

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6280868号  
(P6280868)

(45) 発行日 平成30年2月14日(2018.2.14)

(24) 登録日 平成30年1月26日(2018.1.26)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/569	(2006.01)	GO 1 N	33/569		L
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 O 1 H	
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N	33/531		B

請求項の数 5 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2014-539801 (P2014-539801)	(73) 特許権者	591125371 デンカ生研株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(86) (22) 出願日	平成25年10月3日(2013.10.3)	(74) 代理人	110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/076892	(72) 発明者	三股 亮太郎 新潟県五泉市南本町一丁目2番2号 デン カ生研株式会社 新潟工場内
(87) 国際公開番号	W02014/054712	(72) 発明者	泉谷 憲幸 新潟県五泉市南本町一丁目2番2号 デン カ生研株式会社 新潟工場内
(87) 国際公開日	平成26年4月10日(2014.4.10)		
審査請求日	平成28年8月18日(2016.8.18)	審査官	草川 貴史
(31) 優先権主張番号	特願2012-222618 (P2012-222618)		
(32) 優先日	平成24年10月5日(2012.10.5)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンの測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンと結合するが、該ヘムアグルチニンと抗原抗体反応する抗ヘムアグルチニン抗体と結合しないレクチンと、該抗ヘムアグルチニン抗体とで該ヘムアグルチニンをサンドイッチすることを含む、サンドイッチ免疫測定法によるインフルエンザウイルスのヘムアグルチニンの測定方法であって、

前記レクチンが、ヒママメレクチン、チョウセンアサガオレクチン及びデイゴレクチンから成る群より選ばれる少なくとも1種である、測定方法。

【請求項2】

前記レクチンが固相に固定化され、前記抗ヘムアグルチニン抗体が標識されており、前記レクチンと前記ヘムアグルチニンを介して固相に結合した該標識抗体を測定することを

【請求項3】

前記ヘムアグルチニンが、インフルエンザウイルスを陽イオン性又は陰イオン性界面活性剤で処理することにより抽出されたものである請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

前記陽イオン性又は陰イオン性界面活性剤が、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム及び塩化ヘキサデシルピリジニウムから成る群より選ばれる少なくとも1種である請求項3記載の方法。

10

20

## 【請求項 5】

前記界面活性剤が、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムである請求項 4 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、インフルエンザウイルスの抗原であるヘムアグルチニンの測定方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

インフルエンザウイルスはオルトミクソウイルス科に属し、ウイルス内部に存在する核タンパク質及びマトリクスタンパク質の抗原性の違いからA、B及びC型に分類されるウイルスである。毎年流行がみられるのはA型及びB型であり、特にA型ウイルスは、粒子表面抗原である糖タンパク質の違いからヘムアグルチニンは16種類、ノイラミニダーゼは9種類の亜型に分類され、抗原性の変異を起こしやすいウイルスである。したがって、毎シーズン流行を予測してワクチン株を選定しなければならず、ワクチンの主要抗原であるヘムアグルチニン測定用試薬も株の変更に伴って準備しなければならない。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0003】

【非特許文献 1】 Mahmood N, Hay AJ., An ELISA utilizing immobilised snowdrop lectin in GNA for the detection of envelope glycoproteins of HIV and SIV. J Immunol Methods., 151(1992)9-13

【非特許文献 2】 Legastelois I., et al., Avian glycan-specific IgM monoclonal antibodies for the detection and quantitation of type A and B haemagglutinins in egg-derived influenza vaccines. J Virol Methods., 178(2011)129-136

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

ヘムアグルチニンの高感度で検体処理能の高い測定法としてモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法が挙げられるが、株特異的な2種類の抗体が必要となり、新たなワクチン製造株若しくはパンデミックウイルスのヘムアグルチニン測定にモノクローナル抗体を供するのは、抗体作製期間を鑑みると困難である。更に、非特許文献 2 に記載されるような鳥類の糖鎖に特異的なモノクローナル抗体を用いる測定法では、特殊な抗体故に供給量等の問題より普及性が低い測定法となり、また動物細胞で増幅したインフルエンザウイルスのヘムアグルチニン測定には使用できない。

## 【0005】

従って、本発明の目的は、2種類の抗ヘムアグルチニン抗体を用いるサンドイッチ免疫測定法よりも短期間で測定系を構築することができる、インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンの新規な測定方法を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、レクチンがインフルエンザウイルスのヘムアグルチニンに結合し、抗体とは結合しないことを見出し、レクチンと抗ヘムアグルチニン抗体とでヘムアグルチニンをサンドイッチすれば、必要な抗ヘムアグルチニン抗体は1種類だけとなり、2種類の抗ヘムアグルチニン抗体を用いるサンドイッチ免疫測定法よりも短期間で測定系を構築することが可能であることに想到し、本発明を完成した。

## 【0007】

すなわち、本発明は、インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンと結合するが、該ヘムアグルチニンと抗原抗体反応する抗ヘムアグルチニン抗体と結合しないレクチンと、該

