

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-505320

(P2007-505320A)

(43) 公表日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 H O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
CO 7 K 14/155 (2006.01)	CO 7 K 14/155 Z N A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2006-526311 (P2006-526311)	(71) 出願人	300004500
(86) (22) 出願日	平成16年9月10日 (2004. 9. 10)		アイデックス ラボラトリーズ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年4月26日 (2006. 4. 26)		アメリカ合衆国 メイン州 ウェストブルック アイデックス ドライブ ワン
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/029570	(74) 代理人	230104019
(87) 国際公開番号	W02005/026733		弁護士 大野 聖二
(87) 国際公開日	平成17年3月24日 (2005. 3. 24)	(74) 代理人	100106840
(31) 優先権主張番号	60/501, 982		弁理士 森田 耕司
(32) 優先日	平成15年9月11日 (2003. 9. 11)	(74) 代理人	100105991
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 玲子
(31) 優先権主張番号	60/584, 106	(74) 代理人	100114465
(32) 優先日	平成16年6月30日 (2004. 6. 30)		弁理士 北野 健
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ネコ免疫不全ウイルスの検出のための方法と装置

(57) 【要約】

動物におけるネコ免疫不全ウイルスの感染またはワクチン接種の判定のための方法と装置。方法にはネコの生体サンプルと様々なFIVポリペプチドの接触およびサンプル中の抗体とポリペプチドの結合の判定が含まれる。動物のFIV envポリペプチドに対する免疫反応を測定することにより、その動物がFIVに感染しているか、FIVワクチンを接種されたことがあるかを判定することができる。FIV抗体を検出するための装置を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

FIVに自然感染した動物と、FIV未感染動物またはFIV感染に対するワクチンを接種された動物とを鑑別する方法であって、
動物の生体サンプルを、FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素であるFIV抗体に実質的に結合しないFIVポリペプチドと接触させ、
サンプル中のFIV抗体が実質的にポリペプチドに結合するか否かを検出し、
サンプル中の抗体がFIVポリペプチドに実質的に結合することによりその動物が自然感染していると判定し、サンプル中の抗体がFIVポリペプチドに実質的に結合しないことを検出することによりその動物がワクチンを接種されているか未感染であると判定する、
ことを含む方法。

10

【請求項2】

生体サンプルを、過去約12週間以内にFIVワクチンを接種されていない動物から得る、請求項1記載の方法。

【請求項3】

ポリペプチドはFIV envである請求項1記載の方法。

【請求項4】

FIVポリペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5からなる群から選択される請求項1記載の方法。

20

【請求項5】

ネコがFIVに対するワクチンを接種されたことがあるか、またはFIVに自然感染しているかを判定する方法であって、

(a) ワクチン接種後、FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではない抗体がネコから実質的に排除されるのに十分な期間が過ぎる前に、ネコがFIVペプチドに対する抗体を有するか否かを検出し、

(b) ワクチン接種後、ワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではない抗体がネコから実質的に排除されるのに十分な期間が過ぎた後に、ネコがFIVポリペプチドに対する抗体を有するか否かを検出し

(c) ステップaで抗体が検出され、ステップbで検出されないことにより、ネコが成功裏にワクチン接種されていると判定し、

30

(d) ステップaとステップbで抗体が検出されることにより、ネコが自然感染していると判定する、

ことを含む方法。

【請求項6】

FIVポリペプチドはFIV envである請求項5記載の方法。

【請求項7】

FIVポリペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5からなる群から選択される請求項5記載の方法。

【請求項8】

ネコがFIVに感染したことがないか、またはFIVに対するワクチンを接種されたことがあるかを判定する方法であって、

40

ネコの生体サンプルを分析して、FIV envに対する抗体が存在するか否かを検出し、そのような抗体が存在しないと判定することにより、動物が感染したことがないか、またはワクチンを接種されたことがあると判定する、

ことを含む方法。

【請求項9】

ネコがFIVに対するワクチンを接種されたことがあるか否か、またはFIVに自然感染しているか否かを判定する方法であって、

FIV envポリペプチドを含む試験装置を提供し、

50

ネコから生体サンプルを得、
サンプルがポリペプチドと接触するように試験装置上に生体サンプルを流し、
試験装置の結果を読み取り、ここで陽性の結果はネコがFIVに自然感染したことがあるか
またはFIVに対するワクチンを接種されたことがあることを示し、陰性の結果はネコがFIV
に自然感染したことがないかまたはFIVに対するワクチンを接種されたことがないことを
示す、
ことを含む方法。

【請求項10】

自然にFIV感染しているか、またはFIVに対するワクチンを接種されたことがあることが疑
われる動物から得られた生体サンプル中のFIVポリペプチドの由来を判定する方法であっ
て、

過去約12週間以内にFIVワクチンを接種されたことがない動物から生体サンプルを得、
動物から得られた生体サンプルを以下のものと接触させ；

(a) FIVワクチンに対する動物の抗体反応の重要な要素に実質的に結合する第1のポリペ
プチド、および

(b) FIVワクチンに対する抗体反応の重要な要素に実質的に結合しない第2のポリペプチ
ド、

サンプル中の抗体がそれらポリペプチドの一つまたは両方に実質的に結合するか否かを検
出し、

抗体が実質的に (a) および (b) の両方のペプチドに結合した場合に動物が自然感染して
いると判定し、抗体が (a) のペプチドのみに結合した場合に動物がワクチンを接種され
たことがあると判定する、

ことを含む方法。

【請求項11】

第2のポリペプチドはFIV envである請求項10記載の方法。

【請求項12】

第2のポリペプチドは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5からな
る群から選択される請求項10記載の方法。

【請求項13】

第2のポリペプチドはFIV p15およびFIV p24からなる群から選択される請求項10記載の方
法。

【請求項14】

乾燥した有孔キャリアー；

有孔キャリアー上に固定化された第1の検出試薬、ここで、第1の検出試薬はFIV自然感
染またはFIVワクチン接種に反応して動物が産生したFIV抗体を捕捉するタンパク質を含み
、および

有孔キャリアー上に固定化された第2の検出試薬、ここで、第2の検出試薬はFIV自然感
染に反応して動物が産生したFIV抗体を捕捉するがFIVワクチン接種に反応して動物が産生
した抗体とは実質的に結合しないタンパク質を含む、

を含む診断装置。

【請求項15】

第1の検出試薬はFIV p15およびFIV p24からなる群から選択される請求項14記載の診断装
置。

【請求項16】

第2の検出試薬はFIV envである請求項14記載の診断装置。

【請求項17】

FIV envは合成タンパク質である請求項14記載の診断装置。

【請求項18】

第2の検出試薬は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5からなる
群から選択されるアミノ酸配列である請求項14記載の診断装置。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

ネコがFIVワクチンを接種されたことがあるか否か、またはFIVに自然感染しているか否かを判定する方法であって、生体サンプルを請求項13記載の診断装置と接触させ、サンプル中の抗体が第1の検出試薬および第2の検出試薬の一方または両方と実質的に結合するか否かを検出する、ことを含む方法。

【請求項 20】

第1の検出試薬が固定化されている第一有孔キャリアー、ここで前記第1の検出試薬は、FIVの自然感染またはFIVワクチン接種に反応して動物が産生したFIV抗体を捕捉するポリペプチドを含み、

