

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4625696号

(P4625696)

(45) 発行日 平成23年2月2日 (2011. 2. 2)

(24) 登録日 平成22年11月12日 (2010. 11. 12)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 2 1

GO 1 N 33/577 (2006. 01)

GO 1 N 33/577 B

請求項の数 24 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2004-528036 (P2004-528036)
(86) (22) 出願日 平成15年8月12日 (2003. 8. 12)
(65) 公表番号 特表2005-535887 (P2005-535887A)
(43) 公表日 平成17年11月24日 (2005. 11. 24)
(86) 国際出願番号 PCT/US2003/025125
(87) 国際公開番号 W02004/014220
(87) 国際公開日 平成16年2月19日 (2004. 2. 19)
審査請求日 平成18年3月28日 (2006. 3. 28)
(31) 優先権主張番号 60/403, 407
(32) 優先日 平成14年8月13日 (2002. 8. 13)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505052227
エヌーディア, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国, ニューヨーク州 100
03, ニュー ヨーク, 20番 ストリー
ト イースト 30, スイート501, 5
番 フロア
(74) 代理人 100092783
弁理士 小林 浩
(74) 代理人 100095360
弁理士 片山 英二
(74) 代理人 100093676
弁理士 小林 純子
(74) 代理人 100120134
弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膈分泌液中の羊水を検出するための装置および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

妊婦の膈分泌液中の少量の羊水を検出する際に偽陽性および偽陰性の可能性を最小限にする方法であって、前記方法は、

(i) 妊婦の膈分泌液中の胎盤アルファ-1-ミクログロブリン (PAMG-1) の最小バックグラウンド濃度を決定するためにモノクローナル抗体の高度に特異的な対を選択する工程、および

(ii) 感度の所定の閾値を正確に設定して、前記妊婦の前記膈分泌液中の少量の羊水を検出するために、(i) の最高結合親和力の抗体よりも低い結合親和性を示し、(i) の前記抗体と組み合わせて使用されることが意図される少なくとも1つの他のモノクローナル抗PAMG-1抗体を選択する工程

を包含する、方法。

【請求項2】

前記抗体 (i) の前記対のうち一方の前記高度に特異的なモノクローナル抗体は、ストリップ装置のパッド領域に位置する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記抗体 (i) の前記対のうち一方の前記高度に特異的なモノクローナル抗体は、マーカーに結合される、請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記マーカーは、染料粒子である、請求項3記載の方法。

(2) 膈分泌液中の羊水を検出するための装置および方法

【請求項5】

前記モノクローナル抗体(i)の前記対の1つは、ストリップ装置の検査領域に位置する、請求項1記載の方法。

【請求項6】

1つまたはそれ以上の他の追加抗PAMG-1モノクローナル抗体(ii)は、前記対の前記1つの抗体(i)に対して所定の割合でストリップ装置の検査領域に位置する、請求項1記載の方法。

【請求項7】

前記抗体(i)の前記対と組み合わせて使用される前記抗体(ii)を使用して、前記ストリップ装置の感度の所定の閾値を設定する、請求項6記載の方法。

【請求項8】

前記ストリップ装置の感度の閾値が1ミリリットル当たり5~10ナノグラムの範囲である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

膈分泌液中に漏れている羊水を検出するための方法であって、

(i) 妊婦の膈分泌液中の胎盤アルファ-1-ミクログロブリン(PAMG-1)の最小バックグラウンド濃度の決定のためのモノクローナル抗体の高度に特異的な対の結合を検出する工程であって、前記抗体の対はバックグラウンドを超えるPAMG-1のレベルに感度がある、工程、および

(ii) 前記妊婦の前記膈分泌液中の少量の羊水を検出するために、(i)の最高結合親和力の抗体よりも低い結合親和力を示し、(i)の抗体と組み合わせて使用される少なくとも1つの他の抗PAMG-1抗体の結合を検出する工程を包含する、方法。

【請求項10】

前記一対の抗体は、バックグラウンドを超えるPAMG-1のレベルに感度がある、請求項9記載の方法。

【請求項11】

前記一対の抗体の一方は、固体担体上に固定される、請求項9記載の方法。

【請求項12】

前記固体担体は膜であり、それを通して液体は毛管作用によって移動することができる、請求項11記載の方法。

【請求項13】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項11記載の方法。

【請求項14】

前記固体担体上に固定されたPAMG-1に特異的な第2の抗体をさらに含む、請求項11記載の方法。

【請求項15】

前記固体担体上に固定された前記第1の抗体と前記第2の抗体との比率は、1ミリリットル当たり5~7ナノグラムというPAMG-1を検出する閾値レベルを提供する、請求項14記載の方法。

【請求項16】

モノクローナル抗体は、ロシア国立工業微生物収集(VKPM)寄託機関に寄託されて受託番号VKPM-93が割り当てられたハイブリドーマN271によって生産されるM271と、VKPMに寄託されて受託番号VKPM-92が割り当てられたハイブリドーマN52によって生産されるM52と、VKPMに寄託されて受託番号VKPM-94が割り当てられたハイブリドーマN42によって生産されるM42と、からなる群から選択される、請求項13記載の方法。

【請求項17】

PAMG-1に特異的な固定された第1の抗体およびPAMG-1に特異的な固定された第2の抗体を有する捕捉セクションの上流にあるPAMG-1に特異的な移動可能な抗

(3) 膣分泌液中の羊水を検出するための装置および方法

体を有する検出セクションを備える装置であって、ここで前記固定された第2の抗体は前記移動可能な抗体および前記固定された第1の抗体よりもPAMG-1に対してより低い結合特異性を示し、前記固定された第2の抗体は前記移動可能な抗体および前記第1の抗体と組み合わせて使用されることが意図され、それによって、流体試料による前記移動可能な抗体の移動は、前記移動可能な抗体が前記試料中の任意のPAMG-1に結合するのを可能にし、且つ、それによって形成された移動可能な抗体PAMG-1複合体を前記固定された抗体の少なくとも一方に結合するのを可能にし、前記移動可能な抗体がマーカーを含む、装置。

【請求項18】

前記抗体はモノクローナル抗体である、請求項17記載の装置。

【請求項19】

前記固定された抗体は、膜担体上に固定される、請求項17記載の装置。

【請求項20】

前記マーカーは、コロイド金である、請求項17記載の装置。

【請求項21】

前記固相担体上に固定された前記第1の抗体と前記第2の抗体との比率は、1ミリリットル当たり5～7ナノグラムというPAMG-1を検出する閾値レベルを提供する、請求項17記載の装置。

【請求項22】

モノクローナル抗体は、ロシア国立工業微生物収集(VKPM)寄託所に寄託されて受託番号VKPM-93が割り当てられたハイブリドーマN271によって生産されるM271と、VKPMに寄託されて受託番号VKPM-92が割り当てられたハイブリドーマN52によって生産されるM52と、VKPMに寄託されて受託番号VKPM-94が割り当てられたハイブリドーマN42によって生産されるM42と、からなる群から選択される、請求項17記載の装置。

【請求項23】

前記固相担体上に固定された前記第1の抗体と前記第2の抗体との比率が、1ミリリットル当たり3ナノグラムを超える濃度で存在する場合に、PAMG-1の検出の閾値レベルを提供する、請求項14記載の方法。

【請求項24】

前記固相担体上に固定された前記第1の抗体と前記第2の抗体との比率が、1ミリリットル当たり3ナノグラムを超える濃度で存在する場合に、PAMG-1の検出の閾値レベルを提供する、請求項17記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(優先権データ)

本願は、2002年8月13日に提出された米国仮特許出願第60/403,407号から優先権を主張し、これは、参照によってここに組み込まれる。

【0002】

本発明は、膣内の少量の羊水を正確に検出するための診断方法に関する。特に、本発明は、胎盤 α_1 ミクログロブリンに特異的に結合する特異的に選択されたモノクローナル抗体を使用することに関する。より具体的には、本発明は、妊婦の膣分泌液中のPAMG-1の最小バックグラウンド濃度を検出するのに十分な感度を提供する一対の抗PAMG-1抗体(「基本対」)の選択に関する。さらに、本発明は、PAMG-1抗体を含む固相免疫アッセイシステムに関し、その中で2つまたはそれ以上の抗PAMG-1抗体の組み合わせが、装置の固相担体(solid phase support)に固定され、感度の所定の閾値レベルを正確に設定する。

【背景技術】

【0003】

胎膜(羊膜囊)の早期破裂は、妊婦の約10%で発生し、直ちに処置を行わない場合には、全周産期死亡の約10%の原因である。PROM(胎膜の早期破裂(早期破水))という用語は、正期産または早期産の開始する24時間またはそれ以上前に、膜が自発的に破裂することに関する。PPROMは、膜の前期早期破裂(前期早期破水)を意味する。そのような早期破裂のおよそ約30~50%は、妊娠37週前に発生する。そのような場合には、PROMは、子宮内感染および胎児の肺システムの発育障害のリスクが有意に上昇することに関連があるため、破裂の最終的な診断は、非常に重要である。そのような感染の子宮内侵入は、母親および胎児の発病率および死亡率を約10パーセント高める。一旦PROMが検出されると可能な限り早く出産を誘発しなければならないため、妊娠38~40週で破裂を即座に診断することは重要である。破裂の診断は、羊膜内感染を予防し且つ胎児の肺の発育を刺激することができるため、妊娠37週目の破裂診断も重要である。

【0004】

膜破裂の診断に利用可能な「判断基準」はない。PROMは、動的な存在であり、そのため、膜破裂と診断様式の実行との間のインターバル、「多量の」漏れの存在、間欠的な漏れ、人口に対するPROMの発生率の変動、および検査結果に干渉する能力を有する材料について考慮することは、これらに対処されない場合には、不正確な報告を生じる要因である。これらの不正確さは、PROMを識別するための最良のツールを明らかにすることを目的とする研究の解釈における間違いを招くことがある。

【0005】

PROMの診断は、伝統的に、患者が膣からの液体の漏出を報告することに依存している。理学的診察は、明白に診断することができるが、診察の結果が内的に矛盾しているかまたはいくつかの解釈ができるときがある。この状況は、確認的診断検査の必要性を命じる(ロックウッド、C. J.ら(Lockwood C. J.)、Am. J. Obstet. Gynecol.、1994年、第171巻、第1号、146~150頁)。数種類の 방법이、すべて不十分であるが、現在、膣内の羊水を検出するために使用されている(例えば、頸管粘液検査(Fern test)(M. L. フリードマン(M. L. Friedman)およびT. W. マクエリン(T. W. McElin)、「破裂した胎膜の診断(Diagnosis of Ruptured Fetal Membranes)」、American Journal of Obstetrics and Gynecology、1969年、第100巻、544~550頁)。この方法は、羊水がスライド上で乾燥するときいわゆる樹枝状分岐の観察によって羊水を検出することに基づいている。しかし、この方法は、膣内の羊水の高揮発特性に基づいているため、十分正確ではない。症例の30パーセントもの偽結果を産む可能性がある。

【0006】

数種類の染料、すなわち、ナイルブルー、アクリジンオレンジ、プロモチモールブルー、ニトラジン(nitrazine)等を使用することによって、胎膜の破裂を検出することも提案されている(上記M. L. フリードマンおよびT. W. マクエリン)。このアプローチは、不便であり、膣内の羊水の化学特性の揮発性およびこれへのいくつかの可能な混合物に関連する不都合を有する。例えば、膣感染症が、上記検査の結果に影響を与えることがある。現在一般的なニトラジンおよびシダ状結晶形成検査の初期の研究は、これらの検査が高い不正確率を有することを示した。これは、膜破裂から1時間以上経過すると次第に高くなり、24時間後には結論が出なくなった。PROMが長引く場合には、これらの検査は単なる臨床的評価によって得られるものよりも良い診断情報を与えないと結論づけている(ゴロデスキー、I. G. (Gorodeski I. G)、ハイモビッツ、L. (Haimovitz L.)、バハリ、C. M. (Bahari C. M.)、Journal Perinat. Med.、1982年、第10巻、第6号、286~292頁)。検査に関するより近年のデータ(トロボ、S. (Trovo S.)ら、Minerva Ginecol.、1998年、第50巻、第12号、519~512頁)は、下記の通りである。

ニトラジン検査は、感度70%、特異性97%、正確度90%を示す。

シダ状結晶形成検査は、感度70%、正確度93%を示す。

【0007】

近年では、羊水中のタンパク質を免疫化学的に分析することに基づいて胎膜の破裂を検出することが提案されている。ドックされた免疫化学的分析 (Docked immunochemical analysis) は、膜破裂を検出するために羊水の下記のタンパク質を使用する。すなわち、アルファ-フェトプロテイン、プロラクチン、フィブロネクチン、および、インスリン様成長因子結合タンパク質1である。B. L. ロチェルソン (B. L. Rochelson) ら、「迅速アッセイ膜の早期破裂の診断における可能な適用 (Rapid Assay--Possible Application in the Diagnosis of Premature Rupture of the Membranes)」、Obstetrics and Gynecology、1983年、第62巻、414~418頁；P. R. コニクス (P. R. Koninckx) ら、「臍液中のプロラクチン濃度：破裂した膜を診断するための新規方法 (Prolactin Concentration in Vaginal Fluid: a New Method for Diagnosing Ruptured Membranes)」、British J. Obstetr. Gynecol.、1981年、第88巻、607~610頁；P. ヘルマン (P. Hellemans) ら、「羊膜の破裂の初期検出におけるROMチェックイムノアッセイを使用する予備段階の結果 (Preliminary Results with the Use of the ROM Check Immunoassay in the Early Detection of Rupture of the Amniotic Membranes)」、Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.、1992年、第43巻(3)、173~179頁；ルタネン、E. M. (Rutanen, E. M) ら、「子宮頸部分泌液/臍分泌液中のインスリン様成長因子結合タンパク質1の測定：破裂した胎膜の診断におけるROMチェックイムノアッセイとの比較 (Measurement of Insulin-like Growth-Factor binding Protein-1 in Cervical/Vaginal Secretions: Comparison with the ROM Check Membrane Immunoassay in the Diagnosis of Ruptured Fetal Membranes)」、Clin. Chim. Acta.、1993年、第214巻、73~81頁を参照のこと。ルタネン、E. M. らは、後に、逆さまに配置したクロマトグラフ膜を使用するクロマトグラフ検査を開発した (FI-84863、米国特許第5,554,504号)。

【0008】

アルファ-フェトプロテイン (AFP) およびプロラクチン (PRL) の検出に基づく方法は、信頼できないが、それは、AFPおよびPRLタンパク質の血液/羊水比率は、有意な変動を受けやすいからである。AFPおよびPRLは、妊娠の第2の3ヶ月のみに高濃度で羊水中に存在する。両方のタンパク質についての羊膜/血清タンパク質濃度比率は、正常産時に約3~4にすぎない。

【0009】

臍分泌液における胎児フィブロネクチンの検出に基づいた別の方法もまた、満足のいくものではないことがわかった。例えば、胎児フィブロネクチンの存在は、胎膜破裂がない場合でさえ発生することがあり (P. ヘルマンら)、「羊膜の破裂の初期検出におけるROMチェックイムノアッセイを使用する予備結果」、Eur. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol.、1992年、第43巻(3)、173~179頁；C. ロックウッド (C. Lockwood) ら、「早期産の予測としての子宮頸部分泌液および臍分泌液中の胎児フィブロネクチン (Fetal Fibronectin in Cervical and Vaginal Secretions as a Predictor of Preterm Delivery)」、New England Journal of Medicine、1991年、第325巻、669~674頁)、それによって偽陽性結果を産出する。

【0010】

アルファ-フェトプロテイン、プロラクチンおよびフィブロネクチンの検出に基づいて胎膜破裂を検出するこれらの方法のすべては、羊水中のこれらのタンパク質の濃度、および、血清中のこれらのタンパク質の濃度に対する羊水中のこれらのタンパク質の濃度の相対濃度の制御における可変因子のため、不正確である。

【0011】

最新のIGFBP-1検査に関しては、その特異性および正確性に関する矛盾するデータがある。ラビッドストリップ検査 (フィンランドのOYメディックスバイオケミカ (OY Medix Biochemica) によるPROM検査、アムニチェック (ドイツ、MASTダイアグノスティカ (MAST Diagnostica)) とも称される) が、臍分泌液中でIGFBP-1の存

在を検出するために開発されている (ルタネン EM、カールカイネン TH (Karkkainen TH)、ルトビルタ J. (Lehtovirta J.)、ウオティラ JT (Uotila JT)、ヒンクラ MK (Hinkula MK)、ハーティカイネン AL (Hartikainen AL)、「破裂した胎膜の診断におけるインスリン様成長因子結合タンパク質1用ラピッドストリップ検査の評価 (Evaluation of a rapid strip test for insulin-like growth factor binding protein-1 in the diagnosis of ruptured fetal membranes)」、Clin Chim Acta、1996年、9月30日、第253巻(1-2)、91~101頁)。E. ルタネンは、臍分泌液中の400 ng/ml未満のIGFBP-1濃度(妊婦の血清IGFBP-1レベルの95パーセント未満)がネガティブのままであるように、検査の検出限界が設定されたと報告した。しかし、出血の場合には、胎盤床から直接の血液は子宮頸部血管からの血液よりも高い量のIGFBP-1を含有することがあるため、検査結果は慎重に解釈されなければならない。

【0012】

臨床的に確認されたPROMの女性の全試料(n=55)は、陽性結果を示し、無症候の女性から取られた75試料の71が、検査にしたがって陰性であった。試料のこのセットの中で、検査は、感度100%および特異性94.7%であった。この事実は、検査の最初のステップで使用されたモノクローナル抗体の不十分な特異性(交差反応)によって説明することができる。

