

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/204265

発行日 平成30年6月14日 (2018.6.14)

(43) 国際公開日 平成28年12月22日 (2016.12.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02 ZNA	4B063
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

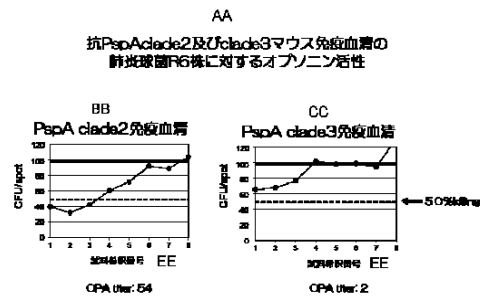
出願番号 特願2017-524852 (P2017-524852)	(71) 出願人 000173692 一般財団法人阪大微生物病研究会 大阪府吹田市山田丘3番1号 大阪大学内
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/068069	
(22) 国際出願日 平成28年6月17日 (2016.6.17)	
(31) 優先権主張番号 特願2015-122520 (P2015-122520)	(71) 出願人 504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(32) 優先日 平成27年6月18日 (2015.6.18)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100088904 弁理士 庄司 隆
	(74) 代理人 100124453 弁理士 資延 由利子
	(74) 代理人 100135208 弁理士 大杉 卓也
	(72) 発明者 明田 幸宏 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺炎球菌補体依存性殺菌能測定方法

(57) 【要約】

肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定方法に関し、いずれの莢膜血清型の肺炎球菌に対しても測定可能な活性測定方法を提供する。莢膜欠損型肺炎球菌、即ち無莢膜型若しくは無莢膜に近い型、又はトランスペアレント (Transparent) 型の肺炎球菌を用いて肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能を測定することによる。いずれの莢膜血清型の肺炎球菌に対しても補体依存性殺菌能を測定することができる。



AA Opsonin activity of Anti-PspA clade2 and clade3 mouse immune serum with respect to pneumococcus R6 strain
 BB PspA clade2 immune serum
 CC PspA clade3 immune serum
 EE Sample dilution number

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の 1) ~ 3) の工程を含む、肺炎球菌特異抗体の、肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定方法：

- 1) 莢膜欠損型肺炎球菌 (a) と肺炎球菌特異抗体を含む試料 (b) とを混合する工程；
- 2) 前記工程 1) の後、補体成分 (c) 及び貪食細胞 (d) をさらに加える工程；
- 3) 前記工程 2) の後、莢膜欠損型肺炎球菌 (a) における一定量の菌が死滅する試料 (b) の濃度を決定する工程。

【請求項 2】

前記工程 3) における一定量が、50%である、請求項 1 に記載の補体依存性殺菌能測定方法。 10

【請求項 3】

前記工程 1) の補体成分 (c) の使用量が、莢膜型肺炎球菌 (a') を用いて測定する場合に使用する補体成分 (c') に比べて、前記工程 1) の補体成分 (c) の使用量が、1/400 ~ 1/100である、請求項 1 又は 2 に記載の補体依存性殺菌能測定方法。

【請求項 4】

前記工程 1) 及び 2) に示す莢膜欠損型肺炎球菌が、無莢膜型肺炎球菌又はトランスペアレント型肺炎球菌である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の補体依存性殺菌能測定方法。

【請求項 5】

莢膜欠損型肺炎球菌 (a) が、WU2株、D39株、KK1162株、ATCC6303株、BG9739株、TIGR4株、及びEF5668株から選択されるいずれかの肺炎球菌由来の莢膜欠損型肺炎球菌である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の測定方法。 20

【請求項 6】

前記工程 1) の貪食細胞 (d) が、HL-60由来細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の測定方法。

【請求項 7】

試料 (b) が、被験体より採取した血液試料である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の測定方法。

【請求項 8】

試料 (b) が、肺炎球菌ワクチンの接種を受けた被験体より採取した血液試料である、請求項 7 に記載の測定方法。 30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の測定方法により測定した結果に基づいて検査することを特徴とする、肺炎球菌ワクチンの免疫原性の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肺炎球菌補体依存性殺菌能測定方法に関する。

【0002】

本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願 2015 - 122520 号優先権を請求する。 40

【背景技術】

【0003】

肺炎球菌は主要な呼吸器病原性細菌であり、肺炎の原因菌として分離頻度の高い細菌である。肺炎球菌は、小児や成人に感染すると髄膜炎・敗血症を含む侵襲性感染症 (Invasive pneumococcal disease : IPD)、や市中肺炎 (Community-Acquired Pneumonia : CAP)、及び医療介護関連肺炎 (Nursing and healthcare associated pneumonia ; NHCAP) を惹起する。肺炎球菌は菌体の外側に病原性の上で重要な多糖体でできた莢膜を保持しており、莢膜血清型 (serotype) は21のグループに属する93種以上と、25の単一型の計118型以上に分類されている。この莢膜がバリアーとなり、菌はヒト多核白血球による貪食作用に 50

強い抵抗性を示す。

【0004】

現行の肺炎球菌ワクチンには肺炎球菌の血清型を決定する莢膜多糖体を精製したものが抗原として含まれている。小児に重症感染症を惹起しやすく、また耐性菌の多い莢膜型7種の肺炎球菌から精製した抗原と無毒化ジフテリアトキシン(CRM₁₉₇)を結合した7価結合型ワクチン(PCV7)が市販された。PCV7導入後にワクチン含有の7血清型の肺炎球菌による侵襲性感染症は明らかに減少したものの、小児及び成人におけるワクチン非含有血清型である血清型19AなどによるIPD症例の増加の問題が浮上してきた。このため、PCV7にさらに6血清型の莢膜多糖体を抗原として追加した13価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV13)が導入され、既に承認、市販されている。また、成人に対する23種の精製された