第2の検出試薬が固定化されている第二有孔キャリアー、ここで前記第2の検出試薬はFIVの自然感染に反応して動物が産生したFIV抗体を捕捉するがFIVワクチン接種に反応して動物が産生した抗体には実質的に結合しないポリペプチドを含む、を含む診断装置。 10

【請求項 21】

第1の検出試薬はFIV p15およびFIV p24からなる群から選択される請求項20記載の診断装置。

【請求項 22】

第2の検出試薬はFIV envである請求項20記載の診断装置。

【請求項 23】

FIV envは合成タンパク質である請求項22記載の診断装置。 20

【請求項 24】

第2の検出試薬は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5からなる群から選択されるアミノ酸配列である請求項20記載の診断装置。

【請求項 25】

ネコのワクチン接種状態を判定する方法であって、

FIV自然感染に反応してネコが産生するFIV抗体に実質的に結合するが、FIVワクチン接種に反応してネコが産生する抗体には実質的に結合しないポリペプチドを提供し、ネコからの生体サンプルとポリペプチドを接触させて、ポリペプチド/抗体複合体を形成させ、そして

ポリペプチド/抗体複合体の存在の有無を判定し、ここで、複合体が存在することは自然感染を表し、複合体が存在しないことはワクチンを接種されているか未感染のいずれかを表す、 30

ことを含む方法。

【請求項 26】

生体サンプルは過去約12週間以内にFIVワクチンを接種されていない動物から得る請求項25記載の方法。

【請求項 27】

ポリペプチドはFIV envである請求項25記載の方法。

【請求項 28】

ポリペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5からなる群から選択される請求項25記載の方法。 40

【請求項 29】

ネコがFIVに対するワクチンを接種されたことがあるか、またはFIVに自然感染したかを判定する方法であって、FIV envポリペプチドに対するネコの免疫反応を判定することを含む方法。

【請求項 30】

ネコがFIVに対するワクチンを接種されたことがあるか否かを診断するためのキットの製造におけるFIV envに由来するポリペプチドの使用。

【請求項 31】

該方法が、ネコがFIVに感染したことがあるかを判定することをも含む、請求項30記載の 50

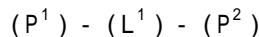
使用。

【請求項 3 2】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5からなる群から選択されるポリペプチド。

【請求項 3 3】

化学式



[式中、

P^1 は ELGSNQNQFFSKVPPELWKRYN [配列番号11]であり、

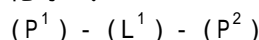
P^2 は NRWEWRPDFESEKC [配列番号16]であり、

L^1 は2~20回交互に繰り返すS残基とK残基からなり、SかKのいずれかで始まり終わるポリペプチドである]

を有するポリペプチド。

【請求項 3 4】

化学式



[式中、

P^1 は CNRWEWRPDFESEK [配列番号17]であり、

P^2 は MQELGSNQNQFFSKVPPELWKRYN [配列番号12]であり、

L^1 は2~20回交互に繰り返すS残基とK残基からなり、SかKのいずれかで始まり終わるポリペプチドである]

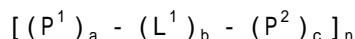
を有するポリペプチド。

【請求項 3 5】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5の抗原性断片および機能的に同等な変異体からなる群から選択されるポリペプチド。

【請求項 3 6】

化学式



[式中、

P^1 は元来のFIV env配列(アミノ酸696~717)、またはその抗原性断片および機能的に同等の変異体であるポリペプチドであり、 P^1 は逆位でもよく、

L^1 は2~20回交互に繰り返すS残基とK残基からなり、SかKのいずれかで始まり終わるポリペプチドであり、

P^2 は元来のFIV表面envタンパク質(アミノ酸396~408)、またはその抗原性断片および機能的に同等の変異体であるポリペプチドであり、 P^2 は逆位でもよく、

a、c、nは、独立して、1~3の整数であり、

bは0から1の整数である]

を有するポリペプチド。

【請求項 3 7】

P^1 は ELGSNQNQFFSKVPPELWKRYN [配列番号11]、

MQELGSNQNQFFSPPELWKRYN [配列番号12]、

ELGSNQNQFFSK [配列番号13]、

LGSNQNQFFS [配列番号14]、および

TAFAMQELGSNQNQFFSKIPLLELWTR [配列番号15]

からなる群から選択される、請求項36記載のポリペプチド。

【請求項 3 8】

P^2 は、NRWEWRPDFESEKC [配列番号16]、

CNRWEWRPDFESEK [配列番号NO:17]、

CWEWRPDFESER [配列番号18]、および

CNRWDWRPDFESKK [配列番号19]

10

20

30

40

50

からなる群から選択される、請求項36記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する出願との相互参照

本出願は、2004年6月30日に出願された米国特許仮出願60/584,106および2003年9月11日に出願された米国特許仮出願60/501,982に基づく優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明はネコ免疫不全ウイルスに対する抗体の検出に関するものである。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

従来ネコTリンパ球レンチウイルスと呼ばれていたネコ免疫不全ウイルス(FIV)は、1986年にカリフォルニア州ペタルマ(Petaluma)の大きな飼いネコ集団から初めて発見された(Pederson et al., Science (1987) 235: 790)。ネコがFIVに感染するとエイズ様症候群を呈する。FIVは形態的および病理学的にヒト免疫不全ウイルス(HIV)と似ているが、抗原性ではHIVと明確に区別される。HIVと同様、ネコが一旦FIVに感染すると初期感染期(ウイルス血症、発熱、一般的なリンパ節炎)から長期の無症候期を経てCD4リンパ球の減少による極めて難治性の免疫機能障害が出現し、二次感染を併発して遂には死に至る。

【0004】

FIVはレトロウイルス科レンチウイルス亜科に分類される。レトロウイルス科にはヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス、ヒツジのマエディ・ピスナ・ウイルス、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)が含まれる。FIV遺伝子は他のレンチウイルスと同様に、gag、polおよびenvに対応する3つの長いオープン・リーディング・フレームを有する構造をしている(Talbott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1989) 86: 5743; Olmsted et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1989) 86: 2448)。gag遺伝子はウイルスの主要な構造要素、env遺伝子はエンベロープの糖タンパク質、pol遺伝子はポリメラーゼ・タンパク質をコードしている。

【0005】

gag遺伝子からは55kDのポリタンパク質が発現し、これはp15マトリックス・タンパク質、p24カプシド・タンパク質、p10核カプシド・タンパク質の3つのサブユニットにプロセシングされる。pol遺伝子は、プロテアーゼ、逆転写酵素、それに機能不明のp14.6タンパク質の3つのタンパク質をコードしている。この遺伝子のプロテアーゼ部分の自動プロセシングにより、pol領域の3つのタンパク質すべての産生が増加する。さらに、このプロテアーゼはgag前駆物質のプロセシングにも重要な働きをする。pol遺伝子はgag-pol融合タンパク質として発現する。エンベロープ遺伝子は160 kDの糖タンパク質gp160として発現する。FIVコア・タンパク質の抗原性は他のレンチウイルスとよく似ている。

【0006】

世界中でいくつかのウイルス株が分離され、ウイルスの構造を決定するためいくつかの研究が実施されてきた。用いられた分離株は米国のペタルマ株(Talbott et al. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 5743-5747; Philipps et al., J. Virol., 1990, 64, 10, 4605-4613)、日本のTM1株とTM2株(Miyazawa et al., Arch.Virol., 1989, 108, 59-68)、スイスのFIVZ1株とFIVZ2株(Morikawa et al., Virus Research, 1991, 21, 53-63)である。

