

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6452644号
(P6452644)

(45) 発行日 平成31年1月16日(2019.1.16)

(24) 登録日 平成30年12月21日(2018.12.21)

(51) Int.Cl.			F I		
GO 1 N	33/569	(2006.01)	GO 1 N	33/569	L
GO 1 N	33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 2 1
GO 1 N	33/531	(2006.01)	GO 1 N	33/531	A
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N	7/00	Z N A
C O 7 K	16/08	(2006.01)	C O 7 K	16/08	

請求項の数 5 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2016-98845 (P2016-98845)
(22) 出願日	平成28年5月17日(2016.5.17)
(65) 公開番号	特開2017-207335 (P2017-207335A)
(43) 公開日	平成29年11月24日(2017.11.24)
審査請求日	平成30年5月7日(2018.5.7)

(73) 特許権者	509352945 田中貴金属工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目7番3号
(74) 代理人	110002000 特許業務法人栄光特許事務所
(72) 発明者	鈴木 啓太 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内
(72) 発明者	岩本 久彦 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内
審査官	海野 佳子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジカウイルス検出用免疫クロマト分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部とを含む、検体中のジカウイルスを検出するための免疫クロマト分析装置であって、

前記標識物質保持部及び前記検出部が、配列番号1で示されるジカウイルスの非構造性タンパク質であるNS1を認識する抗体を含有する、免疫クロマト分析装置。

【請求項2】

前記標識物質保持部及び前記検出部の少なくとも一方が、前記非構造性タンパク質であるNS1の全アミノ酸配列中に存在する配列番号2～4で示される3つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体を含有する、請求項1に記載の免疫クロマト分析装置。

【請求項3】

前記標識物質保持部及び前記検出部が、前記非構造性タンパク質であるNS1の全アミノ酸配列中に存在する配列番号2～4で示される3つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体を含有する、請求項2に記載の免疫クロマト分析装置。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項に記載の免疫クロマト分析装置と、検体を希釈して展開するための検体希釈液とを含む、免疫クロマト分析キット。

【請求項5】

10

20

請求項 4 に記載の免疫クロマト分析キットを用いて、検体中のジカウイルスを検出する免疫クロマト分析方法であって、以下の工程 (1) ~ (4) を含む免疫クロマト分析方法

(1) 検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料として、試料添加部に添加する工程

(2) 標識物質保持部に保持されているジカウイルスの非構造性タンパクである NS 1 を認識する抗体により、検体中のジカウイルスを認識させる工程

(3) 前記検体及び前記抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

(4) 展開された前記移動相中のジカウイルスを、検出部に含まれるジカウイルスの非構造性タンパク質である NS 1 を認識する抗体により検出する工程

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ジカウイルスを検出するための免疫クロマト分析装置、免疫クロマト分析キットおよび免疫クロマト分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ジカウイルス感染症を引き起こすジカウイルス (Zika virus) は、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス等とともにフラビウイルス科 (Flavivirus) に属するウイルスである。ジカウイルスはヒトを含む脊椎動物に広く分布し、蚊やダニといったベクターを介して伝播することが知られている。また、ジカウイルスは、母子垂直感染や性的接触による感染、血液感染等により伝播することも報告されている。

20

【0003】

ヒトがジカウイルスに感染すると、3 ~ 12 日の潜伏期間の後、急性の発熱 (いわゆるジカ熱) が起こり、また非化膿性の結膜炎、頭痛、筋痛、関節痛等の種々の症状が現れる。

【0004】

ジカウイルス感染症に関しては、現在のところ有効な薬剤やワクチンは開発されていない。一方、ジカウイルス感染の拡大を防止するため、ジカウイルス感染の早期診断が望まれている。

30

【0005】

従来、ジカウイルス感染の診断は、血液検査、尿検査、唾液検査において、ジカウイルスの RNA を検出することにより行われてきた (非特許文献 1)。また、血清学的手法として、ジカウイルス感染者が体内に有するジカウイルスに対する抗体 (IgM や IgG) を ELISA や蛍光抗体法で検出することも行われてきた (非特許文献 2)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Chen, LH; Hamer, DH (2 February 2016) . " Zika Virus : Rapid Spread in the Western Hemisphere . " Annals of Internal Medicine

40

【非特許文献 2】Hayes, Edward B. " Zika Virus Outside Africa " . Emerging Infectious Diseases 15 (9) : 1347 - 50 .

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、上記 RNA の検出によるジカウイルス感染の診断には、特別な設備や試

50

薬等が必要であるためコストがかかり、またこれらの検査には半日から一日程度の時間がかかり、検査結果が得られるまで長時間を要していた。

【 0 0 0 8 】

また、上記のジカウイルスに対する抗体を検出する方法は、ジカウイルスを直接検出するものではなく、ジカウイルスに感染してから所定期間経過後にヒトの体内で作られる I g M や I g G を検出することにより、間接的にジカウイルス感染の診断を行うものであるため、ジカウイルス感染初期の診断としては不適であった。また当該方法は、ジカウイルスを直接検出するものではないため、例えば、ジカウイルスと同じフラビウイルス科に属するデングウイルスやウエストナイルウイルスの感染と区別して診断することは難しかった。そのため、ジカウイルスを直接検出することにより、感染初期からジカウイルス感染の診断を行う方法が求められている。

10

【 0 0 0 9 】

そこで本発明は、ジカウイルス感染の診断を簡易かつ迅速に行うことのできる免疫クロマト分析装置を提供することを目的とする。また、ジカウイルス自体を直接検出することにより、ジカウイルス感染を早期に発見でき、かつ、ジカウイルス以外のフラビウイルス科に属するウイルスに対する交叉反応が軽減され、ジカウイルスを特異的に検出することのできる免疫クロマト分析装置を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、免疫クロマト分析装置において、ジカウイルスの非構造性タンパク質である NS 1 を認識する抗体を用いることによつて、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成させた。

20

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は以下の通りである。

1. 試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部とを含む、検体中のジカウイルスを検出するための免疫クロマト分析装置であつて、

前記標識物質保持部及び前記検出部が、配列番号 1 で示されるジカウイルスの非構造性タンパク質である NS 1 を認識する抗体を含有する、免疫クロマト分析装置。

2. 前記標識物質保持部及び前記検出部の少なくとも一方が、前記非構造性タンパク質である NS 1 の全アミノ酸配列中に存在する配列番号 2 ~ 4 で示される 3 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体を含有する、前記 1 に記載の免疫クロマト分析装置。

