

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-530607

(P2009-530607A)

(43) 公表日 平成21年8月27日(2009.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	L 4 B O 6 3
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577	B
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2009-500337 (P2009-500337)	(71) 出願人	508279395
(86) (22) 出願日	平成19年3月16日 (2007.3.16)		ナショナル エンヴァイロメント エー
(85) 翻訳文提出日	平成20年11月17日 (2008.11.17)		ジェンシー
(86) 国際出願番号	PCT/SG2007/000073		シンガポール 2 2 8 2 3 1 シンガポ
(87) 国際公開番号	W02007/106050		ール スコッツ ロード 4 0
(87) 国際公開日	平成19年9月20日 (2007.9.20)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	200601738-8		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成18年3月16日 (2006.3.16)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	シンガポール (SG)		弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 稲田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007
			弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フラビウイルス特異抗体検出のための競合型酵素結合免疫吸着アッセイ (C-E L I S A)

(57) 【要約】

フラビウイルスメンバー特異的免疫学的物質を用いる、競合型酵素結合免疫吸着アッセイ (C-ELISA) を開発し、フラビウイルスへの暴露の指標であるフラビウイルスメンバーに対する特異的抗体を検出した。この検査は、フラビウイルス陽性血清の存在下で、抗フラビウイルスIgAを用いて捕捉されるフラビウイルス抗原のエンベロープタンパク質上でのエピトープ結合に対する競合に基づく。この検査は、ウイルス中和アッセイ (VNT) に匹敵する感度、特異性及びスピードを有する。C-ELISAは融通性のある技術であり、様々な応用しえよう。このプロトコルをわずかに改変することによって、C-ELISA準拠の二次感染検出方法、又は血清型特異的血清疫学的調査及び/又はワクチン評価のために用いることができるC-ELISA準拠方法がもたらされよう。C-ELISAのために開発したプロトコルは、デング溶解物抗原及びデング特異的モノクローナル抗体を用いて提示した。前記プロトコルは他のフラビウイルスに対して用いることができ、日本脳炎の結果はこのことを示している。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

フラビウイルス又はその等価物への被検者の暴露を検出する方法であって、以下の工程

、
前記被検者由来の生物学的サンプルを、抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス成分の混合物と接触させる工程、

前記生物学的サンプル及び前記抗フラビウイルスIgA捕捉成分を、競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質に付する工程、

前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、前記生物学的サンプル中に存在するフラビウイルス特異的結合パートナー及び抗フラビウイルスIgAにより捕捉されるフラビウイルス成分との間で形成される複合体の存在を決定する工程、
を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記生物学的サンプル及び前記抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス成分が、予めインキュベートされて、競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質に付する前に複合体が形成される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記生物学的サンプル、前記抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス成分及び前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質を、複合体の存在を決定する前に同時に接触させる、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質が、抗フラビウイルスIgAにより捕捉されるフラビウイルス成分のエピトープに特異的な抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質が、レポーター基と結合されるモノクローナル抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記レポーター基が、酵素である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗フラビウイルスIgA捕捉成分が、フラビウイルス感染細胞の溶解物から捕捉される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス成分が、フラビウイルスの構造及び非構造タンパク質、フラビウイルス粒子及びそのフラグメント、フラビウイルスに由来する糖タンパク質、脂質及び炭水化物を含む群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記構造タンパク質が、エンベロープタンパク質、Pr膜タンパク質及びヌクレオキャプシドタンパク質を含む群から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗フラビウイルスIgA捕捉成分が、フラビウイルス又はその等価物に由来するIgA捕捉成分への暴露に应答して生成されるフラビウイルス抗体の抗原結合部位に対する抗イデオタイプ抗体である、請求項9に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記結合パートナーが、フラビウイルス特異的抗体又はその免疫学的フラグメントである、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記結合パートナーが、フラビウイルス感染の初期、回復期に発現する抗体、又は以前の感染に由来する抗体である、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記フラビウイルスが、黄熱病ウイルス、デングウイルス及びJEウイルスを含む群から

50

選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記フラビウイルスが、デングウイルスである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記フラビウイルスが、JEウイルスである、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

DEN-1、DEN-2、DEN-3又はDEN-4を含む群から選択されるデングウイルス血清型への暴露を検出する、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記競合性デング特異的免疫学的物質が、デングウイルスのDEN-1、DEN-2、DEN-3又はDEN-4血清型に共通するエピトープに特異的な抗体である、請求項16に記載の方法。 10

【請求項18】

前記非構造タンパク質が、NS-1、NS-2a、NS-2b、NS-3、NS-4a、NS-4b及びNS-5を含む群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項19】

前記非構造タンパク質が、NS-1である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記結合パートナー抗体が、DEN-1、DEN-2、DEN-3又はDEN-4を含む群から選択されるデング血清型に特異的なIgG抗体である、請求項14に記載の方法。

【請求項21】 20

前記生物学的サンプルが、血液、唾液、脊髄液、B細胞、T細胞、血漿、血清、尿及び羊水を含む群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

前記生物学的サンプルが血清又は唾液である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

請求項1から22のいずれか1項に記載の方法で使用される、抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス成分の混合物。

【請求項24】

フラビウイルス感染細胞の溶解物から捕捉される、請求項23に記載の抗フラビウイルスIgA捕捉成分の混合物。 30

【請求項25】

フラビウイルスの構造及び非構造タンパク質、フラビウイルス粒子及びそのフラグメント、フラビウイルスに由来する糖タンパク質、脂質及び炭水化物を含む群から選択される成分を含む、請求項23に記載の混合物。

【請求項26】

前記構造タンパク質が、エンベロープタンパク質、Pr膜タンパク質及びヌクレオキャプシドタンパク質を含む群から選択される、請求項25に記載の混合物。

【請求項27】

前記フラビウイルスが、黄熱病ウイルス、デングウイルス及びJEウイルスを含む群から選択される、請求項23に記載の混合物。 40

【請求項28】

前記フラビウイルスが、デングウイルスである、請求項27に記載の混合物。

【請求項29】

前記フラビウイルスが、JEウイルスである、請求項27に記載の混合物。

【請求項30】

前記デングウイルスが、DEN-1、DEN-2、DEN-3又はDEN-4を含む群から選択される、請求項28に記載の混合物。

【請求項31】

前記非構造タンパク質が、NS-1、NS-2a、NS-2b、NS-3、NS-4a、NS-4b及びNS-5を含む群から選択される、請求項28に記載の混合物。 50

【請求項 3 2】

前記非構造タンパク質が、NS-1である、請求項31に記載の混合物。

【請求項 3 3】

フラビウイルス又はその等価物への被検者の暴露を検出するためのキットであって、以下の成分、

抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス由来成分、

競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質、及び

前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、生物学的サンプル中に存在する結合パートナー及び抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体を検出するための少なくとも1つの検出剤、
を含むことを特徴とするキット。

10

【請求項 3 4】

前記抗フラビウイルスIgA捕捉成分又は前記競合性フラビウイルス特異的若しくはメンバー特異的免疫学的物質が、固相に固定される、請求項33に記載のキット。

【請求項 3 5】

前記フラビウイルス特異的免疫学的物質が、モノクローナル抗体である、請求項33に記載のキット。

【請求項 3 6】

抗 Deng IgA 捕捉成分が、フラビウイルスの構造及び非構造タンパク質、フラビウイルス粒子及びそのフラグメント、フラビウイルスに由来する糖タンパク質、脂質及び炭水化物を含む群から選択される、請求項33に記載のキット。

20

【請求項 3 7】

前記構造タンパク質が、エンベロープタンパク質、Pr膜タンパク質及びヌクレオキャプシドタンパク質を含む群から選択される、請求項36に記載のキット。

【請求項 3 8】

前記フラビウイルスが、黄熱病ウイルス、Dengウイルス及びJEウイルスを含む群から選択される、請求項33に記載のキット。

【請求項 3 9】

前記フラビウイルスが、Dengウイルスである、請求項38に記載のキット。

【請求項 4 0】

前記フラビウイルスが、JEウイルスである、請求項38に記載のキット。

30

【請求項 4 1】

前記競合性 Deng 特異的免疫学的物質が、DengウイルスのDEN-1、DEN-2、DEN-3又はDEN-4血清型に共通するエピトープに特異的な Deng 特異的抗体である、請求項39に記載のキット。

【請求項 4 2】

前記非構造タンパク質が、NS-1、NS-2a、NS-2b、NS-3、NS-4a、NS-4b及びNS-5を含む群から選択される、請求項38に記載のキット。

【請求項 4 3】

前記非構造タンパク質が、NS-1である、請求項42に記載のキット。

40

【請求項 4 4】

フラビウイルス又はその等価物への被検者の暴露を検出する方法で使用される固相であって、以下の工程、

前記被検者由来の生物学的サンプルを抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス又は等価物成分の混合物と接触させる工程、

前記生物学的サンプル及び前記抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス成分を競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質に付する工程、

前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、前記生物学的サンプル中に存在するフラビウイルス特異的結合パートナーと、抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体の存在を決定する工程、

50

を含み、

前記固相が、当該固相上に固定された抗フラビウイルスIgA捕捉成分を含むことを特徴とする固相。

【請求項45】

ビーズ、ディスク、磁性粒子若しくはファイバー視覚センサー、マイクロタイタープレート、ガラススライド若しくは生物学的チップ、又はろ紙担体を有するニトロセルロース膜、ポリテトラフルオロエチレン膜フィルター、酢酸セルロース膜フィルター及び硝酸セルロース膜フィルターを含む膜を含む群から選択される、請求項44に記載の固相。

【請求項46】

所定の場所内で、1以上の被検者がフラビウイルス又はその等価物に暴露される相対的リスクを判定する方法であって、以下の工程、

(a) 所定の場所内の代表的な集団からサンプルを入手する工程、及び

(b) 以下の工程を含む方法によって、フラビウイルス又はその等価物へのサンプル集団の個々のメンバーの暴露を判定する工程、

(i) 被検者由来の生物学的サンプルをフラビウイルス又はその等価物に由来する抗フラビウイルスIgA捕捉成分と接触させて、前記成分と、前記生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナーとの間で複合体を形成させる工程、

(ii) 競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、前記生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナーと、抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体の存在を決定する工程であって、該複合体の存在がフラビウイルス又はその等価物への前記被検者の暴露の指標である工程、及び

(c) 前記所定の場所での相対的な暴露リスクを判定する工程、を有することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特にフラビウイルス又はその等価物への人間及び/又は動物の暴露を検出する技術に関する。より具体的には、本発明は、被検者(動物又は人間)が以前にフラビウイルス科のメンバー又はその等価物に暴露されたか否かを決定することを目的とする、被検者から採取した生物学的サンプルの迅速で容易な分析に関する。本発明は更に、血清分析に基づくフラビウイルス暴露の血清型決定を提供し、更にフラビウイルス感染者又は同等な者に医療用診断キット及び弁別的血清判定を提供する。本発明は、フラビウイルス二次感染検出、以前の感染の血清型の特定、血清疫学およびワクチン評価に特に重要である。

【背景技術】

【0002】

フラビウイルス科は、人間で疾患を引き起こし、一般的には蚊及びダニによって媒介される無数のウイルスを含む。フラビウイルス属は、黄熱ウイルス(YF)、デング熱ウイルス、西ナイル(WN)及び日本脳炎(JE)ウイルス(前記はそれぞれ対応する疾患の原因である)を含む多数のウイルスを含む。

デングは、世界中でもっとも一般的かつ蔓延している節足動物媒介フラビウイルス感染であり、120万人を超えるデング感染症が毎年発生し、一方、25億人が世界のデング発生地域に居住しデング感染リスクを有する(WHO/TDR, 2005年4月)。4種の別個のウイルス血清型が存在し、各々が広範囲の徴候及び症状を引き起こすことができ、前記4タイプの1つによる原感染は当該タイプの持続的免疫を付与する。異なる血清型による二次感染の機会はなお残る。

デングは大半の熱帯及び亜熱帯の国々において風土病であるが、前記は主として、保健に関するインフラ又は効率的で容易なデング診断のための経済的能力を欠く発展途上国で発生する。シンガポールでは、2つの媒介昆虫の不規則な分布が集団内のデングの不規則伝播をもたらした(Ooi et al. 2001)。血清学的調査を実施することによって、デング

10

20

30

40

50

発生場所に変化が生じたことが分かった。この発見は、新規な伝播地域を標的とする媒介昆虫管理プログラムの改変を促進するかもしれない。しかしながら、これまでのところ4種の血清疫学調査が完了しただけである。高コストの検査室試験又は必要な試薬の不足が、前記のようにわずかな調査しか実施されていない一因である。

【0003】

伝統的には、血球凝集抑制(HAI)を用いてデングに対する抗体を検出する。しかしながら、この方法は、マウス脳由来抗原(そのような細胞を増殖させることが困難なために容易には入手できない)を必要とする。一般的に用いられる別の方法は補体結合であるが、これは短命な抗体を必要とする。ますます多くの検査室が市販の酵素結合免疫吸着(ELISA)アッセイキットに頼るようになってきている。しかしながらこれら試験のいずれもデング抗体に特異的ではなく、同じ地域に同時に循環しているフラビウウイルスの他のメンバー(日本脳炎(JE)、西ナイル、C型肝炎、黄熱、マリーバレー脳炎など)と交差反応する。

血清中のデングウイルス特異的免疫グロブリンM(IgM)及びIgG抗体の検出を目的とする6つの市販の免疫吸着アッセイ系の性能の感度が最近判定された(Goren et al. 2000)。調べられたデングウイルス特異的アッセイの感度は、IgMについては71から100%、及びIgGについては52から100%の間で変動し、特定率についてはそれぞれ86から96%及び81から100%であった。これらの試験の試験時間の合計は7分から480分であった。この他に、全ての試験がPan-bio RITを除いて検査室装置の支援を必要とし、更にデングIgGアッセイについてはその感度及び特異性は非常に低かった(それぞれ75%及び52%)。しかしながら、これらの調査で判定された試験のいずれもデング特異抗体を検出することはできず、むしろ他のフラビウウイルスとの交差反応性を示した。従って、二次感染初期の検出は現時点ではかなり困難である。なぜならば感染の急性期(発熱期)のデング特異的IgGの存在のみが二次デング感染の指標となるからである(Schilling et al. 2004)。

【0004】

血清疫学調査によって、二次感染は、抗体依存性症状増強(ADE)によるデング出血熱及びデングショック症候群の主要なリスク因子であることが示された(Halstead et al. 1973, Halstead S.B. 1988)。疫学的及び病理学的研究にとって、一次ウイルス感染及び二次ウイルス感染の識別、並びに過去及び現在の感染のデング血清型の決定は重要である。

