

(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2001 - 343388

(P2001 - 343388A)

(43)公開日 平成13年12月14日(2001.12.14)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/569			G 0 1 N 33/569	L
	33/531		33/531	Z

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 数)

(21)出願番号 特願2000 - 168064(P2000 - 168064)

(22)出願日 平成12年6月5日(2000.6.5)

(71)出願人 000237204

富士レビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72)発明者 内田 好昭

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レビオ株式会社内

(72)発明者 宮川 英二

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レビオ株式会社内

(72)発明者 本多 秀夫

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レビオ株式会社内

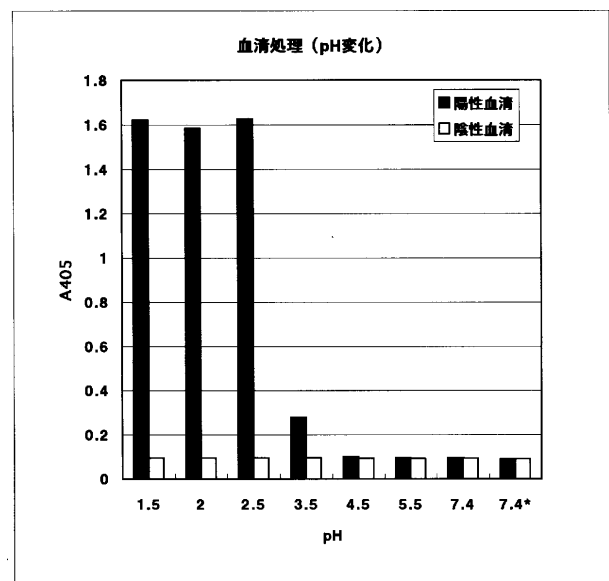
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトパルボウイルスB 1 9 抗原の免疫測定方法

(57)【要約】

【課題】 血清、血漿などの検体中のヒトパルボウイルスB 1 9 抗原の測定法を提供する。

【解決手段】 ヒトパルボウイルスB 1 9 を含むと思われる検体をpH4 . 0以下の酸性条件で処理し、検体中のヒトパルボウイルスB 1 9 抗原を抗ヒトパルボウイルスB 1 9 抗体によって測定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体をpH4.0以下の酸性条件で処理してなるヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定方法。

【請求項2】 酸性条件がpH3.5以下である請求項1記載の免疫測定方法。

【請求項3】 抗ヒトパルボウイルスB19抗体を用いる請求項1又は2記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は検体をpH4.0以下の酸性条件で処理してなるヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒトパルボウイルスB19は、小児における伝染性紅斑(りんご病)の原因ウイルスとして知られ、このウイルスは成人には重篤な症状を引き起こすことが少ないといわれてきた。しかしながら、近年免疫不全患者における慢性骨髄不全、多発性関節炎の原因となること、妊婦が感染すると胎児水腫、流産を引き起こすことが報告された(臨床検査;39,805-810(1995))。従来、ヒトパルボウイルスB19の測定には、ヒトパルボウイルスB19抗原を抗ヒトパルボウイルスB19抗体によって免疫測定する方法(J. Clin. Microbiol., 1997(35), 1575)、pH5.5の緩衝液中でウイルスレセプターを固定した赤血球の凝集を測定する方法(receptor-mediated hemagglutination(RHA), Vox Sang, 76, 14-21(1997), EP特許公開690990号参照)、ウイルス遺伝子をPCR法により増幅する方法(Lancet, 343,798(1994))等が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】抗ヒトパルボウイルスB19抗体を用いた免疫測定法及びRHAは、測定感度が低く微量のヒトパルボウイルスB19抗原の測定を行うことができず、また、PCR法によりヒトパルボウイルスB19遺伝子を増幅して測定する方法は高感度な測定法であるものの、測定するウイルスの精製や増幅時の不純物質の混入防止を必要とし、簡便且つ多量試料を測定する手段ではなかった。そこで、ヒトパルボウイルスB19抗原を簡便且つ感度よく測定し、検体へのヒトパルボウイルスB19の感染を判定する方法が求められていた。本発明の目的は、ヒトパルボウイルスB19抗原の新たな測定方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意検討の結果、ヒトパルボウイルスB19を含むと思われる検体をpH4.0以下の酸性条件で処理した後、ヒトパルボウイルスB19抗原を測定する方法を見出し、本発明を完成した。

