

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6641841号  
(P6641841)

(45) 発行日 令和2年2月5日(2020.2.5)

(24) 登録日 令和2年1月8日(2020.1.8)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>		GO 1 N 33/569		L	
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>		GO 1 N 33/531		B	

請求項の数 12 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2015-190821 (P2015-190821)	(73) 特許権者	306008724 富士レビオ株式会社 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
(22) 出願日	平成27年9月29日 (2015.9.29)	(74) 代理人	110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(65) 公開番号	特開2017-67513 (P2017-67513A)	(72) 発明者	顧 然 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内
(43) 公開日	平成29年4月6日 (2017.4.6)	(72) 発明者	金子 敦 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内
審査請求日	平成30年7月20日 (2018.7.20)	(72) 発明者	青柳 克己 東京都新宿区西新宿二丁目1番1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抗原の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(1)~(4)の少なくともいずれかの界面活性剤を含む処理液にて、pH3.5以下の酸性条件で検体を処理することを含む、ヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定方法。

(1) 分子内に炭素数10以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤

(2) 分子内に炭素数10以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する陽イオン性界面活性剤

(3) 分子内に炭素数9以上のアルキル基と第三級アミドとを有する非イオン性界面活性剤

(4) 分子内にステロイド骨格と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤

【請求項2】

前記(1)~(3)におけるアルキル基が直鎖アルキル基である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記(1)の両性界面活性剤が、C12APS、C14APS、及びC16APSから選択される界面活性剤である、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

前記(2)の陽イオン性界面活性剤が、C12TAB、C14TAB、C16TAB、C12TAC、C14TAC、及びC16TACから選択される界面活性剤である、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法

。

## 【請求項 5】

前記(3)の非イオン性界面活性剤がMEGA-10であり、前記(4)の両性界面活性剤がCHAPSである、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 6】

検体をポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤及びポリソルベート系界面活性剤から選択される少なくとも一種の非イオン性界面活性剤で処理することをさらに含む、請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記少なくとも一種の非イオン性界面活性剤が、TritonX-705、ポリソルベート20、及びポリソルベート80から選択される少なくとも1種である、請求項6記載の方法。

10

## 【請求項 8】

検体を変性剤で処理することをさらに含む、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 9】

変性剤がグアニジン、グアニジン塩、グアニジン誘導体、及び尿素から選択される少なくとも一種である、請求項8記載の方法。

## 【請求項 10】

免疫測定がサンドイッチ法により行なわれる、請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 11】

20

下記(1)~(4)の少なくともいずれかの界面活性剤を含む検体処理液と、抗ヒトパルボウイルスB19抗体又はその抗原結合性断片とを含む、ヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定キット。

(1) 分子内に炭素数10以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤

(2) 分子内に炭素数10以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する陽イオン性界面活性剤

(3) 分子内に炭素数9以上のアルキル基と第三級アミドとを有する非イオン性界面活性剤

(4) 分子内にステロイド骨格と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤

30

## 【請求項 12】

ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤及びポリソルベート系界面活性剤から選択される少なくとも一種の非イオン性界面活性剤を、前記検体処理液中にさらに含むか、又は前記検体処理液とは別個に含む、請求項11記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

40

ヒトパルボウイルスB19は、パルボウイルス科パルボウイルス属に属する一本鎖DNAウイルスである。ウイルス粒子は正20面体構造であり、カプシドタンパク質のVP-1(83 kDa)及びVP-2(58 kDa)が1:9の比率でカプシドを構成している。エンベロープは有していない。パルボウイルスB19感染による疾患・症状として、伝染性紅斑(りんご病)、関節炎、胎児水腫や流産等が知られている。

## 【0003】

検体中のヒトパルボウイルスB19抗原を簡便かつ感度良く測定する手法として、pH3.5以下の酸性条件下で検体を処理してから抗ヒトパルボウイルスB19抗体による免疫測定を行なう手法が知られている(特許文献1)。また、これよりも若干pHが高い酸性条件下、グアニジンで検体を処理してから免疫測定を行なう手法も知られている(特許文献2)。

50

## 【 0 0 0 4 】

検体中の病原体由来抗原を免疫学的手法により測定する方法においては、感染者体内で中和抗体等の抗原物質に対する抗体が生じている場合、検体中に存在する宿主由来の抗体が抗原を測定するための抗体と競合し、抗原が宿主由来抗体との間でも複合体を形成してしまい、結果として測定値が低下してしまうことがある。このことは、検体中に微量にしか含まれない抗原を測定しようとする場合に特に大きな問題となり得る。特許文献 1 や特許文献 2 の方法は、ヒトパルボウイルスB19抗原と宿主由来抗体との間の複合体形成による測定値の低下をある程度改善することができるが、更に改善の余地があった。

## 【 0 0 0 5 】

特許文献 3 には、検体中のC型肝炎ウイルス (HCV) 抗原の免疫測定において、検体を酸性化剤と特定構造の陽イオン性界面活性剤とで前処理することにより、体内でのウイルス量が少ないHCVのウイルス抗原の検出感度を高める手法が開示されている。この検体処理方法では、酸性化剤での処理により検体中の宿主由来抗体を失活させ、酸処理によって生じる沈殿や白濁を抑制する目的で特定構造の陽イオン性界面活性剤を添加する。HCVはエンペロープを有するウイルスであり、特許文献 2 にも記載される通り、エンペロープを有するウイルスの場合、ウイルス抗原を検出するためには、前処理によりエンペロープ膜を強力に破壊し、膜内の抗原タンパク質を曝露させる必要がある。特許文献 3 には、当該処理方法がヒトパルボウイルスに対しても適用可能であるとする記載がごく一部にあるものの、対象ウイルスは脂質膜 (すなわちエンペロープ) を有するウイルスであるものと明記されており、実施例にもHCVの検出しか記載されていない。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 特許第4449171号

