

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-312358

(P2005-312358A)

(43) 公開日 平成17年11月10日(2005.11.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C O 7 K 7/04	C O 7 K 7/04	4 H O 4 5
C O 7 K 7/06	C O 7 K 7/06	
C O 7 K 7/08	C O 7 K 7/08	
C O 7 K 14/18	C O 7 K 14/18	
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 11 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-133743 (P2004-133743)	(71) 出願人	000109015 アボットジャパン株式会社 東京都港区六本木1丁目9番9号
(22) 出願日	平成16年4月28日 (2004.4.28)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 特異性の改良されたC型肝炎ウイルス (HCV) 抗体測定法

(57) 【要約】

【課題】 従来のHCV抗体測定法は、HCV RNA陰性者のHCV抗体をも検出するため、供血者検体検査において、二次感染のおそれのないHCV RNA陰性者の血液も廃棄されることとなり、供血の有効利用の観点からより効率的なHCV抗体測定法が求められている。

【解決手段】 HCVコア抗原ポリペプチドを用いるHCV抗体測定法において、配列番号2のアミノ酸配列から成るポリペプチドまたはその部分断片を反応液に並存させることにより、HCVコア抗原ポリペプチドに対するHCV RNA陰性者のHCV抗体の結合を阻害する一方で、HCV RNA陽性者のHCV抗体の結合を維持し得る。本発明は、HCV RNA陰性者由来のサンプルを効率的に排除し得る上記ポリペプチドおよび該ペプチドを用いた特異性の改良されたHCV抗体測定法を提供するものである。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸配列またはその部分配列から成るペプチド。

【請求項 2】

6 個以上のアミノ酸から成る請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

8 個以上のアミノ酸から成る請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 4】

配列番号 3、4、6、16 から 19 および 25 から 30 のいずれかのアミノ酸配列から成る請求項 1 に記載のペプチド。

10

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のペプチドをコードする塩基配列から成る核酸。

【請求項 6】

サンプルを H C V コア抗原ポリペプチドと接触させる H C V 抗体を免疫学的に検出する方法であって、H C V コア抗原ポリペプチドとサンプルとの反応液が請求項 1 から 4 のいずれかに記載のペプチドを含むことを特徴とする H C V 抗体の検出方法。

【請求項 7】

前記 H C V コア抗原ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列番号 1 のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列から成り抗 H C V コア抗原ポリペプチド抗体と結合し得るポリペプチドまたはこれらポリペプチドを含む融合タンパク質である請求項 6 に記載の H C V 抗体の検出方法。

20

【請求項 8】

H C V コア抗原ポリペプチドがリコンビナント抗原である、請求項 6 に記載の H C V 抗体の測定方法。

【請求項 9】

H C V コア抗原ポリペプチドが大腸菌により発現させた H C - 3 4 リコンビナント抗原である、請求項 8 に記載の H C V 抗体の測定方法。

【請求項 10】

凝集法の原理により免疫学的に H C V 抗体を検出する、請求項 5 から 9 のいずれかに記載の H C V 抗体の測定方法。

30

【請求項 11】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載のペプチドおよび H C V コア抗原ポリペプチドを含む、H C V 抗体の検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学的に H C V 抗体を検出する測定方法において、反応液に添加することにより H C V R N A 陰性者の H C V 抗体に対する検出能のみを低減し、H C V R N A 陽性者の H C V 抗体に対する検出能を維持することができるポリペプチドを提供するものである。また、本発明は該ポリペプチドを用いた H C V 抗体の測定方法も提供する。

40

【背景技術】

【0002】

C 型肝炎ウイルス (H C V) は、血液等の体液を介してヒトに感染し、肝炎を発症する。本邦における H C V 感染者数は推定 2 0 0 万人とも言われ、H C V 感染症は国民病として認知され、その克服が国家的重要課題の一つとなっている。既に H C V 感染症の診断のために、血液等の試料中の H C V 抗体、H C V 抗原又は H C V R N A 等の検査法が開発されたが、より正確で効率的な診断のため、測定法 (測定試薬) の改良は今なお重要な課題である。