もっとも広く用いられるデング診断技術は、疑いのあるサンプルの血清学的分析である。しかしながら、この技術は、以下の(i)-(iv)のいくつかの理由からかなり複雑である:(i)交差防御中和抗体を欠いているので、患者は4種のデングウイルス血清型により多重及び連続感染の可能性がある;(ii)2種以上のフラビウウイルスが同時に循環する区域において、多重及び連続フラビウウイルス感染は、以前から存在する抗体の存在及び抗原の原罪(original antigenic sin)(最初のフラビウウイルス感染に応答する多くのB細胞は再刺激されて、現在感染しているウイルスに対するよりも最初の感染ウイルスに対してはるかに強い親和性を有する初期抗体を、その後フラビウウイルスが感染する度に合成する)のために、弁別診断を困難にする;(iii)IgG抗体は、同種及び異種フラビウウイルス抗原に対して高度の交差反応性を有する;及び(iv)過去、最近及び現在のデングウイルス感染の血清診断は、二次感染を示す多くのデング患者でIgG抗体の長期持続性のために困難である(E/M特異的IgG捕捉ELISAによって測定したときは10ヶ月、又は抗原被覆間接IgG ELISAによって測定したときは生涯にわたって持続する)(D.J. Gubler 1996; 及びInnis et al. 1989)。

従って、血清学によって診断することができるウイルス感染の中で、デングウイルス感染はとりわけ困難である。しかしながら、デングウイルス感染の血清診断及び血清疫学調査のために種々の構造的及び非構造的(NS)タンパク質を標的とする多様な方法が開発されることにより、複雑なウイルス抗原及び抗体応答の分析で大きな進歩が最近達成された。

【0005】

血球凝集抑制 (HAI) 試験は、一次及び二次 Dengue 感染の識別に伝統的に用いられてきた。前記はこの試験固有の欠点のために今や人気は低い (Innis et al. 1989; 及び Shu et al. 2003)。対照的に、捕捉 IgM 及び IgG ELISA は、高い感度及び特異性のゆえに一次及び二次感染の識別のためにもっとも強力になった (Innis et al. 1989, 1997)。しかしながら、特に血清疫学調査のための Dengue 血清型決定の場合、いずれの捕捉 IgM ELISA も IgG ELISA も、Dengue 血清型の抗体の中の交差中和抗体のために有用ではない。

ウイルス中和試験 (VNT) は、Dengue と他のフラビウイルス間の識別に用いることができる。VNT はまた、Dengue の血清型間の区別 (血清型 1-4) にも用いることができる。いずれかのウイルスに対して生成された血清抗体は全ての Dengue 血清型及び他のフラビウイルスさえも同様に中和しえるが、相同なウイルスを前記が異種ウイルスを中和するよりもはるかに高力価で中和しえよう (Makino et al. 1994)。残念ながら、感染の初期相で生じた抗 Dengue 抗体 (IgM) は、全ての Dengue 血清型に対して等しいレベルの中和をもたらす、従って、二次感染はこの時点では VNT によって決定することはできない (Nawa et al. 2000)。他方、VNT は以下の欠点を有する。

- i) 精練された細胞培養検査室及び訓練を受けた職員を必要とする。
- ii) 試験期間は 1 週間を超える。
- iii) 6 ヶ月未満の Dengue 感染を示す患者の血清は、Dengue 交差反応性血清型のために血清型を決定することができない。
- iv) 多種多様な Dengue 血清型の検出は困難である。
- v) 10% 血清は、細胞培養で毒性作用を有する。

【 0 0 0 6 】

Innis ら (1989) は、最初、Dengue ウイルス IgM 抗体単位対 Dengue ウイルス IgG 抗体単位の比を決定することによって一次及び二次感染を分類することを提唱した。彼らは、Dengue ウイルス一次感染を有する患者の急性期血清は高い IgM/IgG 比を示し、一方、二次感染を有する患者は低い IgM/IgG 比を提示することを示した。この方法は、Dengue 患者の免疫状態の分析に大きく貢献した。つい最近、Shu ら (2003) は、上記の方法を改変し単純化し、標準コントロールを使用することにより抗体単位を計算せずに IgM/IgG 表示度数の比を直接用いて一次及び二次 Dengue ウイルス感染を区別した (それぞれ、 >1.2 は一次感染、又は <1.2 は二次感染)。

最近、Ludoffs ら (2002) は、組換え抗原を用いることによって、Dengue ウイルス 1-4 の感染を血清学的に識別することを報告した。大腸菌 (*Escherichia coli*) で発現させた Dengue ウイルス 1-4 血清型の B ドメインを点在させた免疫プロット片を用いて、一次及び二次感染を有する 41 人の患者の一对の血清サンプルで Dengue 血清型特異的抗体を検出した。異種血清型とのいくつかの交差反応性は観察されたが、結果は 93.94% の特異性を示した。但しこの方法による血清型決定は、二次感染については信頼できない。

Dengue ウイルスで直面するこの問題は他のフラビウイルス (抗原性特徴を共有する) でも同じように存在し、従って正確な診断を困難にする。従って、任意の感染期のフラビウイルス特異的抗体を他のフラビウイルスに対する抗体と識別するだけでなくフラビウイルス血清型間でも識別することができる迅速で信頼できかつ単純な試験が希求されている。血清学的検出方法は、フラビウイルス感染をフラビウイルスに類似する他の伝染病と識別することを目的とする臨床診断においても、同様に血清監視調査及びワクチン評価においても果たすべき潜在的な役割を有している。そのような技術は二次感染の早期検出を助け、より良好な症例管理、致死率低下及び治療コスト削減をもたらす。

【 発明の開示 】

【 0 0 0 7 】

本発明の第一の特徴では、フラビウイルス又はその等価物への被検者の暴露を検出する方法が提供される。前記方法は以下の工程を含む：前記被検者由来の生物学的サンプルを抗フラビウイルス IgA 捕捉 (anti-flavivirus IgA captured) フラビウイルス又はその等価物の成分混合物と接触させる工程；前記生物学的サンプル及び前記抗フラビウイルス IgA

捕捉成分を競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質に委ねる工程；前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、前記生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナー及び抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体の存在を決定する工程。

本発明は、現在又は以前のフラビウイルス特異的暴露を決定するために、迅速で低コストで簡単なアッセイを樹立する必要性から生じた。本発明は、フラビウイルスのエンベロープタンパク質上に存在するフラビウイルス又はそれらの血清型に特異的なエピトープに対して、宿主身体由来の結合パートナーと競合させるために、特に競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質を利用する。前記は、抗フラビウイルスIgA捕捉成分の混合物（フラビウイルス感染の指標となる抗原の中でとりわけフラビウイルス粒子を含む）を含む。

従って、本発明は、フラビウイルス又はその免疫学的に近縁なウイルスに対して任意の感染期に産生される抗体（IgG）を特異的に同定することができるプラットフォームを提供することによって、通常的でこれまでのところもっとも多く用いられている他のフラビウイルスIgG間接又は捕捉ELISAと比較して極めて高い特異性及び感度を示す。

好ましくは、前記フラビウイルスは、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、JEウイルス、西ナイルウイルス、C型肝炎ウイルス、マリーパレーウイルス及びセントルイス脳炎を含む群から選択される。

【0008】

本発明の別の特徴では、フラビウイルス又はその等価物への被検者の暴露を検出するキットが提供され、前記キットは以下を含む：抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルス由来成分；競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質；及び前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、前記生物学的サンプルに存在する結合パートナーと抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体を検出するための少なくとも1つの検出剤。

本発明はまた、本発明の方法で使用するために前記キットの個々の成分を提供する。前記成分には、固形支持体、例えば、その上に抗フラビウイルスIgA捕捉成分が固定されるマイクロプレート及びニトロセルロース膜が含まれる。

本発明はまた、所定の場所（例えば地理的区域、動産、輸送手段、又は医療処置若しくは医療判定センター）で、1つ以上の被検者がフラビウイルス又はその等価物に暴露される相対的リスクを判定する方法を提供する。

前記方法は以下の工程を含む。

(a) 所定の場所内の代表的な集団からサンプルを入手する工程；

(b) 以下の工程を含む方法によって、フラビウイルス又はその等価物へのサンプル集団の個々のメンバーの暴露の証拠を判定する工程；

(i) 被検者由来の生物学的サンプルをフラビウイルス又はその等価物由来の成分と接触させて、前記成分と生物学的サンプルに含まれる前記成分の被検者由来結合パートナーとの間で複合体を形成させる工程；

(ii) 複合体の存在を決定する工程（ここで複合体の存在はフラビウイルス又はその等価物への前記被検者の暴露の指標である）

(c) 前記所定の場所での相対的な暴露リスクを判定する工程。

リスク分析は、コンピュータ読み取り可能形態のソフトを用いて実施できる。結果として、本発明は更に、フラビウイルス又はその等価物への被検者若しくは被検者群の暴露又は被検者若しくは被検者群の暴露リスクの分析に適したコンピュータ読み取り可能プログラム及び前記プログラムを含むコンピュータに関する。

【0009】

発明の詳細な説明

本発明の第一の特徴では、フラビウイルス又はその等価物への被検者の暴露を検出するための方法が提供される。前記方法は以下の工程を含む：前記被検者由来の生物学的サンプルをフラビウイルス又はその等価物の抗フラビウイルスIgA捕捉フラビウイルスのウイルス成分混合物と接触させる工程；前記生物学的サンプル及び前記抗フラビウイルスIgA

捕捉成分を競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質に委ねる工程；前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、前記生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナー及びフラビウイルスの抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体の存在を決定する工程。

本発明は、フラビウイルスへの現在又は以前の暴露を決定するために迅速で特異的で低コストである簡便アッセイの必要性からもたらされた。本方法は、好ましくは粗細胞溶解物由来フラビウイルス抗原を捕捉させるために抗フラビウイルスIgAを用いる。前記溶解物は、フラビウイルス成分、好ましくは免疫原性成分の混合物を含むフラビウイルス感染細胞に由来する。被検者（動物、例えば哺乳動物、特にヒトを含む）が、競合フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、生学的サンプル中のフラビウイルス特異的結合パートナーの存在についてスクリーニングされる。好ましい結合パートナーは、被検者由来結合パートナー、例えば免疫反応性分子である（但し前記に限定されない）。好ましくは、前記免疫反応性分子は、抗体、特に免疫グロブリンG（IgG）又は免疫反応性フラグメントである。更にまた、特異性は、生物学的サンプル中のフラビウイルス特異的結合パートナーの競合物質としてフラビウイルス特異的免疫学的物質の使用により強化される。そのような結合パートナー又は競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の確認は、抗フラビウイルスIgA補足成分と複合体を形成するそれらの能力により、被検者が現在又は以前にフラビウイルス又はその等価物に暴露されたことの証拠として用いられる。従って、本発明は、抗フラビウイルスIgA捕捉成分及びC-ELISAの組合せを利用する。

従って、本発明は、任意の感染時期にフラビウイルス又はその免疫学的近縁ウイルスに対して生成される抗体を同定することができるプラットフォームを提供することにより、一般的な従来もっとも用いられている他のフラビウイルスIgG ELISAと比較してはるかに高い感度及び特異性を示す。

本明細書の記述及び特許請求の範囲を通して、“含む（comprise）”という語及び前記語の変化形（例えば“conprising”及び“comprises”）は、他の追加物、成分、整数又は工程を排除することを意図するものではない。

【0010】

フラビウイルス

本明細書の特許請求の範囲及び記述で用いられる“フラビウイルス”という用語は、ヒトで疾患を引き起こすフラビウイルス属を含む複数のフラビウイルスで構成されるフラビウイルス科を含み、一般的には節足昆虫、例えば蚊及びダニによって伝播される。前記ウイルスは、疾患（例えば黄熱、デング熱及びJEを含むが、ただしこれらに限定されない）の原因である。この属を構成するフラビウイルスの種は、ヌクレオチド及びアミノ酸配列レベルである程度の配列保存を示した。フラビウイルス属に含まれるウイルスには、黄熱ウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス及びJEウイルスが含まれるが、ただしこれらに限定されない。ヌクレオチド及びアミノ酸レベルにおける類似性のために、これらのウイルスは抗原性、伝播及び疾患で類似性を示しえる。

【0011】

デングウイルス

本明細書の特許請求の範囲及び記述で用いられる“デングウイルス”という用語は、デング感染に付随する全てのデング血清型（Den-1、Den-2、Den-3及びDen-4）を指す。本発明は、任意の被検者（ヒト、非ヒト動物及び実験動物を含む）のデングウイルス感染又は暴露の検出に利用することができる。本発明にしたがえばしかしながら被検者はヒトが好ましい。しかしながら、本発明には、デングウイルス又はその等価物による感染又は免疫に応答しえる任意の被検者が含まれる。

デングウイルスは、直径が約40 - 50nmのエンベロープをもつ粒子から成るヒトのRNAウイルス群と定義される。前記ウイルスのゲノムはほぼ11kbである（Stollar et al. 1966）。成熟ピリオンは、等長なヌクレオキャプシドに包まれたプラスセンスのRNAゲノムから成る。前記ゲノムは約11000ヌクレオチドのただ1つのオープンリーディングフレームをコードし、前記は3つの構造（C-キャプシド、M-メンブレン及びE-エンベロープ）タンパ

10

20

30

40

50

ク質及び7つの非構造 (NS1、NS2a及びNS2b、NS3、NS4a及びNS4b、NS5) タンパク質をコードする。

デングウイルスは、感染した雌のエーデス (*Aedes*) 蚊、主として *A. エジプチ* (*Aedes aegypti*) の刺し傷からヒトに伝播される。これは、小さな白黒まだらの人間の生活に高度に順化した熱帯性の蚊であり、水を保持することができる屋内又は家屋周辺に見出される人工容器 (例えばバケツ、フラワーケース及び他の水入れ) にその卵を産み付けることを好む。蚊の成虫は戸外ではめったに見出されず、通常室内の暗い場所に潜み、ひそやかであり、日中ヒト又は動物を常食とすることを好み、もっとも強い穿刺活動は早朝及び夕方に生じる (Gubler et al. 1992; Newton et al. 1992)。雌の蚊は神経質な捕食者で、宿主のわずかな動きで捕食過程を中断し、従って捕食を継続するために同じ宿主又は別の宿主のところに戻ってくる。この行動のために、蚊はしばしば1回の吸血中に数人から捕食し、感染している場合にはウイルスを多数の人間に伝播しえる (Platt et al. 1997; Scott et al. 1997)。そのような行動は、デング病が主として小児で発生するという観察の疫学的観察の説明に用いられた (ただしシンガポールのようなある種の場所では、前記現象は媒介動物管理手段の利用により異なっている (Ooi et al. 2001))。

感染した雌の蚊が刺した後、ウイルスは3 - 14日の固有のインキュベーション期間を経る。その後、この者は急性期発熱を他の非特異的徴候及び症状と併せて示す。このウイルス血症期間に (2から7日間でありえる)、ウイルスは感染者の血中を循環する。非感染エーデス蚊がこのウイルス血症期間中にヒトを刺した場合、この蚊は無条件外因性インキュベーション期間 (10 - 12日) 後に感染が成立し、引き続いて他の未感染宿主にウイルスを伝播しえよう。この伝播周期で、ヒトがこのウイルスの主要な増幅宿主であるが、ただし調査によればサルが感染しウイルスの供給源として機能しえることが示されている (Putnam et al. 1995; Gubler et al. 1976; WHO, Fact Sheets, 2002)。

【 0 0 1 2 】

デングウイルス感染は、感染ウイルス、宿主の年齢及び免疫学的状態に応じて、一連の症状をヒトで引き起こす。前記ウイルスは、無症状又は識別不能のインフルエンザ様症状 (ウイルス症候群) からデング出血熱 (DHF) 及び重篤で致死的なショック症候群 (DSS) に及ぶ症状をもたらしえる (Nimmannitya, 1993; WHO, 1997)。

