

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4112560号
(P4112560)

(45) 発行日 平成20年7月2日 (2008.7.2)

(24) 登録日 平成20年4月18日 (2008.4.18)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 T
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z

請求項の数 7 外国語出願 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2005-63664 (P2005-63664)	(73) 特許権者	591003013
(22) 出願日	平成17年3月8日 (2005.3.8)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公開番号	特開2005-253465 (P2005-253465A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公開日	平成17年9月22日 (2005.9.22)		E AKTIENGESSELLSCHAF
審査請求日	平成17年3月23日 (2005.3.23)		T
(31) 優先権主張番号	04005718.4		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(32) 優先日	平成16年3月10日 (2004.3.10)		グレンツアーヘルストラツセ124
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100095832
			弁理士 細田 芳徳
		(72) 発明者	ユールゲン クレップ
			ドイツ連邦共和国 グラーベン-ノイドル
			フ 76676 オルフヴェーク 5
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 生物学的試料からの細菌の単離方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

－生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体を提供する工程、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および
－該抗体および該生物学的試料を混合する工程、および
－該混合物から抗体－真核生物細胞－複合体を分離する工程、を含む、生物学的試料からの細菌の単離方法。

【請求項 2】

－生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体を提供する工程、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および
－該抗体および該生物学的試料を混合する工程、および
－該混合物から抗体－真核生物細胞－複合体を分離する工程、および
－抗体－真核生物細胞－複合体が分離された該混合物中に含まれる細菌の核酸および／またはタンパク質を抽出する工程、を含む、生物学的試料からの細菌の核酸および／または細菌のタンパク質の抽出方法。

【請求項 3】

－生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体を提供する工程、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および
－該抗体および該生物学的試料を混合する工程、および
－該混合物から抗体－真核生物細胞－複合体を分離する工程、および

－抗体－真核生物細胞－複合体が分離された該混合物中に含まれる細菌の核酸および／またはタンパク質を抽出する工程、および

－該生物学的試料中に含まれる細菌の核酸および／または細菌のタンパク質を検出する工程、

を含む、生物学的試料中の細菌の核酸および／または細菌のタンパク質の検出方法。

【請求項 4】

前記細菌の核酸がプローブハイブリダイゼーション工程を任意に含む核酸増幅反応によって検出される、請求項 3 記載の生物学的試料中の細菌の核酸の検出方法。

【請求項 5】

－1 または複数個の容器内に生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体、ここで該抗体は細菌結合性 Fc-末端を欠損している、および

－1 または複数個の容器内に核酸および／またはタンパク質の抽出手段、を含む、生物学的試料からの細菌の核酸および／または細菌のタンパク質の抽出用キット

。

【請求項 6】

－1 または複数個の容器内に生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体、ここで該抗体は細菌結合性 Fc-末端を欠損している、および

－1 または複数個の容器内に核酸および／またはタンパク質の抽出手段、および

－核酸および／またはタンパク質の検出手段、

をさらに含む、生物学的試料中の細菌の核酸および／または細菌のタンパク質の検出用キット。

【請求項 7】

－1 または複数個の容器内に生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体、ここで該抗体は細菌結合性 Fc-末端を欠損している、および

－1 または複数個の容器内に核酸および／またはタンパク質の抽出手段、および

－核酸および／またはタンパク質の検出手段、および

－細菌の核酸標的領域の増幅手段、

をさらに含む、生物学的試料中の細菌の核酸の検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学的試料から、特に血液試料からの細菌の単離方法に関する。これらの方法は、細菌を検出するための核酸に基づくまたは免疫診断的方法のための生物学的試料の試料調製に適している。本発明はまた、生物学的試料からの細菌の単離方法における特異的な抗体の使用およびこれらの方法を実施するためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

生物学的試料中に存在する細菌の測定および単離は、バイオテクノロジー適用内の一般的な業務である。たとえば、医療上の適用においてヒトまたは動物由来の生物学的試料中に存在する細菌の特色付けは、感染性疾患の診断において重要な役割を果たす。集中治療において、敗血症は今なお高い死亡率があり、健康管理システムに莫大な費用がかかる主要な問題である。今日、ほとんどの場合において敗血症の診断には血液培養法が用いられ(非特許文献 1)、係る試料中の細菌の特異的検出ができる。しかしながら、係る方法は非常に時間がかかり、適切な治療を適切な時点で患者に提供することが頻繁にできていない。代替方法は、細菌の特異的なタンパク質および／または核酸配列を検出することによりこれらの生物の診断を可能にする。特に、核酸検出方法は、ここ数年の間に当該分野でなされた進歩の観点から、益々重要になりつつある。核酸増幅反応、特にポリメラーゼ連鎖反応は、試料中に存在する核酸配列の非常に特異的、高感度および迅速な検出が可能であり、そのため、敗血症のような感染性疾患の診断に関する培養アッセイを提供するための

10

20

30

40

50

代案を提供する(非特許文献2;非特許文献3;非特許文献4)。

【0003】

【非特許文献1】Weinstein,M.P.ら、Clin.Infect.Dis. 24(1997)584-602

【非特許文献2】Martineau,F.ら、J.Clin.Microbiol.36(1998)618-623

【非特許文献3】Reischl,U.ら、J.Clin.Microbiol.38(2000)2429-2433

【非特許文献4】Rantakokko-Jalava,K.およびJalava,J.、J.Clin.Microbiol.40(2002)4211-4217

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

10

しかしながら、係る検出方法はしばしば、特異的なタンパク質および/または核酸を検出する前に試料調製を必要とする。

【0005】

改善された生物学的試料からの細菌の単離方法を提供することが、本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

すなわち、本発明の要旨は、以下の通りである：

[1] 一生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体を提供する工程、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および

20

一該抗体および該生物学的試料を混合する工程、および
一該混合物から抗体-真核生物細胞-複合体を分離する工程、
を含む、生物学的試料からの細菌の単離方法；

[2] 一生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体を提供する工程、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および

一該抗体および該生物学的試料を混合する工程、および
一該混合物から抗体-真核生物細胞-複合体を分離する工程、および
一抗体-真核生物細胞-複合体が分離された該混合物中に含まれる細菌の核酸および/またはタンパク質を抽出する工程、

30

を含む、生物学的試料からの細菌の核酸および/または細菌のタンパク質の抽出方法；

[3] 一生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体を提供する工程、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および

一該抗体および該生物学的試料を混合する工程、および
一該混合物から抗体-真核生物細胞-複合体を分離する工程、および
一抗体-真核生物細胞-複合体が分離された該混合物中に含まれる細菌の核酸および/またはタンパク質を抽出する工程、および