【 特許文献 2 】 特許第4855126号

【 特許文献 3 】 特許第4744298号

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 7 】

上記した通り、ヒトパルボウイルスB19のようにエンペロープを持たないウイルスの抗原タンパク質の免疫測定において、検体中の宿主由来抗体による測定値の低下をさらに改善することが求められている。本発明は、ヒトパルボウイルスB19の免疫測定においてこの問題を解決できる手段を提供することを目的とする。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 8 】

本願発明者らは、ヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定方法のさらなる感度向上を目的として鋭意研究した結果、pH3.5以下の酸性条件下で特定の界面活性剤にて検体を処理した後に抗体との反応に付すことにより、免疫測定に用いる抗体と宿主由来抗体との間の競合による測定値の低下を抑制し、検出感度をさらに高めることができることを見出し、本願発明を完成した。

## 【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、下記(1)~(4)の少なくともいずれかの界面活性剤を含む処理液にて、pH3.5以下の酸性条件下で検体を処理することを含む、ヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定方法を提供する。

(1) 分子内に炭素数 10 以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤

(2) 分子内に炭素数 10 以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する陽イオン性界面活性剤

(3) 分子内に炭素数 9 以上のアルキル基と第三級アミドとを有する非イオン性界面活性剤

10

20

30

40

50

(4) 分子内にステロイド骨格と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤

【0010】

さらに、本発明は、上記(1)~(4)の少なくともいずれかの界面活性剤を含む検体処理液と、抗ヒトパルボウイルスB19抗体又はその抗原結合性断片とを含む、ヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定キットを提供する。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、エンベロープを持たないヒトパルボウイルスB19の抗原タンパク質の免疫測定において、検出に用いる抗体と競合する中和抗体等の宿主由来抗体が検体中に存在する場合であっても、宿主由来抗体と測定対象抗原との間で形成された複合体を解離し、測定値の低下を防止することができる。本発明によれば、従来のパルボウイルスB19抗原の免疫測定法よりもさらに検出感度を高めることができる。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明では、ヒトパルボウイルスB19抗原を測定すべき検体を、pH3.5以下の酸性条件下で、特定の界面活性剤を含む処理液にて処理する。使用される界面活性剤は、下記の(1)~(4)の少なくともいずれかである。

(1) 分子内に炭素数10以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤

(2) 分子内に炭素数10以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する陽イオン性界面活性剤

(3) 分子内に炭素数9以上のアルキル基と第三級アミドとを有する非イオン性界面活性剤

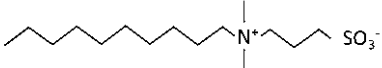
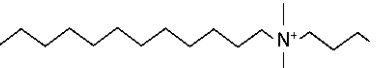
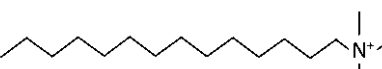
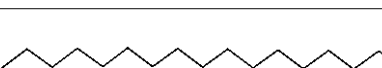
(4) 分子内にステロイド骨格と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤

【0013】

(1)の両性界面活性剤において、アルキル基は好ましくは直鎖アルキル基である。アルキル基の炭素数は12以上であることがより好ましい。(1)の界面活性剤の好ましい例としては、 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-[(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^-]$  (nは9以上の整数)で表される構造の両性界面活性剤を挙げることができ、具体例として下記表1に示す界面活性剤を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0014】

【表1】

表1:(1)の両性界面活性剤の好ましい具体例		
名称	物質名	構造
C10APS	N-Decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate	
C12APS	N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate	
C14APS	N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate	
C16APS	N-Hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate	

【0015】

(2)の陽イオン性界面活性剤において、アルキル基は好ましくは直鎖アルキル基である。アルキル基の炭素数は12以上であることがより好ましい。(2)の界面活性剤の好ましい例としては、 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{Br}^-$ 、及び $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{Cl}^-$  (いずれもn

10

20

30

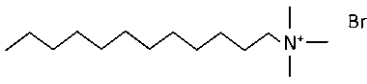
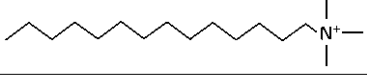
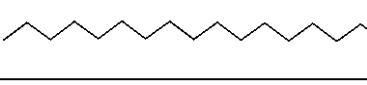
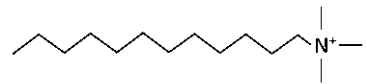
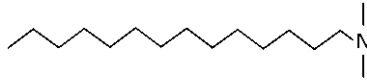
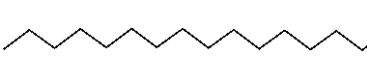
40

50

は9以上の整数)で表される陽イオン性界面活性剤を挙げることができ、具体例として下記表2に示す界面活性剤を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0016】

【表2】

名称	物質名	構造
C12TAB	Dodecyltrimethylammonium Bromide	
C14TAB	Tetradecyltrimethylammonium bromide	
C16TAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide	
C12TAC	Dodecyltrimethylammonium chloride	
C14TAC	Tetradecyltrimethylammonium chloride	
C16TAC	Hexadecyltrimethylammonium chloride	

10

20

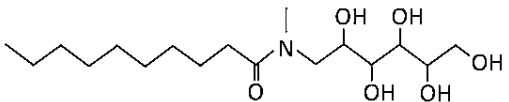
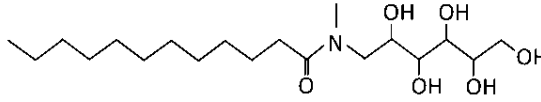
【0017】

(3)の非イオン性界面活性剤において、アルキル基は好ましくは直鎖アルキル基である。(3)の界面活性剤の好ましい例としては、MEGA-10(n-Decanoyl-N-methylglucamide)およびMEGA-12(n-Dodecanoyl-N-methylglucamide)を挙げることができる。MEGA-10がより好ましい。MEGA-10は、下記の構造を有する非イオン性界面活性剤である。MEGA-10は、炭素数9の直鎖アルキル基と第三級アミドとを分子中に含み、上記した(1)及び(2)の好ましい具体例と類似した構造を有している。MEGA-12も、炭素数11の直鎖アルキル基と第三級アミドとを分子中に含み、上記した(1)及び(2)の好ましい具体例と類似した構造を有している。