【0003】

50

H C V 抗体測定法としては、1988年に第1世代H C V 抗体測定法（NS4領域のC100-3抗原を使用）が報告され（特許文献1および2参照）、続いて感度・特異性の改良された第2世代H C V 抗体測定法（コア領域の抗原、NS3領域の抗原、及びNS4領域の抗原を使用）が開発され（特許文献3および4参照）、H C V 感染症の診断に大いに貢献した。その後、NS5領域の抗原を使用する第3世代H C V 抗体測定法も開発されたが性能は第2世代測定法と同等であり、現在では第2世代、及び第3世代の両検査試薬が広く使用されている。本邦でのH C V 抗体検査試薬の販売数は年間約3,000万テストと言われ、感染症検査分野において一大市場を成している。

【0004】

現在、H C V 感染が疑われる患者の初期診断、またはH C V 感染に関する集団健康診断や供血者検体検査における初期検査法としては、一般的に定性的なH C V 抗体検査が行われている。しかしながら、従来H C V 抗体測定法においては、抗体陽性と判定されながらもH C V RNAが検出されない場合があり（非特許文献1および2参照）、これらは測定系の非特異的な反応又は交差反応による偽陽性の可能性もあるが、ほとんどの場合はH C V 感染状態より治癒した後もH C V 抗体が血中に存続する既往感染を示していると考えられている。H C V 既往感染者と持続感染者（キャリア）の判別のために、定性的なH C V 抗体検査に追加して、定量的なH C V 抗体検査、H C V 抗原検査、又はH C V RNA検査等が行われている（非特許文献2および3参照）。

【特許文献1】欧州特許出願公開第318216号公報

【特許文献2】欧州特許出願公開第388232号公報

【特許文献3】欧州特許出願公開第450931号公報

【特許文献4】欧州特許出願公報第472207号公報

【非特許文献1】J. Watanabe et al.; "Vox Sang" 1993、65、p. 199-203

【非特許文献2】吉澤浩司：「臨床医」2002年、28巻、第1号、p. 7-11

【非特許文献3】吉澤浩司、飯野四郎：「ウイルス肝炎 診断・予防・治療の手引き」1998年 文光堂

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従来H C V 抗体測定法がH C V RNA陰性者のH C V 抗体をも検出することは、特に供血者検体検査の分野において深刻な問題となっている。即ち、H C V 抗体陽性と判定される被検者におけるH C V RNA陽性者の割合は、集団健康診断においては20~30%程度であるが（非特許文献3参照）、供血者検査では現在では5%未満とそのほとんどがH C V RNA陰性者で占められている。H C V 抗体陽性と判定された血液はH C V RNAの有無に関わらず廃棄されるため、供血の有効利用の観点から、より効率的なH C V 抗体測定法、即ちより選択的にH C V キャリアを検出するH C V 抗体測定法が熱望されていた。

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで本願発明者は、従来H C V 抗体測定法と比較して、より選択的にH C V キャリアのH C V 抗体を検出するH C V 抗体測定法を開発するため鋭意研究した。即ち、H C V RNA陽性者の検体中のH C V 抗体に対する検出能を維持しつつ、H C V RNA陰性者の検体中のH C V 抗体に対する検出能を低減させることにより、従来法と比較してH C V RNA陽性者のH C V 抗体をより選択的に検出する測定法を鋭意研究した。その結果、H C V コア抗原ポリペプチドを用いるH C V 抗体測定法において、当該ポリペプチドのアミノ酸配列中の特定領域に由来するペプチドを反応液に添加することにより、H C V RNA陰性者のH C V 抗体に対する検出能のみが低減され、H C V RNA陽性者のH C V 抗体に対する検出能は維持されることを見出した。本知見に基づき、新規なH C V 抗体測定法、即ちH C V RNAの有無に対する特異性の改良されたH C V 抗体測定法を発明

10

20

30

40

50

した。

【0007】

(発明の構成)

本発明は、以下に示すアミノ酸配列1 (aa1~aa120) を有する、HCV感染症の診断に有用なHCVコア抗原ポリペプチドを用いてHCV抗体を検出する測定法において、配列1の部分配列 (aa1~aa62; アミノ酸配列2) に由来するアミノ酸配列を有するペプチドを反応液に含有するHCV抗体測定法に関する。