一該生物学的試料中に含まれる細菌の核酸および/または細菌のタンパク質を検出する工程、

を含む、生物学的試料中の細菌の核酸および/または細菌のタンパク質の検出方法；

[4] 前記細菌の核酸がプローブハイブリダイゼーション工程を任意に含む核酸増幅反応によって検出される、前記[3]記載の生物学的試料中の細菌の核酸の検出方法；

40

[5] 前記抗体-真核生物細胞-複合体が前記生物学的試料から遠心分離によって分離される、前記[1]～[4]記載の方法；

[6] 遠心分離が密度勾配培地の存在下で行われる前記[5]記載の方法；

[7] 前記抗体-真核生物細胞-複合体が前記生物学的試料から濾過によって分離される、前記[1]～[4]記載の方法；

[8] 前記抗体が磁性ビーズ上で直接的にまたは間接的に被覆されている前記[1]～[4]記載の方法；

[9] 前記抗体がテトラマー抗体複合体である前記[1]～[8]いずれか記載の方法；

[10] 前記抗体がFab-フラグメントまたはF(ab')₂-フラグメントである前

50

記[1]～[8]いずれか記載の方法；

[11] 前記抗体がFc-末端で覆われている前記[1]～[8]いずれか記載の方法；

[12] 前記抗体がIg-M型抗体である前記[1]～[8]いずれか記載の方法；

[13] 生物学的試料からの細菌の単離方法における、生物学的試料中の真核生物細胞枯渇のための細菌結合性Fc-末端を欠損している、真核生物細胞に特異的に結合する抗体の使用；

[14] 生物学的試料からの細菌の核酸および/またはタンパク質の抽出方法における、生物学的試料中の真核生物細胞枯渇のための細菌結合性Fc-末端を欠損している、真核生物細胞に特異的に結合する抗体の使用；

[15] 生物学的試料中の細菌の核酸および/またはタンパク質の検出方法における、生物学的試料中の真核生物細胞枯渇のための細菌結合性Fc-末端を欠損している、真核生物細胞に特異的に結合する抗体の使用；

[16] -1または複数個の容器内に生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および
-1または複数個の容器内に核酸および/またはタンパク質の抽出手段、
を含む、生物学的試料からの細菌の核酸および/または細菌のタンパク質の抽出用キット；

[17] -1または複数個の容器内に生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および
-1または複数個の容器内に核酸および/またはタンパク質の抽出手段、および
-核酸および/またはタンパク質の検出手段、
をさらに含む、生物学的試料中の細菌の核酸および/または細菌のタンパク質の検出用キット；

[18] -1または複数個の容器内に生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および
-1または複数個の容器内に核酸および/またはタンパク質の抽出手段、および
-核酸および/またはタンパク質の検出手段、および
-好ましくはPCRによる細菌の核酸標的領域の増幅手段、
をさらに含む、生物学的試料中の細菌の核酸の検出用キット。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、改善された生物学的試料からの細菌の単離方法が提供され得る。係る方法は、生物学的試料、特に血液試料中の細菌を検出するための診断方法において試料調製のために使用され得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

発明の要旨

本発明の主要な目的は、生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的な抗体を用いた生物学的試料からの細菌の単離方法を提供することであり、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している。

【0009】

本発明の好ましい態様は、
-生物学的試料中に含まれる真核生物細胞に特異的に結合する抗体を提供する工程、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、および
-該抗体を該生物学的試料と混合する工程、および
-該混合物から抗体-真核生物細胞-複合体を分離する工程、
を含む、生物学的試料からの細菌の単離方法である。

【0010】

係る方法において、細菌結合性Fc-末端を欠損している抗体を使用することが重要であり、少なくともこれらの抗体は、その後に検出されるべきであるそれら細菌に結合しない

10

20

30

40

50

。一般にバイオテクノロジー的適用で使用される抗体のFc-末端はたいいてい、プロテインA、プロテインGおよびプロテインLのような免疫グロブリン結合タンパク質を通じてほぼ全ての細菌に結合することが可能である(Navarre,W.W.およびSchneewind,O., Microbiol.Mol.Biol.Rev.63(1999)174-229; Reeves,H.C.ら、Anal.Biochem. 115(1981)194-196); Nils on,B.ら、J.Immunol.Methods 99(1987)39-45); Akerstrom,B.ら、J.Biol.Chem. 264(1989)19740-19746)。しかしながら、上記の単離方法において係る抗体を使用することは、試料中の真核生物細胞の枯渇のみならず細菌の枯渇にもつながる。このことは必然的に試料中の細菌負荷の過小評価につながるであろうし、最悪の場合は、その後の細菌の核酸またはタンパク質の検出方法における誤った陰性結果につながるであろう。したがって、細菌結合性Fc-末端を欠損している抗体を使用することが非常に重要である。この目的に対しては、テトラマー抗体(US2003/0092078)、Fab-フラグメントおよび覆われたFc-末端を有する抗体が特に適している。

10

【0011】

本発明の別の態様は、生物学的試料からの真核生物細胞の枯渇に続く、生物学的試料からの核酸および/またはタンパク質の抽出に関する。試料由来の抽出されたタンパク質および/または核酸は、続いて細菌特異的タンパク質および/または核酸の検出方法において使用され得る。

【0012】

発明の詳細な説明

本発明の一態様は、生物学的試料中に存在する真核生物細胞を枯渇させることによる該生物学的試料からの細菌の単離方法に関する。

20

【0013】

真核生物細胞が枯渇した試料は、たとえば免疫診断的または核酸検出方法を使用して細菌を検出する時に、実際にいくつかの有利な特性を有する。すなわち、生物学的試料、特に血液試料中に通常存在する真核生物のタンパク質および核酸レベルは、細菌の核酸およびタンパク質のレベルと比較して非常に高い。このことは、係る試料中の細菌の核酸および/またはタンパク質の検出を妨害し得る。これが特異的な核酸および/またはタンパク質を検出する前にこれらの試料から全核酸および/またはタンパク質を抽出する場合の特に重要なことである。

【0014】

このことは、PCR法を用いて係る試料中の細菌の核酸を検出する場合に例証され得る。PCRは、試料中に存在する理論上1個の標的の増幅および検出ができる(しかしながら、実際にはこの感度を達成するのは非常に困難である)。プライマーおよびプローブの最適化の他にPCR-アッセイの感度は、バックグラウンドDNAに対する標的DNAの比に強く影響される。バックグラウンドDNAを増量すると標的DNAに対するPCRアッセイの感度が減衰し得ることは周知である。