10

20

30

40

50

抗ヘムアグルチニン抗体とで該ヘムアグルチニンをサンドイッチすることを含む、サンドイッチ免疫測定法によるインフルエンザウイルスのヘムアグルチニンの測定方法であって、前記レクチンが、ヒママメレクチン、チョウセンアサガオレクチン及びデイゴレクチンから成る群より選ばれる少なくとも1種である、測定方法を提供する。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、1種類の抗ヘムアグルチニン抗体を用いて、サンドイッチ免疫測定により精度よくインフルエンザウイルスのヘムアグルチニンを測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1-1】不活化全粒子ウイルスを以下の各界面活性剤にて処理した後に、しょ糖密度勾配遠心分離法によるフラクション解析をウエスタンブロッティングにより示す図である。A. 非処理、B. 1.0% Triton X-100 処理、C. 1.0% NP-40 処理、D. 1.0% Tween 80 処理、E. 1.0% Brij 35 処理、F. 1.0% CHAPS 処理、G. 1.0% Zwittergent 3-14 処理、H. 1.0% CTAB 処理、I. 0.3% SDS 処理、J. 4.0M Urea 処理、K. 3.0M 塩酸グアニジン処理。

【図1-2】同上。

【図2】下記実施例において行ったサンドイッチ免疫測定により測定された、ヘムアグルチニン濃度と吸光度の関係を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

上記の通り、本発明の方法は、インフルエンザウイルスのヘムアグルチニン（以下、単に「ヘムアグルチニン」と呼ぶことがある）と結合するが抗体と結合しないレクチンと、該ヘムアグルチニンと抗原抗体反応する抗ヘムアグルチニン抗体とで該ヘムアグルチニンをサンドイッチする、サンドイッチ免疫測定法によるヘムアグルチニンの測定方法に係る。

【0011】

本発明の方法において用いられるレクチンは、ヘムアグルチニンと結合するものである。ヘムアグルチニンとの結合の有無は、下記参考例2に具体的に記載するレクチンブロット法（PVDF膜上に転写したヘムアグルチニンに、標識レクチンを反応させ、標識が検出されるか否か）により確認することができる。また、「抗体と結合しない」とは、免疫測定に用いられる抗体を構成している免疫グロブリンと同種、同クラスの免疫グロブリン（通常は、マウス、ウサギ又はヒツジ等のIgG）と結合しないことを意味し、マウス、ウサギ及びヒツジ等の各動物由来のIgGとは結合しないことは、下記参考例3に具体的に記載する通り、各動物のHRP標識IgGとのELISAにより、測定される吸光度が、陰性対照(blank)平均値の2倍未満、好ましくは1.5倍未満が否かにより確認することができる。ヘムアグルチニンと結合し、抗体と結合しないレクチンは、チョウセンアサガオレクチン(DSL)、デイゴレクチン(ECL)及びヒママメレクチン(RCA120)である。ヘムアグルチニンと結合し、抗体と結合しないレクチンは、単独で用いることもできるし、2種以上のものを組み合わせて用いることもできる。

【0012】

本発明の方法では、上記レクチンを、固相に固定化してサンドイッチ法を行うことが好ましい。固相としては、サンドイッチELISA等の周知のサンドイッチ免疫測定において用いられているいずれのものをも用いることができ、プレート、チューブ、ビーズ、メンブレン、ゲル等が上げられる。材質としては、ポリスチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ラテックス、ガラス、架橋デキストリン、アガロース、架橋アガロース、ポリアクリルアミド等が挙げられる。

【0013】

これらの固相にレクチンを吸着させる方法としては、共有結合法、物理的吸着法、イオ

10

20

30

40

50

ン結合法及び生化学的特異結合法（例えば、ビオチン結合レクチンを、ストレプトアビジン結合固相に結合させる等）等を採用することができる。特に物理的吸着法及び生化学的特異結合法が、操作が簡便な点で好ましい。

#### 【0014】

ここで、物理的吸着法は、例えば、レクチンを0.05% Tween 20（商品名）を含むpH7～9の緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液生理食塩水、リン酸緩衝液生理食塩水、炭酸緩衝液等）に溶解して固相（例えば、マイクロプレートのウェル）に加え、室温で1～2時間程度静置するか、4程度で一晩静置して吸着させる方法を挙げることができる。また、生化学的特異結合法は、ストレプトアビジン結合固相（プレートやビーズ）が市販されているので、例えば、レクチンを0.05% Tween 20（商品名）を含むpH7～9の緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液生理食塩水、リン酸緩衝液生理食塩水、炭酸緩衝液等）に溶解して市販のストレプトアビジン結合固相に添加し、室温で1～2時間程度静置するか、4程度で一晩静置して吸着させる方法を挙げることができる（下記実施例参照）。物理的吸着法、生化学的特異結合法のいずれにおいても固相と反応させるレクチンの濃度は、特に限定されないが、通常、終濃度で10 µg/mL～60 µg/mL程度である。

#### 【0015】

レクチンを吸着させた固相表面にはこれらが吸着していない表面部分が残存している場合があり、そこへ検体中のヘムアグルチニンや他の分子種が吸着すると正確な測定結果が得られなくなる恐れがある。よって、検体を固相と接触させる前にブロッキング物質を添加してレクチンが吸着していない部分を被覆しておくことが好ましい。このようなブロッキング物質としては、哺乳動物、例えばウシ等から採取できる血清アルブミン、カゼイン、ミルクタンパク、乳酸発酵物、コラーゲン及びそれらの分解物質等が挙げられ、また、免疫測定におけるブロッキング物質として市販されるものを使用することもできる。