世界保健機構は、DHFの重篤度の等級を決定するためのスタンダードを設定した。重篤度に関して4等級が存在し、そのIII度及びIV度はデングショック症候群 (DSS) と考えられる。

I度：非特異的及び体質性症状を伴う発熱、更にただ1つの出血性症状発現は、駆血帯試験陽性及び/又は容易な打撲傷である。

II度：I度の症状発現に加えて、皮膚型又は他の出血としての偶発的出血。

III度：冷感と湿り気を有する皮膚を提示するとともに速く弱い脈拍、脈圧の幅の減少又は低血圧によって示される循環不全、及び不眠

IV度：血圧又は脈拍が検出できない重篤なショック (WHO, 1997)。

古典的なデング熱は年長の小児、青年、及び成人でより一般的であり、前記の者は無症状であることは少ない (Sharp et al. 1995)。発熱は急激であり、高熱、頭痛、激しい筋肉痛及び関節痛、吐き気嘔吐、及び斑状又は斑丘疹状発赤を伴う (Waterman, 1989)。熱は通常5 - 7日間続き、時に二相性経過を辿る (鞍の背状外観) (Nimmannitya, 1993)。

DHFは15歳より下の小児の疾患であるが、ただし成人でも発生することがあり、主に二次デング感染に付随する (Sumarmo et al. 1983; WHO)。DHFの重要な病期は解熱期であり、このときに体温は正常になる。このときの疾患の重篤度を決定する主要因子は、血管透過性増進及び異常なホメオスタシスによる血漿の漏出並びに他の一般的な出血性症状発現 (例えば点状出血、紫斑病巣及び斑状出血) である。これらの症状 + 駆血帯試験陽性がDHFの正確な診断に有益である (Gubler et al. 1998)。

DSSは、DHFの最終病期であり、血漿の漏出による循環血液減少により症状が発現する (WHO, 1997)。DSSに関する4つの警告徴候が存在する：持続的な腹痛、持続的な嘔吐、不

眠又は嗜眠、発熱から発汗及び虚脱を伴う低体温症への急激な変化。経験豊富な医療スタッフによる早期認知及び適切な治療がDSSの致死率を0.2%に低下させることができるが、いったんショックが発生した場合、死亡率は40%を超ええる(Nimmannitya, 1994; Rigau-Perez JG, et al. 1998)。

Eタンパク質(ウイルスの表面で暴露されるもっとも大きく唯一の構造タンパク質)は、免疫学的反応(例えばレセプター結合、血球凝集及び中和反応)に必要な主要タンパク質である。血清型の1つによるヒトの感染は、当該血清型に対する生涯持続する免疫を提供するが、他の血清方に対しては一時的な防御を提供するのみである。

ヌクレオキャプシドはエンベロープを含む脂質及び膜タンパク質によって順繰りに取り巻かれる。エンベロープ及びキャプシドたんぱく質に加えて、デングウイルスは7つの非構造タンパク質NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b及びNS5を有する。

10

【0013】

日本脳炎ウイルス

日本脳炎は、感染した蚊によってヒトに伝播される疾患である。日本脳炎は、中枢神経系を冒し重大な合併症及び死亡さえも引き起こしえる蚊によって媒介されるウイルス疾患群の1つである。

日本脳炎は日本脳炎ウイルス(アルボウイルス)によって引き起こされる。アルボウイルスは大きなウイルス群であり、前記はある種の無脊椎動物(節足動物)、最も一般的には吸血昆虫によって伝播される。ほとんどのアルボウイルスと同様に、日本脳炎は感染した蚊(クレックス(*Culex*) spp)によって伝播される。

20

感染者は軽度の症状を発するか、又は全く症状を示さない。より重篤な症状を発する者では、日本脳炎は通常インフルエンザ様病状として出発し、発熱、悪寒、倦怠感、頭痛、吐き気、及び嘔吐を示す。初期には錯乱及び興奮もまた生じえる。病気は脳の重大な感染(脳炎)へ進行することがあり、症例の30%が致死的でありえる。生存者では、更に30%の患者が永久的な神経学的後遺症を示した。

ウイルス性脳炎を引き起こしかつ本発明の範囲内に入る他のフラビウイルスが存在する。それらは類似の症状を有し、以下が含まれる：

- セントルイス脳炎及びマリーバレー脳炎
- ロシア春夏脳炎(ダニにより伝播)

他の3つの脳炎ウイルスはアルファウイルス属に属し、これもまた蚊の刺し傷によって伝播される。それらは、西部、東部及びヴェネズエラウマ脳炎(又はそれぞれWEE、EEE及びVEE)である。これらは全て北及び南アメリカで発生する。更にEEE及びWEEに対して防御するワクチンもまた存在する。

30

日本脳炎のように、これらのウイルスはしばしば軽度の一般的症状(軽度のインフルエンザに類似する)をもたらす。

この疾患の診断は、以前にはIgM捕捉ELISAにより血清及びCSF(脳脊髄液)で抗体を検出することによって行われていたが、このELISAは特異性が低いことが示され、更に工程は長時間を要しえる。ワクチンは利用可能であるが、抗ウイルス作用は、感染から数時間以内に投与されなければ通常有効ではない。従って、治療は主として支援的である。日本脳炎ウイルスはヒトからヒトへは伝播されない。JEVによる感染は生涯持続する免疫を付与する。

40

【0014】

等価物

本明細書で用いられ、フラビウイルスに適用される“等価物”という用語は、フラビウイルス又はフラビウイルスの構造的若しくは非構造的タンパク質が誘引することができる応答と同じ又は類似する応答を誘引することができる類似分子を含むことを意図する。例えば、感染の種々の段階でフラビウイルスによって、又は種々のウイルス粒子若しくはフラグメントによって発現される種々の抗原は、完全なウイルスが引き起こす効果と類似の効果を引き起こすことができる。前記応答は免疫学的応答(非臨床的応答)であってもよく、又は感染性応答(臨床的応答)又はワクチン接種によるものであってもよい。

50

暴露

被検者はフラビウイルスに暴露されていてもよいが、必ずしも目に見える感染症状を示している必要はない。本方法は、感染（臨床的又は準臨床的又は非臨床的）をもたらす暴露を検出するか、又は症状が発現されなかった以前の暴露を示すことができる。

本発明は、フラビウイルス又はその等価物への暴露の検出に適用することができる。暴露は、フラビウイルス又はその等価物への現在又は以前の暴露でよい。好ましくは、暴露は、フラビウイルス又はその等価物に反応して結合パートナーを誘発するために、体内で免疫反応又は免疫応答を誘引するために十分なものである。いったん被検者が暴露されたら、本発明の方法は、上記に記載した任意の暴露段階で適用することができる。好ましくは、本方法は、徴候及び症状がなく、かつフラビウイルス感染が明白な暴露の検出に用いられる。好ましくは、本方法は、任意のフラビウイルスの感染期、二次感染の初期急性期、又は一次感染若しくはワクチン接種についてフラビウイルス若しくはその等価物への暴露の後期回復期における被検者の暴露を検出する。暴露は、フラビウイルス感染で常に顕著な徴候又は症状を発現するとは限らないが、結合パートナーを誘発するべく応答が引き起こされるであろう。好ましくは、前記応答は免疫学的応答である。

10

【0015】

免疫応答又は免疫学的応答

“免疫応答”又は“免疫学的応答”は、脊椎動物の免疫系によって生じる選択的応答であると理解される。前記では、特異的抗体又は抗体のフラグメント及び/又は細胞傷害性細胞が、体内で外来物と認識される侵入病原体及び抗原に対して産生される。

20

結合パートナー

従って、本明細書で用いられる“結合パートナー”は、外来フラビウイルス又はその等価物に対して産生される任意の分子又は細胞である。好ましくは、前記は免疫反応性分子である。より好ましくは、結合パートナーは抗体若しくは免疫学的に活性なそのフラグメント、又は細胞傷害性細胞である。前記結合パートナーには、フラビウイルス抗原又は等価物と相互反応し、更にフラビウイルス特異的免疫学的物質（例えばフラビウイルス特異的モノクローナル抗体）と競合することができる免疫反応性分子が含まれる。

好ましい結合パートナーは免疫反応性分子であり、前記は、好ましくは抗原結合部分を含む任意の分子又はその誘導体を指す。好ましくは、免疫反応性分子は、フラビウイルス感染又は暴露を被った被検者で液性応答時に産生される、フラビウイルスタンパク質の任意の部分に対する抗体である。

30

より好ましくは、結合パートナーは、フラビウイルス又は関連ウイルスの成分に対して被検者で産生された抗体である。しかしながら、標的抗体の結合パートナーもまた用いることができる。そのような結合パートナーの例は、抗イディオタイプ抗体、又はフラビウイルスのメンバー若しくは関連ウイルスの成分に特異的な被検者の抗体に特異的であるか、若しくはこれを識別する抗体である。

フラビウイルス感染の初期回復期では、以前のフラビウイルス感染に由来する抗体（好ましくはIgG）は、二次又は一次フラビウイルス感染の指標の1つである。抗体は、この抗体とフラビウイルスのメンバーの成分との複合体形成によって検出することができる。フラビウイルスのメンバー特異的IgGとフラビウイルス特異的若しくはメンバー特異的エピトープ上の抗原による免疫複合体の形成は、競合性フラビウイルス特異的若しくはメンバー特異的免疫学的物質の結合が存在しないことによって示される。

40

本明細書で用いられる、“抗イディオタイプ抗体”は、フラビウイルス属のメンバー又はその免疫学的近縁物に由来する成分への暴露に反応して生成された別の抗体の特異的な抗原結合部位と結合する抗体である。

本明細書で用いられる、“抗体”という用語には完全な抗体及びその機能的部分を含む抗体フラグメントが含まれる。“抗体”という用語には、完全な抗体が結合特異性を有するエピトープとの結合を達成するために十分な軽鎖可変領域及び/又は重鎖可変領域部分を含む、任意の一特異的又は二特異的化合物が含まれる。フラグメントは、少なくとも1つの重鎖若しくは軽鎖免疫グロブリンポリペプチドの可変領域を含むことができ。前記に

50

はFabフラグメント、F(ab')₂フラグメント及びFvフラグメントが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

好ましくは、結合パートナーは抗体である。より好ましくは、前記はフラビウイルスIgG分子又は免疫反応性部分である。もっとも好ましくは、前記フラビウイルスはデングウイルス又はJEウイルスである。

生物学的サンプルに含まれる細胞傷害性細胞は結合パートナーとしてもまた機能を果たすことができる。前記細胞は、フラビウイルス、又はフラビウイルス若しくはその等価物に感染した細胞から得られる細胞溶解物の任意の成分と直接作用することができる。

【0016】

生物学的サンプル

本発明の方法は、フラビウイルスに潜在的に暴露された被検者から得られる生物学的サンプルを使用することにより、フラビウイルス又はその等価物への暴露を検出する。前記生物学的サンプルは、結合パートナーを含むことができる、身体由来の任意のサンプルでありえる。そのような生物学的サンプルは、血液、唾液、脊髄液、B細胞、T細胞、血漿、血清、尿及び羊水を含む群から選択することができる。好ましくは、前記生物学的サンプルは血清又は血漿又は唾液である。もっとも好ましくは、前記生物学的サンプルは血清又は唾液である。

フラビウイルスへの暴露が疑われる被検者から生物学的サンプルを入手することもまた好ましい。生物学的サンプルはまた使用前に（例えば希釈、種々の分画の精製、遠心などによって）改変することができる。従って、生物学的サンプルは、完全な生物、又はその組織、細胞若しくは成分部分のサブセット、又はその分画若しくは部分から調製されるホモジネート、溶解物又は抽出物を指すことができる。

生物学的サンプルはまた、フラビウイルス又はその等価物と相互反応することができる結合パートナーを欠くことができることは注目されるべきである。前記は、被検者がフラビウイルス又はその等価物に暴露されていないときに生じる。従って、“生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナーと抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体の存在の決定”は、複合体は結合パートナーが存在しないときには形成されないのでゼロの結果を生じることがある。この事例で形成されえる唯一の複合体は、競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質、例えば生物学的サンプル中の結合パートナーと競合するように設計されたモノクローナル抗体を含むであろう。

溶解物の成分、好ましくはフラビウイルス又はその免疫学的近縁物の免疫原性成分と生物学的サンプルを接触状態に置くということは、任意の方法について生物学的サンプルの1つ以上の分子とフラビウイルス又はその免疫学的近縁物の成分との相互反応を促進することと理解されるべきである。前記相互反応は、前記免疫反応性分子とフラビウイルス又はその免疫学的近縁物の特異的免疫原性成分との間でカップリング又は結合或いは合体（association）が生じえるようなものであるべきである。

生物学的サンプルは、フラビウイルス又はその等価物の抗フラビウイルスIgA捕捉ウイルス成分と接触される。

【0017】

抗フラビウイルスIgA捕捉成分

抗フラビウイルスIgAは、フラビウイルス又はメンバー特異的成分を捕捉するために用いられる。好ましくは、前記成分は、フラビウイルス特異的結合パートナー及び競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質と反応性を有する。抗フラビウイルスIgAは、抗原に対する抗体の製造のために当業者が利用することができる任意の方法によって入手することができる。好ましくは、IgAは抗ヒトIgAによって捕捉される。

本発明は、一般的に試験の感度の低下をもたらすIgG又はIgMとは対照的に抗フラビウイルスIgAにより捕捉される成分を特に使用する。フラビウイルス成分の捕捉にIgAを使用することによって、血清学的試験の感度を改善することができることが判明した。IgAは、最近の感染及び暴露に由来する結合パートナーとより特異的に反応するフラビウイルス成分を捕捉することができる。

10

20

30

40

50

被検者がフラビウイルスに暴露されたとき、身体の免疫系は最初このウイルスを取り除くために反応する。この免疫系の反応は、フラビウイルス又はその等価物によって提示される多量の抗原に対する免疫学的応答で一般的に発現する一連の事象を引き起こす。従って、本発明で提供される成分はフラビウイルスへの暴露の任意の段階を表し、更に全てのフラビウイルス又は血清型に特異的なエピトープを含む抗原又は抗原の部分でありえる。前記成分は、フラビウイルスそのものを含む任意の供給源に由来しえる。しかしながら、前記成分がフラビウイルスのウイルスに感染した細胞に由来するのが好ましい。前記は、細胞培養に由来するか、又はフラビウイルスに感染した組織若しくは生物学的サンプルに由来しえる。もっとも好ましくは、前記成分は、細胞溶解物入手するフラビウイルス感染細胞培養に由来する。

10

本発明では、細胞溶解物は、好ましくはフラビウイルス免疫原の混合物を含み、前記にはウイルス粒子並びに構造的及び非構造的ウイルスタンパク質が含まれる。これらの免疫原性成分は抗フラビウイルスIgAによって捕捉される。好ましくは、フラビウイルス免疫原は、生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナー及び競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質に対して免疫学的反応を誘引することができる、溶解物の免疫原性成分である。前記溶解物は、ウイルス成分、好ましくは免疫原性成分（前記はフラビウイルスの発育の任意の段階で前記ウイルスによって提供されえる）を提供する。