30

【0015】

ヒトまたは動物由来試料において、核酸のほとんどがこれらの試料中に存在する真核生物の血球に由来しており、検出されるべき細菌由来ではない。ヒトの核酸と比較される細菌の核酸の比は、容易に計算され得る。健康なヒトのドナーに由来する全血の1mlは、 3×10^6 および 10×10^6 間の白血球を含む。敗血症患者の場合、白血球レベルは 30×10^6 /mlまで高められる。「典型的な」敗血症患者は 10×10^6 /mlの白血球量および100/mlの細菌負荷を有するという仮定がなされ得る。ヒトゲノムのサイズが1白血球あたり 3×10^9 塩基対半数体(6×10^9 塩基対2倍体)の範囲内であり、細菌のゲノムサイズが 6×10^6 塩基対の範囲内であることを考慮に入れると、結果として1対 10^8 というヒトのバックグラウンドDNAに対する細菌の標的DNAの比が生じる。

40

【0016】

バックグラウンド核酸の阻害という問題を克服するための一般的な慣行は、増幅の間に内部コントロールを使用することおよびその後のPCR作業において阻害された試料を希釈することである。しかしながら、試料の希釈は通常、感度の減損につながり、避けられる

50

べきである。そしてまた、さらなる希釈工程およびPCR増幅反応は、日常的な診断方法において好ましくない。したがって、患者由来の典型的な血液試料中の細菌を検出することを目的とする場合、これらの試料から抽出される全核酸のほとんどがドナーに由来するという問題を克服することが有利である。さらに、敗血症患者由来の試料については特に、核酸検出方法における感度の問題を回避し得る多量の試料を得ることが出来ない。

【0017】

本発明は、試料から真核生物細胞を選択的に枯渇させることによりこの問題の解決を提供する。この試料は高濃度のドナーの核酸を含まず、病原性因子に由来する、特に試料中に含まれる細菌に由来する核酸を調製するために使用され得る。

【0018】

これは特に核酸を検出する場合の問題を例証するが、細菌のタンパク質の検出に関して同様の問題があることが注目されるべきである。係る方法において、ドナー由来のタンパク質は有意な妨害につながり得る。さらに、係る方法はまた、ウイルスなどの他の病原体の検出方法を改善するためにも使用され得る。

【0019】

生物学的試料は、ヒト、動物または自然界の他の場所由来であってもよい。好ましい試料は、血液、血清、プラズマ、骨髄、組織、唾液、胸膜および腹膜の滲出液ならびに浮遊物、尿、精液ならびに大便である。

【0020】

本発明の文脈における細菌とは、任意の公知の細菌、特に病原性症状、たとえば感染性疾患に關与する細菌をいい得る。

【0021】

Staphylococcus spp、*Streptococcus* spp、*Enterococcus* spp、*Enterobacter* spp、*Klebsiella* spp、*Escherichia coli*、*Proteus mirabilis*、*Pseudomonas* spp、*Haemophilus influenzae*およびその他のような敗血症に關与する細菌は、特に重要である。本発明は、試料から真核生物細胞を枯渇させ、タンパク質および/または核酸を抽出し、続いて1以上の關与する細菌に特異的な核酸および/またはタンパク質を検出する、唯一の単離方法を行うことによって係る疾患に關与する複数の細菌の検出ができる。係る複合的検出手段を、当該分野で公知の試料調製方法を用いて行うことは困難である。

【0022】

所望される効果を達成するためにしばしば、生物学的試料中に存在する全真核生物細胞を枯渇させることが必要ではない。免疫診断方法に關して、たとえば、特定の抗体を使用する場合、より大きな相互反応性(cross-reactivity)を有する特定の真核生物細胞を枯渇させることで足り得るか、または最も豊富にある細胞を枯渇させることによって真核生物のタンパク質の含有量を枯渇させることで足り得る。核酸検出方法に關してたいいていの場合、実際にゲノムDNAを有する核のある真核生物細胞を枯渇させることで足りる。たいいていの場合、真核細胞の枯渇は必要でなく、それはこれらの細胞がゲノムDNAを含まず、これらの細胞に含まれるインヒビターが、その後の試料調製方法の間に容易に洗浄され得るからである。また、核酸増幅方法を行う場合は特に、細菌の核酸の相対含有量が真核生物のゲノムDNAよりも有意に大きいことが何より所望される。したがって、これらの細胞のほとんどを枯渇させることで足りるが、枯渇された生物学的試料が真核生物細胞を全く含まない必要はない。

【0023】

本発明の方法で使用される抗体は、2つの必須の特性を充足しなければならない。第一に、それらは実際に、好ましくはそれらの抗体の特異的抗原結合性ドメインにより生物学的試料から枯渇されるべき真核生物細胞に結合する。たとえば血液試料に關して、白血球、赤血球、単球の細胞表面抗原に特異的に結合する適切な抗体が、当業者に公知である(たとえば、T細胞に対してCD2/CD3、単球に対してCD14、顆粒球および単球に対してCD15、マクロファージに対してCD16、血小板、単球およびマクロファージに対してCD36、白血球に対してCD45)。

【0024】

第二に、該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損しているか、または該抗体のFc-末端は遮られている(たとえば、テトラマー抗体の使用時)。細菌に結合するFc-末端を有する抗体は、細菌をも含む真核生物細胞-抗体複合体を生じるであろう。試料からの該複合体の分離は、意図せずとも細菌をも枯渇された試料につながるであろう。このことは、その後、該試料で実施される細菌検出方法において誤った陰性結果につながるであろう。特に、バイオテクノロジー方法において通常使用されるIgG抗体のFc-末端は、高い親和性で細菌と結合する。

【0025】

本発明の方法において使用され得る、Fc-末端への細菌の結合を欠損している抗体は、たとえばテトラマー抗体あるいはパパインもしくはペプシン消化により生じるFab-または $F(ab')_2$ -フラグメントのようなFc-部分が欠けている抗体フラグメントであり、これは当業者にとって技術操作の状態にある。

10

【0026】

しかしながら、*Peptostreptococcus magnus*のような他の微生物はIgGおよびIgMの双方に強く結合するプロテインLを発現するのに対して、*Staphylococcus aureus*または*Streptococcus spp*のようないくつかの微生物はIgGの(IgG's)Fc γ -部分への強い結合を示すが、(ほとんど)全くIgMに結合を示さないプロテインAまたはプロテインGのような免疫グロブリン-結合性タンパク質のみを発現するので、生物学的試料から特殊な種の微生物のみが検出されるべき場合は、試料からの真核生物細胞の枯渇のためにIgM-型抗体が使用され得る。

20

【0027】

従って、IgM-型-抗体の使用は、このアプローチが普遍的ではなく、*Staphylococcus aureus*または*Streptococcus spp*のような特殊な微生物の検出に限定される場合は、本発明の代替的な態様である。