30

3. 前記標識物質保持部及び前記検出部が、前記非構造性タンパク質である NS 1 の全アミノ酸配列中に存在する配列番号 2 ~ 4 で示される 3 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体を含有する、前記 2 に記載の免疫クロマト分析装置。

4. 前記 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の免疫クロマト分析装置と、検体を希釈して展開するための検体希釈液とを含む、免疫クロマト分析キット。

5. 前記 4 に記載の免疫クロマト分析キットを用いて、検体中のジカウイルスを検出する免疫クロマト分析方法であつて、以下の工程 (1) ~ (4) を含む免疫クロマト分析方法

40

(1) 検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料として、試料添加部に添加する工程

(2) 標識物質保持部に保持されているジカウイルスの非構造性タンパク質である NS 1 を認識する抗体により、検体中のジカウイルスを認識させる工程

(3) 前記検体及び前記抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

(4) 展開された前記移動相中のジカウイルスを、検出部に含まれるジカウイルスの非構造性タンパク質である NS 1 を認識する抗体により検出する工程

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

50

本発明は、免疫クロマト分析装置において、ジカウイルスが有する非構造的タンパク質であるNS1を認識する抗体を使用することによって、ジカウイルス以外の他のウイルス等との交叉反応を抑え、ジカウイルスを迅速かつ特異的に検出することができる。特に、ジカウイルスのNS1の全アミノ酸配列中に存在する配列番号2～4で示される3つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体を用いることによって、ジカウイルスをより特異的に検出できる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明の一実施形態の免疫クロマト分析装置の構造を説明するための断面図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下に、本発明を実施するための形態を説明する。

【0015】

なお、本明細書において、「固定」とは、抗体が移動しないように膜等の担体に配置されていることを意味し、「保持」とは、膜等の担体の中または表面を移動可能に配置されることを意味する。

【0016】

また、本明細書において、抗体が特定のタンパク質を「認識する」とは、抗原抗体反応により抗体が当該タンパク質の有するアミノ酸配列の一部と結合することを示す。また、抗体が特定のアミノ酸配列を「認識する」とは、抗体が、特定のアミノ酸配列の全体又はその一部と抗原抗体反応により結合することを示す。

20

【0017】

<検体>

本発明の免疫クロマト分析装置は、検体中のジカウイルスを検出する。本発明に用いることのできる検体は、ジカウイルスを含む可能性のあるものであれば特に制限されない。具体的には、ジカウイルス感染者の血清、血漿、全血、精液、髄液等が挙げられる。好ましくは、迅速診断の観点から、全血、血清、及び血漿である。

【0018】

<免疫クロマト分析装置>

30

本発明の、ジカウイルスを検出するための免疫クロマト分析装置は、検体を含有する試料（以下、単に試料ともいう）を添加する試料添加部と、標識物質を保持する標識物質保持部と、ジカウイルスを検出する検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、検出部を通過した液体を吸収する吸収部とを備え、標識物質保持部及び検出部が、ジカウイルスの非構造的タンパク質であるNS1を認識する抗体を含有することを特徴としている。

【0019】

（抗体）

本発明の免疫クロマト分析装置に使用する抗体は、ジカウイルスの非構造的タンパク質であるNS1（non structural protein NS1，以下単にNS1ともいう）を認識する抗体である。

40

【0020】

ジカウイルスのNS1は、配列番号1で示される352個のアミノ酸からなり、他のフラビウイルスと同様にウイルスの複製等に関わるタンパク質である事が示唆されているが、詳細な機能、構造は不明である。

【0021】

本発明においては、ジカウイルスが有する種々のタンパク質の中でも特にNS1を認識する抗体を用いることによって、ジカウイルス以外の他のウイルス等との交叉反応を抑え、ジカウイルスを特異的に検出することができるものである。本発明における抗体によれば、例えば、ジカウイルスと同じフラビウイルス科に属する、デングウイルス等に対する交叉反応を軽減できる。具体的には、配列番号6で示されるデングウイルスの非構造的タ

50

ンパク質のNS1に対しては、後述する実施例に示すように交叉反応を示さない。

【0022】

特に、免疫クロマト分析装置の標識物質保持部及び検出部の少なくとも一方が、NS1を認識する抗体の中でも特に、NS1の全アミノ酸配列中に存在する配列番号2～4で示される3つのアミノ酸配列のうち少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体を含有することが好ましい。上記アミノ酸配列の少なくとも1つを認識する抗体を用いることによって、ジカウイルス以外の他の抗原との交叉反応をより低減することができ、ジカウイルスをより特異的に検出することができる。

【0023】

配列番号2のアミノ酸配列(ENGVQLTVVV GSVKNPMWRG PQR L PVPVNE LPHGWKAWGK)はNS1の全アミノ酸配列のうち81番目から120番目までのアミノ酸配列に該当し、配列番号3のアミノ酸配列(SYFVRAAKT N NSFVVDGDTL KECPLEHRAW NSF)はNS1の全アミノ酸配列のうち121番目から153番目までのアミノ酸配列に該当し、配列番号4のアミノ酸配列(GP LSHHNTREGY RTQVKGPWHS EELEIRFEEC PG TKVYV)はNS1の全アミノ酸配列のうち249番目から287番目までのアミノ酸配列に該当する。また、よりC末端側であり、NS1の全アミノ酸配列のうち291番目から320番目までのアミノ酸配列に該当する配列番号5(CGTRGPSLSRSTTASGRVIEE WCCRECTMPP)を認識する抗体を用いた場合でも検出は可能だが、他のウイルスNS1タンパク質と相同性が高い為、特異性に欠けることが推測される。

10

20

【0024】

本発明における抗体としては、例えば、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体等の天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、ヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体、ファージディスプレイによって作製された抗体およびこれらの結合性断片が含まれる。感度の観点からモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0025】

(抗体の作製方法)

ジカウイルスのNS1を認識する抗体の作製方法について、以下例示的に説明をする。

30

【0026】

抗体産生動物種としては、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等を使用できる。免疫グロブリンとしては、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDのいずれでもよい。

【0027】

一実施態様において、免疫原としてのジカウイルスNS1ペプチドは、既知の一般的な製造方法によって製造することができる。すなわち、ジカウイルスから抽出精製したジカウイルスNS1ペプチド、またはクローニングされたジカウイルスNS1の遺伝子を大腸菌などの宿主で遺伝子工学的に発現させて抽出精製したジカウイルスNS1ペプチド、さらにはジカウイルスNS1ペプチドの一部を構成するポリペプチドを免疫原として用いることができる。