【0013】

疑わしいと評価されたが当初診察でははっきりしないPROMであった181の患者の中で、検査は、64例で陽性、117例で陰性であった。64人の陽性患者のうちの50例(78.1%)が、妊娠37週以前に出産し、42例(65.6%)は、試料採取後2週間以内に出産した。陰性検査結果の117症例のうちの5例が、PROMとは関係のない理由で選択的帝王切開術を受けた。他の112人の患者のうち、102人(91.1%)が正産産であり、10人(8.9%)が37週以前に出産し、このうちの7人(6.3%)が試料採取後2週間以内に出産した(E. ルタネンら、1996年)。残念ながら、PROMと明確に診断された女性のPROM検査の感度および特異性に関するデータはない。

【0014】

W. ウォルトマン(W. Woltmann)による研究において、アムニチェックを使用して、臨床的に未確認のPROMの女性から150羊水標本および50臍分泌液試料内のIGFBP-1を検出した。検査は、感度97%および特異性100%であった(ウォルトマン、W. ら、Z. Gebursh. Neonatal、1995年、第199巻、243~244頁)。

【0015】

V. ラゴシュ(V. Ragosh)は、75臍分泌液試料でアムニチェック検査の診断正確度を評価した。検査は、感度100%および特異性83%を示した。調査者は、偽陽性率は、分娩活動に大いに依存すると報告した。子宮収縮のある女性では、検査は、特異性59%であった(ラゴシュ、V. ら、Geburtsh. U. Frauenheilk.、1996年、第56巻、291~296頁)。

【0016】

E. ダルジ(E. Darj)およびS. リレナス(S. Lyrenas)の研究において(Acta Obstet. Gynecol. Scand.、1998年、第77巻、295~297頁)、PROM検査は、臨床的に確認された診断の患者(膜が明らかに破裂した女性、または、膜に傷がない女性)の中で、感度95.7%および特異性93.1%であった。しかし、PROM検査の感度および特異性は、それぞれPROMが疑わしい患者の70.8%および88.2%のみであった。この不一致は、検査のカットオフ限界(400 ng/ml)によって説明することができ、これは、両義に取れる診断(例えば、小破裂の場合)をされた患者の臍分泌液中で少量の羊水を検出することを不可能にする。

【0017】

このようにして、膜に傷がない女性の臍IGFBP-1の有意なバックグラウンドレベ

ルおよび検査の高いカットオフ閾値が、感度および特異性に害することもあり、したがって、両義に取れる診断をされた患者の検査正確度に影響を与える。血清および/または炎症性滲出液の混合物もまた、検査正確度に影響を与えることがある(上記E. ダルジおよびS. リレナスのデータ参照のこと)。この検査の著者は、この問題を研究しなかった。

【0018】

上述の欠点のいくつかを回避しようと試みて、胎盤 α_1 ミクログロブリンの未結合画分を検出するために、インスリン様成長因子用の2つの結合部位に対して、2つのモノクローナル抗体が使用された(米国特許第5,968,758号、第5,597,700号、第5,891,722号、第5,877,029号)。

【0019】

これらの特許において、2つのタンパク質、未結合PAMG-1およびIGFBP-1の同一性(identity)は、根拠が無く想定されている。事実、そのような想定は、これらのタンパク質の一次構造および遺伝子の比較のみに基づいている。

【0020】

上述の特許において、できるだけ最高の正確度(99%またはそれ以上)を達成するように、そのような検査の感度の閾値を設定することは不可能であった。そのような検査の共通の問題は、バックグラウンドレベル、および、検出された物質のバックグラウンド濃度の変動性である。例えば、妊婦の臍分泌液中の別のタンパク質、すなわち、IGFBP-1のバックグラウンドレベルは、0.5から90ng/mlの広い範囲で変動する(ルタネンの研究を参照のこと)。第2の重要な点は、臍分泌液中の検出された物質を含有する炎症性滲出液または血清の混合の可能性である。これは、偽陽性結果を引き起こす可能性がある。

【0021】

タンパク質PAMG-1は、最初、D. ペトルニン(D. Petrunin)によって説明された(D. ペトルニンら、Akusherstvo i Ginekologia、1977年、第1号、64頁、ロシア語;および、PMID:65924(MEDLINE用に索引を付けられたPubMed(PubMed-indexed for MEDLINE):「器官特異的なヒト胎盤アルファグロブリンの免疫学的識別および羊水中のその内容物(Immunochemical identification of organ specific human placental alpha-globulin and its concentration in amniotic fluid)、Akusherstvo i Ginekologia、(モスクワ)、1977年、第1巻、64頁)も参照のこと)。抗体が、精製され単離されたタンパク質に対して得られ、免疫化学的な方法により、妊娠の異なる段階における羊水(臍から取られた羊水も含む)内のタンパク質の内容物を測定し得た。胎児および成人の血液および異なる器官内のタンパク質の濃度も、測定された。

【0022】

このリサーチグループは、その後の年月の間、1990年まで、タンパク質に関する新しい結果を公表し続けた(ペトルニン、D. ら、「妊娠中の4つの胎盤タンパク質の比較研究(Comparative Study of Four Placental Protein During Gestation)」、Akusherstvo i Ginekologia、1988年、第1号、50~52頁;ザライスキー、E. (Zaraisky, E.) ら、Voprosy Med. Khimii、1989年、第5号、131~132頁;タタリノフ、Y. (Tatarinov, Y.) ら、Uspekhi Sovr. Biologii、1990年、第109巻、369~373頁;ボルトフスカヤ、M. (Bol'tovskaya, M.) ら、Bulletin of Experimental Biology and Medicine、1991年、第7号、397~400頁;ナシモワ、S. V. (Nasimova, S. V.) ら、Bulletin of Experimental Biology and Medicine、1993年9月、第116巻、第9号、302~304頁(これらの論文はすべてロシア語であり、英語の要約がついている))。D. ペトルニンは、PAMG-1の単離の方法に関する発明証を得た(#SU-1614184A1、優先権年1988年)。

【0023】

1988~89年には、羊水、胎盤、およびヒトヘパトーマから得られた類似のタンパク質であるインスリン様成長因子結合タンパク質(IGFBP)の部分配列および完全配

列を詳述するいくつかの論文が公表された（ベル、S. (Bell S.)ら、1988年；ルトマン、H. (Luthman H.)ら、1989年；ユルケネン (Julkunen)ら、1988年；リー、Y. (Lee, Y.)ら、1988年)。遺伝子は、第7番ヒト染色体の7p14～7p12片に位置していた。1991年以前には研究者らは、このタンパク質に異なる名前： α_1 -PEG、PP-12、IGFBP、BP-25等を使用した。

【0024】

1980～82年には、ボーン (Bohn) が、胎盤からタンパク質を単離し、これをPP-12と名付けた。ボーンは、その論文で、PP-12を、先に発見されたPAMG-1タンパク質と比較し、両者の間の類似性および相違点を検討した。

【0025】

他の研究発表とは対照的であるのがベルらの論文 (1988年) であり、ベルらは、 α_1 -PEGタンパク質のN末端ペプチドに、すなわち、11番目および12番目の位置に、多型を発見し、実際は1つではなく2つの異なるタンパク質があるという結論に達した。

【0026】

S. ベルは、再度、羊水中の2つの異なるタンパク質 α_1 -PEGに関する自分の論文を参照する。この論文は、1990年の命名委員会 (Nomenclature Committee) の決定を受け入れたが (IGF結合タンパク質の命名に関する報告 (Report on the Nomenclature of the IGF Binding Proteins)、Journ. Clin. Endocr. And Metabol., 1990年、第70巻、第3号、817頁)、これは、タンパク質AFBP、PP-12、 α_1 PEG、GHタンパク質、結合タンパク質28、26、25、JB-1は同一であると判断し、それらすべてに一般名hIGFBP-1を与えた。

【0027】

いわゆる遊離PAMG-1を使用して、胎膜破裂が検出された。しかし、上述のように、高正確度 (>99%) の検査は創出されなかった。この目標は、後に、本願に記載される我々の新しい方法および装置で達成された。本発明は、臍分泌液中の非常に低濃度のPAMG-1の検出のために十分な感度を提供する一対のモノクローナル抗体を選択する方法を使用し、また、他のいくつかの抗PAMG-1抗体の選択を包含し、これは、上述の2つの抗体と組み合わせ、ストリップ装置用の感度の所定の閾値を正確に設定することを可能にした。これは、次に、検査の偽陽性結果の頻度を最小限にすることを可能にした。

【0028】

本発明は、D. ペトルニンの先駆的研究から開始し、ペトルニンは、胎盤アルファミクログロブリンを分離し説明し、免疫化学的な方法を使用して羊水、血液およびいくつかの組織におけるその濃度の徹底的な測定を実施した。この発表は、全ての研究者が考慮に入れるべきパブリックドメインである。PAMG-1を分離する方法は、以前のUSSRにおける特許の等価物である発明者証 (#SU-1614184A1、優先権年1988年) によって保護されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0029】

本発明は、妊娠中に臍分泌液中の少量の羊水を検出するための方法に関する。

【0030】

本発明は、妊婦の臍分泌液中の羊膜タンパク質PAMG-1の最小バックグラウンド濃度を超えるPAMG-1を検出するための方法に関し、それは、羊水の存在を示すものである。

【課題を解決するための手段】

【0031】

特定の実施形態において、PAMG-1タンパク質を検出するための方法は、臍分泌液中の最小バックグラウンド濃度のPAMG-1タンパク質を検出するために特別に選択さ

れた一対のモノクローナル抗体を使用する。検査の感度の所与の閾値を正確に設定するために、この抗体の対は、少なくとも1つの追加抗PAMG-1モノクローナル抗体と組み合わせ使用されている。

【0032】

本発明は、膈分泌液中の羊膜タンパク質PAMG-1を検出するための方法における感度の閾値をより正確に設定するのを可能にするために、1つのストリップ装置にPAMG-1捕捉抗体を組み合わせ使用することを、さらに企図する。このアプローチは、抗体の選択された対を単独で使用するよりも、感度および動的な範囲のより大きな制御を提供する。

【0033】

方法のもっとも適切な感度閾値レベルは、 5 ng/m l に近いことがわかったが、それは、炎症によって発生する可能性のある膈分泌液中のPAMG-1の上限が、 3 ng/m l を超えず、他方、健康な妊婦の膈分泌液中のPAMG-1の通常のバックグラウンドレベルはおよそ 0.2 ng/m l であるためである。バックグラウンドレベルと検出された物質の閾値濃度との間の有意なギャップは、偽陰性および偽陽性の結果を最小限にする。1つの実施形態において、羊膜PAMG-1を認識する第1のステップは、ストリップ装置のパッド部分で起こり、そこに、特別に選択され標識された抗体が位置する。反応の第2のステップは、ディップスティック装置の検査領域で起こり、そこで、選択された対の第2の抗体、および、好ましくは、少なくとも1つの追加抗PAMG-1抗体が、固定される。

【0034】

要約すると、妊婦の膈内の少量の羊水を検出するための方法および装置が説明される。方法は、好ましくは、胎盤 α_1 ミクログロブリン(PAMG-1)に対する一対のモノクローナル抗体の選択に基づいている。選択の目標は、第1に、膈分泌液中の最小バックグラウンド濃度のPAMG-1を測定することである。この情報を有して、閾値を超えるPAMG-1を検出することができる任意の分析技術を使用して、膈分泌液中の羊水を検出することができる。この情報に基づいて、装置の感度の閾値を下げ且つ正確に設定し、それによって偽陰性および偽陽性の結果の可能性を最小限にするように、同じ対の抗体および追加の抗体の使用に基づいて、装置を作り出すことができる。

【0035】

捕捉抗体およびそのフラグメントの様々な組み合わせ、または、ここに特定されるのと同一の特性を備えた任意の他の分子の組み合わせが、可能である。

【0036】

本発明の1つの実施形態において、方法は、PAMG-1タンパク質を含有する試料とモノクローナル抗体との接触を含み、選択された対の最初のものは、PAMG-1を選択的に検出する。これは、抗体PAMG-1複合体を形成する抗体と、対の他方の標識されたモノクローナル抗体によって抗体-PAMG-1複合体を検出するステップと、をさらに含む。これは、最後に、羊膜が破裂していない妊婦の膈分泌液におけるPAMG-1の低最小バックグラウンドを定量的に測定することを含む。この方法は、ELISA分類検査に使用されることが多い。

【0037】

本発明のさらに別の実施形態において、装置は、PAMG-1タンパク質を含有する試料と標識されたモノクローナル抗体との接触を実行し、選択された対の最初のものは、PAMG-1を選択的に検出する。これはさらに、抗体PAMG-1複合体を形成する抗体と、この複合体の側方向流れと、PAMG-1を認識する他方のモノクローナル抗体によって抗体-PAMG-1複合体を検出するステップとを備え、それによって、モノクローナル抗体を認識するPAMG-1の対を使用して達成することができる正確度よりも高い正確度で、追加抗体を使用して、装置の感度閾値を $5 \sim 7 \text{ ng/m l}$ の範囲に設定する。

【発明を実施するための最良の形態】**【0038】**

本発明は、臍分泌液中の非常に低濃度の胎盤 α_1 ミクログロブリンを検出することによって、臍分泌液中の羊水を正確に検出することの上述の問題に対処する。このアプローチは、PAMG-1濃度の低バックグラウンドレベル（妊婦の臍分泌液のおよそ0.2 ng/m¹）のため、有利であることがわかった。本発明の重大な点は、低濃度でタンパク質を検出するモノクローナル抗体の選択であったが、これは、これらの値の定量化を可能にし、次に、PAMG-1のレベルを検出するためにあらゆる分析技術を使用することを可能にする。血液中のタンパク質用の毛細管壁の透過性は、翻訳後のタンパク質修飾および他の分子との相互作用に依存するため、臍分泌液中に低濃度でPAMG-1が存在することは、予想可能であった（マリナロー、J. A. (Marinero J. A.)ら、「O-グリコシル化は、循環からヒトIGF-結合タンパク質-6のクリアランスを遅延する(O-glycosylation delays the clearance of human IGF-binding protein-6 from the circulation)」、Eur J Endocrinol、2000年5月、142(5):512;シュネーベルガー、E. E. (Schneeberger E. E.)、「血管内皮層内のタンパク質および小胞輸送(Proteins and vesicular transport in capillary endothelium)」、Fed Proc、1983年5月、15;42(8):2419-24;ミンシャル、RD (Minshall RD)ら、「内皮細胞内の小胞形成およびトラフィッキング、および、内皮障壁機能の調整(Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function)」、Histochem Cell Biol、2002年2月、117(2):105-12;デルベッキオ、PJ (Del Vecchio PJ)ら、「巨大分子への内皮単層の透過性(Endothelial monolayer permeability to macromolecules)」、Fed Proc、1987年6月、46(8):2511-5;シフリンガー-バーンボイム、A (Siflinger-Birnboim A)ら、「内皮単層の選択性:透過性増大に関する効果(Selectivity of the endothelial monolayer: effects on increase permeability)」、Microvasc Res、1998年11月、36(3):216-27;ギネア、N (Ghinea N)、ミルグロム、EA (Milgrom EA)、「LH/CGレセプター用の新規機能:標的器官の内皮障壁にわたるホルモンのトランスサイトシス(new function for the LH/CG receptor:transcytosis of hormone across the endothelial barrier in target organs)」、Semin Reproduct Med、2001年、19(1):97-101)。翻訳後修飾を受けたか、または、別の分子と非共有結合を確立したPAMG-1分子の中に、臍分泌液中への浸透が最小であるものがある。臍分泌液中のそのような分子の濃度は、羊膜嚢に裂け目がない限り、低くなければならない。PAMG-1分子の異種性もまた、オルタナティブスプライシングの結果であり得る。ベルらは、羊水中の2つの近い異なるタンパク質 α_1 -PEGに関するデータを呈した。アルファ α_1 -PEGは、PAMG-1に近い。臍分泌液中への異なる分子の低い浸透または高い浸透は、毛細管壁の選択的な透過性および選択的分泌過程のために発生する。成功するイムノアッセイには、臍分泌液中の低バックグラウンド濃度のPAMG-1分子を検出することが必要であった。

【0039】

そのような検出が可能である一対のモノクローナル抗体が、首尾よく選択された。検出されたPAMG-1分子の正確な特性は、本発明の目的には重要ではないように見えるが、1つの例外があり、臍分泌液中で低濃度であることが確実でなければならない。このパラメータは、検査の閾値と臍分泌液中のPAMG-1濃度のバックグラウンドレベルとの間に有意なギャップを維持して、感度閾値を低レベルに設定するのに十分である。最適閾値をこのように選択することによって、検査の可能性のある偽陰性結果および偽陽性結果の両方を除外することが可能である。

【0040】

特に、胎盤アルファ α_1 -ミクログロブリンへのモノクローナル抗体(MAb)は、本発明の別のMAbのシステムMAb-PAMG-1-接合体におけるその反応に基づいて研究された(実施例4、表6)。特異的にM271-M52の対を使用して、最高力価が見いだされた。しかし、対MAb271-MAb52および慣用的ELISA技術を使用して、出願人は、臍分泌液中にいかなる濃度のPAMG-1も検出することができなかつ

た。高感度ELISA技術は、対MAb 271-MAb 52（実施例5、表7）用に開発されたものであり、これを使用して、臍試料内の低（ピコグラム範囲）濃度のPAMG-1（実施例6、表8）を測定し、次いで、妊婦の子宮頸部分泌液および臍分泌液中の両方で測定した（実施例7、表9）。ELISAでは、第1の層は、高感度MAb M271から形成された。西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体は、MAb M52を含有し、いかなる抑制剤をも含有しない緩衝液で稀釈された。

【0041】

実施例7、表9から、妊娠の合併症のない妊婦の子宮頸部分泌液および臍分泌液中のPAMG-1の濃度は、0.05から0.22 ng/mlの範囲であったことを見ることができる。このデータから、

- PAMG-1の正常濃度（8例）は、いくつかの安定レベル付近に位置する。臍および子宮頸部の両方のPAMG-1の相対的安定性は、方法のパラメータの安定性を示し且つ収集試料の標準化された方法を示す役割を果たしてもよい。