#### 【0016】

本発明の方法に用いられる抗ヘムアグルチニン抗体は、インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンと抗原抗体反応するものであり、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。インフルエンザウイルスの型特異的に測定を行う場合には、通常、各型のヘムアグルチニンと特異的に抗原抗体反応する抗ヘムアグルチニンモノクローナル抗体が用いられる。

#### 【0017】

抗ヘムアグルチニン抗体は、通常、標識されている。標識に使用される標識物質としては、酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等）、アイソトープ（<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H等）、蛍光色素（ルミノール、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸等）、化学発光物質、ハプテン、ビオチン、アビジン（例えば、ストレプトアビジン等）が挙げられるが、通常タンパク質の標識に使用可能であるものであれば、特に限定されない。なお、ここで標識物質とは、ビオチンのようにそれ自体を直接検出せず、その物質と特異的に結合能を有する物質（例えばアビジン）に検出可能な標識を結合したものを組み合わせて用いる方法に使用する物質も包含する。

#### 【0018】

前述の抗体の標識方法は、標識物質に適した公知の方法、例えば、酵素を標識する際にはグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸架橋法、マレイミド架橋法、カルボジイミド法、活性化エステル法等、放射性同位物質で標識する際にはクロラミンT法、ラクトペルオキシダーゼ法等から適宜選択することができる。なお、標識抗ヘムアグルチニン抗体は、種々の型に対するものが市販されているので、市販品を用いることも可能である。

#### 【0019】

本発明の方法では、通常、上記した固相化レクチンと、標識抗ヘムアグルチニン抗体と、インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンを含む検体とを反応させ、洗浄後、固相に

10

20

30

40

50

結合した標識を測定する。

【0020】

本発明の方法を適用する検体は、インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンを含むものであれば、インフルエンザウイルス粒子を含むものでも、そこからヘムアグルチニンを抽出したものでよい。ヘムアグルチニンを抽出する場合には、ヘムアグルチニンの存在様式に拘わらず測定可能であり、ウイルス粒子中に存在しても遊離ヘムアグルチニンとして存在しても測定することができ、測定精度も高まるので好ましい。ヘムアグルチニンの抽出には、陽イオン性又は陰イオン性界面活性剤（以下、両者を総称して「イオン性界面活性剤」）を用いることができる。イオン性界面活性剤の好ましい例としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、ドデシル硫酸リチウム（LiDS）、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（CTAB）、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（CTAC）及び塩化ヘキサデシルピリジニウム（HPC）を挙げることができ、特に好ましくは、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（CTAB）である。イオン性界面活性剤は、単独でも2種以上のものを組み合わせても用いることができる。

10

【0021】

イオン性界面活性剤での処理条件は、好ましくは、検体に終濃度0.1~2.0%となるようにイオン性界面活性剤を添加し、37℃にて1~2時間程度静置あるいは攪拌してヘムアグルチニンをウイルス粒子より抽出することができるが、これに限定されるものではない。

【0022】

固相化レクチン、検体及び標識抗ヘムアグルチニン抗体は、同時に反応させてもよいし、先ず固相化レクチンと検体を反応させ、洗浄後、標識抗ヘムアグルチニン抗体を反応させてもよいし、先に検体と標識抗ヘムアグルチニン抗体を反応させて免疫複合物を形成後、固相化レクチンと反応させてもよい。各反応は、室温で30分~120分程度で行うことが可能である。反応系中のヘムアグルチニンの終濃度範囲は、通常、1ng/mL~1µg/mL程度であり、標識抗ヘムアグルチニン抗体の終濃度範囲は、通常、0.2~50µg/mL程度である。

20

【0023】

反応後、固相を洗浄し、固相に結合した標識を測定する。洗浄液としては、例えばTween（商品名）系界面活性剤等の界面活性剤を添加した緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、リン酸緩衝液生理食塩水、トリス塩酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液生理食塩水）等が挙げられる。標識物質の検出法としては、用いる標識物質により異なるが、例えば、標識物質にビオチンを使用する場合には、ストレプトアビジン等を介してペルオキシダーゼ等の酵素を標識物質としてビオチンを含む複合体へ結合させ、該酵素の基質としてテトラメチルベンジジン等の発色物質及び過酸化水素水を加え、酵素反応による生成物の発色の度合いを吸光度の変化で測定する方法等を挙げることができる。また、標識物質に蛍光物質や化学発光物質を使用する場合には、反応後の溶液の蛍光や発光を測定する方法等が挙げられる。

30

【0024】

なお、標識抗ヘムアグルチニン抗体に代えて、標識していない抗ヘムアグルチニン抗体を反応させ、さらに標識抗イムノグロブリン抗体を反応させて、洗浄後、固相に結合した標識を測定することも可能である（間接抗体法）。もっとも、間接抗体法では、抗原抗体反応の回数が1回多くなるので、迅速な検査が求められる場合には、先に述べた、標識抗ヘムアグルチニン抗体を用いる直接法が好ましい。