30

【0018】

【表3】

名称	物質名	構造
MEGA-10	n-Decanoyl-N-methylglucamide	
MEGA-12	n-Dodecanoyl-N-methylglucamide	

40

【0019】

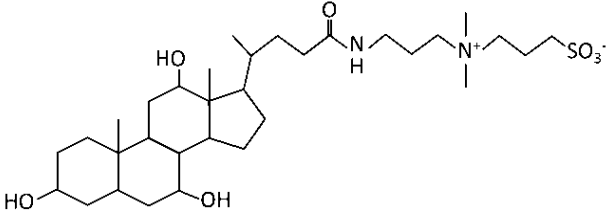
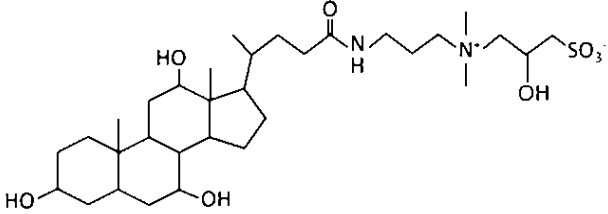
(4)の両性界面活性剤の好ましい例としては、CHAPS(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)およびCHAPSO(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonate)を挙げることができる。CHAPSがより好ましい。CHAPSは、下記構造を有する両性界面活性剤であり、分子内に第四級アンモニウムを含む-N+(CH

50

$3)_2-[(CH_2)_3-SO_3^-]$ 構造を有する両性界面活性剤であるという点で、上記した(1)の好ましい具体例と共通した特徴を有している。CHAPSOも、分子内に第四級アンモニウムを含む $-N^+(CH_3)_2-[CH_2-CHOH-CH_2-SO_3^-]$ 構造を有する両性界面活性剤であるという点で、上記した(1)の好ましい具体例と非常に類似した特徴を有している。

【0020】

【表4】

表4：(4)の両性界面活性剤の好ましい具体例		
名称	物質名	構造
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate	
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonate	

10

20

【0021】

(1)~(4)の界面活性剤の中でも好ましく用いることができる界面活性剤としては、C12APS、C14APS、C16APS、C12TAB、C14TAB、C12TAC、及びC14TACを挙げることができ、とりわけ本発明ではC12APSを特に好ましく用いることができる。

【0022】

上記した(1)~(4)の界面活性剤の処理液中の濃度は、0.01%~5.0%程度、例えば0.01%~3.0%程度、又は0.05%~2.5%程度であればよい。(1)~(4)の界面活性剤を複数組み合わせる場合には、各界面活性剤が上記の濃度であってよいが、合計で10%程度以下とすることが望ましい。

30

【0023】

本発明においては、上記した(1)~(4)の界面活性剤による処理に加え、さらにポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系の非イオン性界面活性剤、及びポリソルベート系の非イオン性界面活性剤から選択される少なくとも一種による検体処理を行ってもよい。上記(1)~(4)のいずれかの界面活性剤とこれらの非イオン性界面活性剤を組み合わせることで、免疫測定之感度をさらに高めることができる。組み合わせる使用し得るこれらの非イオン性界面活性剤の処理液中濃度は、(1)~(4)の界面活性剤と同様でよい。処理液中にこれらの非イオン性界面活性剤をさらに添加しておけば作業工程が簡便であるが、先にこれらの非イオン性界面活性剤と検体を混合してから上記処理液による処理を行ったり、あるいは上記処理液による処理の後にこれらの非イオン性界面活性剤を添加してもよい。

40

【0024】

ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤には、Triton X-100、Triton X-305、Triton X-405、Triton X-705、Nonidet P-40等の非イオン系界面活性剤が包含される。ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤は、Triton系界面活性剤とも呼ばれる。

【0025】

ポリソルベート系界面活性剤には、ポリソルベート20(ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、商品名Tween20)、ポリソルベート40(ポリオキシエチレンソルビタン

50

モノパルミテート、商品名Tween40)、ポリソルベート60(ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、商品名Tween60)、ポリソルベート65(ポリオキシエチレンソルビタントリスステアレート、商品名Tween65)、ポリソルベート80(ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、商品名Tween80)、ポリソルベート85(ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、商品名Tween85)等の非イオン系界面活性剤が包含される。ポリソルベート系界面活性剤は、Tween系界面活性剤、又はポリオキシエチレンソルビタン系界面活性剤とも呼ばれる。

【0026】

ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤及びポリソルベート系界面活性剤の中で好ましい具体例としては、TritonX-705、ポリソルベート20、及びポリソルベート80等を挙げることができるが、これらに限定されない。

10

【0027】

あるいはまた、上記した(1)~(4)の界面活性剤による処理に加え、さらに変性剤による検体処理を行ってもよい。変性剤の具体例としては、グアニジン、グアニジン塩、グアニジン誘導体、及び尿素を挙げることができる。上記(1)~(4)のいずれかの界面活性剤と変性剤を組み合わせて用いた場合にも、免疫測定の高感度をさらに高めることができる。グアニジン塩の具体例としては、これらに限定されないが、グアニジン塩酸塩、グアニジン炭酸塩、グアニジン硝酸塩、グアニジンリン酸塩、グアニジンスルファミン酸塩等を挙げることができる。グアニジン誘導体の具体例としては、これらに限定されないが、グアニジノ安息香酸、グアニジノグルタル酸、グアニジノコハク酸、グアニジノ酢酸、グアニジノプロピオン酸、グアニジノベンズイミダゾール等を挙げることができる。変性剤の処理液中濃度は、0.5M~5M程度でよい。変性剤もまた、処理液中にさらに添加しておいてもよいし、上記処理液による処理よりも先に又は後に変性剤処理を実施してもよい。