【0007】

米国のFIV分離株(ペタルマ株)から得られた3つのプロウイルス・クローン(FIV34TF1

10

20

30

40

50

0、FIV14、分離PPRの各クローン)のヌクレオチド配列が誌上発表され(Olmsted, et al., 1989; Philipps et al., 1990; Talbott et al., 1989)、2つのスイス株と比較されている(Morikawa et al., 1991)。Morikawa et al.はこの比較研究により、FIVのenv遺伝子にはいくつかの不変領域と可変領域が存在することを明らかにした。フランス株(Wo株とMe株)も分離されている(Morailon et al., 1992, Vet. Mic., 31, 41-45)。

【0008】

このウイルスは血液中の単核球の中で複製されて増殖し、Tリンパ球、腹水マクロファージ、脳マクロファージ、星状膠細胞を刺激する。他のレトロウイルスと同様に、FIVの遺伝子物質はRNAであり、ウイルスRNAからDNAをコピーを産生する過程は宿主中のFIVが自己複製するための最も重要なステップである。このステップには侵入したウイルスが宿主に持ち込んだ逆転写酵素が必要である。ウイルス遺伝子のこのDNA版は、ウイルスがプロウイルスの形で住み続ける感染宿主細胞の遺伝物質の中に挿入される。このプロウイルスは細胞が分裂するたびに複製され、新しいウイルス粒子の産生をコードすることができる。FIVに感染した細胞は死ぬまで感染したままである。

10

【0009】

感染したネコの唾液には相当量のウイルスが存在することから、このウイルスは通常、主に感染したネコが噛んだ傷からの水平感染で伝染すると考えられる(Yamamoto et al., Am. J. Vet. Res. 1988, 8:1246)。垂直感染の報告もあるが、これはまれである。

【0010】

FIV感染の現在の診断スクリーニング試験では、血清中の抗FIV抗体(Ab)を検出している。ウイルス検出キットも入手できるが、普及していない。感染動物中の抗FIV抗体の存在を判定する診断試験が多数利用できるようになってきている。例えば、PetChek(登録商標) FIV抗体試験キットおよびSNAP(登録商標) Combo FeLV Ag/FIV抗体試験キット(IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine)は免疫測定法に基づいたFIV感染の診断試験である。

20

【0011】

FIV感染が世界中で広がっていることがいくつかの研究により明らかになっていることから、FIV感染の検出は益々重要となっている。この疾患に対処するためにワクチンが開発されていることから、ワクチンの効果を判定すること、またワクチン接種されたネコと自然感染したネコを識別することがさらに重要となっている。

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明の要約

1つの面として、ここに示す発明はFIV envポリペプチドのようなFIVポリペプチドに対するネコの免疫反応を調べることにより、ネコがFIVのワクチン接種を受けたことがあるのか、またはFIVに自然感染しているのかを判定する方法を提供する。

【0013】

別の面では、本発明はFIVに自然感染した動物とFIV未感染動物やFIVワクチン接種された動物を鑑別する方法に関する。本方法は、動物の生体サンプルを、FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素であるFIV抗体が実質的に結合しないポリペプチドと接触させることを含む。そのポリペプチドに実質的に結合するサンプル中のFIV抗体を検出する。検出ステップの陽性結果は自然感染に相応することからその動物は自然感染であると判定され、陰性結果はワクチン接種または未感染に相応することからその動物はワクチン接種または未感染であると判定される。このポリペプチドはFIV envに由来するものでありうる。

40

【0014】

さらに別の面では、本発明はネコがFIVワクチンを接種されたことがあるか、FIVに自然感染しているのかを判定する方法に関する。この方法は、(a) ワクチン接種後、ワクチンに反応して産生されるある種のFIV抗原に対する特異抗体が検出されない十分な期間が過

50

ざる前に、ネコがFIVペプチドに対する抗体を持っているかどうかを検出し、(b) ワクチン接種後、ワクチンに反応して産生されるある種のFIV抗原に対する特異抗体が検出されない十分な期間が過ぎた後、ネコがFIVポリペプチドに対する抗体を持っているかどうかを検出し、(c) ステップaで抗体を検出し、ステップbで検出しないことにより動物がワクチン接種されたと判定する、(d) ステップaとステップbで抗体を検出することにより動物が自然感染したと判定する、ことを含む。

【0015】

本発明はネコがFIVに感染したことがないか、またはFIVワクチンを接種されたことがあるかを判定する方法をも提供する。この方法は、FIV由来のポリペプチドに対する抗体を検出するためネコの生体サンプルを分析すること、そのネコが感染したことがないかまたはワクチンを接種されたことがあるかを判定することを含んでいる。

10

【0016】

さらに別の面では、本発明はネコがFIVワクチンを接種されたことがあるのかないのか、あるいはFIVに自然感染したことがあるのかないのかを判定する方法を提供する。本方法は、ポリペプチドを含む試験装置の提供、ネコからの採血、血液サンプルの試験装置での測定、試験装置でのデータ読み取りを含んでいる。陽性の結果はネコがFIVに自然感染したことがあるかFIVワクチンを接種されたことがあること、陰性の結果はネコがFIVに自然感染したことがないかFIVワクチンを接種されたことがないことを示す。

【0017】

さらに、本発明は乾燥した有孔キャリアーを含み、有孔キャリアー上で固定化された第1の検出試薬と第2の検出試薬を有する診断装置に関し、第1の検出試薬にはFIV自然感染またはFIVワクチン接種のいずれに対する反応でも宿主が産生するFIV抗体を捕捉するタンパク質が含まれ、第2の検出試薬にはFIV自然感染に対する反応で宿主が産生するFIV抗体を捕捉するがFIVワクチン接種に対する反応で宿主が生成するFIV抗体は実質的に捕捉しないタンパク質が含まれる。第1の検出試薬はFIV p15抗原またはFIV p24抗原であることができ、第2の検出試薬はFIV envタンパク質であることができる。

20

【0018】

別の面では、本発明は新規のFIVポリペプチドに関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

詳細な説明

ここに記載する発明を詳細に説明する前に、いくつかの用語の定義を記す。ここでの使用では、単数形の“a”、“an”、および“the”は文脈が明らかに示しているのではない限り複数形の関係項も含めるものとする。

30

【0020】

本明細書において用いる場合、「ポリペプチド」という用語はペプチド結合でつながっているアミノ酸残基の単鎖もしくは2つ以上の鎖の複合体である化合物を指す。ペプチド鎖はどのような長さでも良い。タンパク質はポリペプチドであり、これらは同義語として扱う。本発明の範囲内では、機能上同等のFIVポリペプチドの変異体および断片も含める。ポリペプチドはそのポリペプチドに特異的な1つまたは複数の抗体と結合することができる。

40

【0021】

FIV由来のポリペプチドには、例えばgagおよびenv領域の部分およびそれらのミミトープを含むFIVプロテオームのいかなる領域も含まれる。参照のためここにそのまま全体が組み込まれている米国特許番号5,648,209、5,591,572、6,458,528には、FIVのenvおよびgagタンパク質に由来するFIVポリペプチドが記述されている。envおよびgagタンパク質由来のこれらのペプチドおよびこれに類するペプチドは、ここに示す発明の方法に使用するのに適している。適切なenvポリペプチドの例には以下のものがある。

ELGSNQNFSSKVPPELWKRYNKSKSKSKSKNRWEWRPDFESEKC

[配列番号1]