【0018】

本発明の溶解物は、フラビウイルス又はその等価物の特定のメンバーを感染させた任意の細胞供給源から入手することができる。好ましくは、細胞はin vivo培養においてフラビウイルス又はその等価物で感染される。

20

任意の細胞タイプに感染させることができる。好ましくは、前記細胞タイプはフラビウイルスの感染及び培養能力を有する。しかしながら、高力価のフラビウイルスを産生することができる細胞を本発明の方法に従って感染させることが好ましい。前記細胞には一般的に入手可能な持続的細胞株（例えばVero細胞（Vero-PM株）、CV-1細胞、LLC-MK2、C6/36及びAP-61細胞）、初代細胞株、例えばリーザス胎児肺（FRhL-2）細胞株、BSC-1細胞及びMRC-5細胞、又はヒト二倍体線維芽細胞が含まれるが、ただしこれらに限定されない。複数の細胞タイプの組合せもまた本発明に含まれる。C6/36又はAP-61細胞がフラビウイルス又は等価物で感染される。もっとも好ましくは、細胞タイプはC6/36である。

30

細胞は、任意の期間、好ましくはフラビウイルスを確立させ細胞の感染を可能にする期間培養することができる。より好ましくは、細胞は、細胞変性効果が細胞培養で明白になり、それによって細胞内でのウイルスの活発な感染が明示されるまで培養される。

この時点で、当業者が利用可能な任意の方法によって細胞を溶解させることができる。好ましくは、洗剤（例えばトリトンX100）を含む低張緩衝液を用いて、フラビウイルス又はその等価物の免疫原性に影響与えないが、好ましくは生ウイルス粒子を不活化する溶解緩衝液を提供することができる。

前記溶解物は、免疫原性ウイルス成分の混合物（完全なフラビウイルスのウイルス粒子と同様にフラビウイルスの構造的及び非構造的ウイルス抗原を含む）を含むことは理解されよう。デングウイルスのためには、これらは、DEN1、2、3又は4を含む群から選択することができる。本発明は、フラビウイルス又は等価物への暴露に反応して生物学的サンプルで生成される結合パートナー混合物によって、抗原混合物を同定しようとする。

40

好ましくは、フラビウイルスはデングウイルス又はJEウイルスである。

より好ましくは、フラビウイルス又はデング特異的免疫原性成分は、フラビウイルス又はデングウイルスの構造的若しくは非構造的タンパク質である。より好ましくは、構造的タンパク質は、C-キャプシド、M-メンブレン及びE-エンベロープタンパク質を含む群から選択され、前記は抗フラビウイルスIgAによって捕捉することができる。より好ましくは、デングの非構造的タンパク質は、NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b及びNS5を含む群から選択される。

溶解物は任意の態様で加工することができる。好ましくは、溶解物を清澄にして核及び細胞屑並びに完全なフラビウイルス粒子を取り除く。溶解物を小分けし、将来の使用のた

50

めに-70 から-80 で保存することができる。

デングウイルスのためには、以前の方法は、デングウイルス感染の指標となる抗体を検出するために特異的デング抗原DEN1、2、3及び4（デングウイルス感染細胞の上清に存在する）を用いた。しかしながら、本発明は、これらの抗原を単独では用いないが、フラビウイルス暴露の過程で抗体がそれに対して生成される、フラビウイルス分子/免疫原の混合物（フラビウイルス感染細胞に存在し、フラビウイルス粒子及び他の免疫学的成分、好ましくは構造性及び非構造性タンパク質を含むことができる）を用いる。

【0019】

競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質

免疫学的物質、好ましくは抗体又はモノクローナル抗体が、生物学的サンプルに存在する結合パートナーと競合させるために用いられる。前記免疫学的物質はまた、フラビウイルス特異的成分とも反応する。フラビウイルスに特異的な、より好ましくはフラビウイルスのエピトープに特異的な任意の免疫学的物質が好ましい。一般的には、免疫学的物質はフラビウイルスのウイルスエンベロップ部分のエピトープに特異的であろう。もっとも好ましくは、競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質は、抗フラビウイルスIgA捕捉成分に特異的である。

前記免疫学的物質はフラビウイルス特異的結合物質と競合することを目的とするので、前記免疫学的物質及びフラビウイルス特異的結合物質は、少なくとも1つ又は同じエピトープについて競合することがまた好ましい。従って、前記免疫学的物質は抗フラビウイルスIgA捕捉成分のエピトープに特異的であることが好ましい。IgA捕捉成分と特異性の強い免疫学的物質の組合せは、フラビウイルス属のメンバーに対する試験の特異性を強化するであろう。

試験の特異性は、競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の特異性の度合いによって強化されえる。好ましくは、競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質は、抗体（例えばポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体）である。より好ましくは、前記は、フラビウイルスのエピトープに特異的なモノクローナル抗体であり、より具体的には抗フラビウイルスIgA捕捉成分に特異的なモノクローナル抗体である。

それに対して抗体が生じる抗原を知ることによって、前記成分の抗原を同定することができる。

当業者が利用することができる任意の方法を用いて、フラビウイルスのウイルスに対する抗体又はモノクローナル抗体を作成することができる。

【0020】

複合体の形成

前記成分及び生物学的サンプルを、前記成分と前記生物学的サンプルに存在する結合パートナーとの間で複合体が形成されえるように接触させる。好ましくは、フラビウイルス粒子の免疫原（フラビウイルスに特異的なエピトープを有する、抗フラビウイルスIgAによって捕捉される構造性及び非構造性タンパク質の免疫原を含むが、ただしこれらに限定されない）は、結合パートナー又は競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質のどちらかと複合体を形成するであろう。好ましくは、前記特異的結合パートナーは生物学的サンプルに存在する抗体又はそのフラグメントである。これらは、被検者がフラビウイルスに暴露/免疫されたときにのみ存在するであろう。

好ましくは、前記複合体は、抗体（好ましくはフラビウイルス属のメンバー又はその等価物に特異的なIgG）と抗フラビウイルスIgAにより捕捉されるフラビウイルスのウイルス成分との間で形成されるであろう。

前記結合パートナーはまた、フラビウイルスの免疫原と反応する細胞傷害性細胞（例えば生物学的サンプル由来の細胞傷害性T細胞）でもよい。

競合性フラビウイルス特異的又はメンバー特異的免疫学的物質はまた、同じエピトープが前記成分において自由な状態で存続する場合、前記成分と複合体を形成するであろう。結合パートナー及び免疫学的物質が同じエピトープに特異的である場合、競合が生じてフラビウイルスに対する結合パートナーの存在及び以前の暴露の指標として出現するであろう

う。

本発明の好ましい方法は、競合性フラビウイルス特異的又はメンバー特異的免疫学的物質と生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナーとの競合の検出を根拠にする。前記競合性免疫学的物質及びフラビウイルス特異的又はメンバー特異的結合パートナーは、フラビウイルス又はその等価物を感染させた細胞に由来する細胞溶解物に存在し、抗フラビウイルスIgAを用いて捕捉されたフラビウイルス抗原の成分に対して競合する。複合体は、フラビウイルス又はその等価物に由来する1つ以上の成分と結合した1つ以上の結合パートナーを含みえる。

生物学的サンプルは、複合体の安定な形成を可能にし、更に競合性免疫学的物質（例えばフラビウイルス又は前記属の任意の具体的メンバーに特異的なモノクローナル抗体）との結合を阻害するために十分な時間及び条件で、フラビウイルス又はその等価物に由来する成分と接触した状態に置かれる。

いったん結合したら、競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質を添加することができる。従って、免疫学的物質の添加前に結合物質及び成分に複合体を形成させる場合には、前インキュベーション工程をもつことが好ましい。しかしながら、これらの成分はまた同時に添加してもよい。

本発明は、好ましくは、フラビウイルス特異的又は任意の特定メンバーに特異的な抗体を利用して、結合パートナー、例えば、フラビウイルス若しくは前記属の任意の特定メンバーに特異的なエピトープ、又は細胞溶解物（他の抗原の中でとりわけフラビウイルス感染の指標となる、フラビウイルス粒子を含むフラビウイルス免疫原性成分の混合物を含む）に由来するフラビウイルスのエンベロープタンパク質に存在する前記の血清型に特異的なエピトープに対する、宿主身体から得られる抗フラビウイルス特異的若しくは任意の特定メンバー特異的IgGと競合させる。

本発明の方法及びキットは、複合体を形成し、フラビウイルス感染の指標となる成分及び結合パートナーを検出することを目的とする。これらの成分及び結合パートナーはフラビウイルス感染の過程で生成される。

更に別の特徴では、生物学的サンプルは固相、例えばニトロセルロース膜又は抗フラビウイルスIgA被覆ポリスチレンプレート（ただしこれらに限定されない）に適用してもよい。前記固相はまた、抗ヒトIgAによって捕捉される成分、及びフラビウイルス又はその等価物に由来する成分が適用されてあってもよい。続いて、フラビウイルス又はその等価物に由来する成分は、フラビウイルス又は前記属の任意のメンバーに特異的な競合性免疫学的物質の存在下で、安定な複合体の形成を可能にするために十分な時間及び条件下にて生物学的サンプルと接触状態に置かれる。いったん複合体が形成されたら、続いて検出系を添加して、複合体中の免疫学的物質の特異的結合の検出を容易にする。

【0021】

複合体の存在の決定

抗フラビウイルスIgAによって捕捉されるフラビウイルス由来成分とフラビウイルス特異的結合パートナー（例えば免疫反応性分子又はフラビウイルス特異的免疫学的物質）との複合体の検出は、当業者に公知の任意の簡便な方法によることができる。

生物学的サンプルで複合体を形成し、フラビウイルス感染の指標となる抗フラビウイルスIgA捕捉成分、結合パートナー及びフラビウイルス特異的免疫学的物質（例えばモノクローナル抗体）の検出に有用な、意図される方法には、免疫学的アッセイ、例えばイムノプロットティング、免疫細胞化学、免疫組織化学又は抗体アフィニティクロマトグラフィー、ウェスタンブロット分析、又はこれら若しくは当分野で公知の他の技術の変型若しくは組合せが含まれる（ただしこれらに限定されない）。

好ましい実施態様では、検出方法は、更なる検出剤、例えば特異的抗体及び酵素結合 (conjugated) 抗-抗体を利用するか、又はレポーター基（例えば酵素）に直接結合させた免疫原性物質を用いる。適切な酵素はセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) であり、前記は競合性成分により形成された複合体の検出を可能にする。特異性を付加するために、モノクローナル抗体を用いてもよい。

10

20

30

40

50

本発明は、レポーター基を有する、フラビウイルス特異的又はフラビウイルスメンバー特異的免疫学的物質の使用を含む。前記の使用によって、試験の実施速度が速められる。前記の使用は、複合体形成の同定に要求される工程数を減少させる。適切なレポーター基は酵素（例えばHRP）である。他の適切なレポーター基も用いることができ、それらは当業者には周知である。

細胞溶解物及び結合パートナーによって形成される複合体は、レポーター基を含み成分/結合パートナー複合体と特異的に結合する検出剤を用いて検出することができる。そのような検出剤は、例えば、他の動物種由来のフラビウイルス特異的若しくはメンバー特異的抗体、又は結合パートナーと特異的に結合する他の物質（例えば抗免疫グロブリン（すなわち抗体）、プロテインG、プロテインA又はレクチン）を含む。また別には、競合性アッセイを利用してよい。前記アッセイでは、フラビウイルスのメンバーに由来する抗原と結合することができる検出剤はレポーター基で標識され、生物学的サンプルの結合パートナーと一緒に、固定した細胞溶解物成分に結合させられる。生物学的サンプルの結合パートナーが、標識フラビウイルス又はフラビウイルスメンバー特異的検出剤と固定成分との結合を阻害する程度が、生物学的サンプルの結合パートナーと固定成分との反応性の指標となる。

好ましい実施態様では、検出試薬は、生物学的サンプルの結合パートナーと結合することができる、抗体又は二次抗体若しくは前記の抗原結合フラグメントである。抗体は、当業者に公知の多様な技術のいずれかによって調製することができる（例えば以下を参照されたい：Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）。一般的に、抗体は、以下を含む細胞培養技術によって製造することができる：モノクローナル抗体の生成、又は組換え抗体の産生を可能にするための適切な細菌若しくは哺乳動物細胞への抗体遺伝子のトランスフェクション。

二次抗体（標識と結合させることができる）を前記複合体に添加して検出を容易にすることができる。検出シグナルを提供する一連の標識を利用することができる。標識は、色原体、酵素、触媒、発蛍光団、及び直接的可視標識を含む群から選択することができる。直接的可視標識の事例では、金属性又は非金属性コロイド粒子、色素粒子、酵素若しくは基質、有機ポリマー、又はラテックス粒子が用いられる。標識としての使用に適した多数の酵素が、米国特許4366241号、4843000号及び4849338号に開示されている。本発明の適切な酵素標識には、アルカリ性ホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼが含まれ、セイヨウワサビペルオキシダーゼが好ましい。酵素標識は単独で用いても、二次酵素（溶液中で存在する）と一緒に用いてもよい。本発明では、好ましくは、セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合させた二次抗体（前記を続けてその基質OPD又はDABと反応させ、視覚的に検出可能な色の変化を生じさせる）が、免疫原と競合性フラビウイルス特異的若しくはフラビウイルスメンバー特異的免疫学的物質（例えばフラビウイルス若しくは前記属の任意のメンバーに特異的なモノクローナル抗体）とで形成された複合体の検出を達成する。

【0022】

抗フラビウイルスIgA捕捉成分の提示

好ましい実施態様では、本明細書に記載される方法は、フラビウイルス若しくは前記属のフラビウイルスメンバー感染細胞に由来する細胞溶解物、又は抗フラビウイルスIgA捕捉成分（本明細書では相互に“成分”又は“細胞溶解物の成分”と称する）の使用を必要とする。前記は、固相（例えばポリスチレン又はニトロセルロース膜）に固定され、当該固相に生物学的サンプルに存在する結合パートナーが結合される。

従って、本発明の別の特徴では、フラビウイルス又はその等価物への被検者の暴露を検出する方法で使用される固相が提供され、

前記方法は、以下の工程、

前記被検者由来の生物学的サンプルを抗フラビウイルスIgAにより捕捉されるフラビウイルス又はその等価物の成分の混合物と接触させる工程；

前記生物学的サンプル及び前記抗フラビウイルスIgAにより捕捉される成分を競合性フラ

10

20

30

40

50

ビウイルス特異的免疫学的物質に委ねる工程；

前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、前記生物学的サンプルに存在するフラビウイルス若しくはフラビウイルスメンバー特異的結合パートナー及び抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体の存在を決定する工程を含み、前記固相は、その上に固定された抗フラビウイルスIgA捕捉成分を含む。

固相は、結合パートナー又は細胞溶解物の成分を結合させることができる当業者に公知の任意の材料でありえる。例えば、固相は、マイクロタイタープレート中のテストウェル又はニトロセルロース若しくは他の適切な膜であってもよい。また別には、固相は、ビーズ又はディスク、例えばガラス、ガラス繊維、ラテックス又はプラスチック素材（例えばポリスチレン又はポリビニルクロリド）であってもよい。固相はまた、磁性粒子又は光学線維センサー（例えば米国特許5,359,681号に開示されたようなもの）であってもよい。