40

【0025】

本発明の測定方法においては、検体中のヘムアグルチニン濃度は、予め既知濃度のヘムアグルチニン標準液を用いてヘムアグルチニンと標識物質の検出結果との関係について検量線を作成し、未知濃度の検体についての検出結果と前述検量線とを用いる方法によって、定量することができる。

【0026】

50

本発明の測定方法の好ましい一形態を以下に説明する。まず、固相にレクチンを吸着（コーティング）させる。好ましい吸着方法は、上記した通りである。

【0027】

上記吸着後、スキムミルク等のブロッキング物質を含む緩衝液を添加して、室温で30～2時間程度静置して、レクチンが吸着していない部分を被覆しておくことが好ましい。

【0028】

検体中のヘムアグルチニンがウイルス粒子中に存在している場合、検体中に終濃度0.1～2.0%となるようにCTABを添加し、37℃にて1～2時間程度静置あるいは攪拌してヘムアグルチニンをウイルス粒子より抽出する。

【0029】

次いで、レクチンが吸着した固相に検体若しくはヘムアグルチニン抽出処理をした検体を添加し、例えば、室温で30～120分間の適切な時間静置あるいは攪拌し、上記レクチンにヘムアグルチニンを結合させる。

【0030】

その後、この複合体が結合した固相を、Tween系界面活性剤等を含む緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液生理食塩水、リン酸緩衝液生理食塩水等）等の洗浄液で洗浄する。さらに、前述固相に、標識物質で標識された抗ヘムアグルチニン抗体または抗ヘムアグルチニン抗体と標識物質で標識された抗抗ヘムアグルチニン抗体を添加して、例えば、室温で30～120分間静置あるいは攪拌し、ヘムアグルチニンに抗ヘムアグルチニン抗体（または抗ヘムアグルチニン抗体-抗抗ヘムアグルチニン抗体）を結合させる。この操作によって、固相-レクチン-ヘムアグルチニン-抗ヘムアグルチニン抗体（または固相-レクチン-ヘムアグルチニン-抗ヘムアグルチニン抗体-抗抗ヘムアグルチニン抗体）からなる複合体を形成させる。次に、前述複合体の標識物質を検出してヘムアグルチニンを測定する。

【0031】

別に、ヘムアグルチニン標準品の濃度と標識物質の検出結果（例えば吸光度）との関係について検量線を作成し、未知試料についての検出結果と前記検量線とを用いて未知試料中のヘムアグルチニンを定量する。

【実施例】

【0032】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0033】

参考例1 ヘムアグルチニン抽出用界面活性剤の検討

発育鶏卵にて増幅し、限外ろ過、しょ糖密度勾配遠心分離法及びベータプロピオラクトンによって精製及び不活化したA/Brisbane/59/2007株の不活化全粒子ウイルスに、終濃度が1.0%となるように、Triton X-100（商品名、シグマアルドリッチ ジャパン社製）、NP-40（商品名、ナカライテスク社製）、Tween 80（商品名、和光純薬工業社製）、Brij 35（商品名、和光純薬工業社製）、CHAPS（商品名、同仁化学研究所社製）、Zwittergent 3-14（商品名、Calbiochem社製）及びCTAB（和光純薬工業社製）を添加し、終濃度が0.3%となるようにSDSを、終濃度が4.0M及び3.0MとなるようにUrea（エムピーバイオジャパン社製）及び塩酸グアニジン（エムピーバイオジャパン社製）を添加して、37℃にて60分間静置して反応させた。反応溶液に終濃度2.0%となるようにしょ糖を添加して、これを分画密度20～50w/w%のしょ糖密度勾配遠心分離法にて17フラクションに分画した。各フラクション溶液とSDS-PAGE用サンプルバッファー（8% SDS, 40%グリセロール/250mM Tris-HCl Buffer pH6.8）とを等量混合して100℃にて5分間静置して反応させた。反応溶液を12.5% ポリアクリルアミドゲル（アトー社製 ePAGE L）にて電気泳動し、セミドライ式転写装置（アトー社製）にてPVDF膜への転写反応を行った。転写後のPVDF膜を75m

10

20

30

40

50

Lのブロッキングバッファー(10%スキムミルク含有TBS)に浸し、室温にて4時間のマスキング反応を行った。反応後、適当量のTBSにてPVDF膜を3回洗浄し、その後PVDF膜を抗HA抗体溶液(SRD(Single radial immunodiffusion)用抗血清)に浸して4にて約16時間反応した(一次抗体反応)。一次抗体反応後、Tween 20(商品名)含有TBSにてPVDF膜を5回洗浄し、HRP標識抗ヒツジ抗体(Bethyl社製)溶液を添加して室温にて60分間反応させた(二次抗体反応)。二次抗体反応後、Tween 20(商品名)含有TBSにてPVDF膜を5回洗浄し、Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(商品名、サーモサイエンティフィック社製)にてヘムアグルチニンの検出を行った。検出には、LAS-3000(商品名、GEヘルスケア社製)を使用した。

10

## 【0034】

これにより、図1に示すとおり非処理の不活化全粒子ウイルスやタンパク質変性剤であるUreaや塩酸グアニジン処理では高密度領域にのみヘムアグルチニンが検出され、非イオン性界面活性剤であるTriton X-100(商品名)、NP-40(商品名)、Tween 80(商品名)及びBrij 35(商品名)や両イオン性界面活性剤であるCHAPS(商品名)及びZwittergent 3-14(商品名)では高密度から低密度にかけて様々な密度にヘムアグルチニンが検出された。一方で、イオン性界面活性剤であるCTABやSDS処理によって低密度側にヘムアグルチニンのバンドが収束するため、イオン性界面活性剤処理が最もヘムアグルチニンの可溶化・抽出処理に適していることが判る。

20

## 【0035】

## 参考例2 各種レクチンとヘムアグルチニンの結合

MDCK細胞及び発育鶏卵にて、A/California/7/2009(H1N1)、A/Brisbane/59/2007(H1N1)、A/Victoria/210/2009(H3N2)、A/Uruguay/716/2007(H3N2)、B/Brisbane/60/2008(B型 Victoria lineage)及びB/Florida/4/2006(B型 Yamagata lineage)の6株のウイルス溶液を調製した。調製したウイルスとSDS-PAGE用サンプルバッファー(8%SDS, 40%グリセロール/250mM Tris-HCl Buffer pH 6.8)とを等量混合して100にて5分間静置にて反応させた。反応溶液を12.5%ポリアクリルアミドゲル(アトー社製 ePAGE L)にて電気泳動し、セミドライ式転写装置(アトー社製)にてPVDF膜への転写反応を行った。転写後のPVDF膜を75mLのブロッキングバッファー(10%スキムミルク含有TBS)に浸し、室温にて4時間のマスキング反応を行った。反応後、適当量のTBSにてPVDF膜を3回洗浄し、各種ビオチン化レクチン:VECTOR LABORATORIES社製)との反応を室温にて4時間行った。レクチンとの反応後、Tween 20(商品名)含有TBSにてPVDF膜を5回洗浄し、HRP標識ストレプトアビジン(サーモサイエンティフィック社製)溶液を添加して室温にて60分間反応させた。反応後、Tween 20(商品名)含有TBSにてPVDF膜を5回洗浄し、Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(商品名、サーモサイエンティフィック社製)にてヘムアグルチニンとレクチンとの複合体を検出した。検出には、LAS-3000(商品名、GEヘルスケア社製)を使用した。

30

40

## 【0036】

その結果、RCA120、DSL及びECLのいずれも、発現基材としてMDCK細胞及び発育鶏卵のどちらを用いて調製したウイルス由来のヘムアグルチニンに対しても結合することが確認できた。

## 【0037】

## 参考例3 各種レクチンとIgGとの結合

ストレプトアビジンコートしたマイクロプレート(Nunc社製)に0.05%Tween 20(商品名)/トリス塩酸緩衝液生理食塩水(TBST)で終濃度が30µg/m

50

Lとなるように希釈した各ビオチン化レクチンを100 $\mu$ L/ウェルで添加して25 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。レクチン反応後、各ウェルをWash buffer (TBST) 300 $\mu$ Lで5回洗浄した。次に、2.5%スキムミルク/TBSTを各ウェルに300 $\mu$ L添加して、25 $^{\circ}$ Cで1時間のブロッキングを行い、その後、各ウェルをWash buffer 300 $\mu$ Lで5回洗浄し、0.5%スキムミルク/TBSTもしくは0.5%BSA/TBSTで希釈したHRP標識化IgG抗体(マウス抗体: BioSS社製 Mouse Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (H+L), HRP Conjugated、ウサギ抗体: Bethyl Laboratories社製 Sheep IgG-heavy and light chain antibody、ヒツジ抗体: Bethyl Laboratories社製 Rabbit IgG-heavy and light chain antibody)を各ウェルに100 $\mu$ L添加して25 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。抗体反応後、各ウェルをWash buffer 300 $\mu$ Lで5回洗浄し、TMB溶液(和光純薬工業社製)を各ウェルに200 $\mu$ L添加して25 $^{\circ}$ Cで20分間反応させた後、1mol/L硫酸(和光純薬工業社製)を各ウェルに50 $\mu$ L添加して反応を停止した。反応停止後、450nmにおける吸光度を測定した。

## 【0038】

結果を表1に示す。表1に示す通り、RCA120、DSL及びECLのいずれも、マウス、ウサギ及びヒツジIgGと反応させた際の吸光度が、陰性対照(blank)の値の2倍未満であり、マウス、ウサギ及びヒツジIgGと反応しないことがわかる。

## 【0039】

なお、RCA120、DSL及びECLのいずれも、ヘムアグルチニンと結合することは上記参考例2において確認されているので、これらのレクチンのいずれを用いても、ヘムアグルチニンをサンドイッチ免疫測定により測定可能であると考えられた。

## 【0040】

## 【表1】

Lectin	BLANK				Mouse IgG			Rabbit IgG			Sheep IgG		
	1	2	3	平均	1	2	3	1	2	3	1	2	3
RCA120	0.057	0.051	0.055	0.054	0.065	0.072	0.070	0.079	0.079	0.077	0.065	0.063	0.067
DSL	0.046	0.047	0.050	0.048	0.055	0.061	0.061	0.055	0.056	0.058	0.054	0.053	0.052
ECL	0.049	0.051	0.047	0.049	0.053	0.061	0.058	0.056	0.058	0.057	0.052	0.055	0.051

## 【0041】

## 実施例1 サンドイッチ免疫測定

NIHSC(The National Institute for Biological Standards and Control)より購入したSRD試験用標準抗原のバイアルに1mLの水を加え、5分間静置後に十分に攪拌した(50 $\mu$ g HA/mL)。50 $\mu$ LのNIHSC標準品(50 $\mu$ g HA/mL)と50 $\mu$ Lの1.0%CTABを混ぜて十分に攪拌した後(25 $\mu$ g HA/mL)、37 $^{\circ}$ Cで2時間静置した。次いで、10倍希釈して2.5 $\mu$ g HA/mLのヘムアグルチニン溶液を調製した。この標準液を希釈し、3.13、6.25、12.5、25、50、100及び250ng HA/mLのヘムアグルチニン溶液を調製した。

## 【0042】

ストレプトアビジンコートしたマイクロプレート(Nunc社製)に0.05%Tween 20(商品名)/トリス塩酸緩衝液生理食塩水(TBST)で終濃度が30 $\mu$ g/mLとなるように希釈した各ビオチン化レクチンを100 $\mu$ L/ウェルで添加して25 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。レクチン反応後、各ウェルをWash buffer (TBST) 300 $\mu$ Lで5回洗浄した。次に、2.5%スキムミルク/TBSTを各ウェルに300 $\mu$ L添加して、25 $^{\circ}$ Cで1時間のブロッキングを行い、その後、各ウェルをWash bu

ffer 300  $\mu$ Lで5回洗浄し、調製した各濃度のヘムアグルチニン溶液を各ウェルに100  $\mu$ L添加して25 で2時間反応させた。反応後、各ウェルをWash buffer 300  $\mu$ Lで5回洗浄し、0.5%スキムミルク/TBSTで終濃度2  $\mu$ g/mLとなるように希釈したHRP標識抗ヘムアグルチニン抗体(Sino Biological社製 2009H1N1 Influenza (Swine Flu) Hemagglutinin ELISA kit添付)溶液を各ウェルに100  $\mu$ L添加して25 で1時間反応させた。抗ヘムアグルチニン抗体との反応後、各ウェルをWash buffer 300  $\mu$ Lで5回洗浄し、TMB溶液(和光純薬工業社製)を各ウェルに200  $\mu$ L添加して25 で20分間反応させた後、1mol/L硫酸(和光純薬工業社製)を各ウェルに50  $\mu$ L添加して反応を停止した。反応停止後、450nmにおける吸光度を測定した。

10

## 【0043】

表2及び図2にRCA120、DSL及びECLを用いたELISAによるヘムアグルチニン測定結果を示すが、いずれのレクチンにおいてもヘムアグルチニン(HA)濃度と吸光度に良好な相関が確認できた。したがって、ヘムアグルチニン結合レクチン及び1種類の抗ヘムアグルチニン抗体にて高感度なヘムアグルチニン測定法が可能となる。

## 【0044】

## 【表2】

HA濃度 (ng/mL)	RCA120	DSL	ECL
250	1.936	0.850	1.808
125	1.040	0.462	0.916
62.5	0.589	0.285	0.506
31.3	0.322	0.158	0.272
15.6	0.223	0.112	0.170
7.81	0.144	0.083	0.158
3.91	0.125	0.106	0.093
BLANK	0.084	0.058	0.042

20

30

## 【0045】

実施例2 SRD試験の測定値との相関確認

A/California/07/2009(X-179A)、A/Victoria/361/2011(IVR-165)及びB/Wisconsin/01/2010(BX-41A)の標準インフルエンザHA抗原(一元放射免疫拡散試験用 国立感染症研究所)の各バイアルに1mLの水を加え、5分間静置後に十分に攪拌した。50  $\mu$ Lの標準インフルエンザHA抗原溶液と50  $\mu$ Lの1.0%CTABを混ぜて十分に攪拌した後、37 で2時間静置した。次いで、10倍希釈してヘムアグルチニン溶液を調製した。この標準液を希釈し、1.95、3.91、7.81、31.3、62.5及び125 ng HA/mLのヘムアグルチニン溶液を調製してこれを検量線用標準溶液とした。また、一元放射免疫拡散試験(SRD試験)によりHA濃度を値付けた製造工程液(A/California/07/2009(X-179A)株、A/Victoria/361/2011(IVR-165)株及びB/Wisconsin/01/2010(BX-41A)株)も上記の検量線用標準溶液と同様にCTAB処理及び希釈操作を行い測定検体とした。

40

## 【0046】

ストレプトアビジンコートしたマイクロプレート(Nunc社製)に0.05%Tween 20(商品名)/トリス塩酸緩衝液生理食塩水(TBST)で終濃度が30  $\mu$ g/mLとなるように希釈したビオチン化ECLを100  $\mu$ L/ウェルで添加して25 で2時間反応させた。レクチン反応後、各ウェルをWash buffer(TBST)300