【0008】

【化1】

アミノ酸配列1:																																																										
1	10	20	30	40	50	60																																																				
M	S	T	N	P	K	P	Q	K	N	K	R	N	T	N	R	R	P	Q	D	V	K	F	P	G	G	G	Q	V	G	G	V	Y	L	L	P	R	G	P	R	L	G	V	R	A	T	R	K	T	S	E	R	S	Q	P	R	G		
70	80	90	100	110	120																																																					
R	R	Q	P	I	P	K	A	R	P	E	G	R	T	W	A	Q	P	G	T	P	W	P	L	Y	G	N	E	G	C	G	W	A	G	W	L	L	S	P	R	G	S	R	P	S	W	G	P	T	D	P	R	R	R	S	R	N	L	G

10

アミノ酸配列2:																																																								
1	10	20	30	40	50	60																																																		
M	S	T	N	P	K	P	Q	K	N	K	R	N	T	N	R	R	P	Q	D	V	K	F	P	G	G	G	Q	V	G	G	V	Y	L	L	P	R	G	P	R	L	G	V	R	A	T	R	K	T	S	E	R	S	Q	P	R	G
62																																																								
R	R																																																							

20

【0009】

アミノ酸配列1は、1987年Chiron社により開示されたHCVポリペプチドの部分配列 (HCV Genotype 1a; aa1~aa120) であり、HCV粒子のコア抗原ポリペプチドの免疫学的に重要なエピトープを形成すると考えられ、現在市販されている多くのHCV抗体測定試薬において配列1、または配列1に相動的なアミノ酸配列を有するHCV抗原ポリペプチドが使用されている。

30

【0010】

本発明において反応液に含有せしめるペプチドは、HCVコア抗原ペプチドとHCV RNA陰性者のHCV抗体との結合をほぼ完全に拮抗阻害する一方で、HCVコア抗原ペプチドとHCV RNA陽性者のHCV抗体との結合を少なくとも一部拮抗阻害し得ない性質を有することが望まれる。このような性質を有するペプチドを検索するために、配列1に由来する配列を有する数多くのペプチドを配列1の全領域を網羅するように化学合成により調製した。そしてこれらのペプチドを単独で、またはいくつかのペプチドを組み合わせると同時に、従来のHCV抗体測定法の反応液に添加して、反応性を鋭意検討した。その結果驚くべきことに、配列1の部分配列aa1~aa62に由来するアミノ酸配列が上記所望の性質を有するのに対し、配列1の部分配列aa63~aa120に由来するアミノ酸配列はHCV抗原ペプチドとHCV RNA陰性者のHCV抗体との結合を阻害し得ないことを見出した。その結果、本発明の目的のために有用なペプチドは、配列2 (配列1のaa1~aa62) に由来するアミノ酸配列を有すると結論付けられた。

40

【0011】

このようにして得られたペプチドは、HCVコア抗原ポリペプチドを用いて免疫学的にHCV抗体を検出する測定法の反応液に添加した場合、HCV RNA陰性者由来検体の反応を阻害する一方、HCV RNA陽性者由来検体の反応は阻害しない、またはほとんど阻害しない。これにより、従来法と比較してHCV RNA陰性群におけるHCV抗体

50

陽性数を低減し、H C V 抗体陽性検体中の H C V R N A 陽性者（キャリア）の割合を相対的に増すこと、即ち H C V R N A 陽性者の H C V 抗体をより選択的に検出することが可能となった。

【 0 0 1 2 】

本発明において、ペプチドは最終的に H C V コア抗原ポリペプチド試薬と試料検体との反応液に含有せしめれば良く、その添加方法はいろいろな方法を取り得る。望ましくは、ペプチドを測定過程の初期に直接検体に、または検体希釈液に添加して検体中の H C V 抗体と反応させた後、H C V コア抗原ポリペプチド試薬と検体とを反応させる方法がより効果的であるが、この方法に限定されるものではない。例えば、ペプチドを H C V コア抗原ポリペプチド試薬に添加しておき、次に検体と反応させる方法も取り得る。また、最終的に反応液に含有せしめるペプチドの免疫学的な活性が十分高ければ、検体と H C V コア抗原ポリペプチド試薬とを混合した後に、ペプチドを反応液に添加する方法も取り得る。