【0028】

抗体の特性によっては、抗体-真核生物細胞-複合体は、当該技術分野で公知の標準的方法により生物学的試料から分離され得る。

【0029】

かかる複合体はたとえば、抗体に結合可能なマトリクスを使用することにより試料から分離され得る。細菌と比較して浮遊(buoyant)密度において複合体が異なる場合、複合体はたとえば試料の密度勾配遠心分離により容易に分離され得る。IgMまたはテトラマー抗体のような架橋抗体を使用する場合、複合体は非常に濃厚であり、たとえばFc cell(ρ 約1,080g/ml)遠心分離を用いた1ステップの密度勾配により非常に容易にペレット化され得る。別の可能性は、直接的または間接的にたとえば磁性粒子のような固相に結合した抗体を使用することである。抗体-真核生物細胞-複合体は次に、磁力を適用することにより非常に容易に分離され得る。固相に直接的に連結される場合、抗体は共有結合を介して当該技術分野で公知の技術を用いて固相に結合される。間接的な連結、たとえばストレプトアビジン-ビオチンおよび(ジゴキシゲニン-抗ジゴキシゲニン抗体のような)抗体-抗原-対もまた、当該技術分野において公知である。

30

40

【0030】

本発明のさらなる態様において、生物学的試料からの真核生物細胞枯渇のために、細菌結合性Fc-末端を欠損している、真核生物細胞に特異的な抗体を使用することにより、細菌が生物学的試料から単離されるのみならず、処理された試料から核酸および/またはタンパク質が抽出される。この目的に関しては、当該技術分野において公知な標準的抽出方法が使用され得る(たとえば、Sambrookら、*Molecular Cloning-A Laboratory Manual*、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)参照)。

【0031】

たとえば核酸は、当該技術分野で周知の通りにこれらの細胞を溶解し、プロテイナーゼKで消化し、任意にフェノール/クロロホルム抽出を行い、アセトンまたはプロパノールを

50

用いて核酸を沈殿させることにより調製され得る(Sambrookら、前出)。しかしながら、たとえばガラス-核酸結合-技術に基づいて市販されている容易に使用できる抽出キット(たとえばRoche Diagnosticsより販売されるMagNAPure(登録商標))のような多くの代替方法もまた使用され得る。

【0032】

本発明のさらなる態様は、細菌結合性Fc-末端を欠損している真核生物細胞に特異的な抗体を用いて真核生物細胞を枯渇させることによる、生物学的試料からの細菌の単離、前記試料からの核酸および/またはタンパク質の抽出および前記試料中の特異的な細菌の核酸配列および/またはタンパク質の検出に関する。適切な検出方法は、当該技術分野で公知な明確な方法に限定されない(たとえば、Sambrookら、前出参照)。

10

【0033】

細菌-特異的な核酸配列は、当業者に公知の方法、たとえばサザンブロット技術を用いたプローブ-ハイブリダイゼーション法により検出され得る。他の検出方法としては、検出される核酸配列の配列決定またはプラスミドベクター中の所望される核酸配列のクローニングが挙げられる。概観は(Sambrookら、前出)中に示される。

【0034】

標的核酸が、試料中に非常に低濃度でしか存在しない場合、検出を可能にするために増幅方法が有用である。適切な増幅方法は、たとえばLCR(米国特許第5,185,243号、第5,679,524号および第5,573,907号; EP 0 320 308 B1; WO 90/01069; WO 89/12696; およびWO 89/09835)、サイクリングプローブ技術(米国特許第5,011,769号、第5,403,711号、第5,660,988号および第4,876,187号)ならびにPCTの公開された出願WO 95/05480、およびWO 95/00667)、インベーターTM 技術(米国特許第5,846,717号;第5,614,402号;第5,719,028号;第5,541,311号;および第5,843,669号)、Q-ベータレプリカーゼ技術(米国特許第4,786,600号)、NASBA (米国特許第5,409,818号; EP-0 329 822)、TMA (米国特許第5,399,491号、第5,888,779号、第5,705,365号、第5,710,029号)、SDA (米国特許第5,455,166号および第5,130,238号)およびPCR(US-A-4,683,202)である。

20

【0035】

本発明はさらに、上記の方法において使用され得るキットに関する。

【0036】

— 1 または複数個の容器内に生物学的試料中の真核生物細胞に特異的に結合する抗体、ここで該抗体は細菌結合性Fc-末端を欠損している、
— 1 または複数個の容器内に核酸および/またはタンパク質の抽出手段、を含む、生物学的試料からの細菌の核酸および/または細菌のタンパク質の抽出用キットが好ましい。

30

【0037】

核酸および/またはタンパク質の抽出手段は、プロテイナーゼK、(核酸)結合バッファー、(核酸)洗浄バッファー、(核酸)溶出バッファーのような核酸もしくはタンパク質を抽出するための試薬またはデバイスであり、必要とされる場合には他の試薬もまた、これらのキット中に含まれ得る。

【0038】

本発明のさらなる態様は、核酸および/またはタンパク質の検出用手段をも含むキットに関する。係るキットはまた、検出のために使用され得る。検出手段は、たとえば細菌のタンパク質に特異的な抗体であり得る。細菌の核酸が標的である場合、適切な手段は細菌に特異的なオリゴヌクレオチドプローブおよび適切なハイブリダイゼーションバッファーである。標的核酸が増幅される場合、増幅手段、たとえばプライマー、増幅バッファー、プローブおよび/または増幅酵素もまた、これらのキット中に含まれ得る。

40

【0039】

抗体、オリゴヌクレオチド(プライマーおよびプローブなど)のような検出用手段は、検出を簡単にするために任意にラベル化され得る。適切なラベルは、当該技術分野において公知である。

50

【0040】

本発明は、以下の実施例により例証される：

【実施例】

【0041】

実施例1

密度勾配遠心分離を用いた白血球の枯渇による血液試料からの細菌の単離

研究方法の背景

密度勾配培地の使用は、臨床化学において血球を遠心分離により異なる集団に分離するための一般的な方法である。最も一般的に使用する培地は、Percoll(登録商標)およびFicoll(登録商標)である。Percoll(登録商標)は、透析できないポリビニルピロリドン(PVP)で被覆された15~30nmの範囲内の多分散系コロイド状シリカゾルである。市販のPercoll(登録商標)(たとえばAmersham由来)は、 $1.130 \pm 0.005 \text{g/ml}$ の密度を有する約23%(重量/重量)のシリカ粒子から成る。AmershamのFicoll-Paque Plus(登録商標)は、 $1.077 \pm 0.001 \text{g/ml}$ の密度を有する、100mlあたり5.7g Ficoll(登録商標)400(スクロースおよびエピクロルヒドリンの合成高分子量ポリマー)および9.0gジアトリゾ酸ナトリウムの水溶液である。