- 子宮頸部分泌液中のPAMG-1の正常濃度の平均レベルは、およそ151 pg/mlであり、臍分泌液ではおよそ110 pg/mlである。

- 血管障害に関連しない妊娠性疾病の場合（貧血、胎児の発育の遅れ）にはまた、正常に近いレベルのPAMG-1が観察された。

- 血液混合物は、子宮頸部のPAMG-1の濃度の上昇を伴い、これは、151 pg/mlの正常濃度とは対照的に、レベル290 pg/mlで観察された。

- 早期産および妊娠中毒症からの症候が存在する場合にPAMG-1レベルが上昇し、これは、タンパク質に対する胎膜の透過性の増加に順応することもある。

- 羊水の漏れがある場合には、PAMG-1レベルは急激に上昇する（10～50倍）。

。

ということが理解され得る。

【0042】

下記の実施例に示されるように、一対のモノクローナル抗体M271およびM52が、方法、装置および検査キットのさらなる開発のために選択された。

【0043】

このように、本発明は、特に、PAMG-1に対する結合親和性を有する選択された対のモノクローナル抗体、PAMG-1に対する結合親和性を有する抗体を含む生物学的組成物、本発明の抗体を使用してPAMG-1を検出するためのキット、および、本発明の抗体を生産するための細胞株に関する。本発明はまた、PAMG-1を検出するための装置および方法、さらに、臍分泌液中にPAMG-1が存在することによって示されるような、臍内の羊水の存在に基づいた、胎膜の破裂にも関する。

【0044】

本明細書中により詳細に説明されるように、本発明は、部分的には、妊婦の臍分泌液中で最小バックグラウンド濃度のPAMG-1を検出するのを可能にする一対のモノクローナル抗体での研究から生じる。臍分泌液中のPAMG-1の最小バックグラウンド濃度および羊水の高濃度は、まず第1に、装置の感度の閾値を低レベルに設定するのを可能にし、それによって、臍分泌液中の非常に少量の羊水の検出を可能にし、第2に、最適なやり方で装置の感度の閾値を、特に、胎膜の破裂のない妊婦の臍分泌液におけるPAMG-1の低い最小バックグラウンド濃度の典型的なレベルと、羊水中のPAMG-1の高い典型的なレベルと、の間に置くことができる。PAMG-1に対する単数または複数の追加のモノクローナル抗体は、装置の感度の閾値を、所定のレベルに、例えば半定量分析のために、より正確に設定することを可能にする。さらに、臍分泌液中に羊水が存在することが胎膜の破裂を示すため、臍分泌液中のPAMG-1の検出は、胎膜の破裂を検出するために使用することもできる。この組み合わせはすべて、PROMおよびPPROMを検出する検査の偽結果を最小限にすることができる。

【0045】

本発明によると、PAMG-1に特異的なモノクローナル抗体を、PAMG-1の検出

、およびそれによって膣分泌液中のPAMG-1の存在に基づいた胎膜破裂の発生の検出に使用される組成物、キット、装置および方法に組み込むことができる。

【0046】

タンパク質PAMG-1

PAMG-1は、妊婦の血清、羊水、および膣分泌液、ならびにすべてのヒトの血清内に存在するタンパク質である。PAMG-1は、非妊婦の血清(0~60ng/ml)および妊婦(5~120ng/ml)に存在し、測定された濃度は、その検出のために使用された一対のモノクローナル抗体に依存する(実施例1、表1、2)。同一のタンパク質に対して異なる対の抗体を使用すると、そのタンパク質の異なる測定濃度を生じることが知られている。このようにして、ディアマンディA. (Diamandi A.)らの類似研究において(ディアマンディA. 、「インスリン様成長因子結合タンパク質-3のイムノアッセイ(Immunoassay of the Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3)」、Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism、2000年6月、第85巻、第6号、2327~2333頁参照のこと)、ELISAの3種類の変形例が、IGFBP-3の3種類の異なる濃度を示した。これを、ディアマンディA. らは、そのタンパク質分子の特定の翻訳後修飾を選定する各抗体対の能力に起因するとした。PAMG-1は、血清よりも有意に高い濃度の羊水に見られる(2000~75000ng/ml)。

【0047】

PAMG-1は、1977年に、D. ペトルニン(D. Petrunin)によって羊水から単離された。これは、もともとは、胎盤の特異的なアルファ-1グロブリンと称された(D. ペトルニンら、「ヒト胎盤の器官特異的なアルファ-1グロブリンの免疫学的識別および羊水中のその内容物(Immunological Identification of Organ Specific alpha-1 Globulin of Human Placenta and Its Content in the Amniotic Fluid)」、Akusherstvo i Ginelologiya、1977年、N1、64~65頁、ソビエト連邦、モスクワ、(実施例2参照のこと)。

【0048】

PP12(胎盤タンパク質12)として識別された類似ではあるが同一ではないタンパク質が、後に、ボーン(Bohn)らによって、胎盤膜および胎膜から、単離され精製された(「Isolierung und Charakterisierung eines Neuen Placentaspezifischen Proteins (PP12)」Arch. Gynecol.、980、第229巻、279~291頁)。S. ベルらは、子宮内膜PEG-1タンパク質の分離を報告したが、これは、15アミノ酸のN末端ペプチドにおける2つのアミノ酸置換基(アミノ酸N11、12)がPP12とは異なっていた(S. ベルら、American Journal of Reproductive Immunology、1989年、第20巻、87~96頁)。

【0049】

羊水から識別されたタンパク質をさらに特徴づけるために、PAMG-1の分子量を決定するために一連の測定が行われた。PAMG-1の分子量を決定するためにイムノブロット法が使用され、これは、32kD(キログルトン、kDは原子質量単位)であることがわかった(ボルトブスカヤM. N. (Boltovskaya, M. N.)ら、「モノクローナル抗体を使用する胎盤アルファミクログロブリン(PAMG-1)の組織化学的臨床診断研究(Histochemical and Clinico-Diagnostic Study of the Placental Alpha-Microglobulin [PAMG-1] Using Monoclonal Antibodies)」、Bulletin of Experimental. Biology and Medicine、1991年、第10号、397~400頁)。出願人は、後に、PAMG-1はIGFBPタンパク質のファミリーに関連すると想定した(米国特許第5,968,758号参照のこと)。

【0050】

PAMG-1は、異なるイソフォームで存在することができ、すなわち、異なる翻訳後修飾を受けている。抗体は、イソフォームごとに異なる特異性を有してもよく、これは、本発明のアッセイにおいて有利に使用することができる。

【0051】

PAMG-1への抗体

元々は、PAMG-1への単一特異的な抗体が使用された（例えば、タタリノフ、Y.ら、Uspekhi Sovr. Biologii、1990年、第109巻、369～373頁参照のこと）。後に、IGF-1および-2がないPAMG-1分子のみを認識することができる抗体が得られた（米国特許第5,891,722号参照のこと）

【0052】

ここで、「抗体」という用語は、タンパク質を得るために使用される方法とは無関係に、本願で特定されたような結合親和力を有するあらゆるタンパク質を意味する。例えば、タンパク質は、モノクローナル抗体であってもよく、または、そのフラグメントであってもよく、または、本願で特定されたような結合特異性を有する任意の分子であってもよい。

【0053】

本発明によると、組み替えによってまたは化学合成によって生産された体液から分離されたPAMG-1ポリペプチド、およびそのフラグメント、または融合タンパク質を含む他の誘導体またはアナログは、PAMG-1ポリペプチドを認識する抗体を生成するイムノゲンとして使用されてもよい。そのような抗体は、ポリクローナル、単一特異性、モノクローナル、キメラ、単鎖、FabフラグメントおよびFab発現ライブラリを含むが、それらに限定されない。本発明の抗PAMG-1抗体は、交差反応性であってもよく、例えば、異なる種からPAMG-1を認識してもよい。ポリクローナル抗体は、交差反応の可能性がより高い。あるいは、本発明の抗体は、PAMG-1の単一フォームに特異的であってもよい。そのような抗体は、ヒトPAMG-1に特異的であることが好ましい。

【0054】

PAMG-1ポリペプチドまたはその誘導体またはアナログへのポリクローナル抗体の生産に、当該分野で公知の様々な手順を使用してもよい。抗体を生産するために、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等を含むが、それらに限定されない様々な宿主動物に、PAMG-1ポリペプチドまたはその誘導体（例えば、フラグメントまたは融合タンパク質）を注入することによって、免疫することができる。1つの実施形態において、PAMG-1ポリペプチドまたはそのフラグメントは、免疫原性キャリア（例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）またはキーホールリンペットヘモシニアン（KLH））に、結合させることができる。免疫反応を高めるために、宿主種に依存して、様々なアジュバントを使用してもよく、これらには、フロイント（完全および不完全）、ミネラルジェル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン）、プルロニックポリオール（pluronic polyol）、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール、および、有用な可能性のあるヒトアジュバント（例えば、BCG（bacille Calmette-Guerin）およびコリネバクテリウムパルヴム（Corynebacterium parvum））が含まれるが、それらに限定されない。

【0055】

PAMG-1ポリペプチド、またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体に対するモノクローナル抗体を調製するために、培養液中の連続継代細胞系によって抗体分子の生産を提供する任意の技術を使用してもよい。これらには、もともとはコーラー（Kohler）およびミルスタイン（Milstein）によって開発されたハイブリドーマ技術（Nature、1975年、256：495～497）、ならびにトリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（コズボル（Kozbor）ら、Immunology Today、1983年、4：72；コート（Cote）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、1983年、80：2026～2030）、およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのEBVハイブリドーマ技術（コール（Cole）ら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、アランR. リス社（Alan R. Liss, Inc.）77～96頁、1985年）が含まれるが、それらに限定されない。本発明のさらなる実施形態において、モノクローナル抗体は、無菌動物で生産することができる（国際特許出願公開第89/12690号、1989年12月28日公開）。事実、この発明によると、PAMG-1ポリペプチドに特異的なマウス抗体分子からの遺伝子を、適切

な生物活性のヒト抗体分子からの遺伝子と一緒にスプライスすることによって、「キメラ抗体」の生産用に開発された技術（モリソン (Morrison) ら、J. Bacteriol、1984年、159:870；ニューベルガー (Neuberger) ら、Nature、1984年、312:604~608；タケダ (Takeda) ら、1985年、Nature、314:452~454) を使用することができる。そのような抗体は、本発明の範囲内である。そのようなヒトまたはヒト化キメラ抗体は、ヒトの疾病または障害の治療に使用するのに好適であるが（後述）、それは、ヒトまたはヒト化抗体が、それ自体、免疫反応、特にアレルギー反応を誘発することが、外因性抗体よりもかなりありそうもないからである。

【0056】

本発明によると、単鎖抗体の生産のために記載された技術（ヒューストン (Huston) に付与された米国特許第5,476,786号および第5,132,405号、米国特許第4,946,778号) を採用して、PAMG-1ポリペプチド特異性単鎖抗体を生産することができる。実際、これらの遺伝子は、生体内で (in vivo) 発現するように送出されることができる。本発明のさらなる実施形態は、Fab発現ライブラリの構築のために記載された技術（ヒューズ (Huse) ら、Science、1989年、246:1275~1281) を使用して、PAMG-1ポリペプチドまたはその誘導体またはアナログに所望の特異性を備えたモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ簡便な同定を可能にする。

【0057】

イディオタイプの抗体分子を含有する抗体フラグメントは、公知の技術によって生成することができる。例えば、そのようなフラグメントは、抗体分子のペプシン消化によって生産することができるF(ab)2フラグメント、F(ab)2フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成することができるFabフラグメント、および、抗体分子をハパインおよび還元剤で処理することによって生成することができるFabフラグメントを含むが、それらに限定されない。

【0058】

抗体の生産において、所望の抗体のためのスクリーニングは、当該分野で公知の技術によって達成することができ、例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、インシチュ (in situ) イムノアッセイ（例えば、コロイド金、酵素またはラジオアイソトープ標識を使用する）、ウエスタンブロット、沈降反応、凝集反応アッセイ（例えば、ゲル凝集反応アッセイ、赤血球凝集反応アッセイ）、補体結合アッセイ、免疫蛍光測定アッセイ、タンパク質Aアッセイ、免疫電気泳動アッセイ等である。1つの実施形態において、抗体結合は、一次抗体の標識を検出することによって検出される。別の実施形態において、一次抗体は、二次抗体または試薬が一次抗体に結合するのを検出することによって検出される。さらなる実施形態において、二次抗体は標識をつけられる。イムノアッセイにおいて結合を検出するための多くの手段が当該分野で公知であり、本発明の範囲内である。例えば、PAMG-1ポリペプチドの特異的なエピトープを認識する抗体を選択するために、そのようなエピトープを含有するPAMG-1ポリペプチドフラグメントに結合する生成物に対して生成されたハイブリドーマをアッセイしてもよい。PAMG-1ポリペプチドに特異的な抗体を特定な種の動物から選択するために、その種の動物の細胞によって発現されるかまたはそれから単離されるPAMG-1ポリペプチドとの陽性結合に基づいて、選択することができる。

【0059】

本発明による特異的な抗体

本発明によるハイブリドーマ細胞系は、下記の手順によって生産される。第1に、脾臓およびリンパ節B細胞を有するマウスを、PAMG-1で免疫する。次いで、ハイブリドーマが生産されて、B細胞を不死化する。B細胞は、脾臓および/またはリンパ節B細胞であってもよい。これらのハイブリドーマは、PAMG-1に結合親和力を有するモノクローナル抗体を生産するものであり、ELISA（第1の層：PAMG-1；第2の層：ハイブリドーマ上清；および第3の層：西洋ワサビペルオキシダーゼによって標識された

ウサギ抗マウス抗体のコンジュゲート)において同定される。これらの同定されたハイブリドーマは、次いで、生体外で (in vitro) または腹水で培養され、それらが産生するモノクローナル抗体が単離される。特定の実施形態において、抗体は、ハイブリドーマN52、N271およびN42由来のものであり、これらはロシア国立工業微生物寄託機関に寄託され、それぞれ、受託番号VKPM H-92、VKPM H-93およびVKPM H-94が付されている。

【0060】

本発明の組成物

本発明は、本発明による2つまたはそれ以上の抗体を含む一連の組成物にも関連する。1つの実施形態において、組成物は、一対の抗体と、その一対の抗体の一方に結合された検出可能なマーカースと、を含む。様々な検出可能なマーカースを使用してもよく、これらには、例えば、着色した粒子、酵素、蛍光色素および放射性同位元素が含まれるが、それらに限定されない。検出可能なマーカースの1つの特定の例は、20~30 nmの範囲の平均寸法を有する金着色粒子である。検出可能なマーカースの別の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼである。例えば、検出可能なマーカースを抗体に結合するための方法は、ハーロー、E. (Harlow, E.) およびレーン、D. (Lane, D.) による、Methods In Enzymology、1981年、第73巻、3~46頁；「抗体aラボラトリーマニュアル (Antibodies a Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory、1988年、322、323および343頁；および、Pierce Catalog、T9~T17頁 (1996年)、に記載されている。適切な酵素として、アルカリホスファターゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼが挙げられるが、それらに限定されない。本発明に使用される他のマーカースまたは標識として、コロイド金、着色ラテックスビーズ、磁気ビーズ、蛍光標識 (例えば、2、3のフルオロフォアの例を挙げると、蛍光イソチオシアネート (FITC)、フィコエリトリン (PE)、テキサスレッド (TR)、ローダミン、フリーまたはキレートのランタニド系列塩、特にEu³⁺)、化学発光分子、ラジオアイソトープ (125I、32P、35S、キレートTc等)、または、磁気共鳴画像法標識が挙げられる。他のマーカースとして、蛍光消光、および、蛍光移動マーカース、例えば、均質アッセイおよび固相アッセイに使用されるものが挙げられる。さらに、本発明にしたがって、マーカースは、エピトープ、結合パートナー、または、別の分子と相互作用するための「ハンドル」、例えば、ビオチン-ストレプトアビジン；グルタチオン-GST；ヘキサヒスチジン-ニッケル等であってもよい。本発明はまた、二次抗体を使用することも企図しており、これは、それ自身が、マーカースとして、検出可能に標識される (例えば、抗PAMG-1抗体対が、2つの異なる動物種からのFc部分を備えた抗体を使用する状況である)。

【0061】

別の実施形態において、組成物は、本発明のストリップ装置の検査領域に位置する2つまたはそれ以上のモノクローナル抗体をさらに含んでもよい。

【0062】

本発明によるキット

本発明は、PAMG-1を検出するためのキットにも関する。1つの実施形態において、キットは、本発明による一対の抗体を含み、その一方は、PAMG-1に高度に特異的である。キットの1つの変形例において、一方または他方の抗体が、抗体に結合された検出可能なマーカースを含む。別の変形例において、選択された対の一方または他方の抗体は、固体担体に結合される。この変形例において、選択された対の移動可能な抗体は、検出可能なマーカースを含む。別の実施形態において、組成物は、3つまたはそれ以上のモノクローナル抗体を含み、そのうちの1つは、移動可能であり且つ検出可能であり、この組み合わせは、イムノクロマトグラフアッセイの感度の閾値を調節するのを可能にする。

【0063】

特定の実施形態において、最高結合親和力の抗PAMG-1抗体は、移動可能であり、当初試料接触のために装置のパッド領域に置かれる。別の抗体は、装置の検査領域に置かれる。あるいは、最高結合親和力ほど高くないが、PAMG-1に高い結合親和力を有す

他のモノクローナル抗体を異なる組み合わせで調製し、装置の検査領域内で固定して、本発明の装置用の感度の所定の閾値を設定するかまたは調整することができる。これは、実施例11に示されるように、慣用的な実験によって行うことができる。抗体の異なる組成物は、所定のレベルで本発明の装置用の信号検出の閾値を確立する。