10

【0005】以下、本発明を更に詳細に説明する。本発明を実施するにはヒトパルボウイルスB19を含むと思われる検体溶液を、pH4.0以下の酸性の条件で処理を行う。この酸性条件はpH4.0以下、好ましくはpH3.5以下であればよく、測定に悪影響を与えないような条件であれば、強酸性条件であってもよい。酸処理は例えば0~50、通常室温付近で実施することができる。処理時間は10秒~10分間程度行うことができるが、pH又は処理温度によって処理時間を調節することが好ましい。本発明の検体としては、ヒトパルボウイルスB19抗原を含むと予想される試料、例えば血清、血漿、輸血用の血液などの血液由来の試料、血漿分画製剤等を挙げることができる。検体はまず緩衝液に溶解後、例えば塩酸、硫酸、酢酸、クエン酸等の酸を単独又は混同して加え、前記pHに調節することができる。

【0006】この酸で処理した溶液は、免疫測定にあたってアルカリ性溶液で所望のpHに中和した後、ヒトパルボウイルスB19抗原の測定に用いることができる。ヒトパルボウイルスB19抗原の測定は、抗ヒトパルボウイルスB19抗体を用いて実施することができ、例えばサンドイッチ法、競合法等の免疫測定法を挙げることができる。この測定に用いる抗ヒトパルボウイルスB19抗体は、周知の抗体作製法に従い製造されたポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であってもよい。また、抗体としては、抗体のFab'、F(ab')₂等の抗体フラグメントも用いることができる。

【0007】また、サンドイッチ法、競合法等に用いる固相としては、周知のマイクロプレート、ガラス、ポリスチレン等のビーズ、ラテックス粒子、磁性粒子等の各種粒子を挙げることができる。また、抗体への標識としては、酵素、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質等の標識物質を用いることができる。前記固相又は前記標識物質と抗体とをそれぞれ結合させるには、周知の吸着法や化学結合法等によって行うことができる。

【0008】前記方法に従い製造された抗体結合固相と標識抗ヒトパルボウイルスB19抗体は、前記の酸で処理された検体と混合して、固相に結合した標識物質によるシグナルを測定することによりヒトパルボウイルスB19抗原を検出し、検体中のヒトパルボウイルスB19の有無を判定することができる。標識物質が酵素である場合には、周知の発色基質、蛍光基質、発光基質等を用いて標識酵素活性の測定を行うことができる。

【0009】

【実施例】以下、参考例及び実施例により本発明を更に詳細に説明する。

【0010】参考例1 リコンビナントVP2抗原の調製

パルボウイルスの主要構成蛋白質であるVP2の発現は以下のようにして行った。即ち、クローニングしておいたVP2全長DNAを、制限酵素EcoRI・BamH

50

Iで切断し、クレノーで処理した後、これを制限酵素部位SmaIで切断したbaculovirus transfer vector (pAcYM1)に組み込んだ。このplasmidをリポフェクチン法により、Baculo Gold linarized Baculovirus DNA (Pharmagen社製)と共に、夜盗蛾由来の昆虫細胞Sf9細胞に導入した。導入細胞を数日培養後、培養上清のウイルスを回収した。さらにこのウイルスを純化するために、限外希釈法を用いてウイルスのクローニングを行った。組換えタンパク(VP2)は、夜盗蛾由来の昆虫細胞Sf21細胞にこの純化した組換えウイルスを感染させ、培養5日後の昆虫細胞から回収した。

【0011】昆虫細胞からのVP2の精製は、以下のように行った。即ち、昆虫細胞を遠心回収後、50mMトリリス-塩酸pH8.0 5%グリセリン 1M塩化ナトリウム 20mM2-メルカプトンエタノール 2mMエチレンジアミン4酢酸ナトリウム溶液にて超音波破碎を行い遠心分離後、沈殿を回収した。沈殿物を0.1%トライトンX100、1%オクチルチオガラクトピラノシドで各々3回洗浄し、洗浄リコンビナントVp2を回収した。事前の平板SDS-PAGEにより精製用SDS-PAGE Model 491Prep Cell (BIO-RAD社製)の分離ゲル濃度を10%と決め、円柱状分離ゲルの作製を行った。洗浄リコンビナントVp2をSDS濃度2%としたサンプルバッファー2mlに溶解後、泳動を行い、円柱状のゲル先端より溶出するVp2を回収した。回収したVp2をセントリプレップ(アミコン社製)を用いて濃縮し精製品とした。

【0012】参考例2 ヒトパルボウイルスB19の精製

精製は緩衝液A(0.15M NaClを含む10mM Tris-HCl, pH8.0)を用いて実施した。ウイルスの検出はKU812Ep6細胞を用いた感染価測定法(Miyagawa; J. Virol. Methods; 83(1999)45-55)及びB19mAbを用いたウエスタンブロットにより測定した。ヒトパルボウイルスB19陽性血漿(ウイルス感染価 10^6 TCID₅₀/ml)をクロマトグラフィー処理してウイルスを分離した。このクロマトグラフィーによりヒトパルボウイルスB19の粒子サイズより推定される溶出位置に単一ピークとして溶出され、ウイルス感染価も確認された。