10

【0042】

原則として、細胞分離には2つの技術：連続および不連続(ステップ様式)密度勾配が使用される。連続勾配の場合、粒子(たとえば細胞)の懸濁液は遠心分離され、細胞はその勾配の位置に沈降し、そこでは細胞の密度および勾配の密度が等しい(細胞の浮遊密度)。 0.01g/ml ほどの低密度において異なる細胞は、この技術により分離され得る。不連続勾配を使用する場合、細胞は2つの異なる密度培地の中間面に沈降し、そこでは上方の培地は沈降した細胞よりも低い密度を有し、下方の培地は沈降した細胞よりも高い密度を有する。

20

【0043】

粒子の沈降速度 v (速度のことである)は、ストークスの法則によって与えられ、

【0044】

【数1】

$$V = \frac{d^2(\rho_p - \rho_i) \times g}{18\eta}$$

30

【0045】

それは、次のことを意味する。

- ・遠心力(g)が増大するのに応じて沈降速度は増大すること。
- ・沈降速度は粒子サイズ(d)の二乗に比例すること。
- ・沈降速度は、粒子の密度(ρ_p)およびその周りの培地の密度(ρ_i)間の差に比例すること、これは粒子の密度および培地の密度が等しい場合は沈降速度がゼロになることを意味する。
- ・培地の粘度(η)が増大するのに応じて沈降速度は減少すること。

40

【0046】

連続Percoll(登録商標)勾配の形成は時間がかかり、高い g 力が必要とされる(20,000~35,000 g)ので、以下に記載した実験は不連続または2ステップ勾配を用いて行い、ここで培地の密度はPercollを等張性NaCl溶液で希釈することにより得られる。

【0047】

この場合、遠心チューブ内の密度ステップはピペティングし、別の培地の後に一方の培地を重層することにより簡単に作られ、低密度の全血試料はチューブの上端に重層される。

【0048】

以下の表には、Percoll(登録商標)の使用に関してAmersham/Pharmaciaの技術応用冊子

50

から引用した異なる血球およびE.coliの浮遊密度を示す。

【0049】

【表1】

表 1:

	密度 (g/ml)
ヒト 血球	
血小板	1.04 – 1.06
リンパ球	1.06 – 1.08
顆粒球	1.08 – 1.09
赤血球	1.09 – 1.10
<i>E. coli</i>	1.13

10

【0050】

20

この一覧表による仮説は、細菌は白血球の密度よりも明らかに高い密度を有しており、従ってリンパ球および単球(PBMC)を顆粒球からおよび赤血球から分離することのできる決まりきったプロトコルが、白血球からインタクトな細菌を分離するのに適合し得るというものであった。

【0051】

実験準備

15mlファルコンチューブ中に、まず4mlの74%ig等張性Percoll(登録商標)溶液(ρ 約1.095g/ml)をチューブ内にピペッティングし、この培地に4mlの55%ig等張性Percoll溶液(登録商標)(ρ 約1.075g/ml)を重ねし、双方の密度培地に4mlの細菌入りの全血を重ねることにより、2ステップPercoll(登録商標)勾配を作った。

30

【0052】

試料を含むこの2ステップ勾配を、スウィングアウトローター(05315型)を有するHeraeus Variofuge 3.0 R中で350gで20分間、室温で遠心分離し、Beckman Coulter AcT Diff上でこれらの画分のアリコート測定することにより画分内および/または培地間に形成される細胞状中間面内の血球量を決定した。

【0053】

LightCycler(登録商標)1.2上でLightCycler-Control Kit(登録商標)DNAを用いて β -グロビン遺伝子を増幅することにより、画分中のヒトゲノムDNAの量を測定し、Roche Diagnosticsの単パラメーターアッセイを用いることにより細菌のDNA (Staph.aureusおよびP.aeruginosa)の量を測定した。

40

【0054】

この目的のために、画分のアリコートを手引書から得られる指示に従い、MagNA-Pure(登録商標)上で処理した。

【0055】

「未処置」血液試料アリコートをMagNA Pure上で処理し、この非-遠心分離試料の濃度を100%とすることで、画分中のヒトゲノムDNAおよび細菌のDNAの回収率を計算した。

【0056】

遠心分離試料の回収率を計算するとき、細胞画分および初発試料体積間の体積比を斟酌した。

【0057】

50

g 力、遠心分離時間、および培地の密度変化のようなこのプロトコルの修正は、以下で議論する。

【0058】

結果および考察

上記のような2ステップ勾配（20分350g）を使用することにより、全血試料を、3つの画分にほぼ定量的に分離する。

【0059】

第一画分は、「血漿」と55%ig Percollとの間の界面に位置する密集した白血球層で、濃縮血小板および末梢血単核細胞（PBMC＝リンパ球および単球）からなる。

【0060】

第二画分は、55%igと74%ig Percoll（登録商標）との間の界面に位置する濃縮顆粒球（多形核細胞）からなり、赤血球は74%ig Percoll（登録商標）溶液よりもわずかに高い密度を有しているため、第三画分は、チューブの底の赤血球の赤色ペレットである。（幾つかの場合、赤血球は濁ったペレットを全体積の74%ig Percoll（登録商標）画分のまわりに分布させた、これは、赤血球あたり低量のヘモグロビン、従ってより低い浮遊密度を有する試料によるものであった。）

【0061】

血球と比較して高い細菌の浮遊密度を想定すると、細菌は、赤血球と共にチューブの底に沈降し、従って、白血球から分離されるべきである。

【0062】

細菌が約1 μ mの範囲であり、一方、血球が約10 μ mの範囲であり、沈降速度 v が細胞直径の平方（ d^2 ）の関数である場合、細菌は、中程度のg力で血球と比較して非常に緩徐に沈降するはずである。

【0063】

ストークス（stocks）方程式によるモデル計算は、上記遠心分離条件に対して約6時間の沈降時間を与え、細菌をチューブの底に濃縮した。これは、小さい粒子サイズによるだけでなく、74%ig Percoll（登録商標）と細菌との間の密度における小さな差にもよるようである。

【0064】

従って、さらなる実験セットにおいて、プロトコルを、より高い沈降速度（rate）／速度（velocity）を生ずるより高いg力に適應させ、これは、高すぎるg力ではPercoll（登録商標）のシリカ粒子が沈降し始め（連続勾配を形成する）、系が「不安定」になるという現象により限定される。

【0065】

密度勾配のステップを破壊することなく、2300gで2時間までの遠心分離が可能であり、また血球を上記3画分に分離できた。

【0066】

さらに、2ステップ勾配を、4mlの全血と4mlの74%ig Percoll（登録商標）のみを含む1ステップ勾配に簡単にした。この場合、界面血漿／Percoll（登録商標）の細胞画分は、白血球（および血小板）の垂集団を全て含み、赤血球はチューブの底でペレット化した。

【0067】

この1ステップ勾配の利点は、チューブの底に沈降するための細菌の距離が明確に短くなり、従って、細菌は（より高いg力と組み合わせて）チューブの底に約1時間で沈降するはずである。