【0064】

PAMG-1を検出するための方法および装置

本発明は、PAMG-1、特に、通常の膣液よりもはるかに多い量の羊水に存在するPAMG-1が、結果として羊水が膣内に漏れることになる胎膜の破裂を検出するための有用な検体であることを確立する。言い換えると、これによって、膜すなわち羊膜嚢の早期破裂を診断することが可能になる。本発明はさらに、正常条件下でのPAMG-1の検出、膣炎の様々な症候および真の膜破裂の検出のためのカットオフを確立する。検体、および、膜の破裂を示す相対的レベルを識別すると、当業者は、早期膜破裂の状態が患者に発生しているか否かを決定するためにタンパク質を検出するのに公知の任意の分析技術を、完全に有利に、使用することができる。

【0065】

イムノアッセイ、特に、イムノクロマトグラフアッセイは、本発明にしたがって好適な技術を構成し、イムノアッセイは下記に詳細に述べられる。これらのアッセイは、特異性、正確度、速度および経済性という利点を有する。

【0066】

本発明は、PAMG-1を検出し定量するための他の方法を使用することもできるが、これらの方法は、高価な機器を必要とし、アッセイを実験室設定に限定することもある。1つのそのような技術は、例えば、ディレイドエクストラクションおよび飛行時間型チャンパのリフレクトロンを備えたマトリックス支援レーザー脱離(MALDI)飛行時間型(TOF)質量分析(MS)を使用する質量分析である。好ましくは、MALDIアッセイは、シリコンアレイ上で実行される。MALDI用のアレイの例は、酸化シリコン上で、350 μ mセンターで、200 μ m円形ゲルパッドである。ゲルパッドの間の疎水性表面(撥水表面)は、MALDI用に、より焦点を合わせたマトリックス/タンパク質スポットをさらに提供し、それによって、定量用の信号を改良する。例えば、パックカードバイオサイエンス(Packard Bioscience)システムを使用して作成されたスポットは、直径が200 μ m未満であり得る。ピエゾシステムは、約300pLのMALDIマトリックス(例えば、DHB、シナピン酸)を、親和力捕捉剤(affinity capture agent)-ペプチドスポットの正確な位置へ送出して、均質なペプチド/マトリックス結晶を形成することができる。MALDI-MS(例えば、パーセプティブボイジャー(Perceptive Voyager))におけるこの結晶からの脱離/イオン化(カラス(Karas)ら、Ion Processes、1987年、第78巻、53~68頁、または、ゼノビ(Zenobi)ら、Mass Spectrom. Rev.、1998年、第17巻、337~366頁)は、ペプチドピークの高さがそのペプチドを含有するタンパク質の量に比例する質量スペクトルを産する。

【0067】

本発明に使用される代替技術は、キャピラリー電気泳動クロマトグラフィであり、これは、少量の試料に存在する検体の定量を可能にする。

【0068】

さらに、定量的な生化学的技術、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、高性能液体クロマトグラフィ等を、単独でまたは組み合わせて使用して、試料中のPAMG-1を検出し、その量を定量してもよい。

【0069】

PAMG-1を検出するための免疫学的方法および装置

抗原に対する抗体の免疫特異的な結合を検出するための当該分野で公知の様々な手段を使用して、本発明にしたがって結合を検出することができる。複合体の分析に関する抗原と抗体との間の相互作用を検出する初期の方法は、ゲルの沈降によるものである。検体-検出抗体結合対を検出するためのさらなる方法は、放射性ヨウ化検出抗体または放射性

ヨウ化タンパク質を使用することを含み、これは、IgG例えばタンパク質Aと反応する。これらの初期の方法は、Methods in Enzymology、1980年、第70巻、166～198頁に検討されているように、当業者によく知られている。抗体および本明細書中に開示されたPROM用の閾値を超える陽性結果を生じる条件を選択することによって、この技術を本発明の実施において使用し得る。

【0070】

1つの抗体のみを使用して試料中の検体の存在を決定するための後の方法は、競合結合アッセイが含まれていた。この技術において、抗体は、固体担体に固定されることが非常に多く、公知の量の標識された検体と一緒に、検体を含有すると疑われる試料に露出される。2つの検体、すなわち、標識された検体と試料中の検体とは、抗体の結合部位を競合する。遊離標識検体または結合標識検体のいずれかが決定され、この測定から、試料中の競合する検体が知られる。この方法のより完全な説明は、「抗原-抗体反応の基本原則 (Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction)、エルビンA. ラバト (Elvin A. Labat) (Methods in Enzymology、70、3～70、1980年) に開示されている。この例において、標識された検体は、ラジオアイソトープまたは酵素標識のいずれかで標識されることができる。

【0071】

より近年のイムノアッセイは、検体の存在を検出するために二重抗体法を使用する。これらの技術も、Methods in Enzymologyの上記参照した巻に検討されている。したがって、本発明の1つの実施形態にしたがって、個別マーカの存在は、検出されるべきマーカの各々用の一対の抗体を使用して決定される。上記対の抗体の一方は、ここでは「検出抗体」と称され、上記対の抗体の他方は、ここでは「捕捉抗体」と称される。本発明の1つの実施形態は、このようにして、臍液の試料内のPAMG-1を検出するために二重抗体サンドイッチ方法を使用する。この方法において、検体は、検出抗体と捕捉抗体との間に挟まれ、捕捉抗体は、固体担体に不可逆的に固定されている。検出抗体は、抗体-検体サンドイッチの存在、すなわち検体の存在を識別するために、検出可能な標識を含有する。

【0072】

固体担体の一般的な初期の形態は、ポリスチレン製のプレート、チューブまたはビーズを含み、これらはすべて、ラジオイムノアッセイおよび酵素イムノアッセイの分野では周知である。より近年には、多数の多孔性材料、例えば、ナイロン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ガラス繊維および他の多孔性ポリマーが、固体担体として使用されている。

【0073】

このようにして、特定の実施形態において、本発明の装置は、イムノクロマトグラフアッセイを行うための手段を具備する（「イムノクロマトグラフアッセイ装置」）。そのような装置は、液体を伝えるための固相手段を具備する。本明細書中において使用される場合、「液体を伝えるための固相手段」は、液体がそれを通して、例えば毛管作用によって、移動することを可能にする固体担体を意味する。この性質を有する典型的な製品は、ニトロセルロース膜であり、これは、当業者に周知の方法で調製されてもよい。

【0074】

多くのイムノクロマトグラフアッセイ手段およびフォーマットは、当該分野で公知であり、本発明の実施のために使用することができる。ディップスティックまたは流入装置に固体担体として膜を使用するイムノクロマトグラフアッセイは、臨床の研究室において使用するために、および代替の、すなわち非実験室系の現場検査での使用のために、よく確立されている。イムノクロマトグラフアッセイ装置用の通常の形態は、プラスチックホルダ内に装備された膜（セルロースまたは非セルロース）である。プラスチックホルダは、装置全体が正確に機能するのを確実にするために、膜を適切な構成に保つ。アッセイ装置の基本構造には、多くの変形例がある。例えば、リトマン (Litman) ら (米国特許第5, 156, 952号および第5, 030, 558号) には、試料中の検体の最小量の存在を

検出するためのアッセイ方法および装置が記載されている。ウルマン (Ullman) ら (米国特許第5, 137, 808号および第4, 857, 453号) には、試料が流れるのを補助するために内蔵式の液体試薬を含むアッセイ膜を収容するための装置が記載されている。ダフオン (Dafforn) ら (米国特許第4, 981, 768号) には、試料および特別な液体を加えるためのポートを備えた装置が記載されている。コルチ (Corti) ら (欧州特許出願公開第89118378. 2号)、グリーンキスト (Greenquist) ら (米国特許第4, 806, 312号)、および、バーガー (Berger) ら (米国特許第5, 114, 637号) にも、アッセイ装置が記載されている。

【0075】

好ましくは、イムノクロマトグラフアッセイ手段は、アッセイが正しく進行していることを示すコントロールを含む。コントロールは、固相担体上の試料添加点から、検体の存在下にまたは非存在下に標識された試薬に結合する検出ゾーンよりも離れたスポットにある特異的な結合反応物であり得、したがって、動員可能なレセプターが液体試料とともに十分な距離を移動して、意味のある結果を与えていることを示す。

【0076】

イムノクロマトグラフアッセイに使用されるのに適切な標識として、酵素、フルオロフォア、クロモフォア、ラジオアイソトープ、染料、コロイド金、コロイド状炭素、ラテックス粒子、および、化学発光剤が挙げられる。コントロールマーカが使用される場合には、レセプターおよびコントロールマーカに同一の標識または異なる標識を使用してもよい。

【0077】

本発明の1つの実施形態は、流入型のイムノアッセイ装置を使用する。バルカーズ (Valkirs) ら (米国特許第4, 632, 901号) には、抗原検体に特異的であり、液体試料が加えられる多孔性膜またはフィルタに結合された抗体を含む装置が開示されている。液体が膜を通して流れるにつれて、標的検体が抗体に結合する。試料の追加後に、標識された抗体が追加される。標識された抗体を目で見て検出することによって、試料内に標的検体が存在することが示される。

【0078】

流入装置の別の例は、クローマー (Kromer) ら (欧州特許出願公開第0229359号) に開示されており、これには、マトリックスの下に配置された反応マトリックスに送達するように試薬の溶出速度を制御するために、水溶性ポリマーに分散された試薬またはその成分で飽和されたマトリックスを備える試薬送達システムが記載されている。

【0079】

移動型のアッセイでは、固相担体 (例えば、膜) に、アッセイを実行するのに必要な試薬が含浸される。標識された検体が結合され、アッセイの結果が読み取られる検体検出ゾーンが設けられる。例えば、トム (Tom) ら (米国特許第4, 366, 241号) およびズク (Zuk) (欧州特許出願公開第0143574号) を参照のこと。移動度アッセイ装置は、通常、その中に、着色された標識 (例えば、コロイド金またはコロイド状炭素) に結合されている試薬を組み込み、それによりさらなる物質を加えることなく、アッセイ結果を目で見て検出するのを可能にする。例えば、バーンスタイン (Bernstein) (米国特許第4, 770, 853号)、メイ (May) ら (国際特許出願公開第88/08534号) およびチン (Ching) ら (欧州特許出願公開第0299428号) を参照のこと。これらの公知のタイプの流入装置のすべては、本発明にしたがって使用することができる。

【0080】

直接標識は、本発明によるイムノクロマトグラフアッセイに使用することができる標識の1つの例である。直接標識は、自然の状態、裸眼により、または光学フィルタおよび/または蛍光を促進するために加えられる刺激 (例えば、紫外線) のいずれかの補助を用いることにより、容易に見ることができエンティティーとして規定されている。本発明にしたがって使用することができる着色標識の例としては、金属ゾル粒子 (例えば、ルーベリン (Leuvering) (米国特許第4, 313, 734号) に記載されたもののような金

ゾル粒子) ; グリブノー (Gribnau) ら (米国特許第4, 373, 932号) およびメイ (May) ら (国際特許出願公開第88/08534号) に記載されたもののような染料ゾル粒子; 上記メイ、およびスナイダー (Snyder) (欧州特許出願公開第0280559号および第0281327号) に記載されたもののような染色されたラテックス; または、キャンベル (Campbell) ら (米国特許第4, 703, 017号) に記載されたようなりボソームに封入された染料が挙げられる。他の直接標識として、放射性核種、蛍光性部分または発光性部分が挙げられる。これらの直接標識づけ装置に加えて、酵素を含む間接標識も、本発明にしたがって使用することができる。様々な種類の酵素結合免疫アッセイが当該分野では周知であり、例えば、アルカリホスファターゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ、リゾチーム、グルコース-6-フォスフェートデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、ウレアーゼであり、これらおよび他のものは、エバ・エンゲバル (Eva Engvall) によって、エンザイムイムノアッセイ ELISA および EMIT (Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT)、Methods in Enzymology、70、419~439、1980年および米国特許第4, 857, 453号に詳細に検討されている。

【0081】

特定の実施形態において、本発明の診断装置は、試料を導入する点の近位に検出セクションと、その点から下流に捕捉セクションとを有する膜アセンブリを具備する。検出セクションは、抗体 (検出抗体) を含有し、これは試料中に存在する本発明の任意の検体と反応する。検出抗体は、膜に可逆的に固定され、使用時には、試料と一緒に移動する。検出抗体は、例えば、放射性核種、酵素、蛍光性部分、発光性部分、または、先行技術に記載されたものおよび上記に検討されたもののような着色され標識で標識されることが、必須ではないが好適である。具体的には、反応の早い標識を使用することができ、そのため、例えば、抗体は、抗原の捕捉前に金に見え、捕捉時に紫に変わる。

【0082】

捕捉セクションは、述べたように、検出セクションから下流にあり、捕捉抗体を含み、これは、固体担体に不可逆的に固定され、各抗体は、捕捉セクションの異なる位置で固定される。抗体および必要な試薬は、先に検討した流入型のイムノアッセイ装置で検討した当該分野で認められた標準的な技術を使用して、固体担体に固定される。一般に、抗体は、非極性タンパク質基礎構造と非極性担体マトリックス材料との間の疎水的相互作用の結果として、固体担体に吸収される。

【0083】

本発明のイムノクロマトグラフアッセイ技術の特定の利点は、これらのアッセイが定量的データを提供することができないことを克服することである。このようにして、捕捉セクションは、試料中の PAMG-1 の量が所望の検出閾値を超えたときのみ、信号が生成されるように、PAMG-1 に特異的な固定された抗体の混合物を含有することができる。

【0084】

加えて、本発明は、均質イムノアッセイフォーマットを使用することを企図する。そのような競合均質方法の1つの例は、ルーベンスタイン (Rubenstein) およびウルマン (Ullman) による米国特許第3, 817, 837号に見られ、これには、リガンドおよび酵素結合リガンドが抗体結合部位に対して競合する技術が記載されている。酵素結合リガンドに対する抗体の結合は、酵素活性を変えるため、存在するリガンドの濃度は、そのような混合物が基質を生成物に転換する速度を測定することによって概算することができる。このようにして、均質方法では、標識の検出可能な特性は、結合しているか否かに依存して本質的に異なる。結合状態では、標識は、より大きいまたはより小さい信号強度を有する。通常、標識されたりガンドに対する抗体の結合は、例えば、標識が酵素であるときには、信号強度を減少させる。このカテゴリーの典型的な生成物として、シバ社 (Syva Company) からのエンザイムイムノアッセイの EMIT 系、および、アボットダイアグノスティクス (Abbott Diagnostics) からの蛍光分極イムノアッセイの TDX 系が挙げられる。特定の均質アッセイは、検体の全てをビーズに沈着させることで調製することができ、そ

の場合、試料が導入され、その後、ビーズは遠心沈降され、検出される。

【0085】

本発明にしたがって使用することができる生物学的診断装置の他の例として、米国特許第4,906,439号および第4,918,025号に、P. B. ダイアグノスティクスシステムズ社 (P. B. Diagnostics Systems, Inc.) のG. グレナー (G. Grenner) が記載している装置が挙げられる。グレナーの'439号の特許装置は、診断検査要素と、流体送達要素を備える試料添加ユニットとを具備し、これは試料を検査要素へ送出するために複数の溝を備えた層を有することを特徴とする。グレナーの'025号特許は、試料導入手段 (例えば、膜) を含む装置に関し、その試料導入手段に隣接して、固定試薬および廃液リザーバーを含有する毛細管が配置される。試料が沈殿された後、毛細管から固定試薬を放出することによって反応を完了し、過剰な液体は廃液リザーバーに保持される。そのため、装置は自己充足式である。

【0086】

膜で測定することが好適であるが、他の技術および対応するセンサ装置も同様に、上記に類似したやり方で使用されてもよいことが理解されるべきである。現在、数種類の自動化アッセイ機器が利用可能であり、これらは、多数の試料のアッセイを同時に行うことができる。これらの自動化アッセイ機器は、連続式/ランダムアクセスアッセイ機器を含む。そのようなシステムの例として、P. B. ダイアグノスティクスシステムズ社 (PB Diagnostic System, Inc.) のOPUS (登録商標)、および、1988年にイリノイ州ノースシカゴ (North Chicago, Ill) のアボットラボラトリーズ (Abbott Laboratories) が導入したIMX (登録商標) アナライザが挙げられる。一般に、検査流体の試料は、典型的に、試料カップに提供され、試料をアッセイ検査要素内にピペット注入することと、インキュベーションと、得られた信号を読み取ることと、を含むすべてのプロセスステップは、自動的に行われる。自動化アッセイシステムは、一般に、一連のワークステーションを含み、その各々は、検査手順でステップの1つを実行する。アッセイ要素は、様々な手段 (例えば、カラーセルまたは可動ラック) によって1つのワークステーションから次のワークステーションへ運ばれて、検査ステップを順に達成することを可能にしてもよい。アッセイ要素はまた、試薬、混合流体、稀釈試料等を保存するためのリザーバーを含んでもよい。アッセイ要素はまた、所定の量の試料流体を投与するのを可能にする開口を含み、必要に応じて、多孔性部材への他の任意の必要な試薬を含む。試料要素もまた、処理ステップの得られた信号 (典型的には、多孔性部材に存在する試薬の蛍光変化または比色分析変化) を、例えば、アッセイシステム内に含まれるスペクトロスコピーまたはフルオリメータのような手段によって、読み取ることができるように、窓を含んでもよい。P. B. ダイアグノスティクスシステムズ社の自動化アッセイ器具は、米国特許第5,051,237号、第5,138,868号、第5,141,871号および第5,147,609号に記載されている。

【0087】

イムノケミカルアナライザシステムのさらなるクラスは、本発明を実行するのに使用することができるが、バイオセンサまたは光学式イムノセンサシステムである。一般に、光学式バイオセンサは、光学的原理を定量的に使用して、興味のある化学的または生化学的な濃度または活性を電気信号に変換する装置である。これらの装置は、4つの主なカテゴリーにグループ分けされる。すなわち、反射技術、表面プラズモン共鳴、光ファイバ技術および集積光学デバイスである。反射技術は、偏光解析法、マルチプルインターナル反射スペクトロスコピー (multiple integral reflection spectroscopy)、および、蛍光キャピラリーフィル装置 (fluorescent capillary fill devices) を含む。光ファイバ技術は、エバネッセント場蛍光、光ファイバキャピラリーチューブ、および、光ファイバ蛍光センサを含む。集積光学デバイスは、プラナーエバネッセント場蛍光、インプットグレーディングカプラーイムノセンサ、マッハツェンダ干渉計、ハートマン干渉計、および、差干渉計センサを含む。結合反応のホログラフ検出は、結合対の一方の反応物が結合対の固定された第2の反応物に結合するときに所定の画像場所で生成されるホログラフ画像の存在