20

【0028】

本発明において、pH3.5以下の酸性条件下で検体を処理するとは、処理中の検体溶液(すなわち、検体と処理液を混合した溶液)がpH3.5以下であることを意味する。処理中の検体溶液のpHは、例えば、pH3.0程度以下、又はpH2.8程度以下としてもよい。処理中の検体溶液をこのような酸性条件にするために使用可能な酸は特に限定されず、無機酸でも有機酸でも使用可能である。例えば、塩酸、硫酸、酢酸、クエン酸等の酸を単独又は複数組み合わせ使用することができる。また、処理中の検体溶液を酸性条件にするために、例えば、適切なpHに調整した、グリシン塩酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の酸性緩衝液を用いてもよい。処理液中に適当な量の酸又は酸性緩衝液を加えてもよいし、処理液とは別に検体に酸又は酸性緩衝液を混合してもよい。

30

【0029】

処理液は、上記の界面活性剤を所定の濃度で含んでいる限り、その他の成分は特に限定されない。市販の免疫測定キット等において使用されている検体希釈液に上記した界面活性剤を添加し、処理中の検体溶液のpHが上記した通りの酸性条件となるように酸又は酸性緩衝液を添加して調製することができる。あるいは、酸又は酸性緩衝液は、上記した通り処理液と別個に検体に添加してもよい。

【0030】

処理液による検体の処理は、抗体との反応の前に実施する。検体処理時の温度は0~50であればよく、通常は室温付近での処理が好ましい。処理時間は通常10秒~10分間程度であるが、pHの値や処理温度に応じて処理時間を適宜調節してよい。

40

【0031】

処理液と検体を混合して検体を処理した後、検体溶液をアルカリ性溶液で中和して中性付近にpHを調整する。抗体との反応の前に中和してもよいし、抗体との反応と同時に中和を行なってもよい。例えば、抗体液のpHを高め(例えばpH8.5~pH10.0程度)に設定することで、酸性化された処理済み検体と抗体液との混合により、抗体反応と同時に中和を行なうことができる。

【0032】

50

処理済み検体中のヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定に用いる抗ヒトパルボウイルスB19抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。一般にはモノクローナル抗体が好ましく用いられる。また、抗体に代えて、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv等の抗原結合性断片を使用することもできる。抗ヒトパルボウイルスB19抗体は公知であり、市販のキットでも用いられている。そのような公知の抗体を好ましく用いることができる。あるいは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗原結合性断片の作製方法は周知であるので、ヒトパルボウイルスB19抗原を免疫原として用いて抗ヒトパルボウイルスB19抗体又はその抗原結合性断片を調製し、免疫測定に使用してもよい。免疫原として用いるヒトパルボウイルスB19抗原タンパク質は、例えば特開平7-147986号を参照して作製することができる。あるいは、ヒトパルボウイルスに感染したヒトの血清等から抽出精製して得

10

**【0033】**

本明細書において、「ヒトパルボウイルスB19抗原」という語には、カプシドタンパク質であるVP-1及びVP-2が包含される。ヒトパルボウイルスB19抗原を検出するための抗ヒトパルボウイルスB19抗体としては、特に限定されないが、ウイルス粒子中に占める存在割合が高いVP-2に対する抗VP-2抗体を用いることが好ましい。

**【0034】**

本発明におけるヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定は、競合法、サンドイッチ法等の公知の免疫測定法により実施することができる。中でも本発明ではサンドイッチ法を好ましく採用できる。サンドイッチ免疫測定の実例を挙げると、化学発光酵素免疫測定法

20

**【0035】**

(chemiluminescent enzyme immunoassay; CLEIA)、酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA)、ラジオイムノアッセイ、電気化学発光免疫測定法等の各種の手法がある。本発明においてはいずれの手法を用いてもよい。

**【0036】**

サンドイッチ測定系においては、通常、2種類の抗体又はその抗原結合性断片のうちの一方を固相に固定化した固相抗体とし、他方を標識物質により標識した標識抗体として使用する。本発明に従い処理した処理済み検体中では、パルボウイルスB19抗原は大部分がモノマーとして存在していると考えられるため、サンドイッチ法で用いる固相抗体と標識抗体は、B19抗原の異なる部位を認識するものを用いることが望ましい。

30

**【0037】**

固相は特に限定されず、公知のサンドイッチ免疫測定系で使用されている固相と同様でよい。固相の材質の具体例としては、ポリスチレン、ポリエチレン、セファロース等が挙げられるが、これらに限定されない。固相の物理的形狀は本質的に重要ではない。使用する固相は、その表面への抗体の固定化が容易で、測定中に形成される免疫複合体と未反応の成分を容易に分離できるものであることが好ましい。特に、通常の免疫測定法に使用されるプラスチックプレートや磁性粒子が好ましい。取り扱い、保存、および分離の容易性等の観点から、前述のような材質の磁性粒子を使用することが最も好ましい。これらの固相への抗体の結合は当業者に周知の常法によって行なうことができる。

40

**【0038】**

サンドイッチ免疫測定の手順を簡単に記載すると、まず、処理済み検体を固相抗体と反応させ、洗浄してB/F分離した後、標識抗体と反応させる。再度洗浄してB/F分離した後、標識抗体からのシグナル(蛍光、発光、発色等)を検出する。標識物質として酵素を使用した場合には、適当な基質を添加して反応させ、酵素反応により生じるシグナルを検出すればよい。ヒトパルボウイルスB19抗原を種々の濃度で含む濃度既知の標準試料について

50

免疫測定を行ない、標識からのシグナルの量と標準試料中の抗原濃度との相関関係をプロットして検量線を作成しておけば、検体中のヒトパルボウイルスB19抗原の量を定量的に測定することができる。