50

CNRWEWRPDFESEKSKSKSMQELGSGSNQNFSSKVPPELWKRYN

[配列番号2]

配列番号1はトリメリックな配列であって最初のモノマーは元来のFIV env配列（アミノ酸696～717でCからS、IからV、LからP、TからKに置換）、2つ目のモノマー（下線）はKSリンカー、3つ目のモノマーは元来のFIV表面envタンパク質（アミノ酸396～408でC末端にC追加）である。本発明の1つの面は、KSリンカーの長さがアミノ酸2～20個と多様であることである。

【0022】

配列番号2はトリメリックな配列であって、最初のモノマーは元来のFIV表面envタンパク質（アミノ酸396～408でN末端にC追加）、2つ目のモノマー（下線）はKSリンカー、3つ目のモノマーは元来のFIV envタンパク質（アミノ酸696～717でCからS、IからV、LからP、TからKに置換）である。本発明の1つの面は、KSリンカーの長さがアミノ酸2～20個と多様であることである。

10

【0023】

「結合特異性」または「特異結合」とは、第一の分子が第二の分子を実質的に認識することである。例えば、ポリペプチドとそのポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、あるいは抗体の断片（例えば、Fv、単鎖Fv、Fab'、またはF(ab')₂断片）である。

【0024】

「実質的な結合」または「実質的に結合する」とは、特定の測定条件下における測定混合液中の分子間の特異的な結合あるいは認識の程度をいう。最も広い意味においては、実質的な結合は第一の分子が第二の分子と結合する、または第二の分子を認識する能力の欠如の程度と第一の分子が第三の分子と結合する、または第三の分子を認識する能力の大きさの差、すなわち分子の相対濃度やインキュベーションの時間と温度を含む特定の測定条件下において特異的な結合を識別する意味ある測定を実施するための十分な差に関係している。別の面では、分子の相対濃度やインキュベーションを含む特定の測定条件下において、第一の分子の第二の分子に対する反応が第三の分子に対する反応の25%以下、好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下である交叉反応という意味において1つの分子が別の分子と結合する、または別の分子を認識する能力が実質的に欠如している。特異的な結合は広く知られている多くの方法、すなわち免疫組織化学法、酵素免疫測定法（ELISA）、放射性免疫測定法（RIA）、またはウェスタン・ブロット法で試験することができる。

20

30

【0025】

FIVに感染する動物はネコ類であって、飼いネコ、ライオン、トラ、ジャガー、ヒョウ、ピューマ、オセロットなどネコ目のすべての動物が含まれると理解されている。本明細書において用いる場合、「ネコ」「動物」の用語はすべてのネコ類を指す。

【0026】

「生体サンプル」とは唾液、全血、血清、血漿、その他FIV抗体を含んでいると考えられるサンプルなど、動物から得られたサンプルを指す。

【0027】

「FIVワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素である抗体」とは、FIVワクチンの接種により誘導された抗体を指す。この抗体はFIV自然感染の結果誘導される抗体と全く同じか同等のものである。ワクチン接種の成功とは、FIVワクチンの重要な要素である抗体が測定可能なレベルまで産生されることである。

40

【0028】

FIVワクチンは、例えば米国特許番号6,667,295、5,833,993、6,447,993、6,254,872、6,544,528に記述され、米国特許申請番号20040096460に公表されており、それぞれはその全体が参照としてここに組み込まれている。米国特許番号6,447,993および6,254,872は、異なるFIV亜種の細胞フリー分離株、または異なる亜種からの異なるプロトタイプFIVウイルスに感染したいくつかの細胞株の組み合わせから用意されたワクチンを記述している。

50

米国特許番号5,833,933は、FIV gagタンパク質およびFIV envタンパク質をコードしているDNA配列を含むワクチンを記述している。これらのワクチンにはその配列を発現するための発現システムが含まれている。利用できるワクチンの1つに、FEL-0-VAX（登録商標）FIV（Fort Dodge Animal Health, Overland Park, Kansas）がある。

【0029】

FIV感染に対するワクチン接種された動物の生体サンプルは、ワクチンに反応して動物が生成した抗体が存在しているため、FIV感染に対する試験で陽性結果を示す可能性がある。1つの面では、本発明はFIVに自然感染した動物とFIV未感染動物やFIVワクチンを接種された動物を鑑別する方法を提供する。本方法には、FIVワクチンに対する動物の抗体反応の重要な要素である抗体が実質的に結合しないFIV由来のポリペプチドを有する動物の生体サンプルと接触させることが含まれる。

10

【0030】

別の面では、本発明はネコがFIVに感染したことがなくFIVワクチンを接種されたこともないかを判定する方法を含んでいる。ネコの生体サンプルについて、FIV envおよび/またはgag由来のポリペプチドに対する抗体を検出するため分析する。次に、そのような抗体がないことを調べて、その動物が感染したことがなくワクチンを接種されたこともないことを判定する。

【0031】

場合によっては、ワクチン接種後の初期段階において、動物はワクチン成分である特異FIVポリペプチドに対するある種の抗体を、自然感染に対する反応で生成される量に比べて低濃度ながら一時的（一過性）に産生することがある。この抗体レベルは経時的に先細りとなり、初期段階が過ぎた後このポリペプチドに対する抗体は検出できなくなる。一般的にこの期間は約10～12週間であるが、動物種や個々の動物によって様々である。一過性の抗体はワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではない。

20

【0032】

例えば、ワクチンに対する動物のFIV抗体産生はワクチンに依存している。例えば、FEL-0-VAX（登録商標）ワクチンを接種してから約2～4週間後、動物は血清学的にp24（gag）に対するFIV抗体が陽性となることが知られている。しかしながら、そのようにワクチンを接種された動物は、envタンパク質がワクチンの成分に含まれているにもかかわらず、その1つまたは複数の領域に対する抗体を恒久的なレベルで産生することがない。それとは対照的に、自然感染した動物は通常、FIV gagおよびenvタンパク質の両方に対する抗体を恒久的なレベルで産生する。

30

【0033】

ワクチンを接種された動物と自然感染した動物の間に見られる免疫反応の相違は、動物がワクチンを接種されたのか自然感染したのかを鑑別する手段を提供する。本発明の方法を用いて、FIVに自然感染した動物を感染したことがない動物およびFIV感染に対するワクチンを接種されている動物から識別することが可能である。したがって、FIV由来のポリペプチドとワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではない抗体の間の実質的な結合の検出は、自然感染を意味することになる。そのような結合の相対的な欠如は、ワクチンを接種されたか、もしくは感染していないことを意味する。さらに、ワクチン接種および/または自然感染に反応して産生されるp15またはp24タンパク質のような抗体と実質的に結合する第二の別の抗体捕捉反応物質を試験系に組み込むことができる。そのように、個々の捕捉反応物質を様々に組み合わせることにより、被検動物がワクチン接種後状態および/または感染後状態かを判定することにつながる。

40

【0034】

例えば、FIV gagタンパク質のp15およびp24は死滅ウイルス全体によるFIVワクチンの免疫抗原成分である。これらの成分は接種された動物に恒久的な抗体反応を誘導するものと考えられる。他方、ワクチンの中には免疫学的に意義ある量のFIV envタンパク質を含まないもの、そのタンパク質がウイルス不活性化の過程で変質してしまったもの、さらにはある期間内にそれに対して産生された抗体が、もしあったとしても、p15およびp24に対す

50

る抗体よりも少なく検出されるレベルまでワクチン接種によるこのタンパク質の抗原呈示が自然感染における抗原呈示とは異なるものなどがある。このように、ワクチン接種後の初期段階で動物は一過性にenvタンパク質に結合する抗体を低レベルながら産生するが、時間経過と共に抗体産生は減少し約12週間後には検出されなくなる。この例では、一過性に産生された抗体は一定期間の後、ワクチンに対する動物の免疫反応の重要な要素ではなくなる。

【0035】

特異的なFIV envポリペプチドに対する検出可能な抗体の産生は、通常ワクチン接種が完了してから約12週間後にはなくなっていることを考えると、本発明の1つの面では、この生体サンプルは過去12週間以内にFIVのワクチンを接種されていない動物から得られている。ワクチン接種状態が不明で試験が感染を示唆する（抗体捕捉タンパク質との反応に基づく）場合、12週間後に再試験することが勧められる。

10

【0036】

特異抗体のレベルおよび/または抗原抗体結合反応の動的パラメータ（例えば、親和性、アビディティ）のような、ワクチンを接種された動物と自然感染した動物の間の免疫反応の相違は、ワクチンを接種された動物と自然感染した動物を鑑別するための測定法のデザインにおいて考慮されるべきである。ワクチン接種後の初期段階の後でさえ、動物がFIVポリペプチドに対する抗体および/または自然感染に対する反応で産生された抗体とは結合性が異なる抗体を低値ながら持続的に産生する場合のように、免疫反応の相違は意義あるものである。

20

【0037】

本発明の方法は様々な仕方で適正化でき、最新技術の一つによりFIV感染とワクチン接種に対する抗体を有する血清の鑑別を実施する方法に使用されるサンプル希釈、試薬濃度、インキュベーションの温度と時間を同時に調整することができる。例えば、特異ポリペプチドに対する抗体のための免疫測定法においてサンプル希釈とその他の条件が最適化されている場合、1つの特異FIVポリペプチドに関しワクチン接種された動物からのサンプルは陰性の測定結果となり、感染動物からのサンプルは陽性の測定結果となる。2つ目のFIVポリペプチドに関しては、両方のサンプルが陽性結果となる。

【0038】

本発明の1つの面では、タンパク質は適切な固形支持体の上に固定化される。サンプル中に抗体が存在する場合、その抗FIV抗体が結合する相手であるタンパク質に生体サンプルが接触するようにする。結合していることは、酵素、放射性物質、粒子化、蛍光標識など適切な方法によって検出できる。適切な実施形態において、検出試薬は抗FIV抗体（もし存在するなら）を捕捉するのに使用されるものと同じか似ているタンパク質と関連させることができる。

30

【0039】

さらに別の面では、この方法はネコがFIVワクチンを接種されたことがあるのか、あるいはFIVに自然感染したことがあるのかを判定する試験装置に関する。この試験装置を使用する方法は、FIV envタンパク質および別にFIV gagタンパク質を備えている試験装置を提供することが含まれる。本装置は、装置に生体サンプルを接触させることによりネコの生体サンプルを試験するのに使用することができる。装置の読み取りにおいて、抗体とgagタンパク質の結合の検出（gagタンパク質の陽性結果）は、そのネコがFIVに自然感染したことがあるかFIVのワクチンを接種されたことがあることを示す。同時にenvタンパク質の結果が陽性になるときは、自然感染（または、恐らく一過性のワクチン接種後反応）を意味し、同時にenvタンパク質の結果が陰性になるときは、ワクチン接種を意味する。上述内容を下表に要約する。

40

【0040】

【表 1】

	<i>gag</i> タンパク質	<i>env</i> タンパク質
ワクチン未接種または未感染	-	-
ワクチン接種	+	-
最近ワクチン接種した可能性	+	+
感染	+	+
感染およびワクチン接種	+	+

【0041】

本発明に使用するポリペプチドは、元来のFIVタンパク質の1つおよびミミトープおよび機能的に同等のその変異体に見出される少なくとも6個のアミノ酸、通常は少なくとも9個のアミノ酸、さらに通常は12個以上のアミノ酸を含む。

10

【0042】

「機能上の同等」または「機能的に同等」とは、元来のFIVエンベロープ (*env*) およびウイルス・コア (*gag*) のポリペプチド配列に関する、または由来するポリペプチドのことを指し、そのアミノ酸配列が1個または複数のアミノ酸の置換、挿入、欠落により修飾されている、あるいはアミノ酸類似物などアミノ酸が化学的に修飾されているが、それにもかかわらず実質的に同等の機能を保持している場合である。機能的に同等の変異体は、自然の生物学的多様性として発生することもあり、また化学合成、部位特定の突然変異、無作為突然変異、アミノ酸の酵素的切断および/または結合などの既知の技術を使って作製することもできる。このように、変異体配列を作るためのアミノ酸配列の修飾は、ポリペプチドの機能が影響されない限り起こり得る。

20

【0043】

本発明の範囲内における機能的に同等のFIV変異体は、保存的に置換された配列を含むことができる。すなわち、FIVポリペプチドの1個または複数のアミノ酸残基がFIVポリペプチドの二次元および/または三次元構造を変えないように別の残基で置き換えられうる。そのような置換には、荷電密度、大きさ、構成、親水性/疎水性など同じような生化学的特性を持つ残基でアミノ酸を置き換えることが含まれる。例としてのみの目的で挙げれば、そのような置換には1つの脂肪族残基 (Ile、Val、Leu、Ala) を別の脂肪族残基に置き換える、あるいは塩基性残基 (LysとArg)、酸性残基 (GluとAsp)、アミド残基 (GlnとAsn)、ヒドロキシン残基 (SerとTyr)、芳香族残基 (PheとTyr) を互いに置き換えることが含まれる。保存的な変異体は通常、本発明のポリペプチド配列を修飾し、修飾されたポリペプチドの抗原性を、例えば免疫組織化学法、酵素免疫測定法 (ELISA)、放射性免疫測定法 (RIA)、またはウェスタン・プロット法によって評価することにより同定できる。表現形質的に表立たないアミノ酸変換体の作製に関する詳細は、ボーウィらの論文 (Bowie et al., Science 247:1306-1310, 1990) に見ることができる。

30

【0044】

配列番号1および2の機能上同等物の例をペプチドの様々な修飾に関する説明とともにここに示す。

40

【表 2】

配列番号	配列	説明
3	CWEWRPDFESERELG <u>SNQ</u> QFFSKSFFQ <u>NSG</u> LELG <u>SNQ</u> QFFSK	多量体配列：最初のモノマーは元来のFIV <i>env</i> タンパク質（アミノ酸 398～408 でN 末端にC 追加、K からR の置換）、2 つ目のモノマー（下線）は元来のFIV <i>env</i> タンパク質（アミノ酸 696～707 でC からS の置換）、3 つ目のモノマーは逆位の元来のFIV <i>env</i> タンパク質（アミノ酸 706～697 でC からS の置換）、4 つ目のモノマー（下線）は元来のFIV <i>env</i> タンパク質（アミノ酸 696～706 でC からS の置換）からそれぞれ構成されている。
4	CNRWDWRPDFESKKS <u>KTAFAMQ</u> ELG <u>SNQ</u> QFFS KIPLELWTR	ダイメリック配列：最初のモノマーは元来のFIV <i>env</i> タンパク質（アミノ酸 396～408 でN 末端にC 追加、E からW、E からK の置換、SK 追加）、2 つ目のモノマー（下線）は元来のFIV <i>env</i> タンパク質（アミノ酸 690～715 でC からS、K からT の置換）からそれぞれ構成されている。
5	CNRWEWRPDFESEK <u>MQ</u> ELG <u>SNQ</u> QFFSKVPP <u>EL</u> WKRYN	ダイメリック配列：最初のモノマーは元来のFIV <i>env</i> タンパク質（アミノ酸 396～408 でN 末端にC 追加）、2 つ目のモノマー（下線）は元来のFIV <i>env</i> タンパク質（アミノ酸 694～717 でC からS、I からV、L からP、T からK の置換）からそれぞれ構成されている。