10

結合パートナー又は細胞溶解物の成分は、当業者に公知の多様な技術を用いて固相に固定することができる（前記技術は特許及び学術文献に数多く記載されている）。本発明の文脈では、“固定”という用語は、免疫吸収又は非共有結合（例えば吸着）及び共有結合（前記は抗原又はヌクレオチドと固相の官能基との間の直接的結合であってもよく、又は架橋剤の手段による結合であってもよい）の両方を指す。マイクロタイタープレートのウェルを被覆した抗体を用いる免疫吸収又は膜への単純な吸収による固定が好ましい。そのような事例では、吸着は、適切な緩衝液中の結合パートナー又は細胞溶解物成分を、以前に適切な時間抗体により被覆した固相と接触させることによって達成することができる。接触時間は温度により変動するが、典型的には約1時間及び一晩である。

20

結合パートナー、抗フラビウイルスIgA捕捉成分、又はフラビウイルス特異的若しくはメンバー特異的免疫学的物質の固相への免疫付着はまた、最初に固相を二官能基性試薬と反応させることによって達成することができる（前記試薬は、被覆抗体及び結合パートナー又は成分の免疫原性成分（例えば非特異的エピトープ）の両方と反応するであろう）。例えば、結合パートナー、抗フラビウイルスIgA捕捉成分、又はフラビウイルス特異的免疫学的物質は、抗抗体を用いて適切な抗体被覆を有する固相に免疫学的に結合させることができる。

【0023】

プロセスの一般的な説明

下記は、一定の好ましい実施態様を単に説明するための本方法の一般的な説明であるが、本発明はこの一般的な説明に限定されずデングウイルスにも限定されるべきではない。デングウイルスは、本発明について説明するために単に好ましいフラビウイルスであるというだけである。

30

アッセイは二工程サンドイッチアッセイとして実施される。このアッセイは、固相（これはウェル又はマイクロタイタープレートでありえる）に固定された生物学的サンプルに存在するデング特異的結合パートナーと本明細書に記載する細胞溶解物の成分とを、成分と固定された結合パートナーとが結合できるように先ず初めに接触させることによって実施することができる。続いて、未結合サンプルを固定された複合体から取り除き、検出試薬（好ましくは結合パートナー又は成分と結合することができるレポーター基を含む第二の抗体）が添加される。続いて、前記特異的なレポーター基に適した方法を用いて、固相に結合したままの検出試薬の量を決定する。

40

より好ましくは、いったん結合パートナー又は細胞溶解物の成分が上記に記載の固相に固定されたら、典型的には固相になお残る結合部位をブロックする。当業者に公知の任意の適切なブロック剤（例えばウシ血清アルブミン又は脱脂粉乳）が、トリトンX100又はトゥイーン20™（Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo）とともに用いられる。続いて、固定された結合パートナー又は成分を、結合パートナーと成分との間で複合体を形成することができるように、細胞溶解物の成分又は結合パートナーとそれぞれインキュベートする。成分又は結合パートナーはまた、インキュベーション前に、デング陰性ヒト血清及びトリトンX100又はトゥイーン20とともに適切な稀釈緩衝液（例えばリン酸緩衝食塩

50

水 (PBS)) で稀釈してもよい。一般的には、適切な接触時間 (すなわちインキュベーション時間) は好ましくは30分であり (前記は細胞溶解物の成分を固定された結合パートナーに結合させるか又はその逆のために十分である)、続いて、競合性免疫学的物質 (例えば Dengue ウイルスに対する抗体、より好ましくはモノクローナル抗体) を前記競合アッセイの混合物に添加し、更に30分反応させる。前記競合性免疫学的物質は、それに直接結合させたレポーター基を持つことができる。好ましくは、結合パートナーと細胞溶解物成分の結合及び未結合間の平衡で達成される少なくとも約95%の結合レベルの接触時間が、付着 Dengue 抗原上の標的エピトープとの結合レベルを達成するために十分である。平衡を達成するために必要な時間は、ある時間にわたって生じる結合レベルをアッセイすることによって容易に決定することができることは当業者には理解されよう。室温では、一般的には約30 - 60分のインキュベーション時間で十分である。

続いて、未結合成分は、適切な緩衝液 (例えば0.05%のトウイーン20™又はトウイーン80を含むPBS) で固相を洗浄することによって取り除くことができる。続いて、細胞溶解物の成分又は結合パートナーと結合することができ、かつレポーター基を含む検出剤を固相に添加することができる。続いて、結合成分又は結合パートナーを検出するために十分な時間、前記検出剤を固定された結合パートナー-成分複合体とインキュベートする。適切な時間は、ある時間にわたって生じる結合レベルをアッセイすることによって一般的に決定することができる。続いて、未結合検出剤を取り除き、レポーター基を用い結合した検出剤を検出する。レポーター基を検出するために用いられる方法は、レポーター基の性質に左右される。

【0024】

また別には、レポーター基は免疫学的物質に直接結合させることができる。その後直ぐにレポーター基を検出することができる。放射能基の場合、一般的にシンチレーション計測又はオートラジオグラフィによる方法が適切である。分光光度計による方法を用いて、色素、ルミネッセンス基、発色酵素及び蛍光基を検出することができる。発色酵素にはペルオキシダーゼ及びアルカリ性ホスファターゼが含まれるが、ただしこれらに限定されない。蛍光基にはフルオレセインイソチオシアネート (FITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC)、ローダミン、テキサスレッド及びフィコエリスリンが含まれるが、ただしこれらに限定されない。ビオチンはアビジンを用いて検出することができ、前記は種々のレポーター基 (一般的には放射能若しくは蛍光基又は酵素) に結合される。酵素レポーター基は、一般的には基質を添加し (一般的には固有の時間)、続いて反応生成物の分光光度計分析又は他の分析を実施することによって検出することができる。基質は、4-クロロ-1-ナフトール (4CN)、ジアミノベンジジン (DAB)、アミノエチルカルバゾール (AEC)、2,2'アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS)、オフエニレンジアミン (OPD) 及びテトラメチルベンジジン (TMB) から成る物質の群から選択することができる。

2つ以上のレポーター基を検出剤に結合させることもまた所望することができる。ある実施態様では、多様なレポーター基が1つの検出剤分子に結合される。別の実施態様では、2つ以上のタイプのレポーター基が1つの検出剤に結合されえる。個々の実施態様に関係なく、2つ以上のレポーター基をもつ検出剤は多様な方法で調製することができる。例えば、2つ以上のレポーター基は検出剤に直接結合させるか、又は結合のために多様な部位を提供するリンカーを用いてもよい。

関連する実施態様では、本明細書に記載の方法は、ポリスチレンプレート又はフロースルー又は細片型試験様式で実施することができる。前記様式では、生物学的サンプルの結合パートナー又は成分は抗 Dengue 抗体によって固定されるか、又は膜 (例えばニトロセルロース) 上に固定される。例えばフロースルー試験では、成分は、サンプルが膜を通過するときに固定された結合パートナーと結合することができる。また別には、生物学的サンプルに存在する結合パートナーは、サンプルが膜を通過するときに固定された細胞溶解物の成分と結合することができる。続いて、標識された第二の検出剤は、前記検出剤を含む溶液が膜を通過するときに結合パートナー-成分複合体と結合する。続いて、結合した検

10

20

30

40

50

出剤の検出を上記のように実施することができる。

【0025】

細片試験様式では、膜の一方の端（ここに細胞溶解物の成分が結合している）が生物学的サンプルを含む溶液に浸漬される。生物学的サンプル中の結合パートナーは、膜に沿って検出剤を含む領域から固定された成分の領域へ移動する。固定された結合パートナー-成分複合体の領域における検出剤の濃度は、生物学的サンプル中の結合物質の存在を示す。典型的には、当該部位における検出試薬の濃度は、視覚的に判読することができるパターン（例えば線）を生じる。そのようなパターンが存在しない場合は陰性の結果を示す。一般的に、膜又はポリスチレンプレートに固定される結合パートナーの量は、生物学的サンプルが、上記で考察した様式のサンドイッチアッセイで陽性シグナルを生じるために十分な結合物質レベルを含むとき、視覚的に識別可能なパターンを生じるように選択される。そのような試験は、典型的には極めてわずかな量の生物学的サンプルを用いて実施することができる。

10

細片試験又はディップスティック試験の簡便型では、細胞溶解物の成分が膜（例えばニトロセルロース膜）上に固定されえる。続いて、膜の細片を生物学的サンプルに委ねて、成分と生物学的サンプル中に存在する結合パートナーとで複合体を形成させる。続いてこの複合体を、検出剤（例えばモノクローナル抗体）を用い上記に記載した任意の手段によって検出することができる。ディップスティック試験は、大量の生物学的サンプルを使用することなく以前の暴露の迅速な表示を提供することができる。

本明細書で用いられる、“結合”は、非共有結合による合体又は2つの別々の分子間の複合体を形成する免疫学的拘束を指す。結合する能力は、例えば複合体形成のための結合定数の決定によって査定することができる。結合定数は、複合体の濃度を成分の生成物濃度で割ったときに得られる値である。一般的には、本発明の文脈では複合体形成のための結合定数が約 10^3 L/molを超えると、2つの化合物は“結合する”と称される。結合定数は、当技術分野で周知の方法を用いて決定することができる。

20

【0026】

本発明の方法及びキットで意図される固相には、結合パートナー、フラビウイルス若しくは前記の群のいずれか特定のメンバー又はその等価物に由来する成分、又は競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質が免疫吸収を用いて結合される任意の表面が含まれる。表面の例にはポリスチレン又は膜が含まれ（ただしこれらに限定されない）、前記膜には、ろ紙担体を有するニトロセルロース膜、ポリテトラフルオロエチレン膜フィルター、酢酸セルロース膜フィルター及び硝酸セルロース膜フィルターが含まれる。もっとも好ましくは、膜はポリスチレンである、膜はニトロセルロース膜である。

30

また別には、本発明の診断方法は、生物学的マイクロチップを用いる自動分析方法を採用することができる。例えば、診断キットは、細胞溶解物の成分を被覆したガラススライドを用いてイムノプロットングを実施するための構造を形成することができる。この診断キットは、その表面に細胞溶解物の成分が固定された生物学的マイクロチップ、適切な緩衝液、検出可能レベルの結合物質を含む標準化サンプル、及び本明細書に記載したような二次検出試薬を含むことができる。

本発明の方法及びキットは、フラビウイルス若しくは前記ファミリーのいずれか特定のメンバー又はその等価物へのヒト若しくは動物の特定の暴露を急性感染期又は回復期に検出することができる。本明細書で用いられる、“急性感染”は、ウイルスが宿主に感染し、活発に複製しているか、及び/又は感染に付随する発熱、発赤、関節痛及び/又は腹痛のような症状を引き起こしている時期を指す。“回復期”は、フラビウイルスがもはや増殖していないか、又は宿主の血液に残存せず、更に結合パートナー（例えば抗体であるが、ただし前記に限らない）を生じるフラビウイルス感染周期の時期を指す。本発明の方法及びキットを用いることによって、暴露は、感染患者で結合パートナーの生成後任意の時期に、又は結合パートナーが以前の感染に由来する患者で検出することができる。

40

【0027】

キット

50

本発明の別の特徴では、被検者のフラビウイルス若しくは前記ファミリーのいずれかのメンバー又はその等価物への暴露を検出するためのキットが提供され、前記キットは以下を含む：

抗フラビウイルスIgAによって捕捉されるフラビウイルス由来成分；

競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質；及び

前記競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、生物学的サンプル中に存在する結合パートナー及び抗フラビウイルスIgAにより捕捉される成分との間で形成される複合体を検出するための少なくとも1つの検出剤。

場合によって、前記キットはまた、追加の部分（例えば洗浄緩衝液、インキュベーション容器、ブロッキング緩衝液、及び前記方法の実施に必要な指示）を含むであろう。

従って、本発明は、被検者のフラビウイルス若しくは前記ファミリーのいずれかのメンバー又はその等価物への暴露を検出するためのキットを提供する。前記キットは、生物学的サンプル中の結合パートナーが抗 Dengue IgA 捕捉フラビウイルス成分と相互作用し、更に競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質と競合することを可能にする、便利な任意の形態であることができる。フラビウイルス特異的又はフラビウイルス特異的結合パートナーが生物学的サンプル中存在することによる結果は、以前のフラビウイルス暴露の指標である。好ましくは、キットは、フラビウイルス又はその等価物の抗フラビウイルスIgA捕捉成分を受容するか又は含むように適応させた、本明細書に記載したような固相を含む。キットはまた、試薬、検出可能なシグナルを提供することができるレポーター分子、及び場合によって使用の指示を含むことができる。キットは、個々の成分を別々に購入することができるモジュール形式であってもよい。

キットは1つ以上のメンバーを含むモジュール式キットであることができ、この場合、少なくとも1つのメンバーは固相であり、前記固相は、フラビウイルス若しくは等価物の抗IgA捕捉フラビウイルス成分、又はフラビウイルス若しくはその等価物に由来する免疫原性成分を含む細胞溶解物を含む。

また別の実施態様では、固相は、1人以上の対象者に由来する、1つ以上のフラビウイルス若しくはその等価物の1つ以上の成分に対する結合パートナーのアレーを含む。

本発明はまた、本発明の方法で使用されるキットの個々の成分を提供する。本発明は、フラビウイルスへの暴露の検出で使用される、フラビウイルスの抗フラビウイルスIgA捕捉成分を含む固相を提供する。ある実施態様では、本発明は、抗フラビウイルスIgAによって捕捉されるフラビウイルスの固定ウイルス成分として若しくはドットプロットとして使用されるか、又はディップスティックとして使用される、フラビウイルス又はその等価物の成分を含む、ウイルス抗原を付着させるためのポリスチレンの96ウェルプレート又はニトロセルロース膜を提供する。好ましくは、前記プレート又は膜は、フラビウイルスの構造的若しくは非構造的タンパク質、フラビウイルス粒子及びそのフラグメント、フラビウイルスに由来する糖タンパク質、脂質及び炭水化物又はその任意の混合物を含む群から選択される成分を含む。固相はまた、マイクロタイタープレート、ガラススライド、又は生物学的マイクロチップでもよく、前記には細胞溶解物の成分が固定される。続いて、これらの固相を生物学的サンプルに委ね、フラビウイルス暴露を検出する。好ましくは、ポリスチレンマイクロタイタープレートを用い、フラビウイルス感染細胞溶解物から抗フラビウイルスIgAを用いる免疫精製によりフラビウイルス抗原を付着させる。

ニトロセルロース膜の事例では、第二の支持体はホルダーであってもよく、前記は固相を保持して、フラビウイルス成分が固定されている固相の操作を改善する。例えば、ニトロセルロース膜はスティック上で保持することができ、このスティックは膜を生物学的サンプル（例えば血清）に浸漬することを可能にする。これは、少量の生物学的サンプルを同時に試験することができるので、キットの成分として有用である。