【0068】

この最適化プロトコルを用いて、細菌がスパイクされた10個の異なるドナー由来の全血を遠心分離し、分析した。

【0069】

細胞画分を界面血漿／Percoll（登録商標）で含む上清は、約90%のヒトゲノムDNAを含んでおり、Coulter Counterで知見した対応する量の白血球と一致した。

10

20

30

40

50

【0070】

驚くことに、約80%の細菌が、この画分および予期できずに74%ig Percoll（登録商標）相に同様に見出され（下の表を参照のこと）、これは、白血球と細菌を2つの異なる相に分離することができないことを意味する。

【0071】

さらに、「ソフトスピン」（30分350g）と「ハードスピン」（100分2300g）との間にはば差はなく、細菌の浮遊密度が74%ig Percoll（登録商標）溶液の密度（ $\rho = 1.095\text{g/ml}$ ）より低くなければならないことを示す。

【0072】

従って、最後の実験セットにおいて、細菌が赤血球と共にPercoll（登録商標）画分に
10
入り込むことができるように、65%および55%Percoll（登録商標）を使用してPercoll（登録商標）溶液の密度を減少させた。

【0073】

この場合、最も稠密な白血球である顆粒球は、すでにPercoll（登録商標）相に入っており、一方、約70%の細菌ならびに全てのリンパ球および単球はまだ界面に／上清にとどまっていた。

【0074】

これは、Percoll（登録商標）の密度がほとんどの細菌細胞の浮遊密度よりもまだ高いことを意味する。

【0075】

【表2】

表2：

DNAの回収 (100分2300g)	74 % Percoll $\rho = 1.095$	65 % Percoll $\rho = 1.085$	55 % Percoll $\rho = 1.075$
上清/ 界面	約 90 % h.gen. DNA 約 80 % 細菌 DNA	約 40 % h.gen. DNA ³ 約 70 % 細菌 DNA	約 40 % h.gen. DNA ³ 約 70 % 細菌 DNA
Percoll 相	約 10 % h.gen. DNA 約 20 % 細菌 DNA	約 60 % h.gen. DNA [#] 約 30 % 細菌 DNA	約 60 % h.gen. DNA [#] 約 30 % 細菌 DNA

³ Coulter Counter によると主にリンパ球と単球

[#] Coulter Counter によると主に顆粒球

【0076】

これらの結果は、細菌が1.10g/mlより大きな浮遊密度を有する（Percoll（登録商標）の使用についてのAmersham/Pharmaciaの技術注解に述べられる）という初期の仮定と明らかに矛盾するので、独自の文献検索を行った。

【0077】

Bakken, L.R., および Olsen, R.A. (Appl. Environ. Microbiol. 45 (1983) 1188-1195) は、幾つかの細菌の浮遊密度について1.035g/mlと1.093g/mlとの間の値を公表した。しかし、1種（E. coli）に対してでさえ、浮遊密度の値は1.05g/mlと1.10g/mlとの間で変化する（例えば、Woldringh, C.L., ら, J. Bacteriol. 148 (1981) 58-63を参照のこと）。

【0078】

報告された値の差は、ある程度は使用された異なる技術／培地（異なる浸透圧影響および細胞への塩浸透を引き起こし、それにより細胞の浮遊密度に影響を及ぼす）による。
40

【0079】

さらに、文献は、生育条件が細菌細胞の浮遊密度に影響を及ぼすことを述べている（例えば、Martinez-Salas, E., ら, J. Bacteriol. 147(1981)97-100を参照のこと）。

【0080】

結論

密度勾配培地の使用は、遠心分離により血球を種々の集団に分離するために臨床化学において一般的な方法である。赤血球中の相対的に稠密なヘモグロビン分子のため、赤血球は遠心分離中にチューブの底に沈降する。形態学的観点から、白血球が細胞の異種クラスである場合、これらの細胞の浮遊密度は、単核細胞（リンパ球および単球）について1.06
50

g/mlから多形核細胞（顆粒球）について1.09g/mlまでの範囲である。

【0081】

結果として、遠心分離に使用される培地の密度に依存して白血球を種々の画分に分離することができる。

【0082】

BakkenおよびOlsen (1983, 上記参照) は、Percoll（登録商標）を使用した幾つかの細菌の浮遊密度について1.035と1.093g/mlとの間の値を公表した。

【0083】

上記結果によると、細菌細胞の浮遊密度（Staph. aureusおよびP. aeruginosaを用いた実験）は、単球の浮遊密度（約1.06～1.07g/ml）と同じ範囲であるように思われる。結果として、全ての白血球と細菌の2つの異なる稠密培地への分離は不可能であると思われる。

10

【0084】

74%Percoll（登録商標）（ ρ 約1.095g/ml）を使用すると、赤血球のみがPercoll（登録商標）に入り込み、細菌はリンパ球、単球および顆粒球と共に上清にとどまる。

【0085】

Percoll（登録商標）の密度を ≤ 1.085 （ $= \leq 65\%$ ）に減少する場合、顆粒球は赤血球と共にチューブの底に沈降し、一方、細菌は単球と共にまだ上清中にとどまったままである。

【0086】

20

従って、「より稠密でない」白血球を「より稠密な」赤血球と同時に沈殿し、次いで、細菌の浮遊密度よりも高い密度を有する培地を用いて遠心分離工程を行うアプローチは、全白血球からの細菌細胞の分離を生じるはずである。このアプローチは、実施例3に示される。

【0087】

実施例2

Dynal（登録商標）ビーズを使用する血液試料からの細菌の単離

アプローチの背景

免疫捕獲による白血球（およびその亜集団）の枯渇は、血液試料から稀有細胞（例えば、腫瘍細胞）を富化するための確立された方法である。種々の型の白血球は種々の型のCD表面抗原を発現するので、磁気ビーズの混合物を使用し、白血球を磁気分離により枯渇する。

30

【0088】

実験段取り

1mlの全血を20分間室温で70 μ lのDynabeads（登録商標）M-450 <CD45>（Dynal Prod. No. 111.19）および／または70 μ lのDynabeads M-450 <CD15>（Dynal Prod. No. 111.17）と共に回転インキュベーター上でインキュベートした。リンパ球は細胞表面上に主にCD45を発現し、一方、単球および顆粒球は主にCD15を発現するので、両磁気ビーズの混合物は、全白血球に対して許容され得る枯渇割合に到達するのに必要である。ビーズの磁気分離後、上清における枯渇割合をBeckman Coulter AcT Diff上の残存血球を測定することにより決定した。次いで、上清を細胞溶解性酵素により、または「青色ビーズ」を使用するRibolyzer上のビーズビーディングにより消化し、マニュアル／パッケージ入紙に記載のプロトコールに従って試料をMagNA Pure（登録商標）上で処理した。