40

【0028】

モノクローナル抗体は、常法に従って、上記免疫原で免疫したマウスの脾臓細胞と骨髄腫細胞をハイブリッドさせ、目的とする抗体を産生するハイブリドーマを選択し、このハイブリドーマから産生されてくるモノクローナル抗体を取得する[例えば、ケーラーとミルスタインの技法(Nature 256(1975)495-497)を参照]。ポリクローナル抗体は、常法により、上記免疫原を産生動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等)に免疫して得た抗血清中から目的とする抗体を分離することにより得られる。

【0029】

50

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の上記免疫原に対する反応性を、例えばELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行うことができる。

【0030】

このハイブリドーマは、培地（例えば、10%牛胎児血清を含むDMEM）を用いて培養し、その培養液の遠心上清をモノクローナル抗体溶液とすることができる。また、本ハイブリドーマを由来する動物の腹腔に注入することにより、腹水を生成させ、得られた腹水をモノクローナル抗体溶液とすることができる。モノクローナル抗体は、単離および/または精製されることが好ましい。

10

【0031】

このようにして、ジカウイルスのNS1を認識する抗体を作製することができる。

【0032】

なお、ジカウイルスのNS1を認識する抗体は市販のものを購入して使用することもできる。例えば、clone 2801116 (Monoclonal Antibody To Zika Virus Ns1 Protein, Aalto Bio Reagent社) や clone 2901126 (Monoclonal Antibody To Zika Virus NS1 Protein, Aalto Bio Reagent社) 等を購入し、使用できる。

【0033】

また、ジカウイルスのNS1を認識する抗体のうち、特に、配列番号2~4で示される3つのアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体は、例えば、上記のようにジカウイルスのNS1を認識する抗体を作製した場合、配列番号2~4で示される3つのアミノ酸配列に相当するペプチド断片を用いたELISA試験やウエスタンブロッティング等により、上記ジカウイルスのNS1を認識する抗体を産生するハイブリドーマの中から、配列番号2~4で示される3つのアミノ酸配列に対してより強い反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより、入手し、使用できる。

20

【0034】

(免疫クロマト分析装置)

次に、図面を参照しながら本発明の免疫クロマト分析装置の一実施形態について説明する。

30

【0035】

本発明の免疫クロマト分析装置の一実施形態としては、図1に示すように、試料添加部(1)、標識物質保持部(2)、クロマトグラフ媒体部(3)、検出部(4)、吸収部(5)、パッキングシート(6)から構成されている。

【0036】

試料添加部(1)は、免疫クロマト分析装置において、検体を含有する試料を添加する部位である。試料添加部(1)では試料が迅速に吸収されるが、速やかに試料が移動していくような性質の多孔質シートで構成することができる。多孔質シートとしては、例えば、セルロース濾紙、グラスファイバー、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロン、綿布等が挙げられる。

40

【0037】

標識物質保持部(2)には、後述する標識物質で標識化された標識抗体(以下、単に、標識抗体ともいう)が保持されており、上記標識抗体が検体中の被検出物質と結合する部位である。この標識抗体はジカウイルスのNS1を認識する抗体であり、標識物質保持部(2)内を試料が移動する際に、上記抗体と検体中の上記ジカウイルスのNS1とが結合する。

【0038】

標識物質保持部(2)には、グラスファイバー、セルロース等の膜が通常使用される。

【0039】

50

標識物質保持部(2)の標識抗体の含有量は、通常 $0.05\mu\text{g}/\text{装置} \sim 0.5\mu\text{g}/\text{装置}$ であり、好ましくは $0.05\mu\text{g}/\text{装置} \sim 0.25\mu\text{g}/\text{装置}$ であり、より好ましくは $0.07\mu\text{g}/\text{装置} \sim 0.1\mu\text{g}/\text{装置}$ である。また、標識物質保持部(2)の単位面積当たりの標識抗体の含有量は、通常 $0.05\mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 1.0\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、好ましくは $0.1\mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、より好ましくは $0.17\mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 0.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。

【0040】

免疫クロマト分析において抗体を標識する標識物質としては、一般的に酵素等も使用されるが、被検出物質の存在を目視で判定するのに適していることから、標識物質としては、不溶性担体を用いることが好ましい。すなわち本発明において、標識物質保持部(2)が含有する抗体としては、ジカウイルスのNS1を認識する抗体を不溶性担体に感作することにより標識化した標識抗体を使用することが好ましい。なお、ジカウイルスのNS1を認識する抗体を不溶性担体に感作する手段は、公知の方法に従えばよい。

10

【0041】

標識物質としての不溶性担体には、金、銀もしくは白金等の金属粒子、酸化鉄等の金属酸化物粒子、硫黄等の非金属粒子及び合成高分子よりなるラテックス粒子、またはその他の不溶性担体を用いることができる。上述のように不溶性担体は、被検出物質の存在を視覚的に判定するのに適した標識物質であり、目視による判定を容易にするためには有色であることが好ましい。金属粒子及び金属酸化物粒子は、それ自体が粒径に応じた特定の自然色を呈するものであり、その色彩を標識として利用することができる。

20

【0042】

標識物質としての不溶性担体は、特に金粒子が、検出が簡便であり、かつ凝集しづらく非特異的な発色が起こりにくい点で好ましい。金粒子の平均粒径は、例えば $10\text{nm} \sim 250\text{nm}$ 、好ましくは $35\text{nm} \sim 120\text{nm}$ である。平均粒径は、透過型電子顕微鏡(TEM:日本電子(株)製、JEM-2010)により、撮影した投影写真を用いて無作為に100個の粒子の投影面積円相当径を計測し、その平均値から算出することができる。標識物質保持部における金粒子の含有量は、標識物質保持部の単位面積あたり、通常 $0.006\mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 0.42\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、好ましくは $0.01\mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 0.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、より好ましくは $0.01\mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 0.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。上記範囲に設定することによって、標識された粒子が分散したまま展開し、抗体の認識部位が阻害されず高感度化できるからである。

30

【0043】

クロマトグラフ媒体部(3)は、クロマトグラフの展開部位である。クロマトグラフ媒体部(3)は、毛管現象を示す微細多孔性物質からなる不活性の膜である。クロマトグラフで使用される検出試薬、固定化試薬または被検出物質などと反応性を有しないという観点から、また、本発明の効果が向上するという観点から、例えば、ニトロセルロース製のメンブレン(以下、ニトロセルロースメンブレンともいう)や、酢酸セルロース製のメンブレン(以下、酢酸セルロースメンブレンともいう)が好ましく、ニトロセルロースメンブレンがさらに好ましい。なお、セルロース類メンブレン、ナイロンメンブレン及び多孔質プラスチック布類(例えばポリエチレン、ポリプロピレン等)も使用可能である。