【0039】

なお、上記は2ステップ法による手順の説明であるが、処理済み検体と固相抗体と標識抗体とを同時に反応させる、1ステップ法を用いてもよい。

【0040】

本発明の方法に供される検体は、典型的にはヒトから分離された検体である。検体提供者がヒトパルボウイルスB19に感染していた場合に該ウイルスの抗原を含むと予想される試料であれば特に限定されず、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。

10

【0041】

本発明の免疫測定を実施するための免疫測定キットは、上記した(1)~(4)の少なくともいずれかの界面活性剤を含む検体処理液と、抗ヒトパルボウイルスB19抗体又はその抗原結合性断片とを含む。該キットの検体処理液は、処理中の検体溶液のpHが上記した通りの酸性条件となるように酸又は酸性緩衝液を含んでいてもよいし、あるいは酸性緩衝液等の酸溶液を検体処理液とは別個に含んでいてもよい。また、該キットは、上記した通りの変性剤や、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系の非イオン性界面活性剤及びポリソルベート系の非イオン性界面活性剤から選択される少なくとも一種を検体処理液中にさらに含んでいてもよいし、又は、検体処理液とは別個に含み、検体処理時に適宜添加して用いることとしてもよい。

20

【実施例】

【0042】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0043】

<抗パルボウイルス抗体固相化粒子の調製>

10 mM MES緩衝液 (pH5.0) 中で磁性粒子0.01g/mLに、マウス抗パルボウイルスB19モノクローナル抗体Prv334抗体0.2mg/mLを添加し、25℃で1時間ゆるやかに攪拌しながらインキュベートした。反応後、磁性粒子を磁石で集磁し、粒子を洗浄液 (50mM トリス緩衝液、150mM NaCl、2.0%BSA、pH 7.2) にて洗浄し、抗パルボウイルス抗体固相化粒子を得た。測定時には、抗パルボウイルス抗体固相化粒子を粒子希釈液 (400mM トリス緩衝液、1 mM EDTA2Na、0.1% NaN<sub>3</sub>、2.0% BSA、pH 9.0) に懸濁した。

30

【0044】

<アルカリホスファターゼ標識抗体の調製>

脱塩したアルカリホスファターゼ (ALP) とN-(4-マレイミドブチリロキシ)-スクシンイミド (GMBS) (終濃度0.3mg/mL) を混合し、30℃で1時間静置してマレイミド化を行った。次いで、カップリング用反応液 (100mM リン酸緩衝液、1 mM EDTA2Na、pH 6.3) 中で、Fab'化したマウス抗パルボウイルスB19モノクローナル抗体VP2-312抗体と、マレイミド化ALPを1:1のモル比で混合し、25℃で1時間反応させた。Superdex200 10/300 (GE社製) のカラムクロマトグラフィーを用いて、精製用緩衝液 (100 mM トリス緩衝液、150 mM NaCl、0.1% NaN<sub>3</sub>、pH8.0) で、流速0.5 mL/minで主要ピークを分取して精製し、アルカリホスファターゼ標識抗体を得た。測定時には、アルカリホスファターゼ標識抗体を標識体希釈液 (50 mM Tris緩衝液、100mM NaCl、0.3 mM ZnCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% NaN<sub>3</sub>、2.0% BSA、pH 7.2) に懸濁した。

40

【0045】

<パルボウイルスB19抗原の測定>

前処理液20 µLと試料100 µLを反応槽に分注し攪拌後37℃で6.5分間インキュベーションした。その後、抗体固相化粒子50 µLを分注し、攪拌した。その後、37℃で8分間インキュベーションし、B/F分離・洗浄を行った。酵素標識抗体50 µLを反応槽に分注し、攪拌後37

50

で8分間インキュベーションし、B/F分離・洗浄を行った。その後、化学発光基質である3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・2ナトリウム塩 (AMPPD) を含むルミパルス基質液200 μLを反応槽に分注し、攪拌後37 °Cで4分間インキュベーションした後、発光量をルミノメーターで測定した。実際の測定は全自動化学発光酵素免疫測定システム (ルミパルスプレストII (富士レビオ社製)) にて行った。

#### 【 0 0 4 6 】

##### 1. 各種界面活性剤の効果の比較

下記表5に示す各種の界面活性剤を前処理液に添加し、サンプルの前処理を行なった。前処理液のpHは、前処理中のサンプル溶液がpH2.8となるように、グリシン塩酸緩衝液で適宜調整した。サンプルは、ヒト精製不活化抗原をTris緩衝液 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA2Na, 0.1 % NaN<sub>3</sub>, 2.0% BSA, pH 7.2) に溶解させたものを陽性サンプルとして用いた。また、試薬に使用される抗体とバッティングする抗体を含む検体のモデルとして、陽性サンプルに阻害抗体を添加したものを用いた。阻害抗体として、パルボウイルスB19抗原との結合に関し固相抗体Prv334と競合し得る2種類のモノクローナル抗体 (抗体1、抗体2) を用いた。ルミパルスプレストIIでのカウント数より、以下の式で結合分離率を算出し、各界面活性剤の効果の評価した。