10

【 発明の効果 】**【 0 0 1 3 】**

本発明による特異性の改良された H C V 抗体測定法により陽性と判定された被検者は、従来の H C V 抗体測定法で陽性と判定された被検者と比較して H C V R N A 陽性である確率が高く、初期診断である定性的な H C V 抗体検査の段階で、H C V 既往感染者と H C V キャリアとのより正確な判別が可能となる。

【 0 0 1 4 】

H C V 抗体陽性と判定された場合、H C V キャリアかどうかを確認するため、引き続き H C V 抗体定量法、H C V 抗原検査、H C V R N A 検査等の確認検査が行われるが、本発明による特異性の改良された H C V 測定法を使用すると H C V 抗体陽性者数が低減し、確認検査に回る被検者数を低減することが可能であり、検査の効率化や医療費の低減に貢献出来る。

20

【 0 0 1 5 】

また、供血者検体の H C V 抗体検査において、本発明による特異性の改良された H C V 抗体測定法を使用すると、H C V R N A 陰性血において H C V 抗体陽性と判定され、廃棄処分される血液の割合が低減し、輸血用及び血液製剤の原料として利用出来る血液数が増加し、血液の有効利用に貢献出来る。

【 発明を実施するための最良の形態 】

30

【 0 0 1 6 】

以下の実施例により、本発明の有効性及び利点を詳細に説明するが、本発明の範囲及び本質を限定するものではない。

【 0 0 1 7 】

この実施例は、凝集法の原理で H C V 抗体を測定する方法に関するが、他の方法例えば放射標識免疫測定法（R I A）、酵素標識免疫測定法（E I A）、化学発光標識免疫測定法（C L I A）、イムノクロマトグラフィー、パーティクルカウント法など、凝集法とは測定原理の異なる免疫学的な H C V 抗体測定法にも応用可能である。

【 0 0 1 8 】

この実施例は、担体である赤血球に H C V コア抗原ポリペプチドを固定し、H C V 抗体を捕捉し検出する測定法であるが、担体としては赤血球以外にもゼラチン粒子、ラテックス粒子などの人工担体などを使用することが出来る。更には、H C V コア抗原ポリペプチドを担体に固定せず、標識体として用いて H C V 抗体を測定する方法にも応用可能である。

40

【 0 0 1 9 】

この実施例で使用した H C V コア抗原ポリペプチドは、アミノ酸配列 1 を有し、大腸菌により C K S との融合蛋白質として発現させたリコンビナント H C - 3 4 抗原（H C V G e n o t y p e 1 a ; a a 1 ~ a a 1 5 0）であるが、他にも酵母により S O D との融合蛋白質として発現させた C 2 2 - 3 抗原（H C V G e n o t y p e 1 a ; a a 1 ~ a a 1 2 0）、H C V N S 3 領域の抗原ポリペプチド（3 3 C 抗原）との融合蛋白質

50

として発現させた H C - 4 3 抗原 (H C V G e n o t y p e 1 a ; a a 1 ~ a a 1 5 0 + a a 1 1 9 2 ~ a a 1 4 5 7) などが使用可能である。また必ずしもアミノ酸配列 1 に 1 0 0 % 一致する配列を有する抗原ポリペプチドである必要はなく、または必ずしもアミノ酸配列 1 の全アミノ酸を有する抗原ポリペプチドである必要はなく、アミノ酸配列 1 に対して少なくとも約 5 0 %、好ましくは少なくとも約 7 0 %、更に好ましくは約 9 0 % 以上の相同的なアミノ酸配列を有する H C V コア抗原ポリペプチドであれば使用可能である。このような H C V コア抗原ポリペプチドとしては、他に J C C - 2 抗原 (H C V G e n o t y p e 1 b ; a a 1 ~ a a 1 2 0)、J 7 C o r e 抗原 (H C V G e n o t y p e 1 b ; a a 1 ~ a a 1 1 5) などが挙げられる。

【 0 0 2 0 】

10

この実施例では、アミノ酸配列 2 から得られ、連続する 8 個から 2 0 個のアミノ酸からなるペプチドを使用した。使用するペプチドのアミノ酸数はこれらに限定されるものではない。一般にペプチドのエピトープ (免疫学的な反応性部位、即ち抗体が特異的に結合する部位) は、特有の少なくとも 5 個のアミノ酸により構成され、より一般的には特有の少なくとも 8 から 1 0 個のアミノ酸により構成されることが知られている。例えば、連続する 6 個のアミノ酸で構成されるペプチドが特異的に抗体と結合することが知られている (特公平 6 - 3 4 4 5)。従って本発明においても、連続する少なくとも 6 個、好ましくは連続する少なくとも 8 個のアミノ酸で構成されるペプチドが使用可能と考えるべきである。