40

【0044】

ニトロセルロースメンブレンとしては、ニトロセルロースが主体で含まれていればよく、純品またはニトロセルロース混合品などニトロセルロースを主材とするメンブレンを使用することができる。

【0045】

ニトロセルロースメンブレンは、さらに、毛細管現象を促進させる物質を含有させることもできる。当該物質としては、膜面の表面張力を低下させ、親水性をもたらす物質が好ましい。例えば、糖類、アミノ酸の誘導體、脂肪酸エステル、各種合成界面活性剤またはアルコール等の両親媒性の作用を有する物質であって、被検出物質の移動に影響がなく、標識物質の発色に影響を及ぼさない物質が好ましい。

50

【0046】

ニトロセルロースメンブレンは、多孔性であって、毛細管現象を示す。この毛細管現象の指標は、吸水速度（吸水時間：capillary flow time）を測ることで確認できる。吸水速度は、検出感度と検査時間に影響する。

【0047】

上記のようなニトロセルロースメンブレンや酢酸セルロースメンブレンに代表されるクロマトグラフ媒体部（3）の形態及び大きさは特に制限されるものではなく、実際の操作の点及び反応結果の観察の点において適切であればよい。

【0048】

さらに操作をより簡便にするためには、クロマトグラフ媒体部（3）の裏面に、プラスチックなどよりなる支持体を設けることが好ましい。この支持体の性状は特に制限されるものではないが、目視判定によって測定結果の観察を行う場合には、支持体は、標識物質によりもたらされる色彩と類似しない色彩を有するものであることが好ましく、通常、無色又は白色であることが好ましい。

10

【0049】

また、クロマトグラフ媒体部（3）上には、非特異的な吸着により分析の精度が低下することを防止するため、必要に応じて、クロマトグラフ媒体部（3）に、公知の方法でブロッキング処理を行うことができる。一般にブロッキング処理は、ウシ血清アルブミン、スキムミルク、カゼインまたはゼラチン等のタンパク質が好適に用いられる。かかるブロッキング処理後に、必要に応じて、例えば、Tween 20、Triton X-100またはSDS等の界面活性剤を1つ又は2つ以上組み合わせて洗浄してもよい。

20

【0050】

検出部（4）は、上記クロマトグラフ媒体部（3）上の任意の位置に形成されており、ジカウイルスのNS1を認識する抗体を含有する。検出部（4）へのジカウイルスのNS1を認識する抗体の固定化は、常法に従って行うことができる。

【0051】

検出部（4）では、クロマトグラフ媒体部上を移動相として通過した検体中のジカウイルスが、検出部（4）に固定されているジカウイルスのNS1を認識する抗体と、標識物質が結合したジカウイルスのNS1を認識する抗体とによってサンドイッチ状に挟まれるように特異的に反応結合する。

30

【0052】

検出部（4）に含有される、ジカウイルスのNS1を認識する抗体の含有量は、通常0.1 μg ~ 3.0 μg であり、好ましくは0.3 μg ~ 2.0 μg であり、より好ましくは0.3 μg ~ 1.0 μg である。また、検出部（4）の単位面積当たりの、ジカウイルスのNS1を認識する抗体の含有量は、通常0.04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、好ましくは0.125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ~ 0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、より好ましくは0.125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ~ 0.42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。

【0053】

吸収部（5）は、クロマトグラフ媒体部（3）の末端に、検出部（4）を通過した検体や展開液等の液体を吸収させるために設置される。本発明において、吸収部（5）は、例えばグラスファイバー、パルプ、セルロースファイバー等、またはそれら不織布にアクリル酸重合体等の高分子、エチレンオキサイド基等を持つ親水性薬剤を含有させたものが用いられ、特に好ましくはグラスファイバーである。

40

【0054】

バックグシート（6）は、基材である。片面に粘着剤を塗布したり、粘着テープを貼り付けたりすることにより、片面が粘着性を有し、該粘着面上に試料添加部（1）、標識物質保持部（2）、クロマトグラフ媒体部（3）、検出部（4）、および吸収部（5）の一部または全部が密着して設けられている。バックグシート（6）は、粘着剤によって試料液に対して不透過性、非透湿性となるようなものであれば、基材としては、特に限定されない。

50

【 0 0 5 5 】

本発明の免疫クロマト分析装置は、製品化する前に、通常乾燥処理に施される。乾燥温度は例えば 20 ~ 50 、乾燥時間は 0 . 5 時間 ~ 1 時間である。

【 0 0 5 6 】

本発明の免疫クロマト分析装置において、標識物質保持部及び検出部の少なくとも一方は、ジカウイルスの全アミノ酸配列中に存在する配列番号 2 ~ 4 で示される 3 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体を含有することが好ましい。上記アミノ酸配列の少なくとも 1 つを認識する抗体を用いることによって、他の抗原との交叉反応をより低減でき、ジカウイルスをより特異的に検出することができる。

【 0 0 5 7 】

このとき、標識物質保持部及び検出部の一方のみが、ジカウイルスの全アミノ酸配列中に存在する配列番号 2 ~ 4 で示される 3 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体を含有するとしても、標識物質保持部及び検出部のうち上記抗体を含有しない方は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を認識する抗体を含有すればよい。

【 0 0 5 8 】

より好ましくは、標識物質保持部及び検出部が、いずれも、ジカウイルスの全アミノ酸配列中に存在する配列番号 2 ~ 4 で示される 3 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体を含有する場合である。

【 0 0 5 9 】

なお、標識物質保持部及び検出部が含有する抗体のいずれもが、ジカウイルスの全アミノ酸配列中に存在する配列番号 2 ~ 4 で示される 3 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体であり、かつ、標識物質保持部及び検出部が含有する上記抗体の両方とも同じ配列番号で示されるアミノ酸配列を認識する抗体であってもよい。この場合、標識物質保持部が含有する抗体と検出部が含有する抗体は、同じ配列番号で示されるアミノ酸配列の中で、異なる箇所のアミノ酸配列と結合することになる。

【 0 0 6 0 】

本発明の免疫クロマト分析装置は、検体中に存在するジカウイルスを検出すると同時に、検体中に存在するジカウイルスに対する抗体（ヒト I g M 及び / 又はヒト I g G ）を検出できるように、以下に説明するように装置を設計することもできる。

【 0 0 6 1 】

本発明の免疫クロマト分析装置において、標識物質保持部（ 2 ）には、ジカウイルスの NS 1 を認識する抗体の他に、別途、検体中に存在する抗体（ヒト I g M 及び / 又はヒト I g G ）を認識する抗体を含有させる。

【 0 0 6 2 】

この場合、さらに、上記クロマトグラフ媒体部（ 3 ）上に、配列番号 1 で示されるジカウイルスの NS 1 の全アミノ酸配列、又は配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 1 個 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を含むペプチド、又はこれらのペプチドに他のタンパク質等を付加したペプチド等を含有する検出部を、上述した検出部（ 4 ）とは別途設ける。好ましくは、上述した配列番号 2 ~ 4 で示されるアミノ酸配列からなるペプチドの少なくとも 1 種のペプチド、又は配列番号 2 ~ 4 で示されるアミノ酸配列の 1 個 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を含むペプチド、又はこれらのペプチドに他のタンパク質等を付加したペプチドの少なくとも 1 種のペプチドを含有する検出部を、上述した検出部（ 4 ）とは別途設ける。

【 0 0 6 3 】

免疫クロマト分析装置がこのような構成を有することにより、検体中に存在するジカウイルスに対する抗体を検出することも可能となる。

【 0 0 6 4 】

これは、例えば、ジカウイルス感染者から採取した血液等を検体とした場合、当該検体中に含まれるジカウイルスの NS 1 を認識する抗体（ヒト I g M 及び / 又はヒト I g G ）

10

20

30

40

50

を、標識物質保持部(2)が含有するヒトIgM及び/又はヒトIgGを認識する抗体に認識させ、さらに、クロマトグラフ媒体部(3)上に検出部(4)とは別途設けられた上記検出部が含有する上記ペプチドに、上記ヒトIgM及び/又はヒトIgGを認識する抗体が結合することによって、検体中に存在するジカウイルスに対する抗体を検出することができるというものである。

【0065】

このように、上記免疫クロマト分析装置によれば、検体中に存在するジカウイルスを直接検出できると同時に、検体中に存在するジカウイルスに対する抗体(ヒトIgM及び/又はヒトIgG)を検出することで間接的にもジカウイルス感染を鑑別できる。

【0066】

検体中に存在するジカウイルスとそれに対する抗体の比率は、ジカウイルスに感染してからの日数等にも依存するため、両者を同時に検出することにより、ジカウイルス感染からの経過日数を大まかに推定することが可能である。

【0067】

なお、上述のように、標識物質保持部がジカウイルスのNS1を認識する抗体とジカウイルスに対する抗体を認識する抗体とを両方含有する場合、それぞれの抗体は、両抗体が相互に反応して凝集することのない抗体を選択することが好ましい。両抗体が相互に反応して凝集する場合は、標識物質保持部から検出部に至るまで両抗体が接触しないように、本装置を任意に設計すればよい。

【0068】

<免疫クロマト分析キット>

本発明の免疫クロマト分析キットは、上記の免疫クロマト分析装置と、検体を希釈して展開するための検体希釈液とを含む。

【0069】

本発明の免疫クロマト分析キットにおいて、検体希釈液は、展開液としても使用することができるものである。検体希釈液は通常溶媒として水を用い、これに緩衝液、塩、および非イオン性界面活性剤を含有する。さらに、例えば抗原抗体反応の促進または非特異的反応を抑制するためのタンパク質、高分子化合物(PVP等)、イオン性界面活性剤もしくはポリアニオン、または、抗菌剤、キレート剤等の1種もしくは2種以上を加えてもよい。

【0070】

検体希釈液を展開液として用いる場合には、検体と展開液を予め混合したものを試料として、試料添加部に供給・滴下して展開させることもできるし、先に検体を含有する試料を試料添加部に供給・滴下した後、展開液を試料添加部に供給・滴下して展開させてもよい。

【0071】

<免疫クロマト分析方法>

本発明の免疫クロマト分析方法は以下の工程(1)~(4)を含み、上記の免疫クロマト分析キットを用いて検体に含まれるジカウイルスを検出する。

(1) 検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料として、試料添加部に添加する工程

(2) 標識物質保持部に保持されているジカウイルスの非構造的タンパクであるNS1を認識する抗体により、検体中のジカウイルスを認識させる工程

(3) 前記検体及び前記抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

(4) 展開された前記移動相中のジカウイルスを、検出部に含まれるジカウイルスの非構造的タンパク質であるNS1を認識する抗体により検出する工程

各工程について以下に説明する。

【0072】

(1) 検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料として、試料添加部に添加する工程

10

20

30

40

50

工程(1)では、第1に、検体を、測定精度を低下させることなく、免疫クロマトグラフ媒体中をスムーズに移動する程度の濃度に、検体希釈液で調整または希釈して検体含有液とするのが好ましい。検体希釈液は上述したものを使用できる。第2に、検体含有液を試料として、試料添加部(1)上に、所定量(通常、0.1ml~2ml)滴下する。試料が試料添加部(1)に滴下されると、試料添加部(1)中で移動を開始する。

【0073】

本発明において使用する検体は、上述したように、被検出物質であるジカウイルスを含む可能性のあるものであり、具体的には、ジカウイルスに感染した患者の、血清、血漿、全血、精液、髄液等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0074】

(2) 標識物質保持部に保持されているジカウイルスの非構造的タンパクであるNS1を認識する抗体により、検体中のジカウイルスを認識させる工程

工程(2)は、工程(1)において試料添加部に添加された試料を、標識物質保持部(2)へと移動させ、標識物質保持部に保持されている、標識物質が結合したジカウイルスのNS1を認識する抗体により、検体中の被検出物質であるジカウイルスを認識させる工程である。標識物質は上述したものを使用できる。

【0075】

(3) 前記検体及び前記抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

工程(3)は、工程(2)において被検出物質であるジカウイルスが標識物質保持部において標識物質が結合したジカウイルスのNS1を認識する抗体に認識された後、検体および前記抗体を、クロマトグラフ媒体部上を移動相として通過させる工程である。

【0076】

(4) 展開された前記移動相中のジカウイルスを、検出部に含まれるジカウイルスの非構造的タンパク質であるNS1を認識する抗体により検出する工程

工程(4)は、クロマトグラフ媒体部上を移動相として通過した検体中のジカウイルスが、抗原・抗体の特異的結合反応により、検出部に固定されているジカウイルスのNS1を認識する抗体と、前記工程(2)において標識物質が結合したジカウイルスのNS1を認識する抗体とによってサンドイッチ状に挟まれるように特異的に反応結合して、検出部が着色する工程である。

