞭な結果であった。結核への進行についてこの被検者を追跡する必要があったが、残念ながらこれを行うことができなかった。決定できない結果は特異性及び感度の計算から除外した。

20

【 0 0 2 5 】

施設内試験の結果を以下の表にまとめた：

【表 1】

表 1

結核母集団において実施された試験

血清の内訳	結果
* 試験した結核血清の数=324	陽性=300 陰性= 4 未確定=20** 感度=98.68%
塗沫標本陰性、培養陽性肺症例 ・・・52	陽性=47 陰性= 2 未確定= 3
塗沫標本陽性、培養陽性、肺症例 ・・・180	陽性=175 陰性=— 未確定=5
肺以外の症例、培養陽性 ・・・35	陽性=28 陰性=2 未確定=5
再発肺症例 ・・・57	陽性=50 陰性=— 未確定=7

30

40

**不明瞭な検体は、WHOの方法に従って、感度及び特異性の計算に含めなかった。

【 0 0 2 6 】

【表 2】

表 2

非結核血清について実施した試験

*試験した非TB血清の数=511	陽性=488 陰性=6 未確定=17** 特異性98.78%
5. 薬物治療、臨床症状の無い症例 ・・・60	陽性=— 陰性=51 未確定=9
6. 健康な家族接触者 ・・・50	陽性=— 陰性=50 未確定=—
7. BCGワクチンを受けた子供 ・・・15	陽性=— 陰性=15 未確定=—
8. B型肝炎陽性検体 ・・・15	陽性=— 陰性=15 未確定=—
9. 一般的感染症の血清（非TB） ・・・27	陽性=— 陰性=25 未確定=2
10. 正常人血清 ・・・344	陽性=6 陰性=332 未確定=6

**不明瞭な検体は、WHOの方法に従って、感度及び特異性の計算に含めなかった。

【0027】

調査対象の被検者の新鮮血清を使用した場合に優れた結果が得られた。凍結血清は解凍後使用することができるが、検体の凍結解凍の反復は結果に影響を及ぼす可能性がある。

フロントページの続き

(74)代理人 100088926

弁理士 長沼 暉夫

(74)代理人 100102897

弁理士 池田 幸弘

(72)発明者 ビセン、ブラカーシュ、シング

インド国、ニューデリー、ロディー ロード、 シージーオー コンプレックス、ブロック 2、
セブンス フロアー、 デパートメント オブ バイオテクノロジー

(72)発明者 ティワリー、ラム、プラモド

インド国、グワリオル、 マーダヴァ インスティテュート オブ テクノロジー アンド サイエ
ンス

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開平07-000805(JP,A)

特表2002-532064(JP,A)

特開平11-295312(JP,A)

米国特許第4605630(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

MEDLINE(STN)

CAPLus(STN)

专利名称(译)	用于检测除肺和肺以外的结核病的诊断试剂盒和用于检测结核病的方法		
公开(公告)号	JP4601628B2	公开(公告)日	2010-12-22
申请号	JP2006553765	申请日	2005-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	生物技术部 技术和科学的鸽子三月研究所		
申请(专利权)人(译)	生物技术系 技术和科学研究所Madavu		
当前申请(专利权)人(译)	生物技术系 技术和科学研究所Madavu		
[标]发明人	ビセンプラカーシュシング ティワリーラムプラモド		
发明人	ビセン、プラカーシュ、シング ティワリー、ラム、プラモド		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N30/88 G01N21/78 G01N33/532 G01N33/539 G01N33/549		
CPC分类号	G01N33/5695 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/569.F G01N33/543.581.G G01N30/88.E G01N21/78.Z		
代理人(译)	池田幸		
优先权	226DEL2004 2004-02-19 IN		
其他公开文献	JP2007523342A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于检测肺和肺以外的肺结核的诊断试剂盒，包括涂有疏水材料，抗原悬浮液，阳性和阴性对照的测试卡“TB Screen”。

血清の内訳	結果
* 試験した結核血清の数=324	陽性=300 陰性= 4 未確定=20** 感度=98.68%
塗沫標本陰性、培養陽性肺症例 ・・・52	陽性=47 陰性= 2 未確定= 3
塗沫標本陽性、培養陽性、肺症例 ・・・180	陽性=175 陰性=一 未確定=5
肺以外の症例、培養陽性 ・・・35	陽性=28 陰性=2 未確定=5
再発肺症例 ・・・57	陽性=50 陰性=一 未確定=7