【0028】

相対的感染リスクの判定

更にまた別の特徴では、本発明はまた、限定された場所（例えば地理的区域、住宅団地、輸送手段、又は施療若しくは判定のための総合施設）で1人以上の対象者がフラビウイ

10

20

30

40

50

ルス若しくは前記ファミリーの任意のメンバー又はその等価物に暴露される相対的リスクを判定する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：

a) 限定された場所の代表的な集団からサンプルを入手する工程；及び

b) 以下の工程を含む方法によって、フラビウイルス若しくは前記ファミリーの任意のメンバー又はその等価物へのサンプル集団の個々のメンバーの暴露を判定する工程；

i) 対象者由来の生物学的サンプルをフラビウイルス又はその等価物に由来する抗フラビウイルスIgA捕捉成分と接触させて、前記成分と前記生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナーとの間で複合体を形成させる工程；

ii) 競合性フラビウイルス特異的免疫学的物質の存在下で、前記生物学的サンプルに存在するフラビウイルス特異的結合パートナーと抗フラビウイルスIgA捕捉成分との間で形成される複合体の存在を決定する工程（ここで複合体の存在はフラビウイルス若しくは前記ファミリーの任意のメンバー又はその等価物への前記対象者の暴露の指標である）；及び

iii) 前記限定された場所での相対的暴露リスクを判定する工程。

リスク分析は、コンピュータ読み取り可能形態のソフトを用いて実施できる。結果として、本発明は更に、フラビウイルス又はその等価物への被検者若しくは被検者群の暴露又は被検者若しくは被検者群の暴露のリスクの分析に適したコンピュータ読み取り可能プログラム及び前記プログラムを含むコンピュータに関する。

本発明の方法又は技術は、フラビウイルス若しくは前記ファミリーの任意のメンバー又はその等価物によって引き起こされる感染の大流行の疫学調査又は血清監視を可能にする。そのような調査は、フラビウイルス疾患の領域における研究を多様な面で促進する価値ある情報を提供する。例えば、疫学的調査は感染の指標の決定に役立つ。そのような情報は、ウイルス流行の原因となったウイルス源の最初の限定場所の特定を可能にする。

更にまた、本発明の技術/方法は、大きな実験室装置を必要とすることなく又は野外条件下ですら、フラビウイルス又はその等価物に感染した被検者の迅速な同定又は隔離を可能にする。そのような情報は、治療を必要とする被検者の特定だけでなく、更なる調査を必要とする地域又は疾患の管理方法（例えば繁殖場所の特定及びその管理）の限定に役立つ。更にまた、本発明の技術は、抗フラビウイルス特異的IgGの存在を決定するために感染動物のモニタリングを可能にする。感染初期におけるIgG力価及びその存在の緩和は二次感染の指標の可能性があり、従って、デング出血熱（DHF）又はデングショック症候群（DSS）のような後続のフラビウイルス感染期のモニタリングに役立つ。

更にまた、本発明の技術は、フラビウイルス属のいずれかの特定メンバーに感染した被検者及び関与する血清型の同定、迅速な検出、更なる感染リスク、感染場所の指摘、及び疾患管理方法の決定のための手段を提供する。

特許文書又は従来技術として提供される他の文献を本明細書で引用したことについて、前記文書又は文献が公知であること、又は前記に含まれる情報が本特許請求の範囲のいずれかの優先日において通常の一般的な知識の部分であることを容認するものと解釈されるべきではない。

本発明で用いた方法の例はこれからより完全に記述されるであろう。しかしながら、以下の記述は単なる例示であると理解されるべきであり、いかなる場合にも上記に記載した発明の普遍性を制限するものと解されるべきではない。

【0029】

（実施態様）

実施例1：デング特異的IgG検出のためのC-ELISA

1. 材料及び方法

1.1 C-ELISA用ウイルス溶解物抗原の調製：デングウイルス抗原溶解物は、デングウイルスの4つの血清型の全てについて文献に記載の方法に従って調製された（Cardosa et al. 2002）。簡単に記せば、2% ウシ胎児血清を含むウイルス維持培養液を用いてデングウイルス（5 m.o.i）をC6/36細胞で増殖させ、細胞変性効果及びウイルスの血清型に応じて4-5日インキュベートした。培養液をデカンタし、感染細胞を含むフラスコをPBSで4回洗

10

20

30

40

50

浄し、1%のtrix100を含む1mLの低張緩衝液で1時間処理し、最後に14000rpmで10分間遠心した。上清を採集し、間接ELISAによって Dengue 群特異的及び血清型特異的モノクローナル抗体に対して試験し、エッペンドルフに500 µLを分配し、使用まで-70 °Cで保存した。

1.2 モノクローナル抗体：汎 Dengue (pan-dengue) 特異的 MAb を2つの別個の供給源 (Abcam, Oxford, UK 及び Immunology Consultants Limited, USA) から入手し、両 MAb を CDC (Atlanta, USA) によって確認した。Dengue 血清型特異的 MAb (den-1、den-2、den-3 及び den-4) は ICL (USA) から入手した。シンガポール単離株の4つの血清型に対する全ての MAb の反応性もまた間接ELISA及びドットプロット免疫アッセイによって判定した。

1.3 試験血清：合計360の血清サンプルをこの調査に用いた。これらのサンプルは、PCR 又はウイルス単離又は血清学的アッセイを用いる Dengue 感染の診断のために種々の診療所及び病院から受け取った。サンプル中の Dengue 反応性抗体 (IgG) の存在は、最初に2つのタイプの Dengue ウイルス IgG 間接ELISA (Pan-Bio, Australia 及び IVD Research Inc, Carlsbad, CA 92008, USA) を用いてスクリーニングし、続いて IgG レベルを段階希釈によるドットプロット EIA を用いて決定した。全てのサンプルは C-ELISA で試験するまで -80 °C で保存した。

1.4 間接ELISA：この調査では3つのタイプの間接ELISAを用いた。市販キット (Pan-Bio, Australia 及び IVD Research Inc, Carlsbad, CA 92008, USA) を血清サンプル中の Dengue ウイルス反応性 IgG 抗体のスクリーニングに用い、試験は製造業者が記載した方法に従って実施した。本施設内の間接ELISAを用いて MAb を判定し、競合ELISAで使用するための最適ウイルス抗原、MAb 及び血清希釈を決定した。間接ELISAは、96ウェルの maxi-sorb ポリスチレンプレートで実施した。アッセイを通して maxi-sorb 96 ウェル平底マイクロタイタープレート (NUNC, Denmark) 及び 100 µL の試薬体積を用いた。ELISA プレートをウェル当たり pH 9.6 の炭酸 / 重炭酸緩衝液 (Fluka, Biochemika, Switzerland) 中の抗ヒト IgA (1 : 500 希釈) の 100 µL で被覆し、37 °C で1時間又は4 °C で一晩インキュベートした。このプレートを洗浄緩衝液 (0.05% の トゥイーン 20 を含む PBS) で1回洗浄し、更に予め決定した最適希釈 (1 : 5000) の PBS 中の抗 Dengue IgA (100 µL) を各ウェルに添加した。このプレートを37 °C で1時間インキュベートし、再び1回洗浄し、予め決定した 1 : 100 の希釈の PBS 中の Dengue 溶解物抗原の 100 µL を各ウェルに添加し、再び37 °C で1時間インキュベートした。インキュベーションに続いて、プレートを4回洗浄し、MAb を C-ELISA 希釈緩衝液 (0.3% の Dengue 抗体陰性ヒト血清及び 0.1% トリトン X100 を含む PBS) 中で 1 : 250 から 64,000 の段階希釈で添加し、室温で30分インキュベートした。6回洗浄した後、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) をコンジュゲートしたヤギ抗マウス IgG (希釈緩衝液で 1 : 3000 に希釈) の 100 µL を各ウェルに添加し、室温で更に30分インキュベートした。HRP を有するヤギ抗マウス IgG の最適希釈 (1 : 3000) は、プレートを段階希釈した MAb で被覆した後で直接ELISAによって決定した。インキュベーション後にプレートを6回洗浄し、100 µL の OPD (オルト-フェニレン-ジアミン、Sigma, USA) を各ウェルに添加し、室温で5 - 10分インキュベートした。更なる発色は、100 µL の H₂SO₄ (2M) を添加することによって停止させ、492nm の波長で最適濃度を読み取った。

1.5 競合ELISA (C-ELISA)：C-ELISA は、Dengue 陽性血清の存在下における Dengue ウイルス共通エピトープに対する MAb の結合の阻止を根拠にする。競合は、MAb 単独で得られる最適濃度表示の減少として検出される。ELISA シグナルの減少量は、血清中の Dengue ウイルス特異的 IgG 力価に比例する。試験は以下の3つの方法で実施される：すなわち、競合ELISA をもたらず抗原捕捉ウェルへの試験血清及び MAb の同時添加、又は30分の試験血清との前インキュベーション後の MAb の添加、又は血清との1時間の前インキュベーション、6回洗浄とその後の MAb の添加 (前記は阻止ELISA 又は B-ELISA と称される)。3つの様式はいずれもこの実験で試験した。

シンガポールで単離された4つの Dengue 血清型をこの実験で用いた。この実験で用いる MAb は、直近の4年間 (2002 - 2005) の間に単離された100を超える単離株 (Den-1、Den-2、Den-3 及び Den-4) をスクリーニングし、いずれとも等しく反応することが見出された。溶解物抗原の最適希釈は、抗 Dengue IgA により以前に捕捉したウェルで抗原捕捉技術を用い

10

20

30

40

50

チェッカーボードタイトレーションによって測定し、溶解物抗原の1:100希釈がアッセイに最適であった。

96ウェルのMaxi-sorb平底マイクロタイタープレートを用い、上記に記載した方法により抗原を捕捉し、4回洗浄してプレートをC-ELISA及びB-ELISAアッセイに使用できるようにした。アッセイのために、45 µLのブロッキング緩衝液(0.3%の Dengue 抗体陰性ヒト血清及び0.1%トリトンX100を含むPBS)を各ウェルに添加し、続いて5 µLの試験血清及びコントロール血清をそれぞれのウェルに添加し、以下のアッセイに従って用いる: 同時C-ELISAのためには、血清を含むウェルに50 µLの特異的MAb(ブロッキング緩衝液で1:1000に希釈)を添加した; 前インキュベーションC-ELISAのためには、30分の血清インキュベーション後に特異的MAbを室温で添加した; B-ELISAのためには、血清を1時間室温でインキュベートし、6回洗浄して特異的MAbを各ウェルに添加した。インキュベーション後(同時C-ELISAについては60分、前インキュベーションC-ELISAについては30分)に、プレートを6回洗浄し、100 µLの1:3000希釈のHRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgG(ブロッキング緩衝液で希釈)を各ウェルに添加した。アッセイの残りの部分は、間接ELISAについて記載したとおり正確に実施した。B-ELISAの場合には、試験血清の添加の後、プレートをRTで1時間インキュベートし、6回洗浄し、続いて100 µLのMAbを各ウェルに1:1000の希釈で添加した。残りの工程はC-ELISAと同様であった。

1.6 MAb及び血清の最適希釈並びに試験様式の確立: 初期試験パラメーター確立のために、2つの Dengue ウイルス-2中和陽性血清(1:640及び1:160)、2つの回復期 Dengue ウイルス血清(PCRによって確認)、2つの黄熱中和陽性血清(1:1280及び1:80)、及び2つのフラビウイルス陰性血清(VNT=1:10)を用いた。最初に、ブロッキング緩衝液中の段階希釈(1:250 - 1:64000)を抗原捕捉プレートに添加し、間接ELISAを実施することによってMAbの力価を測定した(図1a - 2b)。続いて、MAbの2つの希釈を任意に選択し(タイトレーションカーブ上の100%及び75 - 80%のプラトーODに対応する)、段階希釈血清に対してC-ELISA及びB-ELISAによって試験した(図2a、2b及び3)。全てのサンプルをデュプリケートで試験した。コントロールは、血清を含まないがMAb含むウェル(0%阻害)及び血清もMAbも含まないウェル(100%阻害)を含み、存在しない成分はブロッキング緩衝液で置き換えた。

1.7 C-ELISA及びB-ELISAの結果の定量及び統計分析: 血清の存在下におけるエンベロプタンパク質上の特異的エピトープへのMAb結合の阻害はパーセント阻害(PI)として表し、以下の式を用いて平均OD値から計算した:

$$PI = (100 - (\text{試験サンプルのOD} / \text{平均MAb OD}) \times 100)$$

Dengue陰性及び陽性血清サンプルのパーセント阻害値の平均及び標準偏差を算出し、陽性カットオフを確立させた。C-ELISAの比活性及び感度は、ゴールドスタンダード試験としてVNTを用いることによって概算した。

2. 結果

2.1 抗原及びMAbの最適希釈: C-ELISAの要件の1つは非精製及び非濃縮 Dengue 溶解物抗原の使用の可能性であったので、採用した方法は、抗ヒトIgAによって以前にmaxi-sorb ELISAプレートに捕捉された捕捉抗 Dengue IgAを使用することであった。この技術によって、細胞溶解物から Dengue ウイルス抗原を免疫精製及び濃縮し、Dengue特異的IgG(陽性血清から又は特異的MAbから)に対しトラップ抗原として提示することができる。我々は、抗 Dengue IgA特異的捕捉抗原による精製とそれに続く Dengue 特異的MAbを用いる検出(複合体又は血清型特異的)は、MAb捕捉ELISAよりも多くの抗原をピックアップすることを見出した(図1a及び1b)。

2.2 抗原、MAb及び血清の最適希釈: C-ELISAの主要な目的は、フラビウイルス科の他のメンバーから Dengue 特異的抗体を識別することであった。結果的に、この試験の特異性は、種々の濃度で弱陽性(VNTによって規定される) Dengue ウイルス血清と強陽性フラビウイルス血清(黄熱)とを識別するその能力によって測定された。我々は、弱陽性 Dengue 血清と強陽性黄熱血清との間のPI値平均相違として特異性を表した。図2aは、汎 Dengue 特異的MAb(Pan-dengue MAb-Abcam, UK及びPan-dengue MAb-ICL, USA)の力価測定曲線及びそ

れらを更に試験した希釈を提示している。図2bは、血清希釈の関数として差を表した。図2bの結果を基にして、我々は、その後の試験では75%から80%飽和希釈（1：1000）をMAbの最適希釈として採用した。前記濃度のMAbでは、血清の最適希釈はピーク値をもたらす希釈であった。この血清希釈は1：10であった（図3）。2つのMAbが血清とともに同じ希釈でプラトーに達するのは注目に値する（図2a）。以後の試験で、我々は、それらが全ての試験で同様な結果を提示するのを観察した。我々は、その安価さ及び入手の容易さからICL（USA）の汎 Deng MAbを使用することに決めた。

2.3 試験様式：競合ELISA対B-ELISA及びインキュベーション時間：我々は、強、中、弱及び陰性 Deng 血清（VNT = 1：640、1：160、1：40及び < 1：10）によって競合ELISA及び阻止ELISAを比較した。この比較は、最適希釈の血清を用いつつ、血清及びMAbのインキュベーション時間を種々組合せた値を比較することによって拡大した。MAb又は血清を同時に添加するか、又は血清との前インキュベーション後にMAbを添加し、総インキュベーション時間（血清 + MAb）を45分、60分、90分及び120分とした。図4は、競合様式及び阻止様式は類似の感度及び特異性をもたらすことを明瞭に示している。更にまた、血清との30分の前インキュベーション及びMAb添加後の更なる30分のインキュベーションは、MAb及び血清の同時添加よりも最適な特異性及び感度をもたらした。

2.4 陰性カットオフ値： Deng 抗体（IgG及びIgM）について陰性の100血清サンプル（IgM捕捉ELISA及び間接 Deng IgG（Pan-Bio, Australia and IVD Research Inc, Carlsbad, CA 92008, USA）を用いた）、及び64の Deng 陽性血清（VNT > 1：20）、及び Deng IgG 反応性であるが Deng ウイルス VNT については陰性（< 1：10）である25サンプルを用いることによって、カットオフ値をC-ELISA及びB-ELISAについて確立した（図5a、5b）。一緒にした2つの集団について（図5a、5b）、カットオフ値は、任意に平均（9.9）+ 2標準偏差又は阻害（6.6）に設定した。フラビウイルス交差反応性血清サンプルが単独と考えられるときは（図5）、同じカットオフ点は、平均 + 3標準偏差によって与えられる。完全陰性の血清サンプルについては、平均 + 1標準偏差が25%阻害のカットオフ値を提供する。

2.5 VNT及びC-ELISAの比較：図6は、VNT及びC-ELISAによって決定した、2セットの血清サンプルの平均終末点力価を示す。試験の結果間の全体的相関係数は 0.98 であった（n = 64）。全てのサンプルを一緒にすることによって、VNTに対するC-ELISAの特異性及び感度を表1に示すように概算された。

表1は、 Deng 特異的抗体（IgG）の検出についてC-ELISAとウイルス中和試験（VNT）との比較を示す。

【 0 0 3 0 】

表1：ウイルス中和試験（VNT）

		陽性	陰性	合計
C-ELISA	陽性	62	0	62
	陰性	2	100	102
	合計	64	100	164

感度 = 62 / 64 = 1 x 100 = 96.88%、特異性 = 100 / 100 = 1 x 100 = 100%、陽性予想値 = 62 / 62 * 100 = 100、及び陰性予想値 = 100 / 102 * 100 = 98%

C-ELISA及び Deng 二次感染： Deng 二次感染の検出についてC-ELISAの感度及び特異性を2つの通常の技術と比較した：抗 Deng IgM及びIgG比（ < 1.2（二次感染）及び < 1.2（一次感染、Shu et al. 2003））、及び抗 Deng IgG捕捉ELISA（前記は 1：2560HI単位と等価である）（表3）。

表2は、 Deng 二次感染の検出についてC-ELISAと通常の技術（IgM及びIgG比）との比較を示す。

表3は、 Deng 二次感染の検出についてC-ELISAと通常の技術（ Deng 捕捉IgG ELISA）との比較を示す。

【 0 0 3 1 】

表2：抗 Dengue IgM/IgG 比 (1 : 2 及び < 1 : 2)

C-ELISA		陽性	陰性	合計
	陽性	64	8	72
	陰性	51	31	82
	合計	115	39	154

感度 = $72 / 115 \times 100 = 62.60\%$ 、特異性 = $31 / 39 \times 100 = 79.84\%$ 、

陽性予想値 (PPV) = $64 / 72 \times 100 = 88.98\%$ 、及び陰性予想値 = $31 / 82 \times 100 = 37.80\%$

【 0 0 3 2 】

表3：抗 Dengue IgG 捕捉 ELISA

C-ELISA		陽性	陰性	合計
	陽性	54	18	72
	陰性	16	66	82
	合計	70	84	154

感度 = $54 / 70 \times 100 = 77.14\%$ 、特異性 = $82 / 84 \times 100 = 97.62\%$ 、

陽性予想値 = $54 / 72 \times 100 = 75\%$ 、及び陰性予想値 = $62 / 82 \times 100 = 80.49\%$

2.7 C-ELISA 及び Dengue 血清型決定：この試験をまた用いて、Dengue 血清型特異的モノクローナル抗体 Den-1、Den-2、Den-3 及び Den-4 により、血清サンプルに存在する Dengue ウイルスの血清型を識別した。以前に汎 Dengue モノクローナル抗体によって検出された 81 の Dengue 特異的血清サンプルを更に、Dengue 血清型特異的モノクローナル抗体を用いて分析した。3つのタイプの Dengue 血清型特異的MAb；Dengue-2、Dengue-4 及び Dengue-1 を用いた。表4の結果は、80.25% が Den-2 陽性であり、49.38% が Dengue-4、及び 32.10% が Dengue-1 ウイルスにそれぞれ陽性であることを示している。20% の血清が3つの Dengue 血清型 (Den-2、Den-4 及び Den-1) に陽性であり、38.46% のサンプルが Dengue 2 及び Dengue 4 抗体に陽性であり、10.77% の血清が Dengue 2 及び Dengue-1 に対する抗体を有し、一方、12.50% の血清が Dengue-4 及び Dengue 1 ウイルスに陽性であった。血清型特異的MAbの低い反応性のために、血清サンプルは Dengue 血清型3 に対して試験された。

【 0 0 3 3 】

表4：Dengue 血清型決定

サンプル総数	Den-特異的	Den-1 特異的	Den-2 特異的	Den-4 特異的	Den-1 +Den-2 +Den-4	Den-1 +Den-2	Den-1 +Den-4	Den-2 +Den-4
88	81	26	65	46	13	20	18	25
	90.05 %	32.10 %	80.25 %	49.38 %	20%	30.77 %	27.69 %	38.46%

2.8 15分及び一工程競合ELISA：この試験は、競合性モノクローナル抗体がHRP (ICL, USA) とコンジュゲートされたこと、及び試験血清と同時に添加されたことを除いてセクション2.3に記載したとおりに実施された。総インキュベーション時間は90分から15分に、更に二工程から一工程に短縮された。15分、一工程アッセイの結果を前インキュベーションC-ELISA及び同時30分一工程ELISAと比較し、100%類似であることが見出された (表5)。

【 0 0 3 4 】

表5：実施時間の比較

10

20

30

40

	総サンプル	C-ELISA/90分 及び二工程	C-ELISA/30分 及び一工程	C-ELISA/15分 及び一工程
陽性 (Pan-Bio IgG)	98	80 (81.63%)	83 (84.69%)	81 (82.65%)
陰性 (Pan-Bio IgG)	29	1 (3.45%)	3 (10.35%)	1 (3.45%)

2.9 日本脳炎ウイルスに対する競合ELISA：モノクローナル抗体によるC-ELISAはまた、日本脳炎ウイルス（JEV）のような非デングフラビウイルスに対しウイルス特異的モノクローナル抗体（セントリス脳炎ウイルスと交差反応性）を用いて確立された。プレートはセクション2.3に記載したプロトコルを用いて調製され、JEV抗原がデングウイルスに代わって捕捉された。略記すれば、JE溶解物抗原（ナカヤマ株）を用い、抗デングIgAによって捕捉した。抗JE抗体をウサギで作製してアッセイの開発に用い、83のヒト血清サンプルを前記技術によりスクリーニングした。83サンプルのうち、65サンプルがフラビウイルス交差反応性IgGに対して陽性であり、リマインダーの28血清はフラビウイルスに対して陰性であった。結果は、89.23%（58/65）のフラビウイルス反応性血清がJE C-ELISAで陽性であり、一方、89.29%（25/28）のフラビウイルス陰性サンプルはJE-C-ELISAと反応しないことを示した。しかしながら、この技術の有効性の立証はJE確認血清サンプルを用いては実施されなかった。

3. 考察

MAbによる競合ELISAは、デング抗体検出のための迅速で感度の高い特異的な方法であることが証明された。この試験は、間接的ELISAと比較して、種々のフラビウイルスメンバー由来血清からスクリーニングを可能にするという更に別の利点を提供する。VNTと比較して、C-ELISAは高レベルの感度（100%）及び特異性（100%）を提供し、一方、実施時間を7日から2時間未満に短縮する。更にまた、VNTと異なり、C-ELISAは血清の品質による影響を少なくし（細胞傷害性、汚染、溶血又は高脂肪）、他のフラビウイルスメンバーに対する交差反応性レベルを低くすることができる。汚染は以下の2つの態様で血清反応の出現に影響を与ええる：抗体の分解及び抗体の結合を妨げるレベルへのpHの変化。実際には、血清がスクリーニングされる比較的高い希釈（1：20又はそれ以上）が第二の因子を無効にするはずである。

試験血清とMAbの同時添加に較べてB-ELISA及び30分血清前インキュベーションC-ELISAの優越性は、MAbが高度に精製され、血清抗体よりもエピトープに対して高い親和性を有するためにほかならない。前記の2つが同時に添加されるとき、高親和性の血清抗体だけが競合様式で競合し、初期一次応答血清（主として親和性の低い抗体を含む）は陰性を示し、一方、二次応答血清（おそらく高い親和性を有する）はB-ELISAの感度に匹敵するレベルの感度を示した。しかしながら、デングウイルスに特異的なコンジュゲートモノクローナル抗体の使用によって、感度の低いこの技術は排除され、更に同様な結果が得られた。改変技術試験の感度を改善しただけでなく、所要時間を90分から15分に短縮し、二工程を一工程に短縮した。15分一工程C-ELISAは、従来のデングIgG検出技術に途方もないブレイクスルーをもたらし、ただ1つの試験を用いて、疾患初期にデング一次感染及び二次感染を識別するとともに、2つ以上のフラビウイルスが同時循環する場合に特に重要なデング特異的血清監視を実施することができる。デング二次感染の検出及び血清監視には従来2つのタイプの抗デングIgG試験が用いられている。

C-ELISAの微量中和アッセイへの標準化の試みは以下の2つの理由から行われた：（i）VNTは、2つ以上のフラビウイルスが存在するデング感染の唯一利用可能な確証的試験であり、（ii）中和抗体は宿主の免疫状態の最善の予想因子と考えられる。C-ELISAの結果はVNTの結果と極めて良好に一致し、非常に高い正の相関係数（ $r = 0.88$ ）が2つの試験結果間に存在した。

デング特異的抗体の検出は疫学的調査で重要であるだけでなく、患者が以前の感染から

保有している可能性がある Dengue 特異的 IgG の検出により二次感染を診断することができる。WHO によれば、Dengue 感染の初期回復期に 2560 を越える HAI 抗 Dengue IgG を有する血清のみが二次感染と考えられる (WHO マニュアル-1982)。しかしながら、この Dengue 二次感染検出基準は、検出工程が遅いために Dengue 出血熱 (DHF) のような重篤な Dengue 感染形態に患者を移行させる可能性があり、従って適切な患者の管理に応用できない。我々は、我々の新規な技術を WHO の等価試験 (Dengue IgG 捕捉 ELISA、表 3) と比較し、C-ELISA は 77% の感度を有し Dengue IgG 捕捉 ELISA に 97.62% 特異的であることを見出した。更に 18 の Dengue 症例は Dengue 特異的 IgG の存在にもかかわらず、捕捉 IgG は検出に失敗し、一方、Dengue IgG 特異的ではない 16 Dengue 症例は捕捉 IgG ELISA によって検出された。従って、高レベル Dengue 交差反応性 IgG の存在は Dengue 二次感染を意味しない (高レベル Dengue 交差反応性 IgG の存在は 2 つ以上のフラビウイルスが同時に循環している場合の一般的シナリオである)。他方、Dengue 疾患初期の低レベル Dengue 特異的 IgG の存在は、Dengue 二次症例を排除しない。Shu ら (2003) が記載した、IgM 及び IgG 比を用いるまた別の技術 (表 2) は、74.67% の Dengue 患者が二次感染を有することを示した (これは Dengue 捕捉 IgG 及び C-ELISA と比較して極めて高い)。この状況下で、我々は、我々が発明した C-ELISA 技術は、疾患初期の患者血清に存在する Dengue 特異的 IgG を (低レベル及び高レベルの両方において) わずか 15 分以内に検出することによって二次感染を検出する強力なツールであることを見出した。

10

C-ELISA のために開発されたプロトコルは、Dengue 溶解物抗原及び Dengue 特異的モノクローナル抗体を用いて示された。このプロトコルはまた他のフラビウイルスに対しても用いられ、日本脳炎における予備的結果がこの例である。

20

最後に、多様な他の改変及び / 又は変更が、本明細書にアウトラインを示した本発明の範囲を逸脱することなく実施されえることは理解されよう。

【 0 0 3 5 】

参考文献

Gubler, D.J., Sather, G.E. (1988). Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever.. In A. Homma, and J. F. Cunha (ed.), *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue*. p. 291-322.

Gubler, D. J. 1996. Serologic diagnosis of dengue/dengue haemorrhagic fever. *Dengue Bull.* **20**:20-23. **Gubler, D.J. (1998).** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* **11**(3):480-96.

10

Gubler, D.J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* **10**(2):100-3. **Innis, B. L., A. Nisalak, S. Nimmannitya, S. Kusalerdchariya, V. Chongswasdi, S. Suntayakorn, P. Puttisri, and C. H. Hoke. 1989.** An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**:418-427.

20

Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, and J. H. Huang. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**:622-630.

World Health Organization. 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

30

WHO: Fact sheet No: 117. (2002). Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact117.html>

Ooi, E.E., Hart, T.J., Tan, H.C., Chan, S.H. (2001). Dengue seroepidemiology in Singapore. *Lancet.* **357**(9257):685-6.

40

Simmons, M., Jennings, G., Oprandy, J.J. (1993). A rapid membrane based immunobinding assay for the detection of dengue virus in tissue culture. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 24(4):742-6.

Wu, S.J., Paxton, H., Hanson, B., Kung, C.G., Chen, T.B., Rossi, C., Vaughn, D.W., Murphy, G.S., Hayes, C.G. (2000). Comparison of two rapid diagnostic assays for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(1):106-10. 10

Stollar, V., Stevens, T.M., Schlesinger, R.W. (1966). Studies on the nature of dengue viruses. II. Characterization of viral RNA and effects of inhibitors of RNA synthesis. *Virology.* 30(2):303-12.
Newton, E.A., Reiter, P. (1992). A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. *Am J Trop Med Hyg.* 47(6):709-20. 20

Platt, K.B., Linthicum, K.J., Myint, K.S., Innis, B.L., Lerdthusnee, K., Vaughn, D.W. (1997). Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 57(2):119-25.

Scott, T.W., Naksathit, A., Day, J.F., Kittayapong, P., Edman, J.D. (1997). A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. *Am J Trop Med Hyg.* 57(2):235-9. 30

Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K.I., Akatsuka, T., Kurane, I. (2001). Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J Virol Methods.* 92(1):65-70.