10

【0005】

Croneyらは、PCV13接種前の2002～2010年の間に発症した米国アラバマ州の小児侵襲性感染症由来肺炎球菌株を集めて大規模調査を行った。その結果、PCV13に含有される血清型は60%しか含んでおらず、残りの40%の菌株にはPCV13に含まれない17血清型が含まれることを報告した。我が国でも2011年から小児に対するPCV7接種の公費助成が開始されたが、2012年には米国と同様にワクチン非含有血清型によるIPD症例の増加が報告されている。現行ワクチンにワクチン非含有血清型莢膜多糖体を抗原として追加し続けることは非現実的であり、このことは莢膜多糖体をベースとする現行の肺炎球菌ワクチンの限界を示唆するものであると言える。

20

【0006】

以上のような現行肺炎球菌ワクチンの欠点を補う目的で、肺炎球菌表層タンパク質抗原の一つである肺炎球菌表面タンパク質A(Pneumococcal surface protein A:PspA)が、新規肺炎球菌ワクチン抗原として注目されている。PspAの α -ヘリックス及びプロリンリッチ領域には肺炎球菌に対して感染防御作用を示す抗体が認識する抗原エピトープが存在することが知られている。PspAは、そのN末端に存在するclade definition領域のアミノ酸配列により、大きく3つのファミリーに分類され、さらに6つのクレードと呼ばれる亜群に分類される。臨床より分離される肺炎球菌のPspAファミリーは、ファミリー1及び2で98%以上を占める。PspAは病原因子としても働き、肺炎球菌菌体表面への補体C₃の結合を阻害することが報告されている。抗PspA特異抗体は、PspAの持つ補体阻害活性に対して拮抗的に作用し、本菌に対する感染防御活性を示すことが報告されている。この感染防御活性は、異なるPspAファミリーを交差認識する抗体によっても起こる。異なるPspAの交差反応性には多様性があるため、より広域な交差反応を示すファミリー1とファミリー2に属するクレードの組み合わせを選別することは、PspAをベースとするワクチンの開発に重要と考えられる。

30

【0007】

CbpA(Cholin binding protein A)及びPsaA(Pneumococcal surface adhesion A)は肺炎球菌細胞表面に発現するタンパク質であるとともに、病原因子としても知られ、ワクチン抗原候補として考えられている。CbpAはPspAと同じくコリン結合性タンパク質であり、全ての肺炎球菌株の約75%で検出される。CbpAが上皮細胞あるいは粘膜細胞表面の免疫グロブリン受容体へ結合することにより、肺炎球菌は細胞内に取りこまれ、その後、transcytosisされて生体内へと侵入する(非特許文献1)。PsaAはすべての血清型の肺炎球菌に存在するタンパク質であり、ほかの細菌の接着分子(adhesin)と同様に宿主細胞への付着に重要な因子である(非特許文献2)。

40

【0008】

肺炎球菌ワクチンの免疫誘導能(免疫原性)や肺炎球菌感染症に罹患した患者の液性免疫の評価を目的として、ELISA法による血清型特異IgG濃度とmultiplex opsonization assay(MOPA)による血清型特異的なオプソニン活性の測定が可能である。ELISA法による血清型特異IgG濃度測定は、血清中の肺炎球菌の共通抗原[cell wall polysaccharideと22F莢膜ポリサッカライド(CPS)]に対する抗体を吸収後に、ELISAプレートに固定した個々

50

の血清型のCPS抗原と結合するIgG抗体量から定量することが可能である（非特許文献3）。現在、小児における侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）に対する小児用7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）の集団感染防御閾値として、血清型特異的IgG濃度 0.20 µg/ml（第3世代ELISA）が示されている（非特許文献4）。一方、Burtonらは、肺炎球菌ワクチン接種後の血清型特異抗体の機能評価のために、複数の血清型に対するオプソニン活性（opsonization index; OI）の測定を可能にするMOPA法を開発した（非特許文献5）。しかしながら、何れの評価方法も莢膜血清型に特化した測定方法であった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Mol Microbiol 25: 819-829, 1997

【非特許文献2】Microb Pathog 21: 17-22, 1996

【非特許文献3】Clin Diagn Lab Immunol 8: 266-272, 2001

【非特許文献4】Clin Vaccine Immunol 18: 2161-2167, 2011

【非特許文献5】Clin Vaccine Immunol 13: 1004-1009, 2006

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定方法に関し、いずれの莢膜血清型の肺炎球菌に対しても測定可能な活性測定方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、莢膜欠損型肺炎球菌、即ち無莢膜型若しくは無莢膜に近い型、又はトランスペアレント（Transparent）型の肺炎球菌を用いて肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能（OPA）を測定することで、本発明の課題を解決することを見出した。上記方法により、いずれの莢膜血清型の肺炎球菌に対しても補体依存性殺菌能を測定することができる。

【0012】

本発明は、すなわち以下よりなる。

1. 以下の1)～3)の工程を含む、肺炎球菌特異抗体の、肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定方法：

1) 莢膜欠損型肺炎球菌（a）と肺炎球菌特異抗体を含む試料（b）とを混合する工程；

2) 前記工程1)の後、補体成分（c）及び貪食細胞（d）をさらに加える工程；

3) 前記工程2)の後、莢膜欠損型肺炎球菌（a）における一定量の菌が死滅する試料（b）の濃度を決定する工程。

2. 前記工程3)における一定量が、50%である、前項1に記載の補体依存性殺菌能測定方法。

3. 前記工程1)の補体成分（c）の使用量が、莢膜型肺炎球菌（a'）を用いて測定する場合に使用する補体成分（c'）に比べて、前記工程1)の補体成分（c）の使用量が、1/400～1/100である、前項1又は2に記載の補体依存性殺菌能測定方法。

4. 前記工程1)及び2)に示す莢膜欠損型肺炎球菌が、無莢膜型肺炎球菌又はトランスペアレント型肺炎球菌である、前項1～3のいずれかに記載の補体依存性殺菌能測定方法。

5. 莢膜欠損型肺炎球菌（a）が、WU2株、D39株、KK1162株、ATCC6303株、BG9739株、TI GR4株、及びEF5668株から選択されるいずれかの肺炎球菌由来の莢膜欠損型肺炎球菌である、前項1～4のいずれかに記載の測定方法。