を検出して、達成される(リヒテンワルター(Lichtenwalter)らに付与された1994年10月4日に発行された米国特許第5,352,582号参照のこと)。光学式イムノセンサの例は、一般に、G. A. ロビンズ(G. A. Robins)(バイオセンサの進歩Advances in Biosensors)、第1巻、229~256頁、1991年の概説記事に記載されている。これらの装置のより具体的な記載は、例えば、米国特許第4,810,658号、第4,978,503号および第5,186,897号、R. A. ブラディ(R. A. Brady)ら(Phil. Trans. R. Soc. Land. B316,143~160、1987年)、および、G. A. ロビンズら(Sensors and Actuators、エルゼビア、1992年)に見られる。

【0088】

本発明の方法および対応するキットは、様々な光学式測定システム内に組み込み実行することができる。具体的には、本発明のキットおよび材料は、イムノアッセイフォーマットで実行してもよく、そのようなフォーマット自体を、様々なオプトエレクトロニクス検出システムに具現することができる。より詳細には、本発明を実行する際に容易にされ実施されてもよい様々な光学式イムノセンサ技術は、既に公知である。このようにして、例えば、反射技術、表面プラズモン共鳴、光ファイバ導波管技術および集積光学デバイス等の装置および技術は全て、本発明の方法にしたがって患者の生体試料を検出しその試験の結果を表示するように採用され、具体的に構成されてもよい。特定の反射技術(例えば、反射率測定法および偏光解析法)、および光ファイバ、光導波管、蛍光キャピラリーフィル装置および集積光学バイオセンサの特定の用途が、ほんの数例の、使用されてもよい変形例の技術および機器を提示する。これらの装置の一般的な概説は、ロビンソン、G. A. の光学式イムノセンサ：概要(Optical Immunosensors : An Overview)、バイオセンサの進歩(Advances in Biosensors)、第1巻、229~256頁(1991年)に見出され得る。

【0089】

より具体的には、偏光解析法は、偏光ビームの方向に依存し、第1に参照表面(標準)に対して、その後試料表面に対して、それに続いて、結果として得られる反射の性質および程度の比較を行うことができる。特に、レセプター分子に対する検体の結合は、鎖として参照表面に対する表面の厚さを測定される。

【0090】

マルチプルインターナル反射スペクトロスコピー(multiple internal reflection spectroscopy)の場合には、例えば、リガンドおよびそのレセプターが、平坦な溶融石英導波管の光学面に共有結合的に固定されてもよく、その後、光ビームが導波管内で内的に反射し、導波管に隣接する溶液中に浸透し、その結果、屈折の差を、標準と試料との間で測定することができる。この特定のフォーマットにおいて、蛍光標識が連結されていてもよく、蛍光が測定されて、結果として、現在の結合の程度が決定される。

【0091】

追加技術は、蛍光キャピラリーフィル装置として知られる技術を使用する。この特定の技術において、キャピラリー寸法のギャップによって離れて保持される2枚のガラスプレートが使用される。レセプター分子は、基部プレート上で固定されてもよく、これは光導波管としても作用する。FITC標識づけを使用する競合アッセイまたはサンドイッチアッセイが実行されてもよく、誘起された蛍光が、非結合の供給源とは対照的に結合された供給源からの信号で導波管内に連結される。そのような信号は、導波管を出るときにその角度発散によって識別される。表面プラズモン共鳴(SPR)装置も準備されており、これは、薄金属フィルムに入射する光の、金属フィルム内の集積的電子振動に関連した表面モードとの連結に応答して作用する。共鳴状態は、金属フィルムの光学的特徴、その厚さ、そのフィルムのいずれかの側の誘電体の屈折率、および、光の入射の角度に依存する。レセプター分子は、金属フィルムの頂部に結合され、光は、例えばプリズム基材を通過してフィルムの底部に方向づけられる。標的検体は、これらのレセプターに結合するときには、局所屈折率に発生する変化のため、共鳴状態にシフトを生じる。共鳴は、金属フィルム表面に光ビームが入射する角度が変化する際に、反射した光強度をモニタすることによ

て観察される。共鳴角度の変化が、結合された検体の量に直接相関する。

【0092】

光ファイバシステムに関与する技術には、エバネッセント場蛍光が含まれる。この場合、クラッドが、光ファイバの端から除去され、このようにして、周囲の媒体とエバネッセント的に相互作用するセンサ要素を生成する。レセプター分子は、露出されたファイバ表面に結合される。直接アッセイは、レセプターおよび接合体タンパク質の自然な蛍光を使用して実行されてもよい。競合アッセイまたはサンドイッチアッセイは、より大きな感度を達成するためにFITC標識づけを使用して実行されてもよい。操作において、光波がファイバ内に連結され、エバネッセント的に生成された蛍光の一部が、ファイバへ連結し戻され、検出器へ伝播され戻される。

【0093】

光ファイバ技術を使用するさらなる技術は、光ファイバキャピラリチューブに関与し、裸の光ファイバが円筒形フィルチャンバ内に取り囲まれ、ファイバの周囲を直に被っているフィル容量の一部とエバネッセント的に相互作用するセンサ要素を生成する。レセプター分子は、露出されたファイバ表面に結合されてもよく、サンドイッチアッセイまたは競合置換アッセイ (competitive displacement assays) が行われ得る。光波がファイバに連結されて、エバネッセント的に誘起された蛍光の一部がファイバ内に連結されて戻り、そして検出器へ伝播され戻される。バックグラウンド源に対する標的検体からの信号は、ファイバから出るときにその角度発散によって識別される。他の光ファイバ技術 (例えば、光ファイバ蛍光) が、上記に明記した特定の同じ原理を使用して、本発明に適合されてもよい。

【0094】

さらなる光子技術 (例えば、干渉分光法) は、例えば2本の経路を有する薄フィルム導波管の配置を含み、その第1の経路にレセプター分子が固定されてもよく、一方、第2の経路はシールドされて、参照チャンネルを提供する。例えば、レーザー光が導波管内に連結され、2本の経路に分かれてもよく、その結果、覆う層の屈折率および厚さの変化は、ビームの位相シフトの結果として検出され得、それが今度は、結合された検体の量と相関する。このアプローチの変形例は、単一経路マルチモード薄フィルムプラナー導波管が準備されるハートマン干渉計で確認される。レセプター分子はこの経路に固定されてもよく、2つのモードが経路を伝播するようにレーザーからの光が導波管内に連結されてもよい。マルチモード形状の光学では、より高い次元のモードが大きなエバネッセント場を有し、信号機構を提供し、より低い次元のモードは実際にはエバネッセント場を有さず、参照機構を提供する。標的検体と結合することは、経路上を覆う層の屈折率および厚さに関連変化を発生させ、これは、より高い次元のモードのエバネッセント場によって検出され、そのモードに位相シフトを発生させる。より低い次元のモードまたは参照モードではそのような変化は見えないため、位相シフトは経験されず、信号と参照ビームとの間の測定された差は、結合された検体の量を決定するために相関することができる。

【0095】

前述の検討は、一般的に且つ幾分は詳細に提供されているが、光学センサ技術において利用可能な様々な技術が本発明の実施に適合させ得る。上記の列記は、決して網羅的なものでも限定的なものでもなく、様々な現存の技術を採用してもよく、それは、首尾よく結合における差を測定し、結果として、本願におけるそれぞれの目的のマーカまたは検体の存在および量を測定することを理解すべきである。当然ながら、上記に強調されたように、どの技術が使用されるのであれ、本発明の実施は、少なくとも3つの検体の同時検出および測定を含む。

【0096】

PAMG-1を検出するためのイムノクロマトグラフ法

本発明にしたがってPAMG-1を検出する方法の実施形態が、下記に記載される。

【0097】

上記方法の1つの実施形態において、PAMG-1は、PAMG-1を含有する試料を

、本発明のイムノアッセイシステムに接触させ、抗体-PAMG-1複合体を形成させることによって、試料内で検出される。次いで、抗体-PAMG-1複合体が検出される。この実施形態の1つの変形例において、抗体は、検出可能なマーカを含み、抗体-PAMG-1複合体を検出するステップは、検出可能なマーカを含む。

【0098】

上記方法の別の実施形態において、PAMG-1は、試料を、PAMG-1に高度に特異的な結合親和力を有する抗体（下記に例証されるM271のようなもの）に接触させることによって、試料内で検出され、このようにして、抗体M271-PAMG-1複合体を形成する。この複合体は、次いで、固定された第2の抗体（例えば、M52のようなもの）に接触するようになる。第2の抗体は、免疫学的に第1の抗体とは異なり、交差反応せず、そのため、そのような抗体は、PAMG-1分子に同時に結合することができる。固定された抗体は、可動抗体PAMG-1複合体に結合して、固定された抗体PAMG-1抗体複合体を形成する。PAMG-1は、このヘテロトリマー複合体を検出することによって、検出される。上記のように、PAMG-1に高い特異性を有する抗体が、PAMG-1の初期認識のために使用されることが好ましい。

【0099】

上述の方法が、検出可能なマーカで標識された選択された対の一方の抗体の使用を含む場合には、方法の変形例は、試料が第2の固定された抗体に接触する前に、試料を、第1の標識された抗体に接触させることを含む。この変形例において、標識された抗体は、試料中のPAMG-1に結合するように作用する。方法のさらに別の実施形態は、下記のステップを含む。すなわち、PAMG-1を含有する流体試料を、抗体およびタンパク質がそれを通して移動することを可能にする多孔性材料の移動可能な標識された抗体領域に加えるステップであって、抗体領域は、PAMG-1に高い特異性を有する移動可能な抗体を含み、結果として、抗体をPAMG-1に結合させ、抗体PAMG-1複合体を形成するステップと、複合体を、固定された第2の抗体をその中に含有する検査領域へ移動するステップであって、この第2の抗体はPAMG-1に結合親和力を有し、結果として、第2の抗体は、標識された抗体PAMG-1複合体に結合して、固定された複合体を形成するステップと、固定された複合体を検査領域で検出するステップと、である。

【0100】

方法のさらに別の実施形態は、標準サンドイッチアッセイであり、標識されていない抗体は、あらゆる表面に固定される。PAMG-1を含有する流体試料を追加すると、結果として、固定された抗体によるPAMG-1の結合になり、抗体PAMG-1複合体を形成する。標識された抗体を加えると、結果として、固定された抗体PAMG-1-標識された抗体から構成される固定された複合体を形成し、そしてこの複合体を検出する。

【0101】

上述の方法にしたがって、抗体は、検出可能なマーカまたは標識を含んでもよく、抗体-PAMG-1またはPAMG-1-抗体複合体を検出するステップは、検出可能なマーカまたは標識の検出を含む。使用することができる検出可能なマーカの例として、着色した粒子、酵素、染料および放射性同位元素が挙げられる。特定の実施形態において、検出可能なマーカは、金の着色粒子であり、例えば、約20nm~30nmの間の平均寸法を有する。さらに別の実施形態において、検出可能なマーカは、西洋ワサビペルオキシダーゼである。

【0102】

PAMG-1を検出するための模範的な装置

試料内のタンパク質PAMG-1を検出するために、様々な装置が企図されている。PAMG-1を検出するための本発明の装置の特定な実施形態は、図1~2に示されている。本発明による装置は、PAMG-1の濃度が約5ng/mlから50μg/mlの間である試料内のPAMG-1を検出することができることが好ましい。装置は、約5~7ng/mlの検出閾値を有することも好適である。PAMG-1のバックグラウンド濃度と検出装置の感度の閾値との間のギャップが広くなればなるほど、偽陽性の結果が得られる

可能性は低くなる。このセクションでは、本発明による装置の可能な異なる実施形態が、図1、2に例示された装置内で具現される。この装置は、単に、膾分泌液の試料内のPAMG-1の存在を検出するために設計され得ることに注意されたい。

【0103】

本明細書中で使用される「約」という用語は、当業者によって決定される特定の値についての容認可能な誤差範囲内を意味し、これは、ある程度は、値がどのように測定されるかまたは決定されるか、すなわち、測定システムの限界に依存する。例えば、「約」は、当該分野の慣行により、1または1を超える標準偏差内を意味することができる。あるいは、「約」は、所与の値の、20%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%まで、および、さらにより好ましくは1%まで、の範囲を意味することができる。あるいは、特に、生物学的システムまたはプロセスに関しては、この用語は、ある値の、1桁の大きさ内であること、好ましくは5倍内、より好ましくは2倍内であることを意味し得る。特定の値が明細書および特許請求の範囲に記載される場合には、別途記載のない限り、「約」という用語は、特定の値についての容認可能な誤差範囲内を意味することを想定すべきである。

【0104】

本発明の装置の説明

例証の目的で、この説明は、下記に例証されるモノクローナル抗体を参照する。しかし、必ずしもこれらの特定のモノクローナルが使用される必要はない。図1および2に示されるように、装置は、数個の順次に相互連結される要素から構成されるストリップ状本体を具備する。より具体的には、装置の部分12はパッドを具備し、これはM271抗体領域10を含有し、その中で、M271抗体は、例えば、着色した粒子SP（図示せず）によって標識される。パッド12は、ガラス繊維組織または他の任意の材料から作られてもよく、これは、多孔性であり、試料の様々な粒子および物質が移動するのを可能にする。着色した粒子は、20~30nmの範囲内平均寸法を有する金粒子を具備してもよい。M271抗体領域は、同一の着色粒子によって標識されたマウスIgG免疫グロブリンを含有する。標識されたM271抗体およびマウスIgG免疫グロブリンは、パッド12を標識されたM271抗体および標識されたマウスIgGの溶液で含浸することによって、パッド12のバンド部分10内に導入される。M271抗体およびマウスIgG免疫グロブリンの溶液は、製図用ペンまたはマイクロドロップ形成装置を使用して、ニトロセルロース膜22に導入されてもよい。パッド12の一方の端に、その長手方向に、ニトロセルロース膜22が接続され、これは、検査領域14および制御領域16を含む。検査領域14および制御領域16の両方は、その幅全体にわたって装置を横切って配列される。検査領域14は、ニトロセルロース膜22のバンド部分である。検査領域14は、ニトロセルロース膜22に結合されたM52抗体を含有する。制御領域16は、ニトロセルロース膜22に結合された抗マウス抗免疫グロブリン抗体を含有する。制御領域16は、ストリップ22の幅全体を横断する。フィルタペーパー膜24がニトロセルロース膜22の端に接続され、これは、パッド12に接続されたニトロセルロース膜22の端に向かい合っている。フィルタペーパー膜24は、ニトロセルロースストリップ22の端に長手方向に接続される。装置の表面は、特別な保護フィルム28および30（例えば、ストリップ装置用に特別に設計された薄い接着テープ）でコーティングされている。矢印18は、パッド12の試料添加端を示すために、フィルム28の表面に引かれる。パッド12、ニトロセルロース膜22およびフィルタペーパーストリップ24は、接着剛性プラスチック基部26に結合される。

図1、2の説明

- 10 M271抗体領域
- 12 パッド
- 14 検査領域
- 16 制御領域
- 18 矢印

- 22 ニトロセルロース膜
- 24 フィルタペーパー膜
- 26 接着剛性プラスチック基部
- 28 矢印を備えた部分的に透明な保護フィルム
- 30 非透明保護フィルム

【0105】

本発明の装置の好適な実施の形態

このセクションに記載される実施形態において、装置は、抗体およびタンパク質がそれを通して移動するのを可能にする多孔性試料添加マトリックスから形成されたM271抗体パッド領域10を含む。M271抗体領域10は、M271抗体を含み、これは、PAMG-1に高度に特異的に結合することができる。PAMG-1を含有する流体試料をM271抗体領域内に導入することは、結果として、M271抗体がPAMG-1に結合することになり、抗体M271-PAMG-1複合体を形成する。装置はまた、抗体およびタンパク質がそれを通して移動するのを可能にする多孔性材料から形成されたM271抗体領域10に流体接続する検査領域14も含む。検査領域14は、検査領域14に固定されたM52抗体を含み、これもPAMG-1に結合することができる。M52抗体は、M271抗体およびM52抗体が同時にPAMG-1に結合できるように、M271抗体とは免疫学的に異なる。流体試料をM271抗体領域10へ導入することは、結果として、抗体M271-PAMG-1複合体を検査領域14内に移動させることになり、そこで、抗体M271-PAMG-1複合体はM52抗体に結合し、M52抗体によって検査領域に固定される。装置は、検査領域14に固定されたM52抗体の存在に基づいて、試料内のPAMG-1を検出する。この実施形態によると、両方の抗体は、本発明に従う抗体である。上述の抗体の対を選択する手順は、当業者によって再現されることが可能である。結果として、PAMG-1のみが、検査領域14に固定される抗体M271-PAMG-1-M52抗体複合体を形成する。このようにして、検査領域14に固定されたM52抗体の存在が、試料内にPAMG-1が存在することを示す。

【0106】

装置のこの実施形態において、M271抗体は、検査領域14に固定されたPAMG-1を検出するのに使用される検出可能なマーカーに結合される。使用されてもよい検出可能なマーカーの例として、着色した粒子、酵素、染料、蛍光染料および放射性同位元素が挙げられるが、それらに限定されない。1つの実施形態において、検出可能なマーカーは、約20~30nmの間の平均寸法を有する金粒子である。1つの実施形態において、M271抗体は、フリーズドライ状態の標識された抗体である。

【0107】

M271抗体パッド領域のM271抗体が検出可能なマーカーで標識される実施形態の変形例において、装置は、検査領域をさらに含み、これは、M52抗体を含有する。パッド領域および検査領域は、流体接続している。