10

#### 【 0 0 4 7 】

結合分離率 (%) = (阻害抗体を添加した陽性サンプルのカウント値) / (阻害抗体非添加の陽性サンプルのカウント値) × 100

20

#### 【 0 0 4 8 】

結果を表5に示す。C12TAB、C12APS、C14APS、C16APSを添加した酸性の前処理液でサンプルを処理した場合、抗体の結合分離率が大幅に向上した。

#### 【 0 0 4 9 】

【表5】

表5			結合分離率	
前処理液に添加した界面活性剤	前処理液中濃度	性質	抗体1	抗体2
なし			49.1%	55.1%
C12TAB	2.0%	陽イオン性	93.5%	77.6%
C12APS	2.0%	両性	91.5%	74.9%
C14APS	2.0%	両性	93.9%	68.3%
C16APS	2.0%	両性	84.9%	63.1%
Tween20	2.0%	非イオン性	43.1%	30.2%
Tween40	2.0%	非イオン性	38.5%	28.6%
Tween80	2.0%	非イオン性	42.8%	30.3%
Triton X-305	2.0%	非イオン性	52.1%	39.1%
Triton X-405	2.0%	非イオン性	49.2%	39.4%
Triton X-705	2.0%	非イオン性	43.9%	30.9%
Brj35 Polyoxyethyleneglycol Dodecyl Ether	2.0%	非イオン性	49.3%	28.1%
PVA polyvinyl alcohol	2.0%	非イオン性	40.1%	35.6%
PEG1000 polyethylene glycol (1000)	2.0%	非イオン性	19.4%	13.4%
PEG20000 polyethylene glycol (20000)	2.0%	非イオン性	21.8%	13.7%
PEG70000 polyethylene glycol (70000)	2.0%	非イオン性	20.7%	20.5%

10

20

## 【0050】

## 2. 前処理中のpHが及ぼす影響の検討

前処理中のpHが界面活性剤の効果に及ぼす影響を評価した。界面活性剤としてC12APSを使用した。前処理液中の界面活性剤の濃度は2%とした。サンプルとして、陰性サンプル（NC）（Tris緩衝液）、陽性サンプル（PC）、及び陽性サンプルに阻害抗体を添加したサンプルを用いた。阻害抗体として、上記した抗体1及び抗体2に加え、標識抗体VP2-312の方と競合し得るモノクローナル抗体（抗体3）を用いた。

30

## 【0051】

結果を表6に示す。表6には、各添加条件において測定されたカウント値と、カウント値から算出した結合分離率と、非添加条件の結合分離率に対する各添加条件の結合分離率の比率（%）を示す。検討したpH1.9～3.5の全ての条件において、C12APSの添加により結合分離率が向上した。pHを低くしていくと結合分離率がより向上する傾向があった。

## 【0052】

40

【表 6】

表 6 前処理サンプル中 pH C12APS 添加	1.9		2.4		2.8		3.5	
	無	有	無	有	無	有	無	有
NC	576	597	576	565	625	579	612	593
PC	127665	113562	125216	103934	127028	108075	25762	38900
抗体 1	78927	108334	67851	99315	44287	97485	2685	13667
抗体 2	76932	103429	70749	98417	35209	81168	2030	4638
抗体 3	34122	110615	28304	86701	25984	24898	1377	5947
結合分離率 (%)	61.8	95.4	54.2	95.6	34.9	90.2	10.4	35.1
	60.3	91.1	56.5	94.7	27.7	75.1	7.9	11.9
	26.7	97.4	22.6	83.4	20.5	23.0	5.3	15.3
結合分離率 対非添加 (%)		154.3		176.3		258.7		337.1
		151.1		167.6		271.0		151.3
		364.4		369.0		112.6		286.0

10

20

30

40

## 【 0 0 5 3 】

## 3. 界面活性剤のアルキル鎖長の検討

界面活性剤のアルキル鎖の鎖長が結合分離率に及ぼす影響を評価した。下記表 7 に示す

50

界面活性剤を検討した。処理液中の界面活性剤濃度は2%とし、処理中のpHは2.4とした。サンプルは上記2.と同様のものを用いた。

【0054】

結果を表7に示す。アルキル鎖の炭素数が10個以上の界面活性剤で、結合分離率の向上効果が認められた。また陽イオン性界面活性剤も同様に効果を示すことが分かった。

【0055】

【表7-1】

界面活性剤		非添加	C2APS 両性	C8APS 両性	C10APS 両性	C12APS 両性	C14APS 両性	C16APS 両性
カウント	NC	583	567	568	585	586	582	577
	PC	100750	100893	96176	106147	99121	88758	86281
	抗体1	67135	65121	64173	90453	118045	108840	79313
	抗体2	54210	51911	55949	81102	107791	92385	79323
	抗体3	15384	15684	16508	25582	42857	14438	26041
結合分離率(%)	抗体1	66.6	64.5	66.7	85.2	119.1	122.6	91.9
	抗体2	53.8	51.5	58.2	76.4	108.7	104.1	91.9
	抗体3	15.3	15.5	17.2	24.1	43.2	16.3	30.2
結合分離率 対非添加(%)	抗体1		96.9	100.1	127.9	178.7	184.0	138.0
	抗体2		95.6	108.1	142.0	202.1	193.4	170.9
	抗体3		101.8	112.4	157.8	283.2	106.5	197.7

10

20

【0056】

【表7-2】

界面活性剤		非添加	C12TAC 陽イオン性	C14TAC 陽イオン性	C16TAC 陽イオン性	C12TAB 陽イオン性	C14TAB 陽イオン性	C16TAB 陽イオン性
カウント	NC	579	551	615	580	576	581	609
	PC	119076	119602	137667	115502	128365	138596	152089
	抗体1	64410	99302	117667	71265	107515	113531	82959
	抗体2	66067	95330	106452	82254	91235	108311	93581
	抗体3	27521	102255	69917	25143	98300	52798	48137
結合分離率(%)	抗体1	54.1	83.0	85.5	61.7	83.8	81.9	54.5
	抗体2	55.5	79.7	77.3	71.2	71.1	78.1	61.5
	抗体3	23.1	85.5	50.8	21.8	76.6	38.1	31.7
結合分離率 対非添加(%)	抗体1		153.5	158.0	114.1	154.8	151.4	100.8
	抗体2		143.7	139.4	128.4	128.1	140.9	110.9
	抗体3		369.9	219.7	94.2	331.3	164.8	136.9