50

μLで5回洗浄した。次に、2.5%スキムミルク/TBSTを各ウェルに300μL添加して、25℃で1時間のブロッキングを行い、その後、各ウェルをWash buffer 300μLで5回洗浄し、調製した検量線用標準溶液及び測定検体を各ウェルに100μL添加して25℃で2時間反応させた。反応後、各ウェルをWash buffer 300μLで5回洗浄し、0.5%スキムミルク/TBSTで2500倍希釈した各株の参照抗血清（一元放射免疫拡散試験用、国立感染症研究所）溶液を抗ヘムアグルチニン抗体として各ウェルに100μL添加して25℃で1時間反応させた。抗ヘムアグルチニン抗体との反応後、各ウェルをWash buffer 300μLで5回洗浄し、0.5%スキムミルク/TBSTで2500倍希釈したHRP標識抗ヒツジIgG抗体（Bethyl Laboratories社）を各ウェルに100μL添加して25℃で1時間反応させた。抗ヒツジIgG抗体の反応後、TMB溶液（和光純薬工業社製）を各ウェルに200μL添加して25℃で20分間反応させた後、1mol/L硫酸（和光純薬工業社製）を各ウェルに50μL添加して反応を停止した。反応停止後、450nmにおける吸光度を測定した。

【0047】

表3、表4及び表5にA/H1N1亜型（A/California/07/2009 X-179A）、A/H3N2亜型（A/Victoria/361/2011 IVR-165）及びB型（B/Wisconsin/01/2010 BX-41A）のSRD試験の測定結果、ヘムアグルチニン結合レクチンを用いたELISAの測定結果及びSRD試験の測定値に対するELISAの測定値の割合を示す。表に示すように、SRD試験の測定値に対する本ELISA測定値の割合は、A/H1N1亜型で92.2～111.1%、A/H3N2亜型で96.9%～132%、B型で80.4～91.6%となり、良好な相関が確認できた。したがって、ヘムアグルチニン結合レクチンを用いた本ELISAにより、ワクチンの力価試験であるSRD試験結果と相関のある測定値を得ることが可能である。

【0048】

【表3】

**A/H1N1 : A/California/07/2009 (X-179A)**

検体	ELISA (ugHA/mL)	SRD (ugHA/mL)	Ratio (%) (ELISA / SRD)
H1-1	458	412	111
H1-2	441	425	104
H1-3	451	436	103
H1-4	445	430	103
H1-5	425	416	102
H1-6	432	405	107
H1-7	422	433	97.5
H1-8	389	422	92.2
H1-9	411	418	98.3
H1-10	421	410	103

【0049】

10

20

30

40

【表 4】

**A/H3N2 : A/Victoria/361/2011 (IVR-165)**

検体	ELISA (ugHA/mL)	SRD (ugHA/mL)	Ratio (%) (ELISA / SRD)
H3-1	467	361	129
H3-2	482	398	121
H3-3	440	370	119
H3-4	435	372	117
H3-5	411	366	112
H3-6	436	387	113
H3-7	475	361	132
H3-8	442	386	115
H3-9	428	377	114
H3-10	373	384	97.1

10

【 0 0 5 0 】

【表 5】

**B : B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A)**

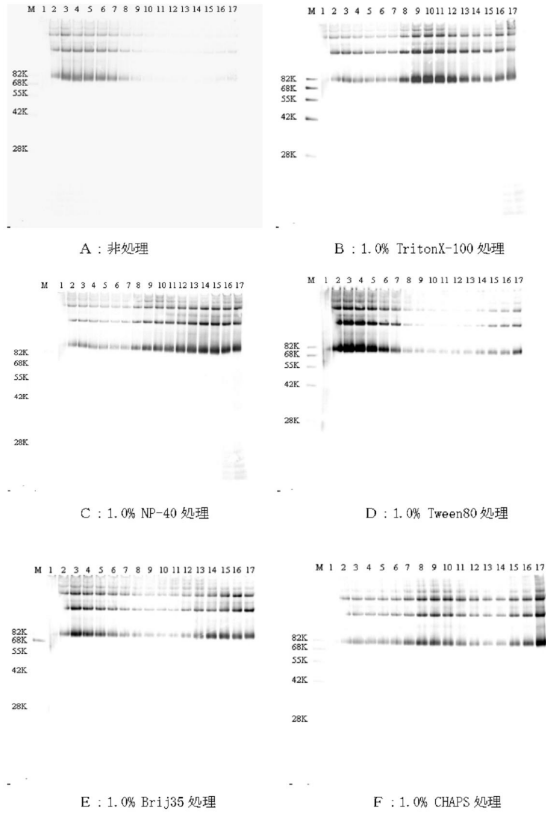
検体	ELISA (ugHA/mL)	SRD (ugHA/mL)	Ratio (%) (ELISA / SRD)
B-1	395	431	91.6
B-2	362	423	85.6
B-3	365	412	88.6
B-4	353	422	83.6
B-5	353	439	80.4
B-6	375	451	83.1
B-7	391	446	87.7
B-8	365	437	83.5
B-9	384	461	83.3
B-10	363	436	83.3