6. 前記工程1)の貪食細胞（d）が、HL-60由来細胞である、前項1～5のいずれかに記載の測定方法。

7. 試料（b）が、被験体より採取した血液試料である、前項1～6のいずれかに記載の測定方法。

10

20

30

40

50

8. 試料 (b) が、肺炎球菌ワクチンの接種を受けた被験体より採取した血液試料である、前項 7 に記載の測定方法。

9. 前項 1 ~ 8 のいずれかに記載の測定方法により測定した結果に基づいて検査することを特徴とする、肺炎球菌ワクチンの免疫原性の検査方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明の補体依存性殺菌能測定方法によれば、感染した肺炎球菌の莢膜の血清型にかかわらず、容易かつ効果的に補体依存性殺菌効果を確認することができる。また、本発明の方法で測定されたオプソニン活性を肺炎球菌の表層タンパク質を用いたワクチンのサロゲートマーカーとして利用することができる。これにより、肺炎球菌の表層タンパク質を用いたワクチンの有効性について、肺炎球菌の莢膜の血清型に関わらず、一定の評価を提供することが可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】本発明の測定系の一態様を示す図である。(実施例 1)

【図 2】抗PspA clade2マウス免疫血清又は非免疫血清の肺炎球菌R6株に対するオプソニン活性を示す図である。(実施例 1)

【図 3】抗PspA clade2マウス免疫血清又は抗PspA clade3マウス免疫血清の肺炎球菌R6株に対するオプソニン活性を示す図である。(実施例 1)

【図 4】ヒト血漿より精製したIgG画分及び抗PspA IgG画分の肺炎球菌R6株に対するオプソニン活性を示す図である。(実施例 2)

20

【図 5】ヒト血漿より精製したIgG画分及び抗PspA IgG画分中に含まれる抗PspA IgG量を測定した結果を示す図である。(試験例)

【図 6】ヒト血漿より精製したIgG画分及び抗PspA IgG画分中に含まれる、抗莢膜(血清型 3) IgG量、抗CbpA IgG量、抗PsaA IgG量を測定した結果を示す図である。(試験例)

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

本発明は、以下の 1) ~ 3) の工程を含む、肺炎球菌特異抗体の肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定方法に関する。

1) 莢膜欠損型肺炎球菌 (a) と肺炎球菌特異抗体を含む試料 (b) とを混合する工程；

30

2) 前記工程 1) の後、補体成分 (c) 及び貪食細胞 (d) をさらに加える工程；

3) 前記工程 2) の後、莢膜欠損型肺炎球菌 (a) における一定量の菌が死滅する試料 (b) の濃度を決定する工程。

上記の測定方法は、いわゆるオプソニン作用活性方法 (Opsonophagocytic killing assay : OPA) の変法に関する。

【 0 0 1 6 】

本明細書において、「莢膜欠損型肺炎球菌 (a) 」とは、無莢膜又は莢膜が通常の莢膜型肺炎球菌と比較して薄い肺炎球菌をいい、例えば無莢膜型肺炎球菌やトランスペアレント型肺炎球菌が挙げられる。この場合において、莢膜は完全に欠損していても良いし、莢膜があったとしても、表層タンパク質が十分に露出していれば良い。莢膜欠損型肺炎球菌は、人為的に作製したものであっても良いし、自然界から得られる莢膜欠損型肺炎球菌であってても良い。人為的には、莢膜合成に関わる遺伝子群の人工的な欠損及び抗生物質の添加により無莢膜型肺炎球菌を作製することができるし、培養系にキシリトールなどの薬品及び莢膜を分解する酵素を添加する方法、さらに振とう培養等によりトランスペアレント型肺炎球菌を作製することができる。無莢膜型肺炎球菌として肺炎球菌R6株をあげることができる。また、人為的に莢膜欠損型肺炎球菌を作製するために、例えば莢膜血清型が 2 型の D39 株、3 型の WU2 株、KK1162 株、ATCC6303 株や、4 型の BG9739 株、TIGR4 株、EF5668 株等を由来株として使用することができる。

40

【 0 0 1 7 】

本明細書において、莢膜欠損型肺炎球菌 (a) における一定量に関し、「一定量」とは

50

、補体依存性殺菌能測定系に添加した莢膜欠損型肺炎球菌量の0~100%の間で特定される一定量であればよく、特に限定されない。具体的には、例えば本発明の莢膜欠損型肺炎球菌(a)の60%、50%、40%、30%又は20%のように特定した菌量をいい、特に好適には50%又は60%が適用される。本発明の補体依存性殺菌能測定方法において、莢膜欠損型肺炎球菌(a)の60%、50%、40%、30%又は20%、特に好適には50%又は60%の菌が死滅する試料の濃度を測定することで、補体依存性殺菌能を測定することができる。

【0018】

本明細書において、「試料(b)」とは、本発明の補体依存性殺菌能測定方法に適用される試料をいい、具体的にはオプソニン作用活性の測定に用いられる試料をいう。本発明の測定のために、肺炎球菌特異抗体を含有可能性のある試料であればよく、特に限定されない。このような肺炎球菌特異抗体を含有可能性のある試料として、肺炎球菌ワクチンを投与した被験体から採取された血液試料、又は肺炎球菌に感染した可能性のある被験体から採取された血液試料を挙げることができる。ここにおいて、血液試料とは、血液に由来する試料であればよく、血清や血漿であってもよい。例えば臨床検査の際に採取した血液を処理した後に使用する通常の臨床検査に使用しうる試料であってもよい。ここにおいて、被験体とは、ヒト又はマウス等の脊椎動物であればよく、特に好適にはヒトである。本発明によれば、試料中の肺炎球菌特異抗体と補体を反応させることで、試料中の肺炎球菌特異抗体について補体依存性殺菌能を測定することができる、

【0019】

本明細書において、使用可能な「補体成分(c)」とは、肺炎球菌特異抗体の肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定に使用可能な補体であればよい。その様な補体であれば、市販の補体試薬を使用することができる。例えばProtocol for a multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA, reference 2) for antibodies against Streptococcus pneumoniae Version E.02, December 2014 (www.vaccine.uab.edu)のプロトコールに従い、第16頁に示される補体成分を使用することができる。補体の使用濃度は、莢膜(Opaque)型肺炎球菌(a')を用いて測定する場合に使用する補体成分(c')の濃度を1とした場合と比べて、前記工程1)の補体成分(c)の使用量を1/400~1/100、好ましくは3/400とすることができる。具体的には、Pelfreez 3-4 week baby rabbit complement, sterile (Pelfreez製)に示される使用濃度の1/400~1/100、好ましくは3/400とすることができる。