30

40

【0057】

#### 4. 実検体での界面活性剤の効果の確認

ヒト血清検体を用いて界面活性剤の効果の評価した。血清検体は、BBI社より購入した321-146-2 (BBI2、 $1.71 \times 10^{11}$  IU/mL)を使用した。この検体をルミパルス用希釈液で $10^n$  ( $n=3 \sim 8$ ) 倍に希釈したサンプルを測定した。阻害抗体は抗体1～3を混合して使用し、混合した抗体の終濃度が $100 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。この抗体濃度は、ヒト血中に生じる特異的IgG量と大きく変わらない量である。界面活性剤はC12APSを使用し、前処理液中に2%となるように添加した。前処理中の検体溶液のpHは2.4となるように調整した。なお、界面活性剤と阻害抗体を共に添加していない条件において、あらかじめ複数の陰

50

性検体と陽性検体とを測定し、得られたカウント値から、カットオフ値を算出した。本測定系では、カウント値がカットオフ値5500以上であれば、陽性検体と判定することができる。

【 0 0 5 8 】

結果を表 8 に示す。表中のDNA価はパルボウイルスのDNA価 (IU/mL) である。阻害抗体を添加すると、界面活性剤非添加の場合、感度が約100倍程度低下するのに対し、C12APSの添加により、阻害抗体存在下でも、阻害抗体を添加していない場合と同程度の感度を有していた。つまり、阻害抗体存在下では、特定の界面活性剤の添加により感度が100倍に上昇した。これにより実際のヒト血清検体でも本技術の効果が得られることが確認された。

【 0 0 5 9 】

【表 8】

サンプル	DNA価	界面活性剤非添加		C12APS添加	
		阻害抗体無	阻害抗体有	阻害抗体無	阻害抗体有
BBI2-3	1.71E+08	6878261	311668	6918696	3684891
BBI2-4	1.71E+07	908351	39895	802787	420299
BBI2-5	1.71E+06	100817	4975	82745	44800
BBI2-6	1.71E+05	12454	1014	10585	5515
BBI2-7	1.71E+04	1937	630	1991	1224
BBI2-8	1.71E+03	974	621	871	613

【 0 0 6 0 】

5 . MEGA8、MEGA10、CHAPSの効果の検討

両性界面活性剤のCHAPS、非イオン性界面活性剤のMEGA8及びMEGA10の効果を評価した。界面活性剤は前処理液中に濃度2%となるように添加した。前処理中のpHは2.4とした。サンプルは上記 2 . と同様のものを用いた。

【 0 0 6 1 】

結果を表 9 に示す。非イオン性界面活性剤では、MEGA10で結合分離率の顕著な向上が認められた。CHAPS (両性イオン界面活性剤) では、パルボウイルスB19への結合部位が標識抗体とバッティングする抗体 3 を添加した場合に顕著な効果が認められた。

【 0 0 6 2 】

【表 9】

界面活性剤		非添加	MEGA8	MEGA10	CHAPS
カウント	NC	579	604	602	614
	PC	119076	129051	127545	107157
	抗体1	64410	74760	110051	74631
	抗体2	66067	78679	97949	57163
	抗体3	27521	32655	37619	51078
結合分離率(%)	抗体1	54.1	57.9	86.3	69.6
	抗体2	55.5	61.0	76.8	53.3
	抗体3	23.1	25.3	29.5	47.7
結合分離率 対非添加(%)	抗体1		107.1	159.5	128.8
	抗体2		109.9	138.4	96.1
	抗体3		109.5	127.6	206.2

【 0 0 6 3 】

## 6 . C12APS + 非イオン性界面活性剤の効果の検討

C12APSに非イオン性界面活性剤を組み合わせて用いた場合の効果の評価した。処理液中のC12APS濃度は2%とし、これにさらに非イオン性界面活性剤を濃度2%となるように添加した。前処理中のpHは2.4とした。サンプルは上記2 . と同様の5種に加え、各阻害抗体を10倍量で陽性サンプルに添加したもの(抗体1×10、抗体2×10、抗体3×10)を用いた。

【0064】

結果を表10に示す。C12APSに非イオン性界面活性剤を組み合わせて使用すると、結合分離率がさらに向上した。

【0065】

【表10】

非イオン性界面活性剤		非添加	TritonX-705	Tween20	Tween80
カウント	NC	588	610	616	623
	PC	105764	86388	149100	117873
	抗体1	91939	78153	138260	114773
	抗体2	89896	77188	132844	105163
	抗体3	75161	76273	119142	79703
	抗体1X10	69343	61940	88336	87404
	抗体2X10	58884	54344	72629	77354
	抗体3X10	39294	42899	54260	28992
結合分離率(%)	抗体1	86.9	90.5	92.7	97.4
	抗体2	85.0	89.4	89.1	89.2
	抗体3	71.1	88.3	79.9	67.6
	抗体1X10	65.6	71.7	59.2	74.2
	抗体2X10	55.7	62.9	48.7	65.6
	抗体3X10	37.2	49.7	36.4	24.6
結合分離率 対非添加(%)	抗体1		104.1	106.7	112.0
	抗体2		105.1	104.8	105.0
	抗体3		124.2	112.4	95.1
	抗体1X10		109.4	90.4	113.1
	抗体2X10		113.0	87.5	117.9
	抗体3X10		133.7	98.0	66.2

【0066】

## 7 . C12APS + 変性剤の効果の検討

C12APSに変性剤を組み合わせて用いた場合の効果の評価した。変性剤として、尿素(2M、4M)及びグアニジン(4M)を用いた。前処理中のpHは2.8とした。サンプルは上記6 . と同様のものを用いた。