【0108】

装置のさらに別の実施形態において、図1~2に例示された装置内に具現されたように、装置は、近位端および遠位端を備えたストリップ状本体を有する。ストリップ状本体のM271抗体領域10は、抗体およびタンパク質がそれを通して移動するのを可能にする材料から作られる。ストリップ状本体のM271抗体領域10は、PAMG-1に高度に特異的な結合親和力を有するM271抗体を含み、PAMG-1を含有する流体試料のM271抗体パッド領域へ導入することは、結果として、M271抗体がPAMG-1に結合することになり、抗体M271-PAMG-1複合体を形成する。

【0109】

ストリップ状本体はまた検査領域14も含み、これは、M271抗体領域10に対して近位であり、M271抗体領域10に流体接続する。検査領域14は、抗体およびタンパク質がそれを通して移動するのを可能にする材料から形成される。検査領域14は、検査領域14に固定されたM52抗体を含み、これは、PAMG-1に結合親和力を有し、流

体試料をM271抗体領域10へ導入することは、結果として、抗体M271-PAMG-1複合体が検査領域14に移動することになり、そこで、抗体M271-PAMG-1複合体はM52抗体に結合し、M52抗体によって検査領域14に固定される。検査領域14は、検査領域14に固定されたM42抗体およびM52抗体も含む。標識されていないM52およびM42抗体を組み合わせ、本発明のストリップ装置の感度閾値を微調整することを可能にする(実施例11)。装置は、標識された抗体M271-PAMG-1の複合体が検査領域14で固定されるのに基づいて、試料内のPAMG-1を検出する。

【0110】

制御領域。本発明の装置は、1つの標準制御領域16を含む(図1~2)。この制御領域は、装置の適切な操作を確認するように作用する。しかし、本発明の装置では、任意の代替的な制御領域設計を使用してもよいことに注意すべきである。

【0111】

1つの制御領域を備えた装置は、抗体およびタンパク質がそれを通して移動するのを可能にする材料から形成されたM271抗体領域10を含み、M271抗体領域10は、中に固定されていない標識されたM271抗体を含み、PAMG-1に高い特異性を有し、PAMG-1を含有する流体試料をM271抗体パッド領域10へ導入することは、結果として、M271抗体がPAMG-1に結合することになり、抗体M271-PAMG-1複合体を形成する。装置はまた、抗体およびタンパク質がそれを通して移動するのを可能にする材料から形成されるM271抗体領域10に流体接続する検査領域14も含む。検査領域14はまた、検査領域14に固定されたM52抗体を含み、これは、PAMG-1に結合親和力を有する。M52抗体は、M271抗体およびM52抗体が同時にPAMG-1に結合することができるように、M271抗体とは免疫学的に異なる。流体試料をM271抗体領域10へ導入することは、結果として、抗体M271-PAMG-1複合体を検査領域14内に移動させることになり、そこで、抗体M271-PAMG-1複合体はM52抗体に結合し、M52抗体によって検査領域に固定される。装置は、標識されたM271抗体が検査領域14に固定されるのに基づいて、試料内のPAMG-1を検出する。低濃度のPAMG-1が試料内に存在するときには、少なくともいくつかの標識されたM271抗体がM271抗体領域10から検査領域14を通して制御領域16へ移動する。抗マウス抗免疫グロブリン抗体は、制御領域16に固定される。抗免疫グロブリン抗体は、制御領域を着色する標識されたM271抗体に結合する。高濃度のPAMG-1が試料内に存在するときには、少量の標識されたM271抗体のみが制御領域16に近づくことができ、制御領域の着色は弱すぎるためヒトの裸眼では見ることができないこともある。そのような可能性を防止するために、標識されたマウスIgG免疫グロブリンが、M271抗体領域10内に加えられた。この免疫グロブリンは、PAMG-1に結合せず、M52抗体検査領域14を通して自由に制御領域16へ移動し、そこで、抗マウス抗グロブリン抗体によって結合され、制御領域16を着色する。制御領域は、試料内のPAMG-1の濃度にかかわらず、装置が適切に機能するのを確認する。

【0112】

本発明の装置のさらに別の構成要素は、検査領域の材料に密接に多孔性接続する多孔性材料である。本発明の装置のこの部分は、液体、タンパク質および抗体がそれを通して動くのを補助するポンプとして働く。マウス抗体およびIgG免疫グロブリンを標識するために使用されてもよい検出可能なマーカーの例として、着色した粒子、酵素、染料および放射性同位元素が挙げられるが、それらに限定されない。1つの実施形態において、検出可能なマーカーは、蛍光染料である。さらに別の実施形態において、検出可能なマーカーは、着色した粒子である。1つの実施形態において、M271抗体は、標識された抗体であり標識されたマウス免疫グロブリンIgGであるが、フリーズドライ状態である。

【0113】

上述の装置の様々な領域に使用される材料は、抗体およびタンパク質がそれを通して移動するのを可能にする材料の任意の組み合わせであってもよい。適切な材料の例として、ガラス繊維、多孔性プラスチック、ニトロセルロースおよびフィルタペーパーが挙げられ

るが、それらに限定されない。

【0114】

装置の部分は、本発明の装置の任意の実施形態において妊婦の臍分泌液中のPAMG-1の最小バックグラウンド濃度を検出する選択された一対の抗体があるならば、任意の機能的な組み合わせに配置され得る。

【0115】

本特許の装置は、装置の少なくとも一部を覆う保護フィルムを必要に応じて含んでいてもよい。これは、透明であってもなくてもよく、また、その表面に、必要な商標、情報マーク/サインまたは矢印を有することができる。

【0116】

胎膜破裂の検出

PAMG-1は、妊婦の血清よりも少なくとも100倍大きい濃度で、胎膜破裂がない場合の妊婦の臍分泌液よりも少なくとも3000倍大きい濃度で、羊水中に存在する。結果として、少量の羊水が臍分泌液試料に溶解されるときでさえ（臍分泌液の1mlにつき1滴の約1/100）、十分な量のPAMG-1がこの臍分泌液試料内に存在し、胎膜破裂が起こっていることを示す。さらに、血清中のPAMG-1の濃度は低いため、試料へのわずかな量の血清の混合（10~15%）は、本発明の装置および方法によって産出される結果に影響を与えない。

【0117】

臍分泌液中に羊水が存在することは胎膜破裂を示すため、臍分泌液中でPAMG-1を検出することもまた、胎膜破裂を検出するために使用することができる。

【0118】

羊水中のPAMG-1を検出するための本発明による方法は、高感度である。例えば、0.05ng/ml濃度のPAMG-1を検出することができる（実施例6、7）。羊水中の最小濃度が約1680ng/mlであるのに比較して、血清内のPAMG-1の最大濃度は約25ng/mlであるため、且つ、臍分泌液中のPAMG-1のバックグラウンド濃度は非常に低く約0.2ng/mlであるため、臍内の羊水の発生を検出するための本発明の方法において、PAMG-1のより低い閾値レベルを使用することができる。本発明の場合には、より低い検出閾値を使用することによって、大半の偽結果が回避される。

【0119】

本発明の装置および方法は、感度が高くPAMG-1に特異的な一対の抗体を使用することによって、偽結果を産出するのを回避するように設計される。それに加えて、本発明の装置の感度の閾値は、5~7ng/mlに近い所定のレベルに正確に設定されてもよい。

【0120】

結果として、本発明の装置および方法は、臍炎または他の変数の存在によって影響されないが、それは、胎膜破裂を検出するための先行技術の方法の正確度にマイナス影響を与えていた。炎症滲出液中のPAMG-1の最大濃度は、3ng/mlである（実施例8、表10、11）。同一濃度のPAMG-1は、臍分泌液への血清の混合が10~15%を超えないときに、発生する可能性がある。加えて、血清対羊膜PAMG-1の濃度の大きな割合が、本発明の装置および方法を、低PAMG-1検出閾値でさえ、臍分泌液中の血清の存在のため、偽陽性結果を産出する可能性を有意に少なくする。ここに記載されるように、即座に且つ便利なやり方で、装置および方法を容易に使用するように適合させることができ、それによって、装置および方法を外来患者の条件で使用することを可能にする。例えば、方法を、装置を前もってほとんど使用したことがないかまたは全く使用したことがない患者が操作し得る使い易い装置に、組み込むことができる。装置を使用するために、測定前に、試料濃度の特別なタイミング、稀釈または整合は必要ない。これによって、装置および方法が、高度に信頼性のある、オペレータの誤操作に対してあまり影響を受けないものになる。この方法はまた、試料内のPAMG-1の存在、および、臍内の羊水

の存在を、簡単に、イエス/ノーで決定することができるように設計されることも可能である。

【0121】

本発明は、妊婦の臍分泌液中のPAMG-1の存在に基づいて、胎膜の破裂を検出するための方法および装置を提供する。その結果、胎膜破裂を検出するための本発明の方法は、単に、臍分泌液中のPAMG-1を検出するステップを含むのみであり、臍分泌液中のPAMG-1の存在は、胎膜破裂の発生を示す。本発明の重要な部分は、妊婦の臍分泌液中で非常に低いバックグラウンド濃度のタンパク質PAMG-1を検出する一対の抗体を段階的に選択することである。血中タンパク質に対する毛細管壁の透過性は、タンパク質の翻訳後修飾および他の分子との相互作用に依存するため、臍分泌液中に低濃度でPAMG-1が存在することが予想し得た(マリナロー、J. A. ら、「O-グリコシル化は、循環からヒトIGF-結合タンパク質-6のクリアランスを遅延する」、European Journal of Endocrinology、2000年5月、第142巻(5)、512頁;シュネーベルガー、E. E.、「血管内皮層内のタンパク質および小胞輸送」、Fed Proc.、1983年5月、第42巻(8)、2419-24頁;ミンシャル、R. D. ら、「内皮細胞内の小胞形成およびトラフィッキング、および、内皮障壁機能の調整」、Histochem. Cell Biol.、2002年2月、第117巻(2)、105-12頁;デルベッキオ、P. J. ら、「巨大分子への内皮単層の透過性」、Fed Proc.、1987年6月、第46巻(8)、2511-2515頁;シフリンガーバーンボイム、A. ら、「内皮単層の選択性:透過性増大における効果」、Microvascular Research、1998年11月、第36巻(3)、216-227頁;ギネア、N.、ミルグロム、E. A.、「LH/CGレセプター用の新規機能:標的器官の内皮障壁にわたるホルモンのトランスサイトーシス」、Semin. Reproduct. Med.、2001年、第19巻(1):97-101頁)。翻訳後修飾を受けたか、または、別の分子と非共有結合を確立したPAMG-1分子の中に、臍分泌液中への浸透が最小であるものがなければならない。臍分泌液中のそのような分子の濃度は、低くなければならない。異なる分子の低いかまたは高い浸透は、毛細管壁の選択的透過性および選択的分泌過程のためである。妊婦の臍分泌液中に羊水が存在することは胎膜破裂の兆候であることが知られているため、臍分泌液中のPAMG-1の検出を使用して、胎膜破裂の存在を検出することもできる。臍分泌液中のPAMG-1を検出するための方法および装置の例は、ここに、より詳細に説明される方法および装置を含む。方法は、臍分泌液の試料内のPAMG-1の検出に基づいて胎膜破裂を検出するステップをさらに含み、これもまたここに、より詳細に説明される。

【0122】

上記に検討されたように、胎膜破裂を検出するための本発明による方法および装置は、高度に特異的であり、感度があり、正確である。感度および正確度は、妊婦の臍分泌液中のPAMG-1の低バックグラウンド濃度と、本発明の装置の感度の予めかなり高く設定された閾値との間の広いギャップによって達成され、閾値は次に、羊水の臍内への漏れを形成する胎膜の破裂時に、臍分泌液中のPAMG-1の典型的な濃度よりも低い。閾値の正確な設定は、次に、PAMG-1に対して検査領域14で少なくとも1つまたはそれ以上の追加抗体を使用することによって達成され、本発明の装置の感度の所定の閾値を正確に設定する(実施例9)。その結果として、本発明の方法および装置は、モノクローナル抗体M271およびM52の高度に特異的な対および少なくとも1つの追加抗体M42を使用することによって、偽陰性および偽陽性の結果を産生するのを回避するように設計される。結果として、方法および装置の正確度は、胎膜破裂を検出するための先行技術の方法の正確度を減じていた臍感染症または他の一定の変数の存在によって悪影響を受けることはない。妊婦の臍分泌液中のPAMG-1を検出するための本発明の好適な装置および方法はまた、使用するのが容易で便利で迅速となるようにも設計されており、それによって、本特許の装置を外来ベースで使用することを可能にする。例えば、方法は、装置を前もってほとんどまたはまったく使用したことがない患者が操作することができる使い勝手のよい装置に、組み込むことができる。装置を使用するために、測定前に、試料濃度の特

別なタイミング、稀釈または整合は必要ない。これによって、胎膜破裂を検出するための本発明の方法および装置は高度に信頼性のあるものになり、オペレータのミスの影響を受けることは非常に少ない。本発明の装置の臨床試験の結果は、実施例10に提示される。膈炎における膈分泌液中のPAMG-1の濃度の測定は、実施例8に提示される。実施例8から、炎症滲出液中のPAMG-1の最大観察濃度は3 ng/mlに近いことがわかる。

【実施例】

【0123】

下記の実施例は、羊水からのPAMG-1の単離、PAMG-1に対する一対の抗体の選択、そのような抗体の特異性の研究、および、膈炎における炎症滲出液中のPAMG-1の濃度をさらに詳細に説明する。これらの実施例は、本発明の一定の態様を例示するために提供されており、それらは、本発明の範囲を限定するようには意図しない。

【0124】

(実施例1) 血液中および羊水中のPAMG-1の濃度

PAMG-1濃度は、非妊婦、妊婦(妊娠37~40週)の血清、および、羊水(妊娠39~40週)で、実施例3に説明されるように生成されたモノクローナル抗体対を使用して、ELISAによって測定された。

【0125】

抗体M1、M271、M152、およびM392は、0.05M 炭酸塩-重炭酸塩緩衝液(pH9.5)中、18時間、6°Cでポリスチレンに吸着された(各ウェル中、100 μ lの抗体溶液)。ポリスチレンへの非特異的な吸着は、各ウェルに200 μ lで、pH7.0でリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でウシ血清アルブミン(BSA)の1%溶液で除去され、37°Cで1時間インキュベートされた。

【0126】

100 μ lのPAMG-1抗原が、50、25、12、6、3、15および0.7 ng/mlの濃度で各ウェルに加えられた。血清または羊水の試料は、0.01%BSAおよびPBSの0.05%Tween 20の緩衝液で稀釈された。稀釈された試料はウェルに加えられ、ウェルは37°Cで1時間インキュベートされた。反応は、0.05M クエン酸塩-リン酸塩緩衝液(pH4.7)でオルソフェニレンジアミンの溶液によって展開され、37°Cで20分間インキュベートされた。光学密度は波長492 nmで読み取られた。

【0127】

第1の層の抗体の濃度と接合体の濃度とが求められ、結果として、約45度の最大スロップでPAMG-1用の標準光学密度曲線になり(1光学ユニットの増加は、1 ng/mlの試料内のPAMG-1濃度の増加に対応する)、上限(PAMG-1濃度50 ng/ml用)は、1.5光学ユニットであり、ゼロ濃度点は0.1光学ユニットを超えない。調査用の試料(血清、羊水、膈分泌液および子宮頸部分泌液)は、-40°Cで凍結された。各試料は、3回検査された。血清は、元々の濃度の1/5に稀釈された。羊水試料は、元々の濃度の1/2000に稀釈された。試料が1.5ユニットを超える光学密度を有した場合には、試料はさらに稀釈され、再検査された。

【0128】

得られたデータは下記の表1~3に要約される。

【表1】

非妊婦の血清内のPAMG-1の濃度 (ng/ml)

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	20	0	15	12
2	20	0	15	13
3	60	5	50	46
4	50	7	48	50
5	40	4	30	34
6	64	15	50	56
7	20	7	15	14
8	48	8	35	30
9	15	0	10	14
10	40	5	20	35

【表2】

妊婦(妊娠37~40週)の血清内のPAMG-1の濃度 (ng/ml)

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	90	8	70	50
2	100	15	90	75
3	105	16	95	75
4	120	22	100	94
5	100	12	98	90
6	98	14	95	80
7	104	20	90	80
8	98	25	75	60
9	64	5	55	40
10	70	10	60	40

【表3】

羊水(妊娠39~40週)内のPAMG-1の濃度 (ng/ml)

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	8,000	1,680	6,400	5,000
2	12,000	8,000	6,000	5,000
3	10,000	6,000	7,000	6,000
4	6,000	2,000	5,000	4,500
5	8,000	12,000	5,800	5,000
6	7,000	20,000	5,000	5,000
7	6,000	2,000	4,000	3,000
8	75,000	8,000	5,000	4,700
9	2,000	3,000	1,440	1,500
10	40,000	13,000	36,000	25,000

【0129】

(実施例2) PAMG-1の単離

D. ペトルニンは、1980年にPAMG-1の単離の修正された方法を提案した(ペ

トルニン、D. D.、コズリアエバ、G. A. (Kozlyayeva, G. A.)、タタリノフ、Yu. S. (Tatarinov, Yu. S.)、シェブチェンコ、O. P. (Shevchenko, O. P.)、Bull etin of Experimental Biology and Medicine、第5号、558頁、1980年(ロシア語)。スキームのステップは、下記の表4に概説される。

【表4】

PAMG-1の単離のステップ

単離のステップ	純度%	収率%
妊娠16～25週の羊水	4	100
0.5%塩化ランタンによる沈降	25	90
50%飽和で硫酸アンモニウムによる沈降	35	70
60%飽和で硫酸リチウムによる沈降	60	60
逆相クロマトグラフィ分離	90	30