【 0 0 2 1 】

20

この実施例で使用したペプチドは、アミノ酸配列 2 から得られ、化学的合成により調製した連続した 2 0 個以下のアミノ酸からなるペプチドであったが、調製の効率化や反応性、安定性の向上等のために、これらよりもアミノ酸数の多いペプチドを化学合成し、または遺伝子工学的な方法などにより異種のペプチドやポリペプチドとの融合ポリペプチドとして調製し、使用することも可能である。また、このように調製したペプチドやポリペプチドは、単独で使用するのみならず、同様な効果を有する異種ペプチドと混合したり、ペプチド同士を連結したり、異種タンパク質等のキャリアに結合させたものも使用することができる。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 2 】

30

方法：この実施例においては、第 2 世代 H C V 抗体測定試薬 H C V P H A 「アボット」 (アボットジャパン社製) の測定系において、反応液にペプチドを添加した。H C V P H A 「アボット」においては、H C V コア抗原ポリペプチド (リコンビナント H C - 3 4 抗原) が固相 (抗原感作用血球) に固定化されている。H C - 3 4 抗原は、H C V G e n o t y p e 1 a ; a a 1 ~ a a 1 5 0 のアミノ酸配列を有するアミノ酸数 3 9 6、分子量約 4 4 k D a のリコンビナント抗原である。

【 0 0 2 3 】

表 1 に示すように、アミノ酸配列 1 に由来する 2 8 個のペプチドを化学合成した。

【 0 0 2 4 】

【表 1】

表 1

配列番号	アミノ酸配列 (アミノ酸番号)												
1	HCVコア抗原ポリペプチド (アミノ酸配列1)												
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
	MSTNPKPQKK	NKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR	KTSERSOPRG	RRQIPKARR	PEGRITWAPG	TPMPLYGNEG	GGWAGILLSP	RGSRPSWGPT	DPRRRSRNLG	
2	アミノ酸配列2												
	1	10	20	30	40	50	60	62					
	MSTNPKPQKK	NKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR	KTSERSOPRG	RR						
3	HCVコアペプチド												
	1 (aa1-aa20)												
	2 (aa15-aa33)	TNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGG									
	3 (aa28-aa47)	GOI VGGVYLLPRR GPRLGVR											
	4 (aa43-aa62)	RLGVRATR KTSERSOPRG RR											
	5 (aa58-aa76)	PRG RRQIPKARR PEGRITW											
	6 (aa71-aa90)	PEGRITWAPG TPMPLYGNEG											
	7 (aa85-aa104)	LYGNEG GGWAGILLSP RGSR											
	8 (aa99-aa118)	SP RGSRPSWGPT DPRRRSRN											
	3m1 (aa28-aa45)	GOI VGGVYLLPRR GPRLG											
	3m2 (aa28-aa44)	GOI VGGVYLLPRR GPR											
	3m3 (aa28-aa43)	GOI VGGVYLLPRR GPR											
	3m4 (aa28-aa41)	GOI VGGVYLLPRR G											
	3m5 (aa28-aa40)	GOI VGGVYLLPRR											
	3m6 (aa28-aa39)	GOI VGGVYLLPR											
	3m7 (aa28-aa37)	GOI VGGVYLL											
	3m8 (aa28-aa36)	GOI VGGVYL											
	3m9 (aa28-aa35)	GOI VGGVY											
	3m10 (aa30-aa47)	I VGGVYLLPRR GPRLGVR											
	3m11 (aa31-aa47)	VGGVYLLPRR GPRLGVR											
	3m12 (aa32-aa47)	GGVYLLPRR GPRLGVR											
	3m13 (aa33-aa47)	GVYLLPRR GPRLGVR											
	3m14 (aa34-aa47)	VYLLPRR GPRLGVR											
	3m15 (aa35-aa47)	YLLPRR GPRLGVR											
	3m16 (aa36-aa47)	LLPRR GPRLGVR											
	3m17 (aa37-aa47)	LPRR GPRLGVR											
	3m18 (aa38-aa47)	PRR GPRLGVR											
	3m19 (aa39-aa47)	RR GPRLGVR											
	3m20 (aa40-aa47)	R GPRLGVR											

これらのペプチドを表 2 に示す 39 通りの組合せにより、HCV PHA「アボット」の検体希釈液に添加した。

【0026】

【表 2】

表 2

HCV PHA「アボット」 検体希釈液に添加した HCVコアペプチドの組合せ	HCV PHA「アボット」判定結果			
	HCV RNA陰性検体 47 例中		HCV RNA陽性 3 例中	
	HCV抗体陰性	HCV抗体陽性	HCV抗体陰性	HCV抗体陽性
添加なし	0	47	0	3
ペプチド1	4	43	0	3
ペプチド2	6	41	0	3
ペプチド3	13	34	1	2
ペプチド4	4	43	0	3
ペプチド5	0	47	0	3
ペプチド6	0	47	0	3
ペプチド7	0	47	0	3
ペプチド8	0	47	0	3
ペプチド1, ペプチド2	10	37	0	3
ペプチド1, ペプチド3	15	32	1	2
ペプチド1, ペプチド4	5	42	0	3
ペプチド2, ペプチド3	25	22	1	2
ペプチド2, ペプチド4	8	39	0	3
ペプチド3, ペプチド4	14	33	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3	30	17	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド4	17	30	0	3
ペプチド1, ペプチド3, ペプチド4	21	26	1	2
ペプチド2, ペプチド3, ペプチド4	28	19	2	1
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3, ペプチド4	31	16	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m1, ペプチド4	25	22	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m2, ペプチド4	23	24	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m3, ペプチド4	22	25	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m4, ペプチド4	21	26	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m5, ペプチド4	21	26	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m6, ペプチド4	18	29	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m7, ペプチド4	18	29	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m8, ペプチド4	18	29	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m9, ペプチド4	18	29	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m10, ペプチド4	24	23	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m11, ペプチド4	25	22	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m12, ペプチド4	25	22	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m13, ペプチド4	25	22	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m14, ペプチド4	25	22	1	2
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m15, ペプチド4	22	25	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m16, ペプチド4	22	25	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m17, ペプチド4	22	25	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m18, ペプチド4	22	25	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m19, ペプチド4	22	25	0	3
ペプチド1, ペプチド2, ペプチド3m20, ペプチド4	17	30	0	3

10

20

30

【0027】

各ペプチドの添加濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。これらのペプチド添加検体希釈液、及び比較対照としてペプチドを添加しない検体希釈液と、HCV PHA「アボット」添付の抗原感作血球試薬を用いて、供血者血漿検体 50 例の HCV 抗体を測定した。

40

【0028】

測定方法は、基本的に HCV PHA「アボット」の添付文書記載の方法に従ったが、添加ペプチドと検体中の HCV 抗体とを十分に反応させるため、検体希釈液により検体を希釈して 1 時間以上静置した後、抗原感作血球液と反応させた。使用した 50 例の検体は、予め PCR 法による HCV RNA 検査を行った結果、47 例が RNA 陰性、3 例が RNA 陽性であった。

【0029】

結果：表 2 にペプチド添加及び非添加の検体希釈液を用いた測定結果を示した。ペプチ

50

ド非添加の検体希釈液を用いた場合、50例全例がHCV抗体陽性と判定された。39通りのペプチド添加のうち35通りにおいて、RNA陰性検体群のHCV抗体陽性数が低減したが、これらのペプチドは全てアミノ酸配列2（アミノ酸配列1；aa1～aa62）に由来する配列を有していた。一方、アミノ酸配列2以外の領域（アミノ酸配列1；aa63～aa120）に由来するペプチド、即ち表1に示したペプチド5、ペプチド6、ペプチド7、ペプチド8の添加においては、RNA陰性検体群のHCV抗体陽性数を低減する効果は全く認められなかった。

【0030】

RNA陽性群のHCV抗体陽性数を変化させず、RNA陰性検体群のHCV抗体陽性数を最も多く低減した添加ペプチドの組合せにおいては、RNA陰性検体47例におけるHCV抗体陽性数が22例（47%）減少して25例となった。即ち、総HCV抗体陽性数はRNA陽性群の3例とRNA陰性群の25例との合計28例にまで減じ、結果的にHCV抗体陽性群におけるRNA陽性検体の割合が6.0%（ $= 3 / 50$ ）から10.7%（ $= 3 / 28$ ）に増加した。