【0077】

被検出物質であるジカウイルスが存在しない場合には、試料の水分に溶解した標識試薬は、クロマトグラフ媒体部上の検出部を通過しても特異的結合反応が起こらないので、検出部が着色しない。

【0078】

最後に、検体含有液の水分は、吸収部(5)へと移動する。

【実施例】

【0079】

以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明は下記例に制限されるものではない。

【0080】

製造例1(抗体の作製)

ジカウイルスのNS1を認識する抗体を以下のように作製した。

まず、配列番号1で示されるジカウイルスのNS1のアミノ酸配列からなるペプチドを合成した。His-tag発現用ベクターであるpET302/NT-Hisを制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理としてアルカリフォスファターゼにより処理し、前記ペプチドと混合し、DNA Ligation Kit Ver.2(タカラバイオ)を用いてライゲーション反応をおこなった。

目的遺伝子を組み込んだ組換えNS1プラスミドを組換え蛋白発現用宿主E.coli BL(DE3)pLysS(Novagen)に導入した。導入菌をLB寒天平板培地で培養し、得られたコロニーをLB液体培地で培養した。さらに1mM IPTG(タカ

10

20

30

40

50

ラバイオ)を添加して組換えNS1の発現を誘導した後、E. coliを回収した。回収した菌を可溶化バッファー[0.5% Tririon X-100 (sigma)、10mM Imidazole、20mM Phosphateおよび0.5M NaCl (pH7.4) (Amersham)]に再浮遊し、超音波処理により可溶化した後、組換えNS1をHis trap Kit (Amersham)を用いて精製した。この精製タンパク質をリン酸緩衝生理食塩水(以下、PBSと称する)に対して透析し、目的の組換えNS1とした。

【0081】

得られた組換えNS1を免疫用抗原として、組換えNS1に対するモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体の作製は次のように、常法に従っておこなった。100 μgの組換えNS1と等量のAduvant Complete Freund (Difco)を混合して、マウス(BALB/c、5週齢、日本SLC)に3回免疫し、その脾臓細胞を細胞融合に用いた。細胞融合には、マウスの骨髄腫細胞であるSp2/0-Ag14細胞(Shulmanら、1978)を用いた。細胞の培養には、Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco)にL-グルタミン0.3mg/ml、ペニシリンGカリウム100単位/ml、硫酸ストレプトマイシン100 μg/ml、Gentacin 40 μg/mlを添加し(DMEM)、これに牛胎児血清(JRH)を10%となるように加えた培養液を用いた。細胞融合は、免疫マウスの脾臓細胞とSp2/0-Ag14細胞を混合し、そこにPolyethylene glycol solution (Sigma)を添加することにより行った。融合細胞はHAT-DMEM[0.1mM Sodium Hypoxanthine、0.4 μM Aminopterinおよび0.016mM Thymidine (Gibco)を含む血清加DMEM]で培養し、酵素結合抗体法(ELISA)により培養上清中の抗体産生を確認した。抗体産生陽性の細胞をHT-DMEM[0.1mM Sodium Hypoxanthineおよび0.16mM Thymidineを含む血清加DMEM]で培養し、さらに血清加DMEMで培養を続けた。

【0082】

クローニングした細胞は、2, 6, 10, 14-Tetramethylpentadecane (Sigma)を接種しておいたマウス(BALB/c、リタイア、日本SLC)に腹腔内接種し、腹水を採取した。この腹水をプロテインGカラムに供し、モノクローナル抗体を精製した。

このようにして得られたモノクローナル抗体に対して、組換えNS1を96穴プレートに固定化した直接ELISA法にて抗体をスクリーニングした。

その結果、ジカウイルスのNS1を認識する3種類の抗体が得られた。以下この3種類の抗体を、No. 1~No. 3の抗体として説明する。

【0083】

参考例1 (ELISA試験)

製造例1で作製したジカウイルスのNS1を認識する各抗体(No. 1~No. 3の抗体)が、配列番号2~4で示される3つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識するか否かについて、ELISA試験を行うことで調べた。ELISA試験で使用したペプチドは、配列番号2~4で示されるアミノ酸配列それぞれからなるペプチド3種類(下記に示すペプチド1~3)であり、ペプチドの化学合成法の常法であるペプチド固相合成法により作製した。

ペプチド1: ENGVQLTVVV GSVKNPMWRG PQRLPVPVNE
LPHGWKAWGK (配列番号2)

ペプチド2: SYFVRAAKTN NSFVVDGDTL KECPLEHRAW
NSF (配列番号3)

ペプチド3: GP LSHHNTREGY RTQVKGPWHS EELEIRFE
EC PGTKVYV (配列番号4)

【0084】

まず、Nunc Immuno modules (Thermo Fisher Scientific社製、コード469949) ELISA用96ウェルプレートに、上記ペプチド1~3の混合物(以下、混合ペプチドという)を、100ng/mLの濃度で固定化した。

【0085】

一次抗体として、上記作製したNo.1~No.3の各抗体溶液(1μg/mL)100μLをそれぞれ別々のウェルに加え37℃で1時間インキュベートした後、一次抗体溶液を取り除き、ウェルを300μL PBST(0.05% Tween20 in PBS)にて3回ウォッシュした。その後1%BSA溶液100μLをウェルに加え、7℃で1.5時間インキュベートした。その後BSA溶液を取り除き、ウェルを300μL PBST(0.05% Tween20 in PBS)にて3回ウォッシュし、ウェルに残った液は、ペーパータオルに叩き付けて取り除いた。

10

二次抗体として、Anti Mouse IgG(H+L), Rabbit, IgG Whole, Peroxidase Conjugated(和光純薬社製、コード014-17611)1mg/mLを100μL、ウェルに加え、37℃で1.5時間インキュベートした。その後二次抗体溶液を取り除き、ウェルを300μL PBST(0.05% Tween20 in PBS)にて3回ウォッシュし、ウェルに残った液は、ペーパータオルに叩き付けて取り除いた。

ウェルに発色基質としてSure Blue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate(1-Component)(KPL社製、コード53-00-01)を100μL加え、15分反応させ、2N硫酸を100μL加えて反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー(BIORAD社製)で450nmの吸光度を測定した。ブランクと比較して反応が見られたものを+、見られなかったものを-とした。結果を表1に示す。