【0130】

PAMG-1は、妊娠16～25週の羊水から分離された。流体は、医学的理由から妊娠が終了した女性から得られた。塩化ランタンの10%溶液を20:1の容量比で(そのため、最終濃度は0.5%であった)、羊水に加え、4°Cで18時間保った。沈殿物が形成され、8,000rpmで30分間の遠心分離で分離された。沈殿物を Na_2HPO_4 の飽和溶液に溶解し、8,000rpmで30分間の遠心分離による処理で生成された不溶性ランタン塩の沈殿物を分離した。得られた溶液を、50%飽和硫酸アンモニウムで4°Cで18時間インキュベートすることによって分画し、得られた沈殿物を、両方の場合で、溶解された沈殿画分の容量を羊水の初期容量に戻すように蒸留水で溶解した。次いで、60%飽和硫酸リチウムによって溶液を沈降し、沈殿物を少量の蒸留水で溶解した。透析後、混合物をピロリン酸カルシウムで、同量の吸湿剤をタンパク質溶液へ加え、混合し、10～15分間インキュベートすることによって吸着し、吸湿剤を遠心分離で分離した。

【0131】

(実施例3)本発明の安定ハイブリッド系の生産

ハイブリドーマ実験1。5BALB/cマウスの膝窩リンパ節からのリンパ球が使用された。マウスは、足蹠(foot pad)にPAMG-1を5回注入することによって免疫した。各注入は、1:1比率の100 μg のPAMG-1および完全フロインドアジュバントから構成された。細胞融合後、細胞は、1152ウェルに接種された。合計で363の一次ハイブリドーマが検査され、そのうちの38がPAMG-1陽性であった。次いで、モノクローナル抗体の特異性を、受胎能のタンパク質-アルファ-2-ミクログロブリン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、トロホプラストベーター1-糖タンパク、ヒト胎盤性ラクトゲン、 α フェトプロテイン、およびヒト血清アルブミンの交差反応結合を研究することによって検査した。モノクローナル抗体が他のタンパク質と交差反応しない14の一次ハイブリドーマが選択された。次いで、限界稀釈の方法を使用して、一次PAMG-1特異性ハイブリドーマを2回クローン化した。最後に、明らかに最も安定しており且つモノクローナル抗体M1、M38、M42、M52、M91を生産的に産生する5つのクローンが選択された。

【0132】

ハイブリドーマ実験2。5匹のマウスの脾臓からのリンパ球が使用された。マウスを、100 μg のPAMG-1を腹腔内注入することによって5回免疫した。各注入は、1:1比率の100 μg のPAMG-1および完全フロインドアジュバントから構成された。1344個のウェルが使用され、562個のハイブリドーマが検査された。そのうち、45個がPAMG-1陽性であることがわかり、19個は、他のタンパク質、例えばPAMG-1特異的なタンパク質に、交差反応しなかった。交差反応しないハイブリドーマは2回クローン化され、最も安定しており且つモノクローナル抗体M122、M152、M2

11、M271、M371およびM392を集中に産生する6つのクローンが、さらなる使用のために選択された。

【0133】

したがって、11個のモノクローナル抗体がPAMG-1に対して作られ、次いで、実施例4に説明されるように、妊婦の膣分泌液中のPAMG-1の最小バックグラウンド濃度を検出したこれらの抗体の対が選択された。

【0134】

本発明による特異的な細胞系

抗体M271およびM52は、それぞれハイブリドーマ細胞系M271およびM52によって生産される。ここでM271およびM52、さらにM42と称されるモノクローナル抗体を生産する細胞系は、後述される装置の感度の閾値を設定し調節するために使用されるモノクローナル抗体を生産する。

【0135】

表5は、2つのトライアルからのハイブリドーマの生産の結果を報告する。

【表5】

	合計	第1のハイブリドーマ	第2のハイブリドーマ
ウェル、合計	2496	1152	1344
一次ハイブリドーマの数	925	363	562
PAMG-1-陽性モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマの数	83	38	45
PAMG-1-特異性モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマの数	33	14	19
さらなる研究用に選択された、モノクローナル抗体を生産する安定ハイブリドーマ系の数	11	5	6

【0136】

(実施例4) 妊婦の膣分泌液中のPAMG-1の最小濃度を検出する一対のモノクローナル抗体の対の選択

0.05M炭酸塩-重炭酸塩緩衝液(pH9.5)中、1 μ g/mlの濃度のPAMG-1を、ポリスチレンプレートに、18時間、4°Cでインキュベートすることによって、吸着された。下記の表6に挙げられた抗体は、3mg/mlから開始して連続希釈法でウェルに加えられた。プレートは、次いで、37°Cで1時間インキュベートされた。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたウサギ抗マウス抗IgG抗体の抗体接合体が、ウェルに加えられた。反応は、0.05Mクエン酸塩-リン酸塩緩衝液(pH4.7)でオルソフェニレンジアミンの溶液によって展開され、37°Cで20分間インキュベートされた。モノクローナル抗体の力価が定量された。

【表6】

本発明のモノクローナル抗体による濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ における PAMG-1 の結合の親和力

MAb	PAMG-1 の $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度における力価
M1	1 : 900,000
M42	1 : 1,000,000
M52	1 : 1,000,000
M91	1 : 1,000,000
M122	1 : 2,000,000
M152	1 : 1,000,000
M392	1 : 1,000,000
M371	1 : 400,000
M271	1 : 3,000,000
M38	1 : 50,000
M211	1 : 50,000

【0137】

表6に示されモノクローナル抗体の濃度は、溶液中のPAMG-1の濃度が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ である限り、抗体がPAMG-1に結合する最小濃度である。濃度が低くなればなるほど、最小濃度のPAMG-1を検出する抗体の能力は高くなる。PAMG-1用に高感度のELISAを展開するために、モノクローナル抗体M271およびM52が選択されて、PAMG-1用の高感度ELISAが開発された。

【0138】

モノクローナル抗体M271は、ELISAでは、羊水の下記の個別タンパク質との交差反応を示さなかった。すなわち、受胎能アルファ-2-ミクログロブリン；ヒト絨毛性ゴナドトロピン；ヒト胎盤性ラクトゲン；トロホブラストベーター1-糖タンパク；アルファフェトプロテイン；ヒト血清アルブミンである。

【0139】

それに加えて、カラムを有する実験では、M271抗体はセファロースに固定され、稀釈されていない羊水は、カラムを通して進んだ。電気泳動後にカラムから得られた溶出液は、PAMG-1の分子量(28~30kDa)に整合する分子量に対応する1つのバンドを示した。高度に特異的なモノクローナル抗体M271が、本発明の装置の側方向流れストリップ装置のパッドに置かれた。

【0140】

抗体M271とは対照的に、抗体M52は、ELISAで、血清および羊水中に豊富なIGFBP-3タンパク質と交差反応した。膾分泌液中の測定された非グリコシル化IGFBP-3の濃度は、約 $600 \text{ ng}/\text{ml}$ であった(実施例9)。本発明のストリップ装置を有する実験において、この濃度のIGFBP-3は、濃度 $5 \text{ ng}/\text{ml}$ で取られたPAMG-1の認識を阻害しなかった。

【0141】

(実施例5) 胎盤01ミクログロブリンのための高感度ELISA検査

PAMG-1は、標準的なELISAおよびM271-M52抗体対を使用しては、膾分泌液中で検出することはできなかった。検出を可能にするために、検出に必要なPAMG-1の濃度を $0.05 \text{ ng}/\text{ml}$ へ下げることによって、ELISAの感度が上げられた。

【0142】

した抗体M271-M52を用いるサンドイッチ免疫アッセイシステムを開発し、こ

(34) 膣分泌液中の羊水を検出するための装置および方法

れは、1ミリリットル当たり50ピコグラム(0.05ng/ml)の感度を実証した。

【0143】

第1の層：モノクローナル抗体M271、濃度6 μ g/ml、炭酸塩-重炭酸塩緩衝液、pH9.5。

第2の層：PAMG-1、濃度3200、1600、800、400、200、100、50pg/ml、および、1/2濃度に希釈された子宮頸部分泌液および膣分泌液、pH=7.0の緩衝液。

第3の層：1/1000希釈の緩衝液で接合体M52。

【0144】

感度の上昇は、第1の層および第3の層を変えることによって得られた。高感度システムとは対照的に、感度1ng/mlの標準システムでは、第1の層は、10~20 μ g/mlのM271濃度で形成され、接合体(西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたM52)の希釈は1/40,000であった。

【0145】

標準校正曲線が得られた。これは、下記の表7に示され、PAMG-1濃度は、1ミリリットル当たりのピコグラム(pg/ml)で与えられ、波長450nmで観察される着色Eの光学密度は、標準的な無次元の単位である。

【0146】

【表7】

高感度ELISAの校正曲線

PAMG-1 pg/ml	3200	1600	800	400	200	100	50	0
E 450 nm	2.000	1.725	1.432	1.130	0.851	0.600	0.304	0.051

【0147】

(実施例6) 妊婦の膣分泌液中のPAMG-1

【表8】

妊婦の膣分泌液中のPAMG-1の濃度 (ng/ml)。PAMG-1に対する異なる対のモノクローナル抗体を使用して測定が行われる (妊娠29~41週)

N	妊娠週	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	29	25	0.15	5	6
2	34	50	0.1	10	8
3	37-38	70	0.22	30	15
4	37-38	60	0.06	25	10
5	33-34	30	0.05	13	5
6	29-30	45	0.05	13	5
7	33	50	0.16	14	10
8	30	60	0.09	15	12
9	39-40	84	0.21	28	18
10	35-36	90	0.13	30	19
11	38-39	90	0.13	30	20
12	38	65	0.15	25	15
13	31	95	0.35	45	30
14	39	44	0.05	10	5
15	29-30	80	0.2	28	12
16	40-41	58	0.078	24	10
17	37	90	0.15	40	30
18	29-30	70	0.4	15	12
19	29	65	0.64	15	12
20	30	80	0.1	22	20

【0148】

最小濃度の測定に続いて、各抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された。ELISA検査において、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で標識されていない抗体が、プレートのウェルに導入された。次いで、50、100、200、400、800、1600、3200 pg/ml の濃度でPAMG-1が、プラスチック上に第2の層として導入された。最後に、他の抗体の1つの接合体が、プレートの各ウェルに導入された。対で働く下記の抗体が選択された (ここでは、抗体-接合体として示される) : M1-M91 ; M271-M52 ; M152-M91 ; M392-M371。

【0149】

これらの対の抗体を使用して、妊婦の膣分泌液中のPAMG-1濃度を測定した。最後に、対M271-M52抗体が選定され、そのために膣分泌液中のPAMG-1の測定された濃度は、最低であった。M271-M52対のためのPAMG-1の濃度は、高感度ELISAを使用して測定された。選択された対M271-M52および数種類の他の対は、非妊婦および妊婦の羊水および血清中のPAMG-1の濃度を測定するために使用された (上記実施例1)。

【0150】

(実施例7) 妊婦の子宮頸部分泌液および膣分泌液中のPAMG-1

【表9】

妊婦の子宮頸部分泌液および膣分泌液中のPAMG-1の濃度、1ミリリットル当たりのピコグラム (pg/ml)。下記の表の正常妊娠は、正常の妊娠過程からいかなる診断的逸脱もないことを示す。

PAMG-1濃度は、M271-M52抗体対を使用して、高感度ELISAによって測定された。

番号	子宮頸部分泌液中のPAMG-1, pg/ml	膣分泌液中のPAMG-1 pg/ml	妊娠週	備考
1	230	150	29	正常妊娠
2	220	100	34	正常妊娠
3	340	150	38	糜爛、子宮頸部分泌液中に血液
4	110	220	37-38	正常妊娠
5	100	60	37-38	正常妊娠
6	350	78	40-41	子宮頸部分泌液中に血液
7	60	400	29-30	切迫流産
8	50	50	33-34	正常妊娠
9	180	50	29-30	正常妊娠
10	470	150	37	子宮頸部分泌液中に血液
11	600	640	29	切迫流産
12	150	160	33	正常妊娠
13	170	90	30	正常妊娠
14	122	210	39-40	羊水過少症、妊娠中毒症
15	300	50	39	妊娠中毒症、膣炎
16	56	130	35-36	胎盤後方の血液供給の障害
17	120	130	38-39	貧血症
18	1000	5000	30-31	羊水漏れ
19	400	200	29-30	切迫流産
20	800	350	31	妊娠中毒症

【0151】

(実施例8) 膣炎の妊婦の膣分泌液中のPAMG-1

【表10】

膣炎の妊婦の膣分泌液中の胎盤アルファ-1ミクログロブリンの濃度。測定は、非高感度ELISAを使用して行った。

患者番号	PAMG-1(ng/ml)
1	1.2
2	2.0
3	0
4	2.5
5	1.5
6	1.9
7	1.5
8	2.0
9	1.4
10	1.2
11	1.0
12	0
13	0
14	3.0
15	1.5

【表11】

膣炎の妊婦の膣分泌液中の胎盤アルファ-1ミクログロブリンの濃度

番号	名前(姓イニシャル、 名イニシャル、ミドルイニ シャル)	診断	本発明の装 置の結果 (「-」は「陰 性」を表す)	ELISA ng/ml
1	Ch., G. A.	妊娠40週、膣炎	-	1.2
2	To., E. N.	妊娠38週、胎児発育不全、 膣炎	-	2.0
3	Ne., N. N.	妊娠33週、腎盂腎炎、膣 炎	-	0
4	St., A. G.	妊娠38週、狭骨盤、膣炎	-	2.5
5	So., T. N.	妊娠40週、膣炎	-	1.5
6	Ch., O. G.	妊娠29~30週、早産の リスク、膣炎	-	1.9
7	Ry., V. V.	妊娠29週、陣痛の徴候、 膣炎	-	1.5

(表 11 の続き)

8	Ma., K. S.	妊娠 38 週、子宮頸部糜爛、 膣炎	-	2.0
9	St., L. E.	妊娠 38 ~ 39 週、狭骨盤、 子宮頸部糜爛、膣炎	-	1.4
10	La., V. S.	妊娠 36 ~ 37 週、早産の リスク、膣炎	-	1.2
11	Si., M. A.	妊娠 39 週、ネフロパシー、 貧血症、膣炎	-	1.0
12	Sh., M. A.	妊娠 37 ~ 38 週、ネフロ パシー、膣炎	-	0
13	Ab., R. V.	妊娠 36 ~ 37 週、早産の リスク、膣炎	-	0
14	Gu., E. K.	妊娠 36 週、早産のリスク、 膣炎	-	3.0
15	Ro., N. V.	妊娠 35 週、膣炎	-	1.5
16	De., S. V.	妊娠 32 週、子宮頸部糜爛、 膣炎	-	0
17	Zd., I. V.	妊娠 35 週、早産のリスク、 子宮頸部糜爛、膣炎	-	1.0
18	Ko., T. V.	妊娠 24 週、早産のリスク、 膣炎	-	0
19	Ma., I. V.	妊娠 36 週、早産のリスク、 膣炎	-	0
20	Io., I. V.	妊娠 40 週、子宮頸部糜爛、 膣炎	-	0
21	Ma., S.	妊娠 39 週	-	0
22	Ve., E. L.	妊娠 38 週、子宮頸部糜爛、 膣炎	-	0
23	St., I. N.	妊娠 36 週、ネフロパシー、 膣炎	-	0
24	Ro., V. A.	妊娠 39 ~ 40 週、貧血症、 膣炎	-	0
25	Pu., T. A.	妊娠 38 ~ 39 週	-	0
26	Tu., Y. A.	妊娠 21 週、PROM の疑 い	-	0
27	No., G. V.	妊娠 22 週、終了のリスク	-	0
28	Ma., E. V.	妊娠 31 ~ 32 週、腎盂腎 炎、膣炎	-	0
29	St., I. V.	妊娠 36 週、終了のリスク	-	0
30	Ka., K. P.	妊娠 32 週、ネフロパシー	-	0

【0152】

(実施例 9) ストリップ装置特性の改変

第 1 の実験において、M52 MAb 溶液は、1、1/2、1/4、1/8、1/16、および 1/32 mg/ml の濃度で調製された。各溶液は、1 つのストリップ装置に配置された。3 つの MAb (M52、M271、M42) の混合物も、元々の濃度の 1、1/2、1/4、1/8、1/16、および 1/32 の濃度に希釈され、各希釈された溶液は、別個のストリップ装置に導入された。次いで、濃度 50 ng/ml の PAMG-1 含有溶液が、12 ストリップ装置の各々に加えられた。純粋 M52 抗体の溶液は、検査領域の着色バンドを 1/8 の濃度で目に見えるようにし、MAb 混合物内で、着色バンドは 1/2 の濃度で目に見えるようになった。したがって、MAb の混合物は、PAMG-1 分子の結合を阻害し、それによって、バンドの可視性を調節する。

【0153】

濃度が M52 では 0.8 mg/ml、M271 では 0.1 mg/ml、および、M42

では0.1 mg/mlのモノクローナル抗体が、多くのストリップ装置の検査領域内に置かれた。次いで、12800 ng/mlから7 ng/mlの広い範囲の濃度のうちの1つおよび1 ng/mlの濃度で、PAMG-1が本発明のストリップ装置の各々の検査領域内に加えられた。検査バンドは、12800 ng/mlから7 ng/mlのPAMG-1濃度の範囲でヒトの目で見ることができたが、1 ng/mlの濃度では見ることができなかった。同時に、同一濃度の純粋M52溶液が使用された場合には、検査ストリップは1 ng/mlも含むPAMG-1濃度の全範囲で見ることができたが、1 ng/mlにおける強度は低かった。これは、一定の病状例えば炎症のある患者に偽陽性の結果が発生する可能性を大いに高める。

【0154】

1. 検査領域内の2つの抗体の組み合わせでの本発明のストリップ装置の感度の調節

第1の調査では、M52抗体(0.4 mg/mlの濃度)のみが検査領域内に導入された。第2の調査では、M52抗体(0.4 mg/mlの濃度)およびM271抗体(0.4 mg/mlの濃度)が検査領域内に導入された。金粒子と接合体化したM271抗体は、光学密度が510 nmの波長で10であるように選択された濃度で、パッド領域に導入された。この接合体は、10%サッカロースおよび2%カゼインの溶液でパッド内に導入された。PAMG-1は、20、10、5、および1 ng/mlの濃度で滴定された。