Groen, J., Koraka, P., Velzing, J., Copra, C., Osterhaus, A.D. (2000). Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(6):867-71. 40

Halstead, S.B. (1974). Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg.* 23(5):974-82.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 6 】

【図 1】抗 Dengue IgA 捕捉ポリスチレンプレートでの Dengue 溶解物抗原の最適化を示す。

図 1 (A) は、Mab-捕捉 ELISA 及び抗 Dengue IgA 捕捉 ELISA の比較を示す。(a) は細胞上清ウ 50

ウイルス抗原を用いたデングウイルス（血清型2）の検出である。ウイルスは、ウイルス希釈液で 10^6 pfu/mLから始めて 10^2 pfu/mLまで10倍希釈（ Log_{10} ）で希釈された。（b）細胞溶解物抗原を用いたデングウイルス（血清型2）の検出である。両方の事例で、抗デングIgA捕捉ELISAは、MAb-捕捉ELISAよりも良好な性能を示した。

【図2】各血清型に対するモノクローナル抗体のデング溶解物抗原における最適化を示す。MAbの最適希釈の決定。（a）各MAbの2倍段階希釈（1：250から1：32000）を、デング陽性及び2つのデング陰性血清の2倍希釈とともにC-ELISAで反応させた（前記2つのデング陰性血清の1つはデング間接IgG ELISAで陰性であり、他方はIgG ELISA及び黄熱VNTで陽性であったがデングVNTでは陰性であった）。1：2000のMAb希釈を選択した。

【図3】競合型ELISA（C-ELISA）を用いた、デングIgG陽性及び陰性血清の最適化を示す。C-ELISAのための最適血清希釈の決定。陰性、フラビ交差反応性、及び陽性コントロール血清の2倍段階希釈を最適なpan-den MAb希釈（1：2000）とともにC-ELISAで反応させた。必要な血清の体積を最小限にするために、好ましい希釈としてわずかに良好な性能を示した1：20の血清希釈を選択した。

【図4】VNTで確認されたデング陰性及び陽性血清を用いた、C-ELISAの打ち切り点の決定を示す。C-ELISAのための陰性打ち切り点の確立。（a）全てのデングIgG陰性血清（ $n = 100$ ）；（b）VNTによって検出されたデングIgG陽性血清（ $n = 64$ ）。（b）点線は、陰性サンプルと陽性サンプルを区別するための30%阻害（平均+3標準偏差）の打ち切り点を表す。

【図5】3つのデング特異的IgG検出技術（阻止ELISA、同時競合型ELISA及び前インキュベーション競合型ELISA）の比較評価を示す。B-ELISAとC-ELISA（MAbの同時添加及び前インキュベーション添加）との比較。各データ点は4つの値の平均である；中等度陽性（ Log_2 100 TCID₅₀, 8）及び陰性血清。テスト血清及びモノクローナル抗体の同時添加は、前インキュベーションELISA及び阻止ELISA（1：160）と比較して低レベルの性能（陽性1：40）を示した。

【図6】デング確認症例由来の10血清サンプルのトリプレット（1日目、4日目及び20日目に採集）を用いたC-ELISAの結果を示す。デングが確認された（PCRによる）10人の患者の1日目、4日目及び20日目のトリプレットサンプルからデング特異的IgGの存在が検出された。第二及び第三の採集物の抗デング特異的IgGのレベルは、第一の採集物と比較して実質的に増加した。

【図7】C-ELISA及びVNT間の相関係数の結果を示す。抗デングIgG特異的血清サンプルの線形回帰は、C-ELISAとVNT間の高レベルの相関性を示し（ $r = 0.91$ ）、“ゴールドスタンダード”技術と比較して高レベルの特異性を示している。

【図8】30分及び15分の一工程C-ELISAとの間の相関係数を示す。2つのアッセイの線形回帰は高レベルの相関性を示す（ $r = 0.9675$ ）。

10

20

30

【 図 1 (A) 】

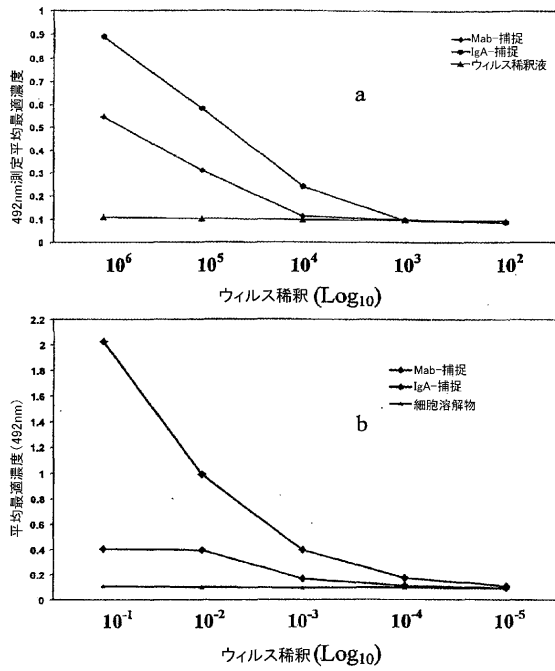


FIGURE 1 (A)

【 図 1 (B) 】

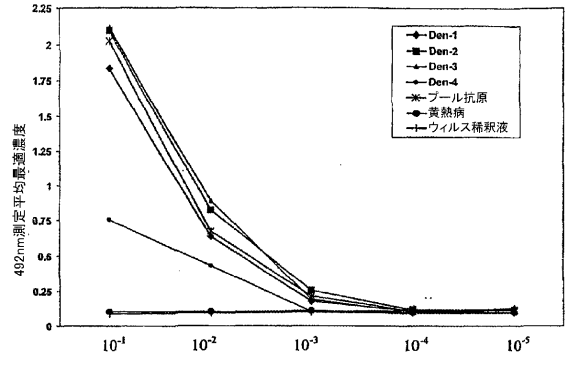


FIGURE 1 (B)

【 図 2 】

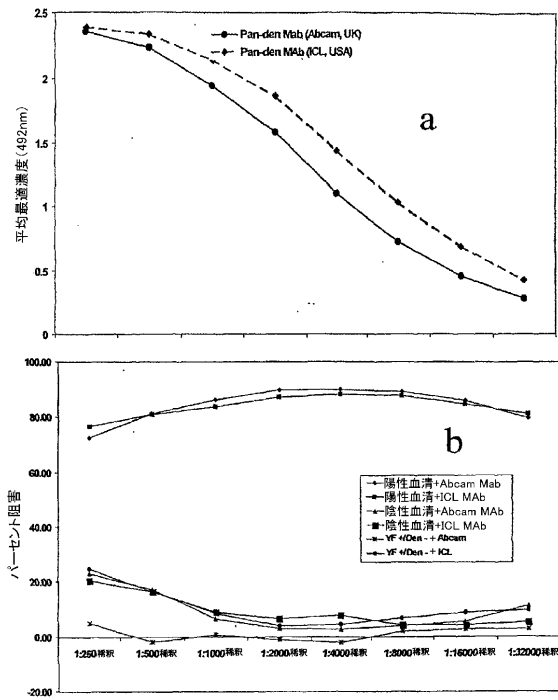


FIGURE 2

【 図 3 】

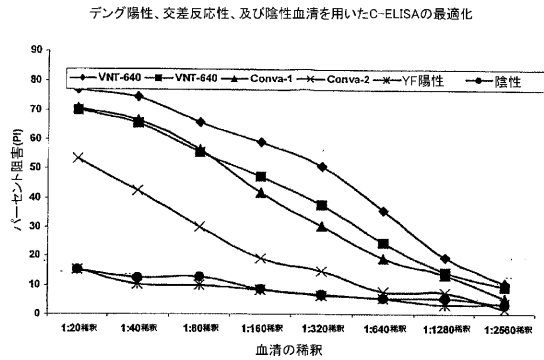


FIGURE 3

【 図 4 】

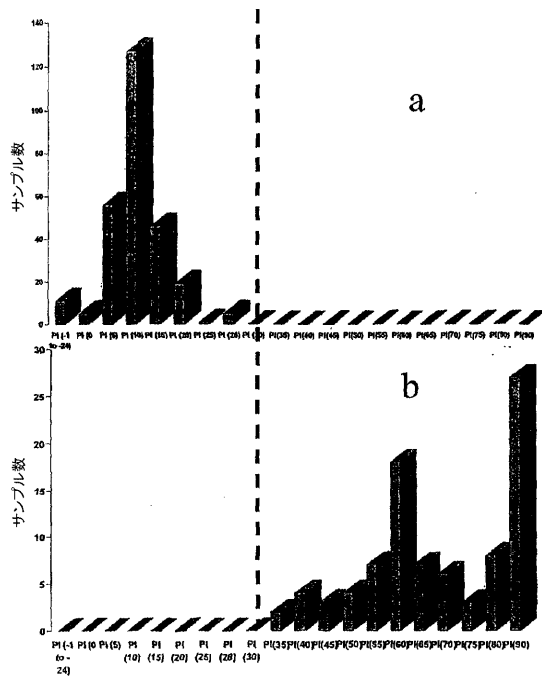


FIGURE 4

【 図 5 】

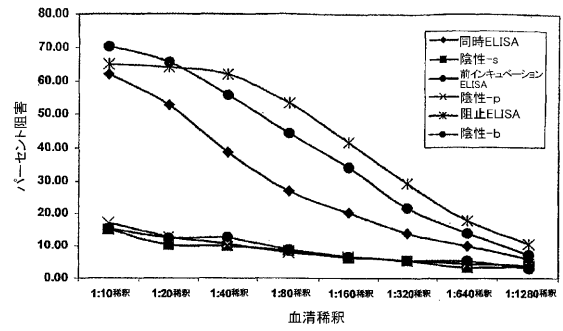


FIGURE 5

【 図 6 】

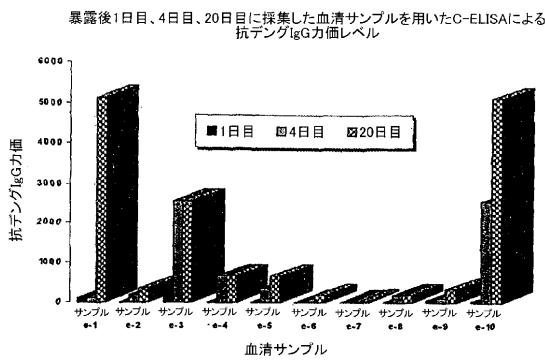


FIGURE 6

【 図 7 】

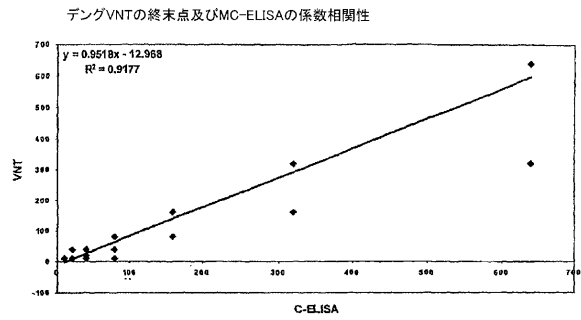


FIGURE 7

【 図 8 】

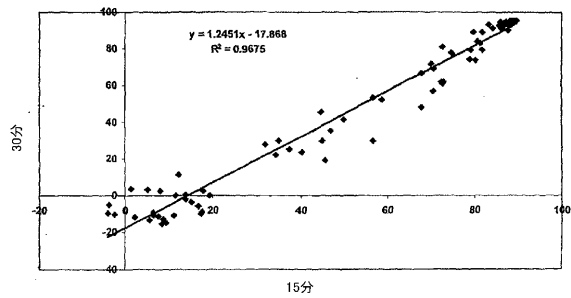


FIGURE 8

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2007/000073
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. G01N 33/569 (2006.01) C07K 1/22 (2006.01) C12N 7/02 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01) C07K 2/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, JAPIO, CA, Medline, Biosis and keywords, immunoassay, ELISA, IgA, flavivirus, dengue fever, yellow fever, West Nile virus, Japanese encephalitis, Murray Valley encephalitis, St. Louis virus, with synonyms and plurals.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BALMASEDA, A. ET AL. 'Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva' Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (2003) Volume 10, Number 2, pages 317-322 See page 318, 'Materials and Methods', particularly the section headed 'Inhibition ELISA'.	1-46
A	TALARMIN, A. ET AL. 'Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever' Journal of Clinical Microbiology (1998) Volume 36, Number 5, pages 1189-1192	
A	GROEN, J. ET AL. 'Diagnostic value of dengue virus-specific IgA and IgM serum antibody detection' Microbes and Infection (1999) Volume 1, pages 1085-1090	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 19 April 2007		Date of mailing of the international search report 27 APR 2007
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6283 3929		Authorized officer BARBARA AKHURST AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : (02) 6283 2343

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG2007/000073

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAZQUEZ, S. ET AL. 'Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections' Journal of Clinical Virology (2005) Volume 33, pages 132-137	
A	PRINCE, H. E. AND LAPE-NIXON, M. 'Evaluation of a West Nile virus immunoglobulin A capture enzyme-linked immunosorbent assay' Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (2005) Volume 12, number 1, pages 231-233	
A	NAWA, M. ET AL. 'Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection' Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (2005) Volume 12, Number 10, pages 1235-1237	
A	LOMBARDI, V. ET AL. 'Early detection of IgA specific antibodies in HIV-1 infected children by peptide-ELISA and peptide time-resolved fluoro-immunoassay' European Journal of Pediatrics (1993) Volume 152, pages 484-489.	
A	WO 99/09414 A (INSTITUT PASTEUR) 25 February 1999	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 クマルシル ビジョン

シンガポール 1 3 8 6 6 7 シンガポール ヘリオス ブロック # 0 6 - 0 5 / 0 8 バイオ
ポリス ウェイ 1 1 ナショナル エンヴァイロンメント エージェンシー エンヴァイロンメ
ント ヘルス インスティテュート内

(72)発明者 リ チェニー シ チェン

シンガポール 4 3 6 8 8 1 シンガポール タンジョン リュ ロード 3 # 0 9 - 0 2 ザ
ウォーターサイド

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ10 QR48 QR55 QR82 QS33

专利名称(译)	用于检测黄病毒特异性抗体的竞争性酶联免疫吸附测定 (C-ELISA)		
公开(公告)号	JP2009530607A	公开(公告)日	2009-08-27
申请号	JP2009500337	申请日	2007-03-16
申请(专利权)人(译)	全国日元威罗恩包换局		
[标]发明人	クマルシルビジョン リチェニーシチェン		
发明人	クマルシル ビジョン リ チェニー シ チェン		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/53 C12Q1/70		
CPC分类号	G01N33/56983 C12N2770/24111 G01N2333/18 Y02A50/53		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/577.B G01N33/53.D C12Q1/70		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS33		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	200601738 2006-03-16 SG		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

开发了使用黄病毒成员特异性免疫物质的竞争性酶联免疫吸附测定 (C-ELISA) , 以检测针对黄病毒成员的特异性抗体, 黄病毒暴露指标。该试验基于黄病毒阳性血清存在下抗黄病毒IgA捕获的黄病毒抗原的包膜蛋白上表位结合的竞争。该测试具有与病毒中和测定 (VNT) 相当的灵敏度, 特异性和速度。C-ELISA是一种通用技术, 可以以各种方式应用。通过略微修改该协议, 有符合C - ELISA的二次感染检测方法或符合C - ELISA的方法, 可用于血清型特异性血清学流行病学调查和/或疫苗评估它会。使用登革热裂解物抗原和登革热特异性单克隆抗体呈现针对C-ELISA开发的方案。该方案可用于其他黄病毒, 日本脑炎的结果显示了这一点。

表1: ウイルス中和試験 (VNT)

	陽性	陰性	合計
C-ELISA	62	0	62
陽性	2	100	102
陰性	64	100	164
合計			