10

20

【0045】

30

その他の変異体も本発明の範囲内として企図されており、そのような変異体には、例えば1つまたは複数のアミノ酸の配列内への挿入のほか不特定数の残基のアミノ酸配列の追加により得られるアミノおよび/またはカルボキシル末端の融合が含まれる。例えば、追加されるアミノ酸配列は、別のポリペプチドまたはタンパク質の全体または一部に由来するものであってもよく、またFIVのエンベローブまたはウイルスのタンパク質の対応する位置に提供されるものであってもよい。より長いペプチドは1つまたは複数のポリペプチド配列の多数の複製を含むことができる。さらに、ポリペプチドの多数の複製を組み合わせさせて多抗原ペプチド（MAP）を形成するポリリジンの主骨格のようなポリアミノ酸の主骨格とすることができる。

【0046】

40

アミノ酸配列の欠落変異体は、配列から1つまたは複数のアミノ酸残基が脱落している変異体である。挿入変異体は、1つまたは複数のアミノ酸がタンパク質のあらかじめ定められた部位に組み込まれている場合に存在するが、無作為挿入法は結果的な産物の適切なスクリーニングが必要なオプションである。いずれの場合も、これらおよびその他の使用されたFIV変異体は実質的にFIVポリペプチドと同じ抗原性を保持している。このタンパク質の抗原認識領域以外の領域のアミノ酸が置換されているものも含め、その他の変異体も企図されている。FIVの2つ以上のポリペプチド配列を含む融合タンパク質も、適切な抗原性を提示する配列を提供する点で本発明の範囲内にある。そのようなポリペプチドは一般的に、FIVの特徴であるエピトープまたはミミトープの少なくとも1つに対応している。エピトープまたはミミトープは性質上、生体サンプル中のFIVに対する抗体の免疫学的検出

50

を妥当な確かさで可能にすることを意味する。通常、エピトープまたはミミトープ、変異体または融合タンパク質は、免疫学的にFIV以外のウイルスから明確に区別されること（すなわち、FIV以外のウイルスを認識する抗体と交叉反応しないこと）が望ましい。

【0047】

抗原性を発揮する変異体は、配列番号1および2とは、例えば配列番号3~10に示すように1、2、3、5、6、10、15、または20個のアミノ酸残基数が異なり、その断片からも同様に異なる。この比較にアライメントが必要なときは、配列を最大相同性に対してアライメントする。欠落、挿入、置換、反復、逆位、あるいは不一致は相違と考える。相違は必要不可欠な部位以外の相違または変化、あるいは保存的な置換であることが好ましい。でき上がった変異ポリペプチドが、例えば配列番号3~10に示す変化のように配列番号1および2と抗原的に実質的に類似している限り、変異部位はポリペプチドのいずれの部位で生じてもよい（表3および表4参照）。機能的に同等の典型的な変異体には50%以上のアミノ酸が相同性を示すものが含まれる。相同性は60%、70%、あるいは80%より大きいことが好ましい。しかし、そのような変異体は全体的により少ない割合の相同性を示すが、相同性が保存されている領域を持っている点で本発明の範囲内である。

【0048】

場合によっては、特異的なキャリアーとの結合を促進するため、あるいはジスルフィド結合が抗原ループを模倣できるようにして抗原性を高めるために、1個または複数のシステイン残基をポリペプチドの末端に付加してもよい。さらに、デリバリー溶媒への混入を容易にし抗原性を増すため、ペプチドに脂肪酸または疎水性尾部を付加することもできる。

【0049】

配列番号1~5のポリペプチドの変異体を作製するのに使用できるモノマーのいくつかの例を以下に示す。

【表3】

配列番号	配列	説明
6	TAFAMQELGNSNQFFSK	元来のFIV <i>env</i> タンパク質 (アミノ酸690~707でCからSの置換)
7	TAFAMQELGCNQQFFCA	元来のFIV <i>env</i> タンパク質 (アミノ酸690~707でNからQ、KからAの置換)
8	YTAFAMQEIGCNQNQFFCA	元来のFIV <i>env</i> タンパク質 (アミノ酸689~707でLからI、KからAの置換)
9	ELGCNQNQFFCK	元来のFIV <i>env</i> タンパク質 (アミノ酸689~707)
10	CEGSNQNQFFSK	元来のFIV <i>env</i> タンパク質 (アミノ酸696~707でN末端にC追加、CからSの置換)

【0050】

さらに別の面では、本発明は新規のポリペプチドを提供する。これらのポリペプチドは例えばキットやワクチンの検出試薬として使用できる。そのようなポリペプチドの1つは、化学式： $[(P^1)_a - (L^1)_b - (P^2)_c]_n$ を有する。ここで、 P^1 は元来のまたは抗原性を持つ断片であって元来のFIV *env* ペプチド696~717の機能的同等変異体のポリペプチドであり、 P^2 は元来のまたは抗原性を持つ断片であって元来のFIV *env* タンパク質、アミノ酸396~408の機能的同等変異体のポリペプチドである。 P^1 と P^2 のいずれも逆位にすることができる。例えば、 P^1 は配列番号6~10または
ELGSNQNQFFSKVPPPELWKRYN [配列番号11]、
MQELGSNQNQFFSPPELWKRYN [配列番号12]、
ELGSNQNQFFSK [配列番号13]、

LGSNQNQFFS [配列番号14]、および
TAFAMQELGSNQNQFFSKIPLLELWTR [配列番号15]

の1つであり、

P^2 は例えば

NRWEWRPDFESEKC [配列番号16]、

CNRWEWRPDFESEK [配列番号17]、

CWEWRPDFESER [配列番号18]、および

CNRWDWRPDFESKK [配列番号19]

の1つであり、

ここで P^1 および/または P^2 のいずれかは逆位である。 L^1 はSペプチドとKペプチドが2~20回交互に繰り返しているリンカー・ポリペプチドであり、SがKのいずれかで始まり終わっている。ここでa、c、nは、独立して、1~3の整数であり、bは0または1の整数である。

【0051】

検出試薬として使用するFIVポリペプチドは自然のもの、すなわち自然界から分離されたFIVタンパク質全体または断片であってもよく、または合成されたものであってもよい。自然のタンパク質はアフィニティークロマトグラフィなど従来の方法でFIVウイルス全体から分離することができる。よく知られた技術により、ポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を使用して適切なアフィニティカラムを準備できる。

【0052】

自然界のFIVタンパク質と免疫学的に交叉反応するタンパク質を化学的に合成することができる。例えば、アミノ酸を連続的に付加して長くしてゆく、よく知られたMerrifield固相合成法により、約100個以下、より一般的には約80個以下、典型的には約50個以下のアミノ酸からなるポリペプチドを合成することができる。Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156) 組み換えタンパク質を使用することもできる。これらのタンパク質は、FIV遺伝子の目的部位をコードしている組み換えDNA分子を持った培養細胞に発現させて産生することができる。FIV遺伝子の部分はそれ自体自然でも合成でもよく、自然の遺伝子は分離されたウイルスから従来技術で手に入れることができる。もちろんFIVの遺伝子はRNAであり、逆転写酵素を使った従来技術で自然のRNAをDNAに転写する必要がある。ポリヌクレオチドもよく知られた技術で合成することができる。例えば、短い単鎖DNA断片はBeaucageおよびCarruthersが記載したフォスフォアミダイト法でを用いて用意できる (Beaucage and Carruthers, 1981, Tett. Letters 22:1859-1862)。二重鎖断片は、相補性の鎖を合成した後それを適当な条件下でともにアニールするか、適当なプライマー配列とDNAポリメラーゼを使って相補性の鎖を加えてゆくことにより作製できる。

【0053】

目的のFIVタンパク質または断片をコードした自然のまたは合成のDNA断片は、生体外 (in vitro) で細胞培養に導入でき発現させることができるDNA構造体の中に組み込む。通常、DNA構造体は酵母や細菌のような単細胞内で複製させるのが適している。それらを哺乳動物の培養細胞または他の真核細胞の遺伝子に導入し一体化させることも意図している。細菌や酵母に導入するために用意されたDNA構造体には、宿主細胞に認識される複製システム、目的のポリペプチド産物をコードしているFIV DNA断片、その断片の3'末端に結合しているFIV DNA終末制御配列の5'末端に結合している転写および翻訳の開始制御配列が含まれている。転写制御配列には宿主細胞によって認識される異種プロモーターが含まれている。便利なことに、多数の宿主細胞のための多くの適切な発現ベクターが市販されている。

【0054】

本発明の検出方法に有用であるためには、ポリペプチドは実質的に純粋な形、すなわち典型的には純度が約50% w/w以上であって、妨害タンパク質や不純物が実質的に含まれていない形で得る。FIVポリペプチドは少なくとも80% w/wの純度で分離あるいは合成するのが好ましく、少なくとも95% w/wの純度ならさらに好ましい。従来タンパク質精製法を使って少なくとも約99% w/wの純度の同種ポリペプチド成分を手に入れることができる。

例えば、上述のイムノアフィニティカラムを使用し以下に示す抗体を用いてタンパク質を精製することができる。

【0055】

本発明の方法は、マイクロプレートや側方流 (lateral flow) 装置などを使用した最新技術に精通した者によく知られている免疫測定技術を用いて行なう。1つの実施形態では、FIVタンパク質は固形支持体上の特定の部分で固定化される。固形支持体上のタンパク質抗体複合体の検出は、既知の技術で行うことができる。例えば、参照のためここにその全体が組み込まれている米国特許番号5,726,010には、本発明に有用な側方流 (lateral flow) 装置であるSNAP (登録商標) 免疫測定装置 (IDEXX Laboratories) の例が記載されている。市販されているWITNESS (登録商標) FIV診断試験 (Synbiotics Corporation, Lyon, France) のようなコロイド粒子に基づく試験も使用可能である。

10

【0056】

分析物捕捉試薬がサンプル、希釈液および/または洗浄操作により洗い流されないように、例えばFIVタンパク質などの1つまたは複数の分析物捕捉試薬を装置あるいは固形支持体上に固定化する。物理的な吸収 (すなわち、化学リンカーを使用しない) または化学的結合 (すなわち、化学リンカーを使用して) によって、1つまたは複数の分析物捕捉試薬を表面に取り付けることができる。化学的結合は特異的な結合物質を表面により強く取り付け、表面結合分子の明確な方向と配座を提供することができる。

【0057】

本発明の別の実施形態は、側方流 (lateral flow) 測定法に適切な装置を提供する。例えば、試験サンプルは最初の領域 (サンプル適用ゾーン) でフローマトリックスに添加する。試験サンプルは毛細管現象により液体流路に沿って流れ、試験サンプル中の分析物と結合し第一複合体を形成することができる標識物質があるフローマトリックスの二番目の領域に運ばれる。第一複合体は、FIVタンパク質が明確な部位に固定化されているフローマトリックスの三番目の領域に運ばれる。第二複合体は固定化されたタンパク質とサンプル中の抗体を含む第一複合体の間で形成される。例えば、金ゾル粒子とFIV抗体に結合しているFIVタンパク質からなる第一複合体は、第二固定化FIVタンパク質またはネコの抗体に対する第二抗体と特異的に結合し第二複合体を形成する。第二複合体の一部を成す標識物質は直接可視化できる。

20

【0058】

別の面では、本発明は装置に適用する前に試験サンプルと混合できる1つまたは複数の標識化特異的結合試薬を含む。この場合、標識化特異的結合試薬を装置の特異的結合試薬パッドに沈殿させ乾燥させる必要はない。標識化特異的結合試薬は、例えば試験サンプルに加えるにしても装置にあらかじめ沈殿させるにしても、FIVに対する抗体に特異的に結合する標識化FIVタンパク質となり得る。

30

【0059】

上記の実施形態のどれもまたはすべてが、キットとして提供することができる。1つの具体的な例では、そのようなキットに、特異的結合試薬 (例えば、非固定化標識化特異的結合試薬および固定化分析物捕捉試薬) と洗浄試薬、さらに検出試薬および陽性コントロール、陰性コントロールで完全装備した装置を含む。さらに、安定化剤、バッファなどのような添加物を含めることができる。種々の試薬の相対量は、測定法の感度に実質的に最適の溶液中の試薬濃度を提供するため変わり得る。特に、試薬は乾燥粉末 (通常は凍結乾燥) で提供することができ、溶解時にサンプルと混合するための適切な濃度の試薬溶液にする。

40

【0060】

FIVタンパク質は反応ゾーン (固相) の固定化分析物捕捉試薬になり得る。標識物質と抱合した第二分析物捕捉試薬、すなわち第二FIVタンパク質は、サンプルを装置に適用する前にサンプルに添加することも、装置に組み込むこともできる。例えば、標識化特異的結合試薬は、サンプル適用ゾーンと固相の間の液体による通信系となる液体流路に沈殿させ乾燥させることができる。標識化特異的結合試薬が液体サンプルに接触すると標識化特

50

異的結合試薬が溶け出す。

【0061】

この装置には結合していない物質（例えば、未反応の液体サンプルや未結合の特異的結合試薬）を反応ゾーン（固相）から除去する液体試薬を含めることができる。液体試薬は洗浄試薬で未結合物質を反応ゾーンから除去することのみに利用するか、検出試薬を含み未結合物質を除去し分析物の検出を促進することの両方に利用することができる。例えば酵素への特異的結合試薬複合体の場合、検出試薬には反応ゾーンに酵素抗体複合体と反応して検出信号を発する基質を含めることができる。放射性物質、蛍光物質、吸光分子と抱合させた標識化特異的結合試薬の場合、検出試薬は単に未結合の標識試薬を洗い流すことによって反応ゾーンでの複合体形成の検出を促進する洗浄液としての役目のみを果たす。

10

【0062】

2つ以上の液体試薬、例えば洗浄試薬として働く液体試薬と検出試薬として働き分析物の検出を促進する液体試薬を備えた装置とすることができる。

【0063】

液体試薬にはさらに限定された用量の「阻害物質」、すなわち検出可能な最終産物の成長を阻止する物質を含めることができる。限定された用量とは、検出可能な最終産物が産生され過剰の未結合物質のほとんどまたはすべてが第二領域から運び出されるまで最終産物の成長を阻止するのに十分な阻害物質の量である。