【0020】

本明細書において、貪食細胞(d)とは、補体依存性殺菌能の測定に適用しうる貪食細胞であればよく、特に限定されない。汎用される貪食細胞としては貪食能を誘導させたヒト白血病由来HL-60由来の細胞が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0021】

本発明の肺炎球菌特異抗体の肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定方法により、肺炎球菌ワクチンの免疫原性を検査することができる。ここにおいて「肺炎球菌ワクチンの免疫原性」とは、肺炎球菌ワクチンによる抗体の産生や細胞性免疫を誘導する性質等の免疫誘導能をいい、オプソニン活性(opsonization index; OI)であっても良い。本発明の方法で測定されたオプソニン活性をワクチンのサロゲートマーカーとして利用することができる。

【0022】

本発明の補体依存性殺菌能測定方法に適用可能な「肺炎球菌ワクチン」は、自体公知の「肺炎球菌ワクチン」であっても良いし、今後開発されるあらゆる「肺炎球菌ワクチン」であっても良い。例えば国際公開公報第2014/045621号に明示されている肺炎球菌ワクチンを用いることができ、今後開発される新たに表層タンパク質をターゲットとした肺炎球菌ワクチンの評価を行うことができる。

【0023】

本発明の肺炎球菌特異抗体の肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定(オプソニン作用活性方法:OPA)の一態様は、図1に示すとおりである。例えば、以下の方法により測定

10

20

30

40

50

することができる。

1) 莢膜欠損型肺炎球菌 (a) を播種したマイクロプレートの各ウェルに、肺炎球菌特異抗体を含む試料 (b) を加え、インキュベートする工程；

2 - 1) 前記工程 1) の後、補体成分 (c) 及び貪食細胞 (d) をさらに加え、培養する工程；

2 - 2) 前記工程 2 - 1) の反応溶液を寒天培地に添加し、さらに培養する工程；

3) 寒天培地に出現した莢膜欠損型肺炎球菌 (a) のコロニー数を計測し、添加莢膜欠損型肺炎球菌 (a) における一定量の菌が死滅する試料 (b) の濃度を決定する工程。

【0024】

上記において、工程 1) におけるインキュベート条件は、室温、例えば 10 ~ 35 °C で、15 ~ 60分、好ましくは 30分とすることができる。工程 2 - 1) における培養条件は、5% CO₂存在下で、37 ± 1 °C で 30 ~ 180分間、好ましくは 40 ~ 80分間、さらに好ましくは 45 ~ 75分間とすることができる。さらに、工程 2 - 2) における培養条件は、5% CO₂存在下で、37 ± 1 °C で 6 ~ 48時間、好ましくは 6 ~ 24時間、さらに好ましくは 16時間、とすることができる。上記条件は、測定系において最適な条件を適宜選択することができる。

10

【0025】

本発明の補体依存性殺菌能測定において使用される緩衝液、培地は自体公知の緩衝液や培地、又は今後開発される適用可能な緩衝液、培地を使用することができ、特に限定されるものではない。具体的には、使用する莢膜欠損型肺炎球菌 (a) や、補体成分 (c) の添加量を本発明で特定する事項を適用する以外は、Protocol for a multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA, reference 2) for antibodies against Streptococcus pneumoniae Version E.02, December 2014 (www.vaccine.uab.edu) のプロトコールに従い行うことができる。

20

【実施例】

【0026】

本発明の理解を助けるために、以下に実施例を示して具体的に本発明を説明するが、本発明は本実施例に限定されるものでないことはいうまでもない。

【0027】

(実施例 1) マウス免疫血清のオプソニン活性

抗PspA clade2マウス免疫血清又は抗PspA clade3マウス免疫血清のオプソニン活性 (OPA) を、以下の方法で測定した (図 1 参照)。抗PspA clade2マウス免疫血清又は抗PspA clade3マウス免疫血清を試料とした。

30

【0028】

(a) 莢膜欠損型肺炎球菌：無莢膜型肺炎球菌 R6 株

(b) 試料：抗PspA clade2血清は、国際公開公報第 2014/045621 号の段落 0065 に示す PspA clade2 のタンパク質を抗原として免疫したマウスより得られた血清であり、抗PspA clade3血清も国際公開第 2014/045621 号の段落 0065 に示す PspA clade3 を抗原として免疫したマウスより得られた血清である。C57/BL6j マウス (6-8 週齢、メス) に抗原として PspA clade2 又は PspA clade3 を 0.1 µg、アジュバント CpGK3 を 2.5 µg 及び Alum 5 µg と混合しマウスに皮下接種した。接種は 1 週間毎で計 3 回行い、最終免疫後 1 週間後に全採血を行い、免疫血清を得た。

40

(c) 補体成分：Pelfreez 3-4 week baby rabbit complement, sterile (Pelfreez 製)

(d) 貪食細胞：ヒト白血病由来 HL-60 細胞を CM1 培地 (RPMI 1640 500ml、非動化 FBS 50ml、GlutaMax-1 5ml、penicillin/streptomycin 5ml) で、5% CO₂ 存在下で、37 °C で培養後、分化用培地 (RPMI 1640 500ml、非動化 FBS 50ml、GlutaMax-1 5ml、DMF (dimethyl formamide) 4.55ml) に培地を交換し、分化誘導を行う。培養開始 4-5 日後の HL-60 細胞を HBSS (without Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) で洗浄し、その後、HBSS (with Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) で洗浄する。得られた細胞を、OBB 液 (distilled water 32ml、10xHBSS (with Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) 4ml、1% gelatin 4ml、inactivated FBS 2.12ml) に 1 × 10⁷ 個/ml となるよう懸濁したものを使用した。

