

(19)日本国特許庁（ J P ）

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 43047

(P2003 - 43047A)

(43)公開日 平成15年2月13日(2003.2.13)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/576		G 0 1 N 33/576	Z 2 G 0 5 4
C 1 2 Q 1/70		C 1 2 Q 1/70	4 B 0 6 3
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	B
			C
			Z

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 5 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 230946(P2001 - 230946)

(22)出願日 平成13年7月31日(2001.7.31)

特許法第30条第 1 項適用申請有り 2001年 2 月 7 日発行の
朝日新聞に掲載

(71)出願人 501302429
長井 辰男
埼玉県さいたま市南中野45 - 6
(71)出願人 501302430
岡崎 登志夫
埼玉県所沢市東所沢和田1 - 26 - 28
(72)発明者 長井 辰男
埼玉県さいたま市南中野45 - 6
(72)発明者 岡崎 登志夫
埼玉県所沢市東所沢和田1 - 26 - 28
(74)代理人 100074675
弁理士 柳川 泰男

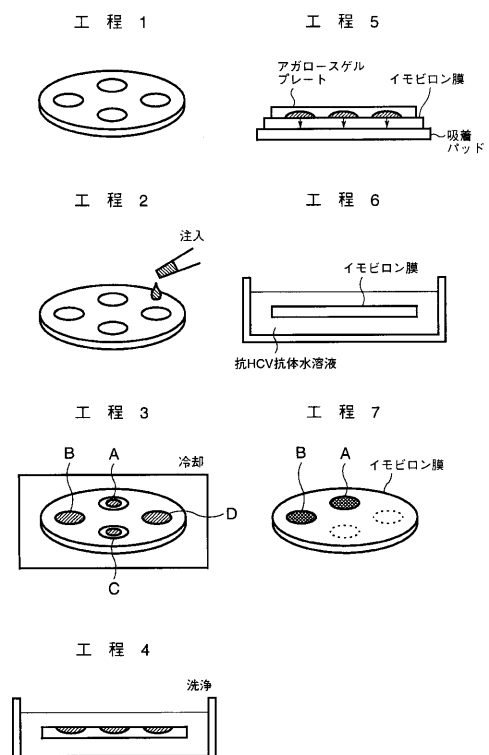
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルスの濃縮検査方法

(57)【要約】

【課題】 簡単な装置と簡単な操作で、血清中のC型肝炎ウイルス（H C V）の検査を、その存在状態の判別を含めて可能とする検査方法を提供すること。

【解決手段】 ゲル状プレートの表面の凹みに血清試料を点着する；血清試料が点着されたプレートを冷却して、血清試料中に存在するH C V及びその免疫複合体をリング状に凝集させ、血清試料からの相分離と濃縮とを発生させる；冷却処理後の血清試料をシート状支持体上に転写する；支持体上の転写試料にH C V抗体を接触させて、転写試料中に遊離状態のH C Vが存在している場合に、該抗体とH C Vとの免疫複合体を形成させる；該免疫複合体に、該免疫複合体と特異的に結合する標識物質を接触させて、該免疫複合体に標識を付ける；そして標識化された免疫複合体を検知するという操作を含む検査方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 表面に凹みを有するゲル状プレートの該凹みに血清試料を点着する工程、血清試料が点着されたゲル状プレートを冷却して、該血清試料中に存在する C 型肝炎ウイルス及びその免疫複合体をリング状に凝集させて、血清試料からの相分離と濃縮とを発生させる工程、上記冷却処理後の血清試料の少なくとも一部をシート状支持体上に転写する工程、シート状支持体上の転写試料に C 型肝炎ウイルス抗体を接触させ、転写試料中に C 型肝炎ウイルスが存在している場合に、該抗体と C 型肝炎ウイルスとの免疫複合体を形成させる工程、該免疫複合体に、該免疫複合体と特異的に結合する標識物質を接触させて、該免疫複合体に標識を付す工程、そして標識化された免疫複合体を検知する工程を含む C 型肝炎ウイルスの検査方法。