【0013】参考例3 抗VP-2モノクローナル抗体の確立

抗VP-2モノクローナル抗体は、参考例1で示したリコンビナントVP-2又は参考例2で示した精製パルボウイルスをマウスに免疫し、その脾臓リンパ球とミエローマ細胞を融合することにより作製した。すなわち、BALB/Cマウスをフロイント完全アジュバントでエマルジョン化したリコンビナントVP-2又は精製パルボ

ウイルスを25~100µg/マウスで初回免疫を行い、2週間後、フロイント不完全アジュバントでエマルジョン化した同抗原25~100µg/マウスで追加免疫を行った。抗体価のチェックは、リコンビナントVP-2でコートし96Well ELISAプレートを用いた固相ELISAで行った。抗体価の上昇が認められたマウスにFreeのリコンビナントVP-2、或いは精製パルボウイルス25~100µgを静脈内投与し、その3~4日後、マウスから脾臓を取り出し脾細胞を調製した。前もってRPMI-1640培地で培養していたマウスミエローマ細胞(P3U1)と脾細胞を1:2~1:5の比率で混合し、PEG(ペーリンガー社製)を用い細胞融合を行った。融合した細胞はHAT培地に浮遊した後、96Well培養プレートに分注し37、CO₂インキュベーターで培養した。

【0014】スクリーニングは上記に示した固相ELISAで行った。すなわち、参考例1で示したリコンビナントVP-2抗原を96Well ELISAプレート(ファルマシア社製)に1µg/mlの濃度で50µl/Well分注し、4~1晩放置することにより吸着させた。1%スキムミルクでブロッキングした後、洗浄Buffer(0.05% Tween20を含むPBS)で3回洗浄し、細胞融合を行ったプレートの培養上清50µlを加え、37 1時間反応させた。同様に洗浄Bufferで3回洗浄後、POD標識抗マウスイムノグロブリン抗体(DACO社製)を加え、さらに37 1時間反応させた。洗浄Bufferで4回洗浄後、基質(2,2'-アジノジ(3-エチルベンズチアゾリン)-6'-スルホン酸; ABTS)を加え発色の見られるWellを選択した。このようにして抗VP-2抗体2種を選択した。リコンビナントVP-2免疫マウスからVP2-312、精製パルボウイルス免疫マウスからPrv334を確立した。

【0015】参考例4 rVP-2測定サンドイッチELISAの確立

リコンビナントVP-2を抗原としてサンドイッチELISAを行った。ELISAは以下のように行った。すなわち、NUNC社製ELISAプレート(MAXISORB)にPrv334抗体を10µg/mlの濃度にPBS7.4で希釈し、100µl/wellづつ入れ、4~1晩放置しCoatした。次に1%BSA-PBS7.4を200µl/well入れ、37、5時間放置しMaskingを行った。洗浄緩衝液(0.05% Tween20含有PBS7.4)で3回洗浄後、リコンビナントVP-2を1%BSA-PBSで2n希釈し、100µl/well入れ、37、1時間反応させた。特異性を確認するため、ヒトパルボウイルスB19抗原とは異なる抗原を免疫原として作製したモノクローナル抗体3DG-472を同様Coatしたプレートに抗原を入れ、37、1時間反応させた。洗浄緩衝液

で3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ（ALP）標識VP2-312抗体を100μl/well入れ、37、1時間反応させた。洗浄緩衝液で充分洗浄し、基質（p-ニトロフェノールリン酸；PNPP）を100μl/well入れ室温で15分放置後、波長405nmの吸光度を測定した。図1に示すように、本固相抗体と標識抗体の組合せで、パルボウイルスの構成蛋白質であるリコンビナントVP-2が特異的に測定できることが確認された。

【0016】実施例1 血清の測定と酸処理
 血清の測定は、未処理と各pHで処理した血清について比較した。ELISAは参考例4と同様に行った。すなわち、NUNC社製ELISAプレート（MAXISORB）にPrv334抗体を10μg/mlの濃度にPBS7.4で希釈し、1wellに100μlづつ入れ、4時間放置しCoatした。次に1%BSA-PBS7.4を200μl/well入れ、37、5時間放置しMaskingを行った。洗浄緩衝液（0.05%Tween20含有PBS7.4）で3回洗浄後、パルボウイルス陽性（PCR）血清と、対照として20陰性血清の測定を行った。

【0017】各pH条件（pH1.5、2.0、2.5、3.5、4.5、5.5及び7.4）で処理を行ったものと、処理を行わなかったもの（pH7.4；従来法）について（計8種）、100μl/wellで37、1時間反応させた。血清の酸処理は、例えばpH2.0は0.1Mグリシン塩酸緩衝液pH2.0で、pH5.0は0.1Mクエン酸緩衝液pH5.0で、未*

*処理は0.1Mリン酸緩衝液pH7.4で血清を10倍希釈し行った。酸性条件で処理をした血清は少量の2Mトリス緩衝液pH8.5で速やかに中和した。ELISAサンプルとしては、これを更に1.0%BSA-PBS7.4で2倍に希釈したものをを用いた。洗浄緩衝液で3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ（ALP）標識VP2-312抗体を100μl/well入れ、37、1時間反応させた。洗浄緩衝液で充分洗浄し、基質PNPPを100μl/well加え室温で15分放置後、波長405nmの吸光度を測定した。その結果を図2に示す。

【0018】

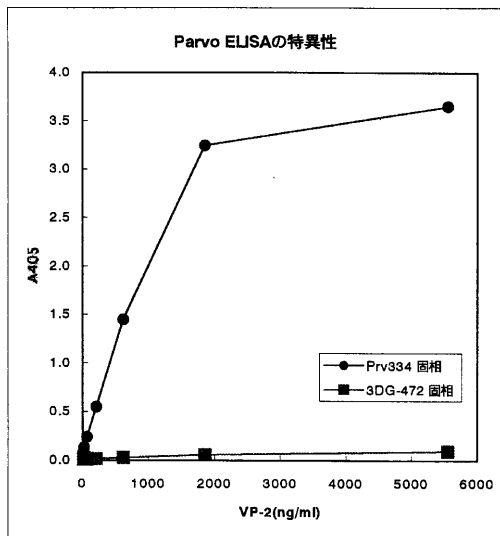
【発明の効果】本発明では、検体を酸処理することにより検体中に含まれるヒトパルボウイルスB19抗原を簡単に測定することができる。本発明によって、従来法では測定できなかった微量のヒトパルボウイルスB19抗原の測定が可能となり、殊に輸血による感染の防止に多大な貢献をする。

【図面の簡単な説明】

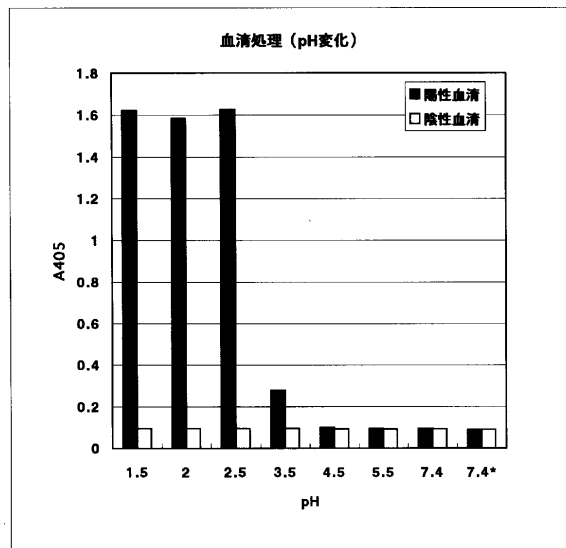
【図1】ELISA法による抗体の特異性を測定した結果を示す図である。対照として用いたモノクローナル抗体3DG-472は、ヒトパルボウイルスB19抗原と異なる免疫原から作製した抗体である。

【図2】各pH条件でパルボウイルス陽性血清又は陰性血清を処理した後、ELISA法によってヒトパルボウイルスB19抗原を測定した結果を示す図である。*は処理を行わない従来法の測定結果を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 伊藤 哲
東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
富士レビオ株式会社内

专利名称(译)	免疫测定人细小病毒B19抗原的方法		
公开(公告)号	JP2001343388A	公开(公告)日	2001-12-14
申请号	JP2000168064	申请日	2000-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	内田好昭 宫川英二 本多秀夫 伊藤哲		
发明人	内田 好昭 宫川 英二 本多 秀夫 伊藤 哲		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/531.Z		
其他公开文献	JP4449171B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种测量样品（例如血清或血浆）中人细小病毒B19抗原的方法。在pH 4.0或更低的酸性条件下处理怀疑含有人细小病毒B19的样品，并通过抗人细小病毒B19抗体测量样品中的人细小病毒B19抗原。