【0067】

結果を表11に示す。C12APSに変性剤を組み合わせて使用すると、結合分離率がさらに向上した。

【0068】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 11					
変性剤		非添加	尿素 2M	尿素 4M	グアニジン 4M
カウント	NC	594	592	599	582
	PC	98262	99988	97793	72891
	抗体1	95377	93683	100834	70704
	抗体2	70220	89838	91856	59233
	抗体3	24082	34549	93483	25522
	抗体1X10	60202	73042	76086	47947
	抗体2X10	17938	59536	65087	31580
	抗体3X10	13387	15644	55795	9696
結合分離率(%)	抗体1	97.1	93.7	103.1	97.0
	抗体2	71.5	89.8	93.9	81.3
	抗体3	24.5	34.6	95.6	35.0
	抗体1X10	61.3	73.1	77.8	65.8
	抗体2X10	18.3	59.5	66.6	43.3
	抗体3X10	13.6	15.6	57.1	13.3
結合分離率 対非添加(%)	抗体1		96.5	106.2	99.9
	抗体2		125.7	131.4	113.7
	抗体3		141.0	390.1	142.9
	抗体1X10		119.2	127.0	107.4
	抗体2X10		326.2	364.6	237.3
	抗体3X10		114.8	418.8	97.6

10

20

## 【 0 0 6 9 】

## 8 . 界面活性剤の濃度の検討

前処理液中に添加する界面活性剤の濃度を検討した。界面活性剤としてC12APSを使用し、前処理液中の添加濃度は下記表 1 2 の通り0.1%~2.0%とした。前処理中のpHは2.4とした。サンプルは上記 2 . と同様のものを用いた。

30

## 【 0 0 7 0 】

結果を表 1 2 に示す。0.1%~2.0%の全ての条件で結合分離率が向上した。前処理液中に界面活性剤が0.1%以上の濃度で存在すれば向上効果が得られると考えられる。結合分離率は界面活性剤の濃度依存的に高まることが確認された。

## 【 0 0 7 1 】

【表 1 2】

C12APS濃度(%)		非添加	0.1	0.5	1	2
カウント	NC	694	701	637	633	670
	PC	90863	89083	87567	80905	74397
	抗体1	61047	60232	71093	75640	72405
	抗体2	54918	59608	63111	64931	67008
	抗体3	33227	35404	44588	55911	62184
結合分離率(%)	抗体1	67.2	67.6	81.2	93.5	97.3
	抗体2	60.4	66.9	72.1	80.3	90.1
	抗体3	36.6	39.7	50.9	69.1	83.6
結合分離率 対非添加(%)	抗体1		100.6	120.8	139.2	144.9
	抗体2		110.7	119.2	132.8	149.0
	抗体3		108.7	139.2	189.0	228.6

10

## 【 0 0 7 2】

## 9. (比較例) 尿素の効果の検討

酸性条件下で界面活性剤に代えて尿素を単独で用いることの効果を確認した。前処理中のpHが2.4となるように調整した前処理液に、下記表 1 3 に示す濃度で尿素を添加した。サンプルは上記 2. と同様のものを用いた。

20

## 【 0 0 7 3】

結果を表 1 3 に示す。尿素を4M以上の濃度で使用すると陽性サンプルであってもカウント値が大幅に低下してしまった。カウント値が維持された2M尿素の添加では結合分離率の向上効果は認められなかった。

## 【 0 0 7 4】

【表 1 3】

処理中	pH	尿素濃度				
	2.4	0M	2M	4M	6M	8M
カウント	NC	602	1131	757	847	845
	PC	159949	152777	805	840	811
	抗体1	94427	80253	815	869	868
	抗体2	93793	92847	804	836	820
	抗体3	36933	41235	900	862	834
結合分離率(%)	抗体1	59.0	52.5	101.2	103.5	107.0
	抗体2	58.6	60.8	99.9	99.5	101.1
	抗体3	23.1	27.0	111.8	102.6	102.8

30

40

---

フロントページの続き

審査官 西浦 昌哉

- (56)参考文献 特開2001-343388(JP,A)  
国際公開第2005/040815(WO,A1)  
国際公開第2005/111620(WO,A1)  
特開2007-278902(JP,A)

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

专利名称(译)	人细小病毒b19抗原的测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6641841B2</a>	公开(公告)日	2020-02-05
申请号	JP2015190821	申请日	2015-09-29
[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	顧然 金子敦 青柳克己		
发明人	顧然 金子敦 青柳克己		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/531.B		
其他公开文献	JP2017067513A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供进一步减轻人类细小病毒B19抗原免疫测定中样品中宿主衍生抗原引起的测量结果减少的方法。解决方案：提供一种人类细小病毒B19抗原免疫测定方法，包括在以下条件下处理样品的步骤 使用含有以下至少一种表面活性剂 ( 1 ) - ( 4 ) 的处理液在pH值为3.5或更低的酸性环境中：( 1 ) 碳原子数为10以上的烷基的两性表面活性剂和季铵盐 在分子中，( 2 ) 碳原子数为10以上的烷基的阳离子表面活性剂和季铵盐，( 3 ) 碳原子数为9以上的烷基的非离子表面活性剂，以及 分子中的叔酰胺，和 ( 4 ) 分子中具有类固醇骨架和季铵的两性表面活性剂。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6641841号 (P6641841)
(45) 発行日 令和2年2月5日 (2020. 2. 5)	(24) 登録日 令和2年1月8日 (2020. 1. 8)	
(51) Int. Cl. G 0 1 N 3 3 / 5 6 9 ( 2 0 0 6 . 0 1 ) G 0 1 N 3 3 / 5 3 1 ( 2 0 0 6 . 0 1 )	F I G O 1 N 3 3 / 5 6 9 L G O 1 N 3 3 / 5 3 1 B	
請求項の数 12 (全 18 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-190821 (P2015-190821)	(73) 特許権者 306008724 富士レビオ株式会社 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号	
(22) 出願日 平成27年9月29日 (2015. 9. 29)		
(65) 公開番号 特開2017-67513 (P2017-67513A)	(74) 代理人 110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所	
(43) 公開日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)	(72) 発明者 顧 然 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内	
審査請求日 平成30年7月20日 (2018. 7. 20)	(72) 発明者 金子 敦 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内	
	(72) 発明者 青柳 克己 東京都新宿区西新宿二丁目1番1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抗原の測定方法		