【請求項 2】 表面に凹みを有するゲル状プレートの該凹みに血清試料を点着する工程、血清試料が点着されたゲル状プレートを冷却して、該血清試料中に C 型肝炎ウイルスの免疫複合体が存在している場合に、該免疫複合体をリング状に凝集させて、血清試料からの相分離と濃縮とを発生させる工程、上記冷却処理後の血清試料の少なくとも一部をシート状支持体上に転写する工程、シート状支持体上の転写試料に標識化された C 型肝炎ウイルス抗体を接触させ、転写試料中に C 型肝炎ウイルスが存在している場合に、該標識化抗体と C 型肝炎ウイルスとの標識を有する免疫複合体を形成させる工程、そして標識を有する免疫複合体を検知する工程を含む C 型肝炎ウイルスの検査方法。

【請求項 3】 ゲル状プレートが板状アガロースゲルである請求項 1 もしくは 2 に記載の C 型肝炎ウイルスの検査方法。

【請求項 4】 血清試料が点着されたゲル状プレートの冷却を 1 ～ 10 の範囲内の温度にて実施する請求項 1 乃至 3 の内のいずれかの項に記載の C 型肝炎ウイルスの検査方法。

【請求項 5】 冷却処理後の血清試料を転写させるシート状支持体がポリアミド樹脂膜である請求項 1 乃至 4 の内のいずれかの項に記載の C 型肝炎ウイルスの検査方法。

【請求項 6】 C 型肝炎ウイルス抗体が、抗 HCV ポリクロナール抗体もしくは抗 HCV モノクロナール抗体である請求項 1 乃至 5 の内のいずれかの項に記載の C 型肝炎ウイルスの検査方法。

【請求項 7】 標識が、発色性物質もしくは発光性物質である請求項 1 乃至 6 の内のいずれかの項に記載の C 型肝炎ウイルスの検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、C 型肝炎ウイルスの検査方法に関する。本発明は特に、簡単な装置と煩雑

でない操作にて、血清中の C 型肝炎ウイルスの検査を実施することが可能な検査方法に関する。

【0002】

【従来の技術】C 型肝炎ウイルス (HCV) に感染すると、慢性化しやすく、肝硬変を引き起こす確率が高いことが知られている。このため、C 型肝炎ウイルス感染が疑われている患者について、血液中に C 型肝炎ウイルスが存在しているか、否かを、短時間のうちに検査確認することができる検査技術は重要である。

【0003】HCV 感染患者であっても、血液中の C 型肝炎ウイルスの存在量は非常に僅かであるため、その検査は容易ではない。しかしながら、近年、PCR を利用する検査技術である、競合的 RT-PCR 法 (CRT-PCR) およびマルチサイクリック-PCR 法が開発され、実地的な検査方法として用いられている。また、PCR を利用しない検査方法として、分岐 DNA プローブ法も開発され、実際に使用されている。しかしながら、これらの検査方法は、高価な測定装置が必要な上に、検査操作が煩雑であること、検査結果が判明するまでに長時間を必要とすること、全自動化が難しいことなどの問題点があり、実用検査技術として、充分満足できるレベルにはない。

【0004】さらに、C 型肝炎ウイルスは、HCV 感染患者の体内にて、遊離状態及び / 又は免疫複合体の状態 で存在しているが、従来の検査方法では、患者の体内に、C 型肝炎ウイルスが存在するか、否かの確認はできたが、その C 型肝炎ウイルスが如何なる状態 (すなわち、遊離状態あるいは免疫複合体の状態) で存在しているかについては、知る方法がなかった。

【0005】HCV 感染患者の体内で、C 型肝炎ウイルスは、感染後の経過によって、次のような状態で存在しているものと考えられる。

(1) HCV 感染初期：遊離ウイルス量が増加するが、免疫複合体は存在しない。

(2) 感染ウイルスに対して抗体が働く時期：遊離ウイルス量が減少し、免疫複合体が形成され、その量が増える。

(3) 免疫によってウイルスの増殖が抑制される時期：遊離ウイルス量が殆ど存在せず、免疫複合体の量も減少する。

(4) 慢性化による免疫力の減退する時期：遊離ウイルス量が増加し、免疫複合体の量が減少もしくはゼロとなる。

【0006】現在、C 型肝炎ウイルス感染の治療方法としては、インターフェロンの投与が一般的であるが、このインターフェロンは高価な医薬であり、その有効利用が必要とされている。従って、HCV 感染患者の体内での C 型肝炎ウイルスの存在状態を知ることができれば、インターフェロンの投与をより効率的に行うことができる。

【0007】なお、Clinical Chemistry 1998; 44: 1558 - 1559には、免疫複合体であるクリオグロブリンを含有する血清を、アガロースゲルの表面の凹みに点着し、これを冷却することにより、クリオグロブリンがリング状に凝集、相分離することが報告されている。ただし、この文献には、クリオグロブリン凝集相分離の記載はあるが、該技術、遊離ウイルス相分離検知技術を、C型肝炎ウイルスの検査技術として用いることの示唆は存在しない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、簡単な装置と煩雑でない操作にて、血清中のC型肝炎ウイルスの検査を実施することを可能とする検査方法を提供することを主な目的とする。本発明はまた、血清中のC型肝炎ウイルスの存在、不存在のみならず、その存在状態、すなわち、遊離状態であるかあるいは免疫複合体の状態であるかを、容易に判定することを可能にするC型肝炎ウイルスの検査方法を提供することも、その目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、表面に凹みを有するゲル状プレートの該凹みに血清試料を点着する工程、血清試料が点着されたゲル状プレートを冷却して、該血清試料中に存在するC型肝炎ウイルス及びその免疫複合体をリング状に凝集させて、血清試料からの相分離と濃縮とを発生させる工程、上記冷却処理後の血清試料の少なくとも一部をシート状支持体上に転写する工程、シート状支持体上の転写試料にC型肝炎ウイルス抗体を接触させ、転写試料中にC型肝炎ウイルスが存在している場合に、該抗体とC型肝炎ウイルスとの免疫複合体を形成させる工程、該免疫複合体に、該免疫複合体と特異的に結合する標識物質を接触させて、該免疫複合体に標識を付す工程、そして標識化された免疫複合体を検知する工程を含むC型肝炎ウイルスの検査方法にある。

【0010】なお、本発明の検査方法において、シート状支持体上に転写された試料に、直接、標識化されたC型肝炎ウイルス抗体を接触させ、転写試料中にC型肝炎ウイルスが存在している場合に、該標識化抗体とC型肝炎ウイルスとの標識を有する免疫複合体を形成させ、その標識を有する免疫複合体を検知する方法を利用することもできる。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のC型肝炎ウイルスの検査方法を、添付図面に示した検査工程の模式図を参照しながら説明する。

【0012】工程1：凹み（ウェル）付きアガロースゲルの作製

本発明の検査方法で用いるゲル状プレートの代表例としては、アガロースゲルプレートを挙げることができる。アガロースゲルプレートは、公知の方法で作製すること

ができる。以下に記載するのは、アガロースゲルプレートの作製方法の一例である。

（1）組成物A：

NaCl	800mg
KCl	200mg
リン酸一水素ナトリウム	1150mg
リン酸二水素ナトリウム	200mg

（2）組成物B：

アジ化ナトリウム	0.75g
グリシン	56.25g
アガロース	4.50g

【0013】750mLの水に、組成物Aと組成物Bとを加え、十分に攪拌した後、沸騰湯浴中で溶解させる。溶解に際しては、5分毎にスターラーで攪拌し、均一なアガロース溶液とになるようにする。溶解後、直ちに、直径30mmのプレートにこのアガロース溶液を注ぎ、室温で凝固させてアガロースゲルプレートを得る。このアガロースゲルプレートに直径5mmの凹み（ウェル）を所望個数形成し、これを冷蔵保存する。添付図面では、一枚のアガロースゲルプレートに四個の凹みが設けられている。