【0029】

50

1) 肺炎球菌R6株 (a) を500CFU播種した96穴のマイクロプレートの各ウェルに、試料 (b) 20 μ l 加え、室温で30分間インキュベートした。

2 - 1) 前記工程 1) の後、補体成分 (c) を10 μ l (終濃度0.75%) 加え、及び貪食細胞 (d) を 4×10^5 細胞加え、5% CO₂ 存在下で、37 で75分間インキュベートする工程；
2 - 2) 前記工程 2 - 1) の反応溶液を寒天培地10 μ l に添加し、5% CO₂ 存在下で、37 で16時間培養した。

3) 寒天培地に出現した肺炎球菌R6株のコロニー数を計測し、50%の肺炎球菌R6株 (a) が死滅する試料 (b) の濃度を算出し、OPA活性を測定した。

【 0 0 3 0 】

その結果を、図 2 及び図 3 に示した。図 2 では上記 (b) で得られた抗PspA clade2マウス免疫血清を用いてオプソニン活性を検討した。その結果、免疫血清では非免疫血清と比較して、試験菌に対して70倍以上のオプソニン活性が認められた。図 3 では、試験菌 (肺炎球菌R6株、PspA clade2) に対する抗PspAマウス免疫血清 (PspA clade2又はclade3) のオプソニン活性を検討した。その結果、抗PspA clade2マウス免疫血清は試験菌株に対して抗原特異的なオプソニン活性を示したが、抗PspA clade3マウス免疫血清は全くオプソニン活性を示すことができず、本試験が抗原特異的なオプソニン活性を測定できることが明らかとなった。

10

【 0 0 3 1 】

(実施例 2) ヒトの抗PspA IgGを用いたオプソニン活性

本実施例では、ヒトの抗PspA IgGを含む試料について、オプソニン活性の測定をおこなった。PspA clade2タンパク質を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりヒト血漿から抗PspA IgGを精製した画分を試料 (b) とし、オプソニン活性 (OPA) を、以下の方法で測定した。

20

【 0 0 3 2 】

(a) 莢膜欠損型肺炎球菌：無莢膜型肺炎球菌R6株 (実施例 1 と同じ)

(b) 試料：ヒト抗PspA clade2抗体を含むヒト血漿試料である。オプソニン活性の測定に用いられる。本実施例で使用される試料の作製方法は以下のとおりである。

-80 で保存されたヒト血漿を常温で融解し、HiTrap rProtein G FF Column (GEヘルスケア製) を用いて本カラムの使用手順に従って血漿中に含まれる全てのIgGを精製した。また国際公開公報第2014/045621号の段落0065に示すPspA clade2タンパク質をNHS-activated HP Column (GEヘルスケア製) に固定した後、本カラムの使用手順に従って、ヒト血漿中抗PspA IgGを精製した。

30

(c) 補体成分：Pelfreez 3-4 week baby rabbit complement, sterile (Pelfreez 製)

(d) 貪食細胞：実施例 1 に示すヒト白血由来HL-60細胞を貪食細胞として使用した。

(e) OPA試験方法：実施例 1 と同手法により試験を行った。

【 0 0 3 3 】

精製ヒト抗PspA clade2 IgG画分及び精製全IgG画分を用いてR6株に対するオプソニン活性を測定した結果、全IgG画分では肺炎球菌R6株に対するオプソニン活性が17496であった。精製抗PspA IgG画分によるオプソニン活性は603であった (図 4)。この結果から、ヒト抗PspA IgGは肺炎球菌R6株に対して高いオプソニン活性を示すことが明らかとなった。これは、ヒトPspA特異IgGが肺炎球菌R6株に存在するPspAに結合することによってオプソニン化が誘導されたためと考えられる。このことからヒト抗PspA特異IgGは、莢膜欠損肺炎球菌株及びトランスペアレント型肺炎球菌株に対してもオプソニン活性を示す可能性が示唆された。

40

【 0 0 3 4 】

(試験例) 試料 (b) の解析

本試験例では実施例 2 で作製した試料 (b)、即ち精製ヒト抗PspA clade2 IgG画分に含まれるPsaA、CbpA、莢膜 (血清型 3) 又はPspAに対する抗原特異的IgG量をELISA法で測定した。

【 0 0 3 5 】

50

1) ELISA法に使用する各抗原の作製

PsaA及びCbpA抗原は、以下の方法に基づき、*E. coli* DH5 Competent Cells (TOYOBO製) を用いて遺伝子組み換えの手法により作製した。PsaA又はCbpAのクローニング手順は*E. coli* DH5 Competent Cells (TOYOBO製) を用いて行った。*E. coli* DH5 は30 µg/mlのカナマイシンを含むLB (Luria-Bertani) 又はLB agar培地を用いて培養した。

【0036】

・PsaAは、配列番号1及び2に示すプライマーセットを用いて、肺炎球菌D39株のゲノムDNAをテンプレートとしてPCR法にて増幅した。

PsaA-F(NdeI): GGAATTCATATGGCTAGCGGAAAAAAG (配列番号1)

PsaA-R(HindIII): CCCAAGCTTTTATTTTGCCAATCCTTCAG (配列番号2)

・CbpAは、配列番号3及び4に示すプライマーセットを用いて、肺炎球菌D39株のゲノムDNAをテンプレートとしてPCR法にて増幅した。プライマーは、CbpAのN末端側の -Helix (配列番号3) 及びprolin-rich 領域をコードする遺伝子部分 (配列番号4) を用いた。

CbpA-F(NdeI): GGAATTCATATGACAGAGAACGAGGGAAGTACCCA (配列番号3)

CbpA-R(HindIII): CCCAAGCTTTTACCACATACCGTTTTCTGTTTC (配列番号4)

【0037】

2) 各抗原の発現及び作製:

N末端側に制限酵素NdeI認識配列、C末端側にHindIII認識配列が付加されているPsaA及びCbpAのPCR産物をpET28a(+) ベクターの制限酵素NdeI及びHindIII認識サイトに挿入し、PsaA又はCbpAタンパク質を発現するプラスミドを作製した。この2つのPsaA、CbpA遺伝子断片はシーケンシングすることでその配列を確認した。CbpAあるいはPsaA発現プラスミドは*E. coli* BL21 (DE3) に形質転換され、それぞれのタンパク質を大量発現させた。タンパク質を精製するために、それぞれのタンパク質を発現する*E. coli* BL21 (DE3) はカナマイシン30 µg/mlを含むLB培地において37 °Cで震盪培養され、吸光度OD600nmが約0.8になった時点で、0.5mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加し、さらに3時間震盪培養を行ない、その後、菌体を収集した。PsaA、CbpAタンパク質はN末端にHis-tagが付加されたタンパク質としてNi²⁺ affinity chromatography及びgel filtration法によって精製された。精製タンパク質はSDS-PAGE及びWestern blotting法を用いて確認した。

【0038】

3) PsaA、CbpA、PspA特異的IgG抗体測定

PsaA、CbpA、莢膜、PspA抗原に対する抗原特異的IgG量をELISA法で測定した。

1 µg/mlのPsaA、CbpA、PspA抗原を96-wellマイクロプレートに100 µl/wellとなるように添加し、4 °Cで一晩インキュベートをおこなった。抗原がコーティングされたプレートはPBST (Phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20) で洗浄した後、段階希釈したヒト血漿より精製された全IgG画分及び精製PspA clade2特異IgG画分を50 µl/wellとなるように添加し、37 °Cで30分間インキュベートした。その後マイクロプレートをPBSTで洗浄し、そこに5000倍希釈した alkaline phosphatase conjugated affini pure goat anti-human IgGを100 µlずつ各ウェルに添加し、37 °Cで30分間インキュベートした。その後PBSTで洗浄し、基質[4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate diluted with substrate buffer (1M diethanolamine, 0.5mM MgCl₂)] を100 µlずつ各ウェルに添加した後、室温、遮光下で45分間インキュベートした。その後、OD405nmの吸光度を測定した。

【0039】

4) 血清型3莢膜特異的IgG抗体測定

血清型3の莢膜抗原 (ATCC、169-X) は5 µg/mlに調製したのち、96-wellマイクロプレートの各ウェルに100 µlずつ添加し、37 °Cで5時間インキュベートした。抗原がコーティングされたプレートをPBSTで洗浄し、これに段階希釈したヒト血漿より精製された全IgG画分及び精製抗PspA IgG画分を100 µl/wellで各ウェルに添加し、37 °Cで1時間インキュベートした。その後PBSTで洗浄したのち、5000倍希釈した alkaline phosphatase conjugated affini pure goat anti-human IgGを100 µl/wellで添加し、37 °Cで1時間インキュベ

10

20

30

40

50

トした。その後PBSTで洗浄し、基質[4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate diluted with substrate buffer (1M diethanolamine, 0.5mM MgCl₂)]を100 μlずつ添加し、37℃、遮光下で45分間培養した。培養後、OD405nmの吸光度を測定した

【 0 0 4 0 】

5) 結果

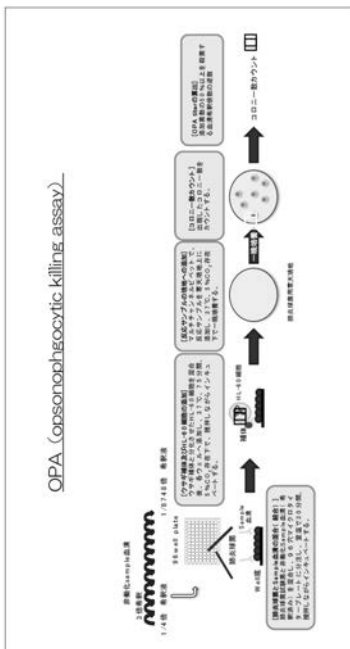
ヒト血漿より精製した抗PspA IgG画分中には高濃度の抗PspA IgG抗体が存在していた(図5)。ヒト血漿より精製した抗PspA IgG画分中には、肺炎球菌由来抗原である抗荚膜(血清型3)IgG、抗CbpA IgG、抗PsaA IgG抗体は残存していないことを確認した(図6)

【 産業上の利用可能性 】

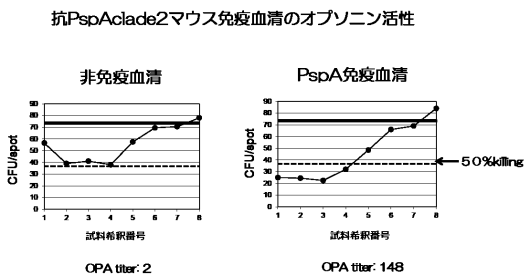
【 0 0 4 1 】

以上詳述したように、本発明の補体依存性殺菌能測定方法によれば、肺炎球菌の荚膜血清型にかかわらず、容易かつ効果的に補体依存性殺菌効果を確認することができる。また、本発明の方法で測定されたオプソニン活性を肺炎球菌の表層タンパク質を用いたワクチンのサロゲートマーカーとして利用することができる。これにより、肺炎球菌の表層タンパク質を用いたワクチンの有効性について、肺炎球菌の荚膜の血清型に関わらず、一定の評価を提供することが可能となる。

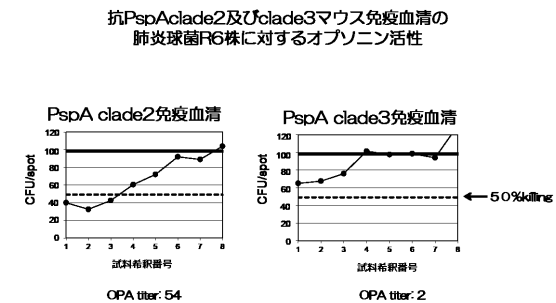
【 図 1 】



【 図 2 】

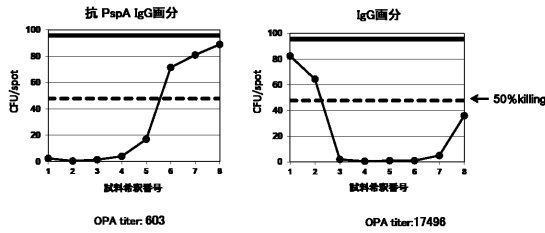


【 図 3 】



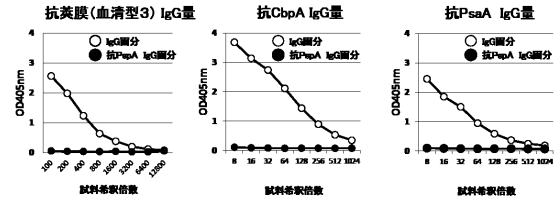
【 図 4 】

ヒト血漿より精製した IgG画分 及び抗 PspA IgG 画分の肺炎球菌R6株に対するオプソニン活性



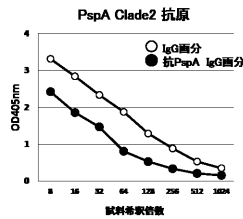
【 図 6 】

ヒト血漿より精製した IgG画分 及び 抗PspA IgG画分中に含まれる抗荚膜(血清型3) IgG量、抗CbpA IgG量、抗PsaA IgG量を測定



【 図 5 】

ヒト血漿より精製した IgG画分 及び 抗PspA IgG画分中に含まれる抗PspA IgG量を測定



【 配 列 表 】

2016204265000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成29年11月30日 (2017.11.30)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

以下の 1) ~ 3) の工程を含む、肺炎球菌特異抗体の、肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定方法：

- 1) 荚膜欠損型肺炎球菌 (a) と肺炎球菌特異抗体を含む試料 (b) とを混合する工程；
- 2) 前記工程 1) の後、補体成分 (c) 及び貪食細胞 (d) をさらに加える工程；
- 3) 前記工程 2) の後、荚膜欠損型肺炎球菌 (a) における一定量の菌が死滅する試料 (b) の濃度を決定する工程。

【 請 求 項 2 】

前記工程 3) における一定量が、50%である、請求項 1 に記載の補体依存性殺菌能測定方法。

【 請 求 項 3 】

前記工程 2) の補体成分 (c) の使用量が、荚膜型肺炎球菌 (a ') を用いて測定する場合に使用する補体成分 (c ') に比べて、前記工程 2) の補体成分 (c) の使用量が、1/400 ~ 1/100である、請求項 1 又は 2 に記載の補体依存性殺菌能測定方法。

【 請 求 項 4 】

前記工程 1) 及び 3) に示す莢膜欠損型肺炎球菌が、無莢膜型肺炎球菌又はトランスペアレント型肺炎球菌である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の補体依存性殺菌能測定方法。

【請求項 5】

莢膜欠損型肺炎球菌 (a) が、WU2株、D39株、KK1162株、ATCC6303株、BG9739株、TIGR4株、及びEF5668株から選択されるいずれかの肺炎球菌由来の莢膜欠損型肺炎球菌である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の測定方法。

【請求項 6】

前記工程 2) の貪食細胞 (d) が、HL-60由来細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の測定方法。

【請求項 7】

試料 (b) が、被験体より採取した血液試料である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の測定方法。

【請求項 8】

試料 (b) が、肺炎球菌ワクチンの接種を受けた被験体より採取した血液試料である、請求項 7 に記載の測定方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の測定方法により測定した結果に基づいて検査することを特徴とする、肺炎球菌ワクチンの免疫原性の検査方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

本発明は、すなわち以下よりなる。

1. 以下の 1) ~ 3) の工程を含む、肺炎球菌特異抗体の、肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定方法：

- 1) 莢膜欠損型肺炎球菌 (a) と肺炎球菌特異抗体を含む試料 (b) とを混合する工程；
- 2) 前記工程 1) の後、補体成分 (c) 及び貪食細胞 (d) をさらに加える工程；
- 3) 前記工程 2) の後、莢膜欠損型肺炎球菌 (a) における一定量の菌が死滅する試料 (b) の濃度を決定する工程。

2. 前記工程 3) における一定量が、50%である、前項 1 に記載の補体依存性殺菌能測定方法。

3. 前記工程 2) の補体成分 (c) の使用量が、莢膜型肺炎球菌 (a') を用いて測定する場合に使用する補体成分 (c') に比べて、前記工程 2) の補体成分 (c) の使用量が、1/400 ~ 1/100である、前項 1 又は 2 に記載の補体依存性殺菌能測定方法。

4. 前記工程 1) 及び 3) に示す莢膜欠損型肺炎球菌が、無莢膜型肺炎球菌又はトランスペアレント型肺炎球菌である、前項 1 ~ 3 のいずれかに記載の補体依存性殺菌能測定方法。

5. 莢膜欠損型肺炎球菌 (a) が、WU2株、D39株、KK1162株、ATCC6303株、BG9739株、TIGR4株、及びEF5668株から選択されるいずれかの肺炎球菌由来の莢膜欠損型肺炎球菌である、前項 1 ~ 4 のいずれかに記載の測定方法。

6. 前記工程 2) の貪食細胞 (d) が、HL-60由来細胞である、前項 1 ~ 5 のいずれかに記載の測定方法。

7. 試料 (b) が、被験体より採取した血液試料である、前項 1 ~ 6 のいずれかに記載の測定方法。

8. 試料 (b) が、肺炎球菌ワクチンの接種を受けた被験体より採取した血液試料である、前項 7 に記載の測定方法。

9. 前項 1 ~ 8 のいずれかに記載の測定方法により測定した結果に基づいて検査することを特徴とする、肺炎球菌ワクチンの免疫原性の検査方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