【0155】

下記の表において、数字は、スキャナでシグマスキャンプログラム(Sigma Scan program)によって測定された相対光学密度指数である。M271抗体はパッド内にあり、M271+M52の組み合わせは検査領域内にある。「+」は、検査ストリップが見えることを示し(ヒトの目で検出されるように十分着色されている)、「-」は、検査バンドがヒトの目では検出することができないことを示す。

【表12】

PAMG-1の濃度 ng/ml	20	10	5	1
MAb M52 可視	62 +	58 +	39 +	2 -
MAb M52+M271 可視	82 +	8 -	2 -	4 -

【0156】

検査の感度は、第1の調査の5 ng/mlから第2の調査の20 ng/mlへ変化した。MAb M271を検査領域へ加えることによって、感度の4倍の阻害が得られたと結論づけてもよい。

【0157】

2. 2つの抗体の組み合わせでのストリップ装置の検査バンドの色強度の調節

第1の調査では、M52抗体(0.8 mg/mlの濃度)のみが検査領域内に導入された。第2の調査では、M52抗体(0.8 mg/ml)、M271抗体(0.7 mg/ml)およびM42抗体(0.8 mg/ml)が検査領域内に導入された。検査領域用の抗体の混合物は、下記のように調製された。8.6 mg/mlの濃度の14 μl(マイクロリットル)のM52抗体溶液が、13.9 mg/mlの濃度の7 μlのM42溶液および10.9 mg/mlの濃度の3 μlのM271溶液と、混合された。次いで、緩衝液が、150 μlの合計容量へ加えられ、溶液はストリップ装置内に導入された。

【0158】

下記の表には、相対光学密度が示される。

【表13】

PAMG-1 の濃度、ng/ml	50	25	12	6	3	1.5
MAb M52 可視	17 +	13 +	9 +	5 +	2 -	0 -
MAb M271+M52+M42 可視	25 +	18 +	13 +	3 -	0 -	0 -

【0159】

光学密度曲線のスロープ（勾配）は、第1の調査と第2の調査との間で異なった。12 ng/ml の PAMG-1 濃度で、第2の調査のストリップの着色線は、第1の調査よりも明るかった。6 ng/ml の PAMG-1 濃度で、ストリップの着色線は、第1の調査では目に見えたが、第2の調査では見えなかった。

【0160】

抗体の組み合わせで、視覚的により明るいバンドが観察された。したがって、ほぼ同一の感度にもかかわらず、ヒトの目によって観察された着色の強度は異なった。

【0161】

3. 4つの抗体の組み合わせを使用する本発明の装置の感度および着色強度曲線のスロープの調節

下記の表において、「+」は、目に見える検査バンドのままであり、「-」は、検査バンドがヒトの目では検出することができない。

【表14】

PAMG-1 の濃度、ng/ml	0	1	2.5	5	10	25	50
MAb M52+M42+M172	-	-	-	-	+	+	+
MAb M271+M52+M42+M122	-	-	-	+	+	+	+

したがって、抗体を組み合わせることによって、検査の感度を調節することができる。

【0162】

（実施例10）臨床検査の結果

研究プロトコル

患者は、「臨床的評価」-対照、および本発明の装置によって、評価された。

試験対象患者基準

- 1) 妊娠週齢 20.0~41.0週
- 2) PROMまたはPPROMを示唆する徴候または症候を報告している患者。
- 3) 患者をPROMまたはPPROMについて評価するために標本が得られるまで、デジタル式膣内診はしない。
- 4) 患者は、標準臨床的評価（鬱血、ニトラジン、シダ状結晶形成）の収集目的のための無菌検鏡診察、および、PAMG-1アッセイ用の無菌スワブに同意する。

【0163】

除外基準

- 1) 任意の源からの能動的な膣出血
- 2) 前置胎盤

【0164】

シャープメモリアルメリーバーチホスピタルフォーウィメン (Sharp Memorial Mary Birch Hospital for Women) (サンジエゴ) から、および、サミットメディカルセンター (Summit Medical Center) (オークランド) から、2000年12月15日現在で192症例の統計分析が利用可能である。

【0165】

192のうちの2症例で、本発明の装置が陽性反応を示したが、標準臨床的評価は、PROMのいかなる徴候も示さなかった。したがって、これらの2例は、元々は、本発明の装置から偽陽性結果としてみなされた（下記の「未訂正」データ参照のこと）。しかし、検査後、何時間か間に両患者でPROMの症候がすぐに明らかになった。PROMの診断は、第2の臨床的評価で確認され、本発明の装置の両方の結果は、真の陽性であると判断された（下記の「訂正済」カラムは、最終トライアルデータを表す）。

【0166】

組み合わせデータ

(未訂正)

DxPROM

a=84, b=5, c=2, d=101

感度= $a/(a+c)=84/(84+2)=97.7\%$ 特異性= $d/(b+d)=101/(5+101)=95.3\%$ PPV= $a/(a+b)=84/(84+5)=94.4\%$ NPV= $d/(d+c)=101/(101+2)=98.1\%$

ただし、

aは、観察された真陽性例の数であり、

bは、観察された偽陰性例の数であり、

cは、観察された偽陽性例の数であり、

dは、観察された真陰性例の数である。

感度= $a/a+c$; 特異性= $d/b+d$ 陽性子測値: $PPV=a/a+b$ 陰性子測値: $NPV=d/d+c$

真陽性は、本発明の装置による陽性応答の数であり、PROMは、それに続く臨床的評価によって確認される。

真陰性は、その後の臨床的評価によって確認された陰性応答の数である。

偽陽性は、陽性応答の数であるが、PROMは、その後の臨床的評価によって確認されない。

偽陰性は、陰性応答の数であるが、PROMが、その後の臨床的評価によって確認される。

【表15】

番号	名前(姓イニシャル、名イニシャル、ミドルイニシャル)	診断	アムニウア (Amnisure) 結果	備考
1	Ser., L. B.	妊娠17週、切迫流産、膣炎	陰性	臨床観察：漏れ無し
2	Ga., L. A.	妊娠17週、切迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し
3	Kuz., M. B.	妊娠23週、pHネガティブ、血液	陰性	漏れ無し
4	Bul., M. V.	妊娠39週、漏れの疑い。膣炎	陽性	臨床観察：膣帯下増加、さらなる観察：陽性検査確認（より多くの膣帯下、陣痛の開始）
5	Kra., E. U.	妊娠40週、妊娠中毒症、人工破水	陰性	臨床観察：漏れ無し
6	Mel., N. V.	妊娠39週、妊娠中毒症、尿結石疾病	陰性	臨床観察：漏れ無し
7	Buh., S. N.	妊娠29週、高血圧	陰性	臨床観察：漏れ無し
8	Niv., I. P.	妊娠27～28週、切迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し

(42) 膣分泌液中の羊水を検出するための装置および方法

(表15の続き)

9	Aik., A.	妊娠35週、切迫流産、 膣炎	陰性	臨床観察：漏れ無し
10	Yak., L. A.	妊娠40週	陰性	臨床観察：漏れ無し
11	Kis., G. V.	妊娠33週、切迫流産、 膣炎	陰性	臨床観察：漏れ無し
12	Koch., L. A.	妊娠34週、漏れの疑 い	陰性	臨床観察：漏れ無し
13	Bai., S. A.	妊娠32週、切迫流産、 妊娠中毒症	陰性	臨床観察：漏れ無し
14	Mer. I. S.	妊娠32週、切迫流産、 膣炎	陰性	臨床観察：漏れ無し
15	Ugr. T. I.	妊娠32～33週、妊 娠中毒症、低羊水	陰性	臨床観察：漏れ無し
16	Pav., N. A.	妊娠22～23週、妊 娠中毒症、膣炎	陰性	臨床観察：漏れ無し
17	Bog., T. I.	妊娠29週、切迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し
18	Var., T. I.	妊娠32週、妊娠中毒 症	陰性	臨床観察：漏れ無し
19	Dal., O. V.	妊娠35週、妊娠中毒 症、膣炎	陰性	臨床観察：漏れ無し
20	Koz., O. A.	妊娠40週	陰性	臨床観察：漏れ無し
21	Sen., S. G.	妊娠12～13週、切 迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し
22	Pol., E. A.	妊娠21週、切迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し
23	Ber., L. M.	妊娠24週、切迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し
24	Ard., V. M.	妊娠39週、急性妊娠 中毒症、胎盤機能不全	陰性	臨床観察：漏れ無し
25	Aki., A.	妊娠8週、妊娠中毒症、 膣炎	陰性	臨床観察：漏れ無し

【表16】

ロシア連邦、モスクワの第3産科病院における本発明の装置(ロットC98-0007)のトライアル

番号	名前	診断	アムニシユア結果	備考
1	Fan., E. A.	妊娠38週、浮腫	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
2	Sem., Z. D.	妊娠36週、妊娠中毒症	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
3	Tab., N. V.	妊娠36~37週、切迫流産	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
4	Zah., O. P.	妊娠35週、浮腫、膣炎	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
5	Dem., O. V.	妊娠38~39週、浮腫	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
6	Vul., D. V.	妊娠32週、切迫流産、膣炎	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
7	Klo., V. V.	妊娠38~39週、浮腫、腎盂腎炎、子宮頸部糜爛	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
8	Bor., E. A.	妊娠35~36週、胎盤循環の障害	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
9	Jer., E. A.	妊娠40~41週	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
10	Vik., N. P.	妊娠41~42週、腎盂腎炎、浮腫、膣炎	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
11	Tul., O. S.	妊娠35~36週、妊娠中毒症、肥満症	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
12	Med., T. E.	妊娠38~39週、静脈瘤症	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
13	Kuz., T. A.	妊娠39~40週	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
14	Kab., E. M.	妊娠39~40週、浮腫、羊水過多症	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
15	Che., E. V.	妊娠39~40週、浮腫、貧血症	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
16	Tih., T. Y.	妊娠40週、子癩前症	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
17	Bah., N. I.	妊娠39~40週、分娩の前兆、漏れの疑い	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
18	Gol., N. V.	妊娠38~39週、胎児仮死	陰性	検査結果は臨床観察により確認された
19	Gri., O. V.	妊娠25週、切迫流産	陰性	検査結果は臨床観察により確認された

【表17】

ロシア連邦、モスクワの第3産科病院における本発明の装置(ロットC98-0007)のトライアル

番号	診断	アミニユア結果	注
1	妊娠40週、巨大胎児、漏れの疑い	陽性	陣痛の痛み、分娩活動は4時間で生じた。明白な漏れが観察された
2	妊娠34週、切迫流産	陰性	6時間の臨床観察：漏れ無し
3	妊娠39週	陰性	臨床観察：漏れ無し
4	妊娠40週	陰性	臨床観察：漏れ無し
5	妊娠39～40週	陰性	臨床観察：漏れ無し
6	妊娠39～40週	陰性	臨床観察：漏れ無し
7	妊娠39～40週、子宮頸部糜爛	陰性	臨床観察：漏れ無し
8	妊娠40週、陣痛の症候、羊水の漏れ	陽性	臨床観察：羊水の漏れ
9	妊娠39週	陰性	臨床観察：漏れ無し
10	妊娠39～40週	陰性	臨床観察：漏れ無し
11	妊娠39週	陰性	臨床観察：漏れ無し

【表18】

ロシア連邦、モスクワの第3産科病院における本発明の装置(ロットC98-0007)のトライアル、ロシア国立モスクワ大学産科婦人科長(Obstetrics and Gynecology Chair of the State Moscow University of Russia)

番号	診断	アミニユア結果	備考
1	妊娠39週、ネフロパシー、羊水過多症	陰性	陣痛の痛み、分娩活動は4時間で生じた。明白な漏れが観察された
2	妊娠41週、浮腫	陰性	6時間の臨床観察：漏れ無し
3	妊娠39～40週、巨大胎児、陣痛の症候、ネフロパシー	陰性	臨床観察：漏れ無し
4	妊娠39～40週	陰性	臨床観察：漏れ無し
5	妊娠37～38週、血液混合、高血圧	陰性	臨床観察：漏れ無し
6	妊娠36週、ネフロパシー	陰性	臨床観察：漏れ無し
7	妊娠40週、漏れの疑い	陽性	臨床観察：漏れ。分娩活動は30分で生じた。

(表18の続き)

8	妊娠39～40週	陰性	臨床観察：羊水漏れ無し
9	妊娠38～39週	陰性	臨床観察：漏れ無し
10	妊娠38週	陰性	臨床観察：漏れ無し
11	妊娠39週、十代の妊産婦	陰性	臨床観察：漏れ無し
12	妊娠32週、胎児発育不全	陰性	臨床観察：漏れ無し
13	妊娠39～40週、妊娠中毒症	陰性	臨床観察：漏れ無し
14	妊娠24週、切迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し
15	妊娠34～35週、妊娠中毒症	陰性	臨床観察：漏れ無し
16	妊娠33週、浮腫	陰性	臨床観察：漏れ無し
17	妊娠34～35週、妊娠中毒症	陰性	臨床観察：漏れ無し
18	妊娠35～36週、胎児発育不全	陰性	臨床観察：漏れ無し
19	妊娠32週、切迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し
20	妊娠38～39週、漏れの疑い、膣帯下に血液混合	陰性	臨床観察：漏れ無し。10時間で破水、分娩開始
21	妊娠40～41週、陣痛の症候	陰性	臨床観察：漏れ無し
22	妊娠25週、切迫流産	陰性	臨床観察：漏れ無し
23	妊娠28週、妊娠中毒症	陰性	臨床観察：漏れ無し

【0167】

注記：表16、17、18の羊水の漏れは、膣帯下の量および超音波検査によって臨床的に評価された。

【0168】

患者は合併症の治療のために入院中であったため、陰性検査結果の拡大臨床観察が可能であった。

【0169】

本発明は、ここに記載された特定の実施形態によって範囲を限定されるものではない。実際、先の説明および添付の図面から、本明細書中に記載されたものに加えて、本発明の種々の改変が当業者には明らかである。そのような改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

【0170】

すべての値は、概算であり、説明のために提供されることをさらに理解すべきである。

【0171】

特許、特許出願、刊行物、製品説明およびプロトコルは、本願の全体にわたって引用され、その開示は、すべての目的のためにその全体が参照として本明細書中に組み込まれる。

【表19】

ロシア国立工業微生物収集(VKPM)寄託所(1ドローズニープロエツ1、モスクワ117545、ロシア(1Dorozhny proezd 1, Moscow 117545, Russia))に寄託された微生物

名前	寄託日	受託番号
ハイブリドーマ細胞系N52	2003年5月22日	VKPM H-92
ハイブリドーマ細胞系N271	2003年5月22日	VKPM H-93
ハイブリドーマ細胞系N42	2003年5月22日	VKPM H-94

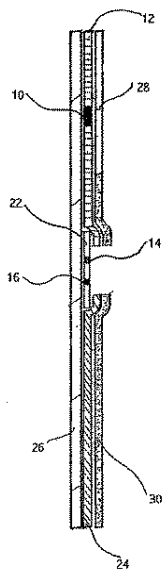
【図面の簡単な説明】

【0172】

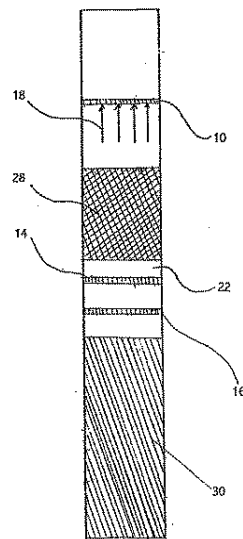
【図1】胎膜の破裂を診断するべくPAMG-1の存在を検出するために使用され得る本発明の装置の概略長手方向断面図である。

【図2】図1の装置の平面図である。

【図1】



【図2】



(47) 膣分泌液中の羊水を検出するための装置および方法

- (72)発明者 ペトルニン, ディミトリル, ディ.
ロシア国, モスクワ 109316, ストロイコブスカヤ ウル 6, エーピーティ 190
- (72)発明者 フクス, ボリス, ビー.
アメリカ合衆国, ニュージャージー州 08859, パルリン, クラス レーン 1, エーピーティ. 335
- (72)発明者 ザライスキー, エブゲニー, アイ.
ロシア国, モスクワ 117454, ウル ウダルトソバ 69, エーピーティ 19
- (72)発明者 ボルトブスカヤ, マリナ, エヌ.
ロシア国, モスクワ 121433, マラヤ フィルブスカヤ ウル 50, エーピーティ 88
- (72)発明者 ナジモバ, スベトラナ, ヴィ.
ロシア国, モスクワ 113162, ミトナヤ ウル 50, ビーエルディジー 1, エーピーティ 31
- (72)発明者 スタロスベツカヤ, ネリー, エー.
ロシア国, モスクワ, グロドネンスカヤ ウル 10, エーピーティ 64
- (72)発明者 コンスタンチノフ, アレクサンダー, ビー.
アメリカ合衆国, ニューハンブシャー州 03062-2915, ナシュア, スピトブルック ロード 105, エーピーティ 19-シー
- (72)発明者 マーシスカイア, マルガリータ, アイ.
ロシア国, モスクワ 117342, ウル ブブデンスコーゴ 27, ビーエルディジー 2, エーピーティ 256

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開平10-185921 (JP, A)
米国特許第05597700 (US, A)
Boltovskaia, M.N. et al., *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 1991年, Vol.112(10), p.397-400
Tkachenko, O.A. & Petrunin, D.D., *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.*, 1995年, Vol.3, p.40-4
Chen, F.C. & Dudenhausen, J.W., *Am J Perinatol.*, 2008年, Vol.25(4), p.243-6

- (58)調査した分野(Int. Cl., DB名)
G01N 33/48 - G01N 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed