

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4449171号
(P4449171)

(45) 発行日 平成22年4月14日(2010.4.14)

(24) 登録日 平成22年2月5日(2010.2.5)

(51) Int.Cl. F 1
GO 1 N 33/569 (2006.01) GO 1 N 33/569 L
GO 1 N 33/531 (2006.01) GO 1 N 33/531 Z

請求項の数 2 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2000-168064 (P2000-168064)	(73) 特許権者	306008724
(22) 出願日	平成12年6月5日(2000.6.5)		富士レビオ株式会社
(65) 公開番号	特開2001-343388 (P2001-343388A)		東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号
(43) 公開日	平成13年12月14日(2001.12.14)	(72) 発明者	内田 好昭
審査請求日	平成19年6月5日(2007.6.5)		東京都中央区日本橋浜町2丁目6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6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6番5号
			富士レビオ株式会社内
		(72) 発明者	伊藤 哲
			東京都中央区日本橋浜町2丁目6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B19抗原の免疫測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検体を pH 3.5 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】

抗ヒトパルボウイルスB19抗体を用いる請求項1記載の免疫測定方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は検体を pH 3.5 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)、pH 5.5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 hemagglutinati

on (R H A) , Vox Sang , 7 6 , 1 4 - 2 1 (1 9 9 7) , E P 特許公開 6 9 0 9 9 0 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。

【 0 0 0 3 】

【 発明が解決しようとする課題 】

抗ヒトパルボウイルス B 1 9 抗体を用いた免疫測定法及び R H A は、測定感度が低く微量のヒトパルボウイルス B 1 9 抗原の測定を行うことができず、また、P C R 法によりヒトパルボウイルス B 1 9 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 B 1 9 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 B 1 9 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 B 1 9 抗原の新たな測定方法を提供することである。

【 0 0 0 4 】

本発明者らは、鋭意検討の結果、ヒトパルボウイルス B 1 9 を含むと思われる検体を p H 3 . 5 以下の酸性条件下で処理した後、ヒトパルボウイルス B 1 9 抗原を測定する方法を見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 5 】

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 B 1 9 を含むと思われる検体溶液を、p H 3 . 5 以下の酸性の条件で処理を行う。この酸性条件は p H 3 . 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 ~ 5 0 、通常室温付近で実施することができる。処理時間は 1 0 秒 ~ 1 0 分間程度行うことができるが、p H 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 B 1 9 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、前期 p H に調節することができる。

【 0 0 0 6 】

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 p H に中和した後、ヒトパルボウイルス B 1 9 抗原の測定に用いることができる。ヒトパルボウイルス B 1 9 抗原の測定は、抗ヒトパルボウイルス B 1 9 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 B 1 9 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 F a b '、F (a b ')₂等の抗体フラグメントも用いることができる。

【 0 0 0 7 】

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。

【 0 0 0 8 】

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 B 1 9 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 B 1 9 抗原を検出し、検体中のヒトパルボウイルス B 1 9 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。

【 0 0 0 9 】

【 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・BamHI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 linearized 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。

10

【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 491 Prep 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。

20

【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。

30

【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25~100 μ g/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25~100 μ g/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25~100 μ g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 $^{\circ}$ C、CO₂インキュベーターで培養した。

40

【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

50

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 50 $\mu\text{l}/\text{Well}$ 分注し、4 ー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% Tween 20 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 50 μl を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 VP 2 - 312、精製パルボウイルス免疫マウスから Prv 334 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 Prv 334 抗体を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に PBS 7.4 で希釈し、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ づつ入れ、4 ー晩放置し Coat した。次に 1% BSA - PBS 7.4 を 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 時間放置し Masking を行った。洗浄緩衝液 (0.05% Tween 20 含有 PBS 7.4) で 3 回洗浄後、リコンビナント VP - 2 を 1% BSA - PBS で 2n 希釈し、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、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 $^{\circ}\text{C}$ 、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 VP 2 - 312 抗体を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、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 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 入れ室温で 15 分放置後、波長 405 nm 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 Prv 334 抗体を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に PBS 7.4 で希釈し、1 well に 100 μl づつ入れ、4 ー晩放置し Coat した。次に 1% BSA - PBS 7.4 を 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 時間放置し Masking を行った。洗浄緩衝液 (0.05% Tween 20 含有 PBS 7.4) で 3 回洗浄後、パルボウイルス陽性 (PCR) 血清と、対照として陰性血清の測定を行った。

【0017】

各 pH 条件 (pH 1.5、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 (pH 7.4; 従来法) について (計 8 種)、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応させた。血清の酸処理は、例えば pH 2.0 は 0.1 M グリシン塩酸緩衝液 pH 2.0 で、pH 5.0 は 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 5.0 で、未処理は 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 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 2 M トリス緩衝液 pH 8.5 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 - PBS 7.4 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 VP 2 - 312 抗体を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 入れ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応させた。洗浄緩衝液で充分洗浄し、基質 PNPP を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え室温で 15 分放置後、波長 405 nm 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

10

20

30

40

50

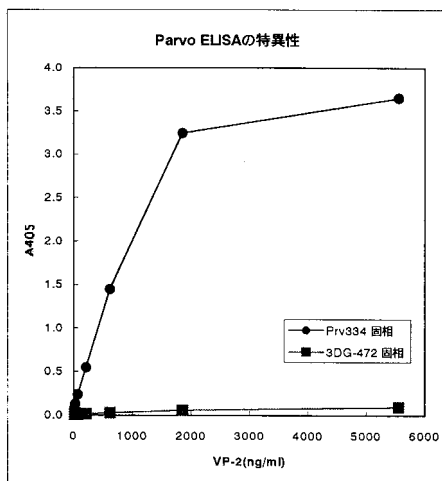
原を簡便に測定することができる。本発明によって、従来法では測定ができなかった微量のヒトパルボウイルス B 1 9 抗原の測定が可能となり、殊に輸血による感染の防止に多大な貢献をする。

【図面の簡単な説明】

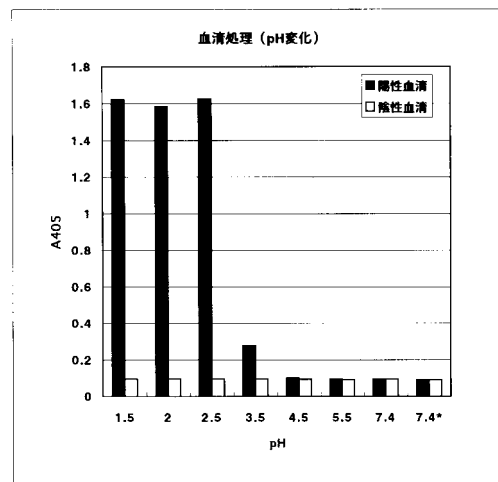
【図 1】 E L I S A 法による抗体の特異性を測定した結果を示す図である。対照として用いたモノクローナル抗体 3 D G - 4 7 2 は、ヒトパルボウイルス B 1 9 抗原と異なる免疫原から作製した抗体である。

【図 2】 各 p H 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、E L I S A 法によってヒトパルボウイルス B 1 9 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

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開平07 - 147986 (JP, A)
特開平09 - 010000 (JP, A)
特開平11 - 032757 (JP, A)
特開平09 - 236605 (JP, A)
Y.MATSUNAGA, Infection and Immunity, 米国, 1977年11月, Vol
. 18, NO. 2

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

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	JP4449171B2	公开(公告)日	2010-04-14
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		
当前申请(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		
审查员(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2001343388A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供测试体如血清，血浆中人细小病毒B19抗原的测量方法。解决方案：在pH4.0或更低的酸性条件下处理具有包含人细小病毒B19的可能性的测试体，并且通过抗人细小病毒B19抗体测量测试体中的人细小病毒B19抗原。