20

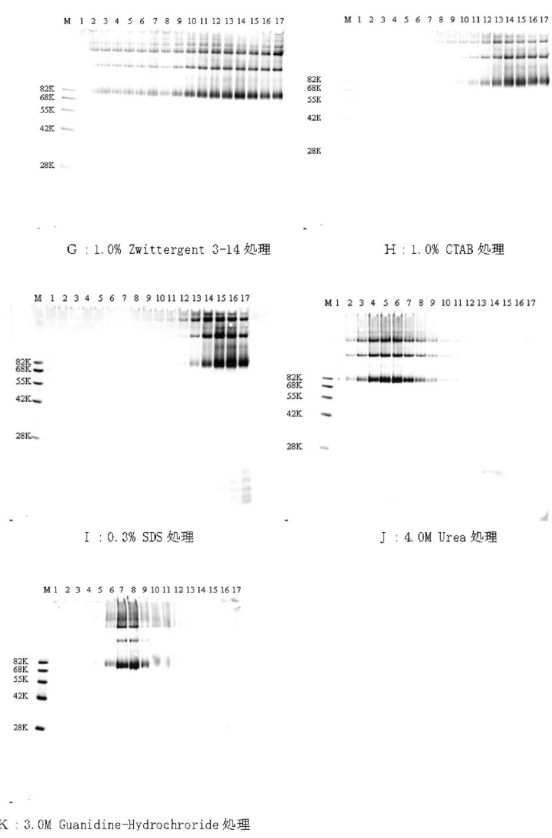
30

40

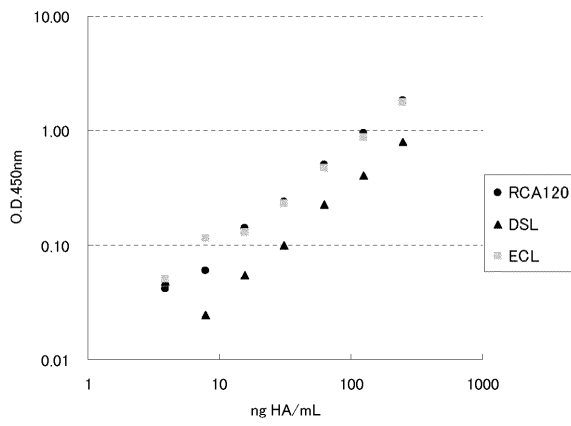
【 图 1 - 1 】



【 图 1 - 2 】



【 图 2 】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2012-528139(JP,A)  
国際公開第2010/136896(WO,A1)  
特表2009-532352(JP,A)  
SATO Yuichiro, 外3名, High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner, *Biochem Biophys Res Commun*, 2011年 2月11日, Vol.405, No.2, Page.291-296 (2011.02.11)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	测量流感病毒血凝素的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6280868B2</a>	公开(公告)日	2018-02-14
申请号	JP2014539801	申请日	2013-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	デンカ生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	デンカ生研株式会社		
[标]发明人	三股亮太郎 泉谷憲幸		
发明人	三股 亮太郎 泉谷 憲幸		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N2333/11		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/543.501.H G01N33/531.B		
优先权	2012222618 2012-10-05 JP		
其他公开文献	JPWO2014054712A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了一种测量流感病毒血细胞凝集素的新方法，其可以在比使用两种抗血凝素抗体的夹心免疫测定方法更短的时间内构建测定系统。用于测量流感病毒的血凝素的方法通过夹心免疫测定方法实现，所述夹心免疫测定方法包括将血细胞凝集素夹在结合血细胞凝集素但不结合抗体的凝集素和抗血凝素抗体之间，所述抗血凝素抗体经历抗原 - 抗体反应。血凝素。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6280868号 (P6280868)
(45) 発行日 平成30年2月14日 (2018. 2. 14)	(24) 登録日 平成30年1月26日 (2018. 1. 26)	
(51) Int. Cl. G01N 33/569 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01)	F I G O I N 33/569 L G O I N 33/543 5 O I H G O I N 33/531 B	
請求項の数 5 (全 13 頁)		
(21) 出願番号 特願2014-539801 (P2014-539801)	(73) 特許権者 591125371 デンカ生研株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号	
(86) (22) 出願日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)	(74) 代理人 110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2013/076882	(72) 発明者 三股 亮太郎 新潟県五泉市南本町一丁目2番2号 デンカ生研株式会社 新潟工場内	
(87) 国際公開番号 W02014/054712	(72) 発明者 泉谷 憲幸 新潟県五泉市南本町一丁目2番2号 デンカ生研株式会社 新潟工場内	
(87) 国際公開日 平成26年4月10日 (2014. 4. 10)	審査官 草川 貴史	
審査請求日 平成26年8月18日 (2016. 8. 18)		
(31) 優先権主張番号 特願2012-222618 (P2012-222618)		
(32) 優先日 平成24年10月5日 (2012. 10. 5)		
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルスのヘムアグロチニンの測定方法

最終頁に続く