【0014】工程2：アガロースゲルプレートの凹みへの血清サンプルの注入

C型肝炎ウイルスの感染者あるいは感染が疑われている患者から所定の手段で採取した血清試料20μLを37に維持し、これを室温にて、工程1で作製した凹みに注入し、その後20分間静置して、血清試料をゲルプレート内に染み込ませる。なお、添付図面の四個の凹みには、それぞれ下記の血清試料を注入した。

A：遊離のHCVと、免疫複合体状態のHCVの両方が存在する。

B：遊離のHCVは存在するが、免疫複合体状態のHCVは存在しない。

C：遊離のHCVは存在しないが、免疫複合体状態のHCVは存在する。

D：遊離のHCVと、免疫複合体状態のHCVのいずれもが存在しない。

【0015】工程3：血清試料が染み込んだゲルプレートの低温インキュベート

工程2で得られた血清試料が染み込んだゲルプレートを、次いで、低温（通常は、1～10の範囲、特に4附近）に置き、12時間以上の時間をかけてインキュベートする。上記の低温インキュベートによって、遊離のHCV及び免疫複合体（クリオグロブリン）を含んでいた血清試料（A、C）を注入した凹みでは、遊離HCV及び免疫複合体が凝集して濃縮、相分離を起こし、図に示したようなリング状の凝固物の生成が観察される。

【0016】工程4：ゲルプレートの洗浄

注入した血清試料中に、HCVに関係する蛋白質以外の蛋白質が混在している場合には、次の遊離HCV検出時

10

20

30

40

50

において、ノイズとなって、検査操作の邪魔となるため、工程 3 の処理を行ったゲルプレート（例えば、4 ）の緩衝液（生理食塩水）に 24 時間程度浸して、洗浄して、混在蛋白質を除去する。ただし、この工程は必須ではない。

【0017】工程 5：血清試料の転写

吸着パッドの上に、シート状支持体（例、イモピロン膜などのポリアミド樹脂膜）を置き、次に、その上に、工程 3 の処理、あるいは更に工程 4 の洗浄処理を行ったゲルプレート（血清サンプルが染み込んでいるゲルプレート）を置き、37 のインキュベータ中にて、2 時間放置して、ゲルプレート中の血清試料（凝集した遊離 HCV 及び免疫複合体）をシート状支持体上に転写する。

【0018】工程 6：シート状支持体上での免疫反応
工程 5 の処理を施した、シート状支持体上に、抗 HCV 抗体（例、抗 HCV ポリクロナール抗体或は抗 HCV モノクロナール抗体）を接触させることにより、シート状支持体に血清試料中の遊離 HCV が転写されているスポット（A、B）にて免疫反応を発生させる。この操作は、例えば、抗 HCV 抗体水溶液（例、抗 HCV 抗体 Goat (Antigenix America, NY) の 2000 倍希釈液）に、上記シート状支持体を 1 時間程度浸漬することにより行われる。

【0019】工程 7：シート状支持体上での免疫複合体の染色

工程 6 の処理を施したシート状支持体を、ペルオキシダーゼ標識抗 - Goat - IgG 二次抗体と標識物質（た

例えば、発色物質もしくは発光物質、具体例としては、RENAISSANCE 4CN PLUS (NEN Life Science Product, Inc., Boston) が挙げられる) とを用いて染色する。この染色操作により、工程 6 の処理によりシート状支持体上にて生成した免疫複合体（A と B の各スポットに対応）は、着色する。従って、遊離 HCV が存在していた血清試料の判別が可能になる。