40

【0089】

溶出液中のヒトゲノムDNAの量を、LightCycler Controll Kit DNA（Rocheカタログ番号2 158 833）を使用してLightCycler 1.2（Roche Diagnostics）上で β -グロビン遺伝子を増幅することにより定量し、細菌DNAの量を、Staph. aureusおよびP. aeruginosaについての単一パラメーターアッセイを使用することにより定量した。

【0090】

結果および考察

50

上記のような〈CD45〉および〈CD15〉ビーズの混合物を使用すると、白血球および対応のヒトゲノムDNAの枯渇割合は、90%までであった。

【0091】

以下の表は、白血球の免疫捕獲後、スパイクされた全血（100細菌/PCR）の上清中のグラム陽性およびグラム陰性細菌の回収を示す。

【0092】

細菌DNAの回収を、未処理血液試料アリコートにMagNA Pure（登録商標）上で処理し、試料の濃度を100%として設定することにより計算した。

【0093】

【表3】

ビーズ	回収%		白血球の 枯渇割合(%)
	Staph. aureus	P. aeruginosa	
〈CD45〉	34%	38%	73%
〈CD15〉	114%	85%	57%
〈CD45〉 + 〈CD15〉	49%	42%	89%

【0094】

細菌の回収割合は、スパイクされた試料を〈CD15〉ビーズのみとインキュベートする場合、100%の範囲である。同量の〈CD45〉ビーズを使用するか、または〈CD15〉ビーズに〈CD45〉ビーズを添加すると、細菌の回収が約40%の範囲に低下し、これは白血球と並んで主な細菌が〈CD45〉ビーズに結合することを意味する。

【0095】

試料物質として細菌がスパイクされた血漿を用いた実験を繰り返すことにより、細菌の〈CD45〉ビーズへの結合は白血球媒介ではないことが示された。

【0096】

さらに、白血球がまだ溶解されない濃度範囲（0.05%～0.5%）での血液試料への種々の界面活性剤（NP-40、Na-ラウリルサルコシン、Zwittergent 3-12(登録商標)）の添加はビーズへの細菌の所望でない結合を減少しないので、細菌が〈CD45〉IgGコーティングビーズに非特異的に結合することはない。

【0097】

最も有望な説明は、細菌が免疫グロブリン結合タンパク質を介して〈CD45〉ビーズ上にコーティングされたIgGのFcγ部分に結合するということである。Staphylococcus aureusは、例えば、細胞表面上に免疫グロブリン結合タンパク質としてプロテインAを発現する。

【0098】

これは、ビーズ上の〈CD15〉AbがIgMであり、かつプロテインAがIgMに親和性を有さない場合、なぜ〈CD15〉ビーズへの細菌の結合がほとんど生じないか説明するであろう。

【0099】

結論

〈CD45〉 / 〈CD15〉磁気ビーズを介する白血球の枯渇は、細胞分離において確立されたツールである（例えば、腫瘍細胞の富化）。

【0100】

細菌は〈CD45〉ビーズに結合し、おそらく細菌の細胞表面上に発現された免疫グロブリン結合タンパク質を介してビーズ表面上にコーティングされたマウスIgG抗体に結合することがわかった。マウスIgM抗体を含む〈CD15〉ビーズを使用する場合、ビーズへの細菌の結合は見出されなかった。

【0101】

実施例3

10

20

30

40

50

テトラマー抗体を使用して白血球を枯渇し遠心分離することによる血液試料からの細菌の単離

アプローチの背景

会社Stemcell (Vancouver Canada) が血球の枯渇用のRosetteSep(登録商標)製品系列である幾つかの抗体カクテルを提供する。これらのRosetteSep(登録商標)試薬は、所望でない細胞(例えば、白血球)を複数の赤血球に架橋し、ロゼットを形成する。Ficoll(登録商標)(ρ 約1.080g/ml)のような浮遊密度培地に亘り遠心分離すると、所望でない(ロゼット)細胞は遊離RBC(ρ 約1.09~1.10g/ml)と共にペレット化し、所望の細胞(例えば、腫瘍細胞)を接触しないまま、血漿上清、または遠心分離条件に依存して、Ficoll/血漿界面にとどまらせる。

10

【0102】

カクテルのテトラマー抗体複合体は、2つのマウスIgG抗体からなり、1つは白血球の表面抗原(CDxx)に対して指向され、他方は、赤血球上に発現される表面抗原としてのグリコホリンAに対して指向され、2つの〈マウスFc γ 〉ラットIgM抗体は、Fc γ 部分を介して2つのマウス抗体をテトラマー複合体に架橋する。

【0103】

これらの試薬は、腫瘍細胞富化に慣用的に使用され、製造業者によると約30%の腫瘍細胞の回収割合で2~3オーダーの大きさの範囲でロゼット細胞に対して枯渇割合を与える。

【0104】

免疫沈降工程に関して、カクテルの抗体への細菌の有意な非特異的結合は予期されなかった(Dynabeads M 450〈CD45〉の使用でわかったように、実施例2参照)。なぜならば、このアプローチにおいて、使用されるマウスIgGのFc γ 部分は架橋ラットIgM抗体により隠され、細菌により発現される免疫グロブリン結合タンパク質はラットIgMとの相互作用を示さないかまたは非常に弱くだけ示すからである。

20

【0105】

密度勾配培地を使用した初期の実験において(実施例1を参照)、細菌は1.070以上の浮遊密度を有する密度培地(55~74%Percoll)に入り込むことができないことが観察された。

【0106】

従って、細菌はソフトスピン中は上清にとどまっているはずであり、一方、相対的に稠密な赤血球および白血球同時沈殿物はFicoll相中でペレットを形成することにより分離されるであろうことが予測される。

30

【0107】

実験段取り

バクテリアスパイク血液試料を用いる実験についての開始点は、白血球の枯渇用のStem cell製の技術応用ノートから得たプロトコールであった。

【0108】

プロトコールは、〈CD45〉と並んで〈CD66b〉および〈CD36〉に指向される「CD45 Depletion for Enrichment of Circulating Epithelial Tumor Cells」カタログ番号15 122と呼ばれる抗体カクテル(40mlの全血を標識するために2ml)を使用する。

40

【0109】

さらに、DM-L(カタログ番号15 705、100ml; ρ =1.081g/ml)と呼ばれる特別な密度培地を使用する。Stemcellは、一般に使用されるFicoll(ρ =1.077g/ml)を同様に使用することができ、上清中の腫瘍細胞について少し低い回収割合を生じることを述べている。