20

【0086】

【表1】

表1

抗体	No.1	No.2	No.3
混合ペプチド	+	+	-

30

【0087】

この結果から、No.1及びNo.2の抗体は、配列番号2~4で示される3つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識することが分かった。

【0088】

実施例1

検体希釈液、及び、試料添加部(1)と、標識物質保持部(2)と、検出部(4)を有するクロマトグラフ媒体(3)と、吸収部(5)とを含む免疫クロマト分析装置からなる免疫クロマト分析キットを作製した。

なお、標識物質保持部が含有する抗体には、上記で作製したNo.1の抗体を使用し、検出部が含有する抗体には、上記で作製したNo.2の抗体を使用した。以下詳細に説明する。

40

【0089】

(1) 試料添加部の作製

試料添加部としてグラスファイバーからなる不織布(ミリポア社製:300mm×30mm)を用いた。

【0090】

(2) 標識物質保持部の作製

金コロイド懸濁液(田中貴金属工業社製:LC40nm)0.5mlに、リン酸緩衝液(pH7.4)で0.05mg/mlの濃度になるように希釈した上記No.1抗体を0

50

． 1 m l 加え、室温で 1 0 分間静置した。

次いで、 1 質量 % の牛血清アルブミン (B S A) を含むリン酸緩衝液 (p H 7 . 4) を 0 . 1 m l 加え、更に室温で 1 0 分間静置した。その後、十分攪拌した後、 8 0 0 0 × g で 1 5 分間遠心分離を行い、上清を除去した後、 1 質量 % の B S A を含むリン酸緩衝液 (p H 7 . 4) を 0 . 1 m l 加えた。以上の手順で標識物質溶液を作製した。

上記作製した標識物質溶液 3 0 0 μ L に、 3 0 0 μ L の 1 0 質量 % トレハロース水溶液と 1 . 8 m L の蒸留水を加えたものを 1 2 m m × 3 0 0 m m のグラスファイバーパッド (ミリポア社製) に均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、標識物質保持部を作製した。

【 0 0 9 1 】

(3) クロマトグラフ媒体部および検出部の作製

メンブレンとしてニトロセルロースからなるシート (ミリポア社製、商品名 : H F 1 2 0 、 3 0 0 m m × 2 5 m m) を用いた。

次に、 5 質量 % のイソプロピルアルコールを含むリン酸緩衝液 (p H 7 . 4) で 1 . 0 m g / m l の濃度になるように、上記 N o . 2 抗体を希釈した溶液 1 5 0 μ L を、乾燥されたメンブレン上の検出部に 1 m m の幅でイムノクロマト用ディスペンサー「 X Y Z 3 0 5 0 」 (B I O D O T 社製) を用いて 1 μ L / m m の量 (1 シートあたり 2 5 μ L) でライン状に塗布した。

また、金ナノ粒子標識試薬の展開の有無や展開速度を確認するために検出部位の下流に、金ナノ粒子標識物質と広く親和性を有するヤギ由来抗血清をリン酸緩衝液 (p H 7 . 4) で希釈した液をコントロール部位 (コントロールライン) に塗布した。その後、 5 0 で 3 0 分間乾燥させ、室温で一晩乾燥させ、クロマトグラフ媒体部および検出部を作製した。

【 0 0 9 2 】

(4) 免疫クロマト分析装置の作製

次に、バックグシートからなる基材に、試料添加部、標識物質保持部、検出部を有するクロマトグラフ媒体部、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収部としてグラスファイバー製の不織布を順次貼り合わせた。そして、裁断機で幅が 5 m m となるように裁断し、免疫クロマト分析装置とした。なお、標識物質保持部の試料展開方向の長さを 1 2 m m とした。

【 0 0 9 3 】

(5) 検体希釈液の調製

1 質量 % の非イオン性界面活性剤 (ナカライテスク社製 N P - 4 0 と日油社製 ノニデット M N - 8 1 1 の 1 : 1 混合物) を含む 5 0 m M の H E P E S 緩衝液 (p H 7 . 5) を調製し、検体を希釈処理するための検体希釈液とした。

【 0 0 9 4 】

実施例 2

実施例 1 において、標識物質保持部が含有する抗体を、上記作製した N o . 2 の抗体とし、検出部が含有する抗体を、上記作製した N o . 1 の抗体とした点を除いては、実施例 1 と同様にして、実施例 2 の免疫クロマト分析キットを作製した。

【 0 0 9 5 】

実施例 3

実施例 1 において、標識物質保持部が含有する抗体を、上記作製した N o . 2 の抗体とした点を除いては、実施例 1 と同様にして、実施例 3 の免疫クロマト分析キットを作製した。

【 0 0 9 6 】

実施例 4

実施例 2 において、標識物質保持部が含有する抗体を、上記作製した N o . 3 の抗体とした点を除いては、実施例 2 と同様にして、実施例 4 の免疫クロマト分析キットを作製した。

10

20

30

40

50

【0097】

実施例5

実施例1において、標識物質保持部が含有する抗体を、上記作製したNo.3の抗体とした点を除いては、実施例1と同様にして、実施例5の免疫クロマト分析キットを作製した。

【0098】

試験例1（ジカウイルスNS1組換え抗原を用いた測定）

本試験では、上記作製した実施例1～5の免疫クロマト分析キットを用い、ジカウイルスNS1組換え抗原を検体として測定を行った。検体としては、Zika Virus NS1 Recombinant Antigen (Meridian Life Science社製)を用い、濃度が5ng/mL、又は20ng/mLとなるように検体希釈液で希釈し、検体含有液を調製し、これを陽性検体試料とした。

上記調製した各検体含有液90μLを免疫クロマト分析装置の試料添加部に滴下し展開させ、15分後にテストラインを目視で確認した。テストラインの赤い線がより強く発色したものを「+++」、赤い線が強く発色したものを「++」、赤い線が発色したものを「+」、赤い線がわずかに発色したものを「±」、赤い線を目視確認できないものを「-」とした。結果を表2に示す。

また、上記陽性検体の代わりにPBS及びヒト標準血清(Access Bio社製)を用いた陰性検体試料を作製し、同様の試験を行った。結果を表2に示す。

【0099】

【表2】

表2

		実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5
標識物質保持部		No.1	No.2		No.3	
検出部		No.2	No.1	No.2	No.1	No.2
陽性検体	Zika virus NS1 5ng/mL	++	++	+	±	-
	Zika virus NS1 20ng/mL	+++	++	++	+	+
陰性検体	PBS	-	-	-	-	-
	ヒト標準血清	-	-	-	-	-