10

【0031】

RNA陽性群のHCV抗体陽性数を変化させず、RNA陰性検体群のHCV抗体陽性数のみを低減した添加ペプチドの組合せにおいては、表3に示したアミノ酸配列2由来の13個のペプチドのうち何れかを含んでおり、これらのペプチドが本発明にとって特に有用であると考えられた。

【0032】

20

【表 3】

表 3

配列番号	アミノ酸配列 (アミノ酸番号)
2	1 10 20 30 40 50 60 62 MSTNPKPQKK NKRNTNRRPQ DVKFPGGQI VGGVYLLPRR GPRLGVRATR KTSERSQPRG RR
3	アミノ酸配列2由来のペプチドID 1 (aa1-aa20) MSTNPKPQKK NKRNTNRRPQ
4	2 (aa15-aa33) TNRPPQ DVKFPGGQI VGG
6	4 (aa43-aa62) RLGVRATR KTSERSQPRG RR
16	3m6 (aa28-aa39) GOI VGGVYLLPR
17	3m7 (aa28-aa37) GOI VGGVYLL
18	3m8 (aa28-aa36) GOI VGGVYL
19	3m9 (aa28-aa35) GOI VGGVY
25	3m15 (aa35-aa47) YLLPRR GPRLGVR
26	3m16 (aa36-aa47) LLPRR GPRLGVR
27	3m17 (aa37-aa47) LPRR GPRLGVR
28	3m18 (aa38-aa47) PRR GPRLGVR
29	3m19 (aa39-aa47) RR GPRLGVR
30	3m20 (aa40-aa47) R GPRLGVR

10

20

30

40

【配列表】

2005312358000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/576	G 0 1 N 33/576	Z

(72)発明者 山田 徹

千葉県松戸市稔台3 4 4 番地 アポットジャパン株式会社総合研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA14 BA80 CA01 DA06 EA04 GA11

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA15 BA16 BA17 BA20 CA02 DA86

EA53 FA10 FA74

专利名称(译)	用于测量具有改善的特异性的丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体的方法		
公开(公告)号	JP2005312358A	公开(公告)日	2005-11-10
申请号	JP2004133743	申请日	2004-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	雅培日本		
申请(专利权)人(译)	雅培日本有限公司		
[标]发明人	山田 徹		
发明人	山田 徹		
IPC分类号	G01N33/531 C07K7/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/18 C12N15/09 G01N33/576		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/18 G01N33/531.A G01N33/576.Z C07K7/04.ZNA C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A G01N33/53.D G01N33/531.B		
F-TERM分类号	4B024/AA14 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA20 4H045/CA02 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA10 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
其他公开文献	JP4533656B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：从有效利用捐献血液的角度解决需要有效的HCV抗体测量方法的问题，因为传统的HCV抗体测量方法也检测HCV RNA阴性者的HCV抗体和在检查供体标本时，也丢弃了没有继发感染风险的HCV RNA阴性者的血液。ZSOLUTION：在使用HCV核心抗原多肽的HCV抗体测定方法中，可以维持HCV RNA阳性者的HCV抗体与HCV核心抗原多肽的结合，同时HCV RNA阴性者的HCV抗体的结合通过使由序列No.2的氨基酸序列或其部分片段组成的多肽在反应混合物中共存来防止多肽。本发明提供能够有效地排除来源于HCV RNA阴性的样品的多肽和通过使用该肽提高特异性的HCV抗体测量方法。Z

		(43) 公開日 平成17年11月10日(2005)	
(5) Int. Cl. ⁷		F I	テマコード (参)
C12N 15/09		C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 7/04		C07K 7/04	4H045
C07K 7/06		C07K 7/06	
C07K 7/08		C07K 7/08	
C07K 14/18		C07K 14/18	
		審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 11 頁) 最終	
(21) 出願番号	特願2004-133743 (P2004-133743)	(71) 出願人	000109015
(22) 出願日	平成16年4月28日 (2004. 4. 28)		アボットジャパン株式会社 東京都港区六本木1丁目9番9号
		(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100109820 弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明