【0110】

このプロトコールに従い、2.0mlの全血を、Eppendorfミキサー中で穏やかに振とうしながら室温で20分間100 μ l CD45枯渇カクテルと共にインキュベートした。試料を、2%RPLA-4(ウシ血漿アルブミン)を含む2.0ml PBSで希釈した。3.0mlのDM-L密度培地を15ml円錐底Sarstedtチューブ(カタログ番号62.554.502 PP)にピペットし、希釈した試料をFicoll様培地上に積層した。試料を、旋回ローター(タイプ05315)を使用してHeraeus Variof

50

uge 3.0R中で20分間2700rpm (=1200g) で遠心分離した。

【0111】

遠心分離後、生じた「血漿」とペレット化血球を含むFicoll様培地との間の界面は、はっきりと見えた。2相をピペティングにより分離し、そのアリコートでBeckman Coulter Counterで測定し、試料の初期細胞数と比較して白血球の枯渇比を決定した。

【0112】

ヒトゲノムDNAおよび細菌DNAの量を、マニュアル／パッケージ入紙に記載のプロトコールに従って両相の750 µlアリコートをRoche Diagnostics製MagNA Pure上で処理することにより決定した。溶出液中のDNAを、前記のようにLightCycler (登録商標) -PCRにより定量し、前述の免疫沈降工程なしのMagNA Pure処理試料のDNA含有量を100%値として採用して細菌についての回収割合およびヒトゲノムDNAについての枯渇割合として表した。

10

【0113】

結果および考察

上記のように元のStemcellプロトコールを使用すると、白血球および赤血球は、遠心分離後の血漿相中には細胞計数により検出されなかった。Ficoll様相でさえ、小型の細胞ペレットの他には血球がなかった。これらの結果は、2相中のヒトゲノムDNAの含有量についての値と一致する。

【0114】

このプロトコールは相対的に激しい遠心分離条件 (20分、1200g) を使用するので、g-力および遠心分離時間は、最初の実験セットでは少なくして、上清中の細菌について良好な回収割合を得た。

20

【0115】

130または350g (=800rpmまたは1500rpm) の5分スピンは血漿相中で約80~90%の範囲でStaph. aureusおよびP. aeruginosaについて回収割合を得ることを見出した。

【0116】

130gと350gとの間の回収割合に差はなく、これは、細菌が稠密なFicoll様培地に有意に入り込むことができないことを示している。

【0117】

これらの遠心分離条件を使用すると、Ficoll様相中の血球ペレットは、密集 (compact) よりも濁っている (cloudy) が、それにもかかわらず、細菌を含む血漿相のヒトゲノムDNAの含有量はまだ約1%の範囲である。

30

【0118】

PBS/RPLA-4で希釈することなく、従って上清中の細菌の初期濃度の希釈を防止しながらインキュベートした試料を遠心分離することがさらに可能である。

【0119】

結論

白血球枯渇用のRosetteSep.抗体カクテルを使用すると、20分のインキュベーション工程により血球を同時沈殿すること、および短い遠心分離工程 (5分130または350g) によりFicoll様培地に細胞を沈降することが可能であった。白血球の枯渇は非常に効果的であるので、インキュベーション工程の時間を短くすることさえ可能なはずである。血漿画分のStaph. aureusおよびP. aeruginosaについての回収は、約80%~90%の範囲であった。

40

【0120】

従って、このプロトコールは、真核生物細胞に特異的な抗体 (細菌結合Fc-末端を欠損している) を提供することによって有意な量の細菌を放つことなく、非常に効果的に全血試料から白血球を枯渇することが可能である。

【0121】

実施例 4

磁性ビーズおよび抗体を使用する血液試料からの細菌の単離

より便利なプロトコールは、細菌結合Fc-末端を欠損している抗体を磁気ビーズ技術分離とあわせたフォーマット (例えば、実施例 3 に記載のテトラマー抗体／免疫沈降アプロ

50

ーチ)であり得る。かかるフォーマットは、自動化デバイス(例えば、MagNA Pure(登録商標)システム(Roche Diagnostics)など)に容易に統合され得るという利点を有する。

【0122】

かかるアプローチにおいて、白血球は、(テトラマー抗体/免疫沈降アプローチにおける赤血球の代わりに)磁気ビーズに直接的にまたは間接的に結合された抗体真核生物細胞複合体を介して同時沈殿される。かかるアプローチにおいて、例えば、ジゴキシゲニンポリハプテンコーティングビーズおよび<Dig>抗体を使用し得る。

【0123】

細菌の免疫グロブリン結合タンパク質と使用される免疫試薬との間の所望でない相互作用は、テトラマー抗体複合体に存在するIgGのFc γ -部分のブロックにより排除されると考
えられる。 10

【0124】

文献一覧

Akerstrom, B., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 19740-19746

Bakken, L.R., and Olsen, R.A., Appl. Environ. Microbiol. 45 (1983) 1188-1195

EP 0 320 308 B1

EP-0 329 822

Martineau, F., et al., J. Clin. Microbiol. 36 (1998) 618-623

Martinez-Salas, E., et al., J. Bacteriol. 147 (1981) 97-100

Navarre, W.W., and Schneewind, O., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63 (1999) 174-229 20

Nilson, B., et al., J. Immunol. Methods 99 (1987) 39-45

Rantakokko-Jalava, K., and Jalava, J., J. Clin. Microbiol. 40 (2002) 4211-4217

Reeves, H.C., et al., Anal. Biochem. 115 (1981) 194-196

Reischl, U., et al., J. Clin. Microbiol. 38 (2000) 2429-2433

Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

US 2003/0092078

US 4,786,600

US 4,876,187

US 5, 455,166 30

US 5,011,769

US 5,130,238

US 5,185,243

US 5,399,491

US 5,403,711

US 5,409,818

US 5,541,311

US 5,573,907

US 5,614, 402

US 5,660,988 40

US 5,679,524

US 5,705,365

US 5,710,029

US 5,719,028

US 5,843,669

US 5,846,717

US 5,888,779

US-A-4,683,202

Weinstein, M.P., et al., Clin. Infect. Dis. 24 (1997) 584-602

WO 89/09835 50

WO 89/12696

WO 90/01069

WO 95/00667

WO 95/05480

Woldringh, C.L., et al., J. Bacteriol. 148 (1981) 58-63

フロントページの続き

(72)発明者 ペーター カスパル

ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム 82362 アンガーマイエルシュトラッセ 14

(72)発明者 ラルフ ツィーレンスキ

ドイツ連邦共和国 ベーネディクトボイヤーン 83671 シュタインバッハー キルヒェンヴェーク 9

(72)発明者 ライナー シュリプフェンバッハー

ドイツ連邦共和国 パート デュルクハイム 67098 シェンケンペールシュトラッセ 9

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表2003-501629 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

C12N1/00

JSTPlus (JDreamII)

JMEDPlus (JDreamII)

JST7580 (JDreamII)

PubMed