【0100】

この結果、ジカウイルスのNS1を認識する抗体を用いた本発明の免疫クロマト分析装置によれば、検体中のジカウイルスを検出できることがわかった。特に、標識物質保持部と検出部に、配列番号2～4で示される3つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識するNo.1またはNo.2の抗体を含有させた実施例1～3の免疫クロマト分析装置では、より感度良くジカウイルスを検出できることがわかった。

【0101】

試験例2（不活化したジカウイルスを用いた測定）

本試験では、上記作製した実施例1～4の免疫クロマト分析キットを用い、不活化したジカウイルスを検体として測定を行った。検体としては、Zika virus Heat inactivated virus (ZeptMatrix社製、原液濃度：TC

$1 \times 10^5 \cdot 2^3 \text{ U/mL}$) を用い、その濃度が原液、10倍希釈、100倍希釈、1000倍希釈となるように、検体希釈液で希釈し、検体含有液を調製した。

調製した検体含有液を試料として、試験例1と同様に測定を行った。結果を表3に示す。

【0102】

【表3】

表3

		実施例1	実施例2	実施例3	実施例4
	標識物質保持部	No.1	No.2		No.3
	検出部	No.2	No.1	No.2	No.1
希釈倍率	×1	+++	+++	++	++
	×10	+++	+++	+	+
	×100	+++	++	+	-
	×1000	++	++	±	-

10

【0103】

この結果、検体を Zika Virus NS1 Recombinant Antigen として陽性反応が見られた実施例1～4の免疫クロマト分析キットについて、検体を不活化したジカウイルスとした場合でも、同様に陽性反応を示した。

20

【0104】

また、特に、標識物質保持部と検出部に、配列番号2～4で示される3つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識するNo.1またはNo.2の抗体を含有させた実施例1～3の免疫クロマト分析キットでは、より感度良く不活化したジカウイルスを検出できることがわかった。

【0105】

試験例3（デングウイルスを用いた測定）

本試験では、上記作製した実施例1～4の免疫クロマト分析キットを用い、不活化したデングウイルスを検体として測定を行った。検体としては、Dengue Virus type 2 AbD (serotec社製)を用い、濃度が $1 \times 10^7 \text{ pfu/mL}$ となるように検体希釈液で希釈し、検体含有液を調製した。

30

調製した検体含有液を試料として、試験例1と同様に測定を行った。結果を表4に示す。

【0106】

【表4】

表4

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4
標識物質保持部	No.1	No.2		No.3
検出部	No.2	No.1	No.2	No.1
デングウイルス	-	-	-	-

40

【0107】

この結果、本発明の免疫クロマト分析キットは、ジカウイルスと相同性の高いデングウイルスに対して交叉反応を起こさず、ジカウイルスを特異的に検出できることが分かった。

【0108】

以上の実施例の結果により、ジカウイルスのNS1を認識する抗体を用いた本発明の免

50

疫クロマト分析装置によれば、検体中のジカウイルスを検出できることがわかった。特に、標識物質保持部と検出部に、配列番号 2 ~ 4 で示される 3 つのアミノ酸配列のうち少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体である、No. 1 または No. 2 の抗体を含有させた免疫クロマト分析キットでは、特に感度良くジカウイルスを検出できることがわかった。

【 0 1 0 9 】

さらに、ジカウイルスの NS 1 を認識する抗体を用いた本発明の免疫クロマト分析装置によれば、ジカウイルスと相同性の高い他のウイルスに対して交叉反応を起こさず、ジカウイルスを特異的に検出できることが分かった。

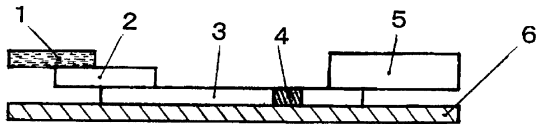
【 符号の説明 】

【 0 1 1 0 】

- 1 試料添加部
- 2 標識物質保持部
- 3 クロマトグラフ媒体部
- 4 検出部
- 5 吸収部
- 6 バッキングシート

10

【 図 1 】



【配列表】

0006452644000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2006-230397(JP,A)
特開2015-200517(JP,A)
Michelle N. D. BALM et al., A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus, J. med. virol, 2012年 9月, Vol.84, No.9, PP.1501-1505
山田健太郎、西園晃、免疫クロマト法による狂犬病とデング熱の迅速検査法, 臨床と微生物, 2012年11月25日, Vol.39, No.6, PP.713-719
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	用于检测迪卡病毒的免疫色谱分析仪		
公开(公告)号	JP6452644B2	公开(公告)日	2019-01-16
申请号	JP2016098845	申请日	2016-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
[标]发明人	鈴木啓太 岩本久彦		
发明人	鈴木 啓太 岩本 久彦		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531 C12N7/00 C07K16/08		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K16/08 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/58		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/543.521 G01N33/531.A C12N7/00.ZNA C07K16/08		
F-TERM分类号	4B065/AA95X 4B065/BD14 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
其他公开文献	JP2017207335A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种能够轻松快速诊断双歧杆菌感染的免疫色谱分析仪，尤其是一种能够轻松快速诊断双链病毒感染的免疫色谱分析仪，能够减少交叉这可以通过免疫层析设备检测到。解决方案：本发明涉及一种用于检测寨卡病毒的免疫色谱分析仪，包括样品添加部分，标记物质保持部分，具有检测部分的色谱介质部分和吸收部分标记物质保持部分和检测部分含有识别NS1的抗体，NS1是由SEQ ID NO：1代表的双病毒的非结构蛋白质。背景技术

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6452644号 (P6452644)
(45) 発行日 平成31年1月16日(2019.1.16)	(24) 登録日 平成30年12月21日(2018.12.21)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 L	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A	
C O 7 K 16/08 (2006.01)	C O 7 K 16/08	
請求項の数 5 (全 19 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-98845(P2016-98845)	(73) 特許権者 509352945 田中贵金属工業株式会社	
(22) 出願日 平成28年5月17日(2016.5.17)	東京都千代田区丸の内2丁目7番3号	
(65) 公開番号 特開2017-207335(P2017-207335A)	(74) 代理人 110002000 特許業務法人栄光特許事務所	
(43) 公開日 平成29年11月24日(2017.11.24)	(72) 発明者 鈴木 啓太 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内	
審査請求日 平成30年5月7日(2018.5.7)	(72) 発明者 岩本 久彦 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内	
	審査官 海野 佳子	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 ジカウイルス検出用免疫クロマト分析装置		