本明細書において、使用可能な「補体成分(c)」とは、肺炎球菌特異抗体の肺炎球菌に対する補体依存性殺菌能測定に使用可能な補体であればよい。その様な補体であれば、市販の補体試薬を使用することができる。例えばProtocol for a multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA, reference 2) for antibodies against Streptococcus pneumoniae Version E.02, December 2014 (www.vaccine.uab.edu)のプロトコールに従い、第16頁に示される補体成分を使用することができる。補体の使用濃度は、莢膜(Opaque)型肺炎球菌(a')を用いて測定する場合に使用する補体成分(c')の濃度を1とした場合と比べて、前記工程2)の補体成分(c)の使用量を1/400~1/100、好ましくは3/400とすることができる。具体的には、Pelfreez 3-4 week baby rabbit complement, sterile (Pelfreez製)に示される使用濃度の1/400~1/100、好ましくは3/400とすることができる。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/068069
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, C07K16/12(2006.01)n, C12N1/20(2006.01)n, C12N5/078(2010.01)n, C12N5/0787(2010.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/02, G01N33/15, C07K16/12, C12N1/20, C12N5/078, C12N5/0787 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DANTELS C.C. et al., Modified Opsonization, Phagocytosis, and Killing Assays To Measure Potentially Protective Antibodies against Pneumococcal Surface Protein A, Clin. Vaccine Immunol., 2013, Vol.20, No.10, pp.1549-1558, abstract, page 1550, right column, paragraph of 'Bacterial strains and antisera to recombinant PspA proteins', page 1549, right column, line 19 to page 1550, left column, line 2, page 1550, left column, lines 35 to 40, tables 1 to 2	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 September 2016 (05.09.16)		Date of mailing of the international search report 13 September 2016 (13.09.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/068069

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2012-184236 A (Intercell AG), 27 September 2012 (27.09.2012), paragraphs [0019] to [0020], [0227], [0237], [0278], [0281]; fig. 7 & WO 04/092209 A2 page 4, lines 12 to 30; page 46, lines 2 to 11; page 47, lines 36 to 41; page 56, lines 4 to 16; page 56, line 40 to page 57, line 3; fig. 7	<u>1, 3-5, 7-9</u> 1-9
Y	WO 2014/045621 A1 (Osaka University), 27 March 2014 (27.03.2014), paragraphs [0003] to [0004] & US 2015/0320851 A1 paragraphs [0004] to [0005]	1-9
Y	ONWUBIKO C. et al., Characterization of Streptococcus pneumoniae Isolated from Children with Otitis Media, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2007, Vol.50, pp.119-125, page 123, left column, line 12 to page 123, right column, line 19	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 6 8 0 6 9									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, C07K16/12(2006.01)n, C12N1/20(2006.01)n, C12N5/078(2010.01)n, C12N5/0787(2010.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/02, G01N33/15, C07K16/12, C12N1/20, C12N5/078, C12N5/0787											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2016年										
日本国実用新案登録公報	1996-2016年										
日本国登録実用新案公報	1994-2016年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	DANIELS C. C. et al., Modified Opsonization, Phagocytosis, and Killing Assays To Measure Potentially Protective Antibodies against Pneumococcal Surface Protein A, Clin. Vaccine Immunol., 2013, Vol. 20, No. 10, pp. 1549-1558, 要約, 第 1550 頁右欄 「Bacterial strains and antisera to recombinant PspA proteins」の項, 第 1549 頁右欄第 19 行-第 1550 頁左欄第 2 行, 第 1550 頁左欄第 35-40 行, 表 1-2	1-9									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 05.09.2016		国際調査報告の発送日 13.09.2016									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 市島 洋介 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 5804								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 6 8 0 6 9
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2012-184236 A (インターツェル・アクチェンゲゼルシャフト) 2012.09.27, 段落[0019]-[0020], 段落[0227], 段落[0237], 段落 [0278], 段落[0281], 図7 & WO 04/092209 A2, 第4頁第12-第30 行, 第46頁第2-11行, 第47頁第36-41行, 第56頁第4-16行, 第 56頁第40行-第57頁第3行, 図7	1, 3-5, 7-9 1-9
Y	WO 2014/045621 A1 (国立大学法人大阪大学) 2014.03.27, 段落 [0003]-[0004] & US 2015/0320851 A1, 段落[0004]-[0005]	1-9
Y	ONWUBIKO C. et al., Characterization of Streptococcus pneumoniae Isolated from Children with Otitis Media, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2007, Vol. 50, pp. 119-125, 第123頁左欄第12行-第 123頁右欄第19行	1-9

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 宮武 浩

香川県観音寺市瀬戸町4-1-70 一般財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所瀬戸センター内

(72) 発明者 朴 貞玉

香川県観音寺市瀬戸町4-1-70 一般財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所瀬戸センター内

(72) 発明者 古泉 ゆか

香川県観音寺市瀬戸町4-1-70 一般財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所瀬戸センター内

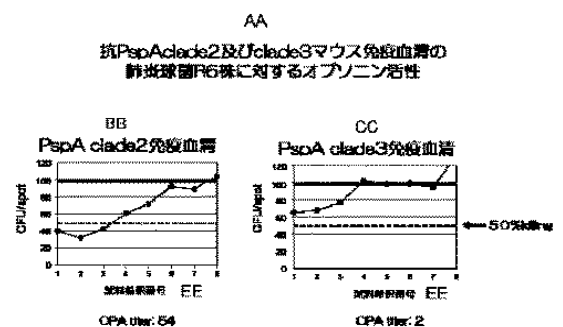
Fターム(参考) 4B063 QA05 QQ03 QQ06 QQ08 QQ79 QR48 QR75 QR77 QS24 QX01

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	肺炎球菌补体依存性杀菌能测定方法		
公开(公告)号	JPWO2016204265A1	公开(公告)日	2018-06-14
申请号	JP2017524852	申请日	2016-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
申请(专利权)人(译)	一般財団法人阪大微生物病研究会 国立大学法人大阪大学		
[标]发明人	明田幸宏 宮武浩 朴貞玉 古泉ゆか		
发明人	明田 幸宏 宮武 浩 朴 貞玉 古泉 ゆか		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/18 C07K16/12 C12N1/20 G01N2333/3156		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA G01N33/15.Z G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B063/QA05 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QX01		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2015122520 2015-06-18 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于测量针对肺炎球菌的补体依赖性杀菌活性的方法，并且提供用于任何荚膜血清型肺炎球菌的可测量活性测量方法。通过使用胶囊缺陷类型的肺炎球菌测量对肺炎球菌的补体依赖性杀菌活性，即未包膜或非包膜型或透明型肺炎球菌。可以测量任何荚膜血清型肺炎球菌的补体依赖性杀菌活性。



AA Opsonin activity of Anti-PspA clade2 and clade3 mouse immune serum with respect to pneumococcus R6 strain
 BB PspA clade2 immune serum
 CC PspA clade3 immune serum
 EE Sample dilution number