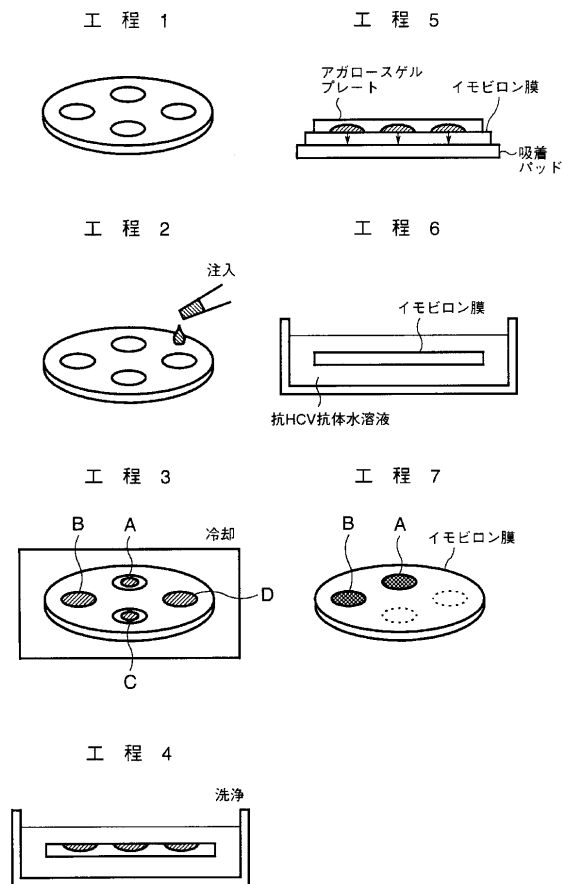
【0020】なお、工程 6 と工程 7 とを行う代わりに、標識化した抗体を用いて、遊離 HCV を検出することも可能である。

【0021】本発明の C 型肝炎ウイルスの検査方法において、アガロースゲルプレートの冷却によって生成する免疫複合体の定量は、既知量の免疫複合体を含む血清試料を用いて作製した検量線などを利用することにより可能となる。また、遊離 C 型肝炎ウイルスの定量も、当該標識からの信号量（発色、発光など）と、同様に既知量の遊離 C 型肝炎ウイルスを含む血清試料を用いて作製した検量線などを利用することにより可能となる。

【0022】

【発明の効果】本発明の検査方法を利用することにより、簡単な装置と煩雑でない操作にて、血清中の C 型肝炎ウイルスの検査を実施することが可能となる。特に、本発明の検査方法により、血清中の C 型肝炎ウイルスの存在、不存在のみならず、その存在状態、すなわち、遊離状態であるかあるいは免疫複合体の状態であるかを、容易に判定することも可能となる。

【図 1】



【手続補正書】

【提出日】平成13年10月16日(2001.10.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】追加

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に従うC型肝炎ウイルスの検査方法を示した検査工程の模式図である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/536
33/569

識別記号

F I

G 0 1 N 33/536
33/569

テ-マコード(参考)

E
L

Fターム(参考) 2G054 AA07 CA20 CA30 CE02 EA01
GE09
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ10
QR48 QR66 QS03 QS15 QS33
QS36 QX02

专利名称(译)	丙型肝炎病毒的浓度测试方法		
公开(公告)号	JP2003043047A	公开(公告)日	2003-02-13
申请号	JP2001230946	申请日	2001-07-31
申请(专利权)人(译)	永井达郎 冈崎俊夫		
[标]发明人	長井辰男 岡崎登志夫		
发明人	長井 辰男 岡崎 登志夫		
IPC分类号	G01N33/576 C12Q1/70 G01N21/78 G01N33/536 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/576.Z C12Q1/70 G01N21/78.B G01N21/78.C G01N21/78.Z G01N33/536.E G01N33/569.L		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/CA20 2G054/CA30 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/GE09 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS03 4B063/QS15 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够通过简单的设备和简单的操作即可检测血清中丙型肝炎病毒（HCV）的测试方法，包括确定其现有状态。解决方案：将血清样品点样在凝胶状板表面的凹口上；冷却点有血清样品的板，并将血清样品中存在的HCV及其免疫复合物聚集成环形。从血清样品中产生相分离和浓缩；冷却处理后的血清样品转移到片状支持物上；HCV抗体与支持物上的转移样品接触，以将其释放到转移样品中当存在免疫复合物的HCV时，形成抗体和HCV的免疫复合物；与免疫复合物特异性结合的标记物质与免疫复合物接触以形成免疫复合物。一种检测标记的免疫复合物的方法。