【0064】

以下は例示目的のためだけに提供し、上記の広範な項で記述した本発明の範囲を限定することを意図するものではない。この開示で引用しているすべての参考文献は参照としてここに組み入れられている。

20

【実施例】

【0065】

実施例1

SNAP（登録商標） FeLV Ag/FIV Ab 試験キットでFIVが陰性結果となった8匹のネコに、Fel-0-Vax（登録商標）FIVワクチン（Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge Iowa）でワクチン接種した。このワクチンは多数のFIVウイルス株の死滅物全体から生成されている。製造元の使用方法に従って、ネコに試験0日、14日、および28日にワクチンを接種した。FIV試験で陰性結果が出た2匹のネコにはワクチン接種を行わず、本試験の対照群に含めた。

30

【0066】

ワクチン接種試験の第0日およびそれ以降第12週まで7日ごとに、10匹のネコから血液サンプルを採取し測定時まで冷凍保存した。それに加えて、ウェスタン免疫ブロット確認試験によりFIV Ab陰性または陽性と確認されたFIV陰性ネコおよびFIV自然感染ネコの血液サンプルも同じく試験した。

【0067】

サンプルの測定はSNAP（登録商標） ELISA法により実施した。米国特許番号5,726,010に記述されているように、サンプルの逆行クロマトグラフィ・フローと洗浄溶液および酵素基質溶液の自動連続フローの固相を提供するためにSNAP（登録商標）装置技術を使用した。

40

【0068】

SNAP（登録商標）装置については、固相上に単体抗体捕捉スポットを形成するためにFIV gag p24（組み換えDNA）およびN末端システイン - CELGCGNQNFCK [配列番号20] - タンパク質付加のFIV env 696-707を沈殿させた。SNAP（登録商標）装置の固相上に陰性コントロールスポットを形成するために陰性コントロール試薬を、また陽性コントロールスポットを形成するために陽性コントロール試薬を沈殿させた。gag もしくはenvタンパク質は酵素のホースラディッシュペルオキシダーゼに化学的に抱合し、バッファ、洗浄剤および動物の血清成分から構成された溶液に入れて用意した。

【0069】

50

血清サンプルはgagもしくはenvタンパク質-酵素抱合溶液と混合して、SNAP（登録商標）装置に適用した。短時間インキュベーションしたのち、装置の作動を開始した。陽性コントロールスポットが発色したことから適正な試験であったことが示された。サンプルスポットの発色が陰性コントロールスポットの発色よりも大きかったことから、サンプル内に抗原が存在していたことを示し、陽性の試験結果とされた。試験結果は視覚的に判定し、表1に示した。

【 0 0 7 0 】

【表 4】
表 1

動物 ID	状態	日	<i>gag</i> Ab 試験の結果 (視覚的)	<i>env</i> Ab 試験の結果 (視覚的)
NV1	未ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	14	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	21	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	28	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	35	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	42	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	49	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	56	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	63	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	70	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	77	陰性	陰性
NV1	未ワクチン接種、未感染	84	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	14	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	21	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	28	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	35	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	42	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	49	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	56	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	63	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	70	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	77	陰性	陰性
NV2	未ワクチン接種、未感染	84	陰性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	14	陰性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	21	陽性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	28	陽性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	35	陽性	陽性
V1	ワクチン接種、未感染	42	陽性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	49	陽性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	56	陽性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	63	陽性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	70	陽性	陰性

10

20

30

40

【 0 0 7 1 】

【表 5】

V1	ワクチン接種、未感染	77	陽性	陰性
V1	ワクチン接種、未感染	84	陽性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	14	陰性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	21	陰性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	28	陰性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	35	陽性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	42	陽性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	49	陽性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	56	陽性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	63	陽性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	70	陽性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	77	陽性	陰性
V2	ワクチン接種、未感染	84	陽性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	14	陰性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	21	陰性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	28	陰性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	35	陽性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	42	陽性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	49	陽性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	56	陽性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	63	陽性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	70	陽性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	77	陽性	陰性
V3	ワクチン接種、未感染	84	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	14	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	21	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	28	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	35	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	42	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	49	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	56	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	63	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	70	陽性	陰性

10

20

30

40

【 0 0 7 2 】

【表 6】

V4	ワクチン接種、未感染	77	陽性	陰性
V4	ワクチン接種、未感染	84	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	14	陰性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	21	陽性	陽性
V5	ワクチン接種、未感染	28	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	35	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	42	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	49	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	56	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	63	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	70	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	77	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	84	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	14	陰性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	21	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	28	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	35	陽性	陽性
V5	ワクチン接種、未感染	42	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	49	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	56	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	63	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	70	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	77	陽性	陰性
V5	ワクチン接種、未感染	84	陽性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	14	陰性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	21	陽性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	28	陽性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	35	陽性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	42	陽性	陽性
V7	ワクチン接種、未感染	49	陽性	陽性
V7	ワクチン接種、未感染	56	陽性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	63	陽性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	70	陽性	陰性

10

20

30

40

【 0 0 7 3 】

【表 7】

V7	ワクチン接種、未感染	77	陽性	陰性
V7	ワクチン接種、未感染	84	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	0	陰性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	7	陰性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	14	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	21	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	28	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	35	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	42	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	49	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	56	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	63	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	70	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	77	陽性	陰性
V8	ワクチン接種、未感染	84	陽性	陰性
Inf1	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
Inf2	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
Inf3	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
Inf4	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
Inf5	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
Inf6	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
Inf7	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
Inf8	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
Inf9	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性
inf10	未ワクチン接種、感染	ND	陽性	陽性

10

20

【0074】

30

実施例 2

FIV陰性の感染ネコおよびFEL-0-VAX(登録商標) FIVワクチンを接種されたネコから採取した血清サンプルに対して、固相上の個々の動物のFIVポリペプチドと抗ネコIgG-ペルオキシダーゼ複合体を用いた間接測定法によりマイクロプレートELISA解析を実施した。FIV envに対する抗体は、以下のペプチドを抗原試薬として用いて検出した。

ELGSNQNQFFSKVPPPELWKRYNKSksksksksnrweWRPDFESEKC [配列番号1]

CNRWEWRPDFESEKSksksksmqELGSNQNQFFSKVPPPELWKRYN [配列番号2]

CWEWRPDFESERELGSNQNQFFSKSFFQnQNSGLELGSNQNQFFSK [配列番号3]

CNRWDWRPDFESKkskTAFAMQELGSNQNQFFSKIPLELWTR [配列番号4]

CNRWEWRPDFESEKmqELGSNQNQFFSKVPPPELWKRYN [配列番号5]

40

CEGSNQNQFFSK [配列番号10]

【0075】

ポリペプチドは市販の機器を用い製造元の使用説明書に従って合成した。ポリペプチド保存試薬はDMSOに5 mg/mlで溶解して準備した。次にポリペプチドをマイクロプレートウェルにコーティングした(ペプチドを50 mM Tris-HCl pH 7.4に10 ug/mlの濃度で溶解し100 ul/ウェルの割合でコーティング)。次にプレートを2%ツイーン-20/2.5%ショ糖によりブロック/コーティングし、吸湿剤入りマイラーバッグで乾燥させた。

【0076】

分析試験については、ネコの血清サンプル(100 ul/well, 1/1000 in 50%に希薄された胎児ウシの血清)がウェル(well)に加えられ、プレートは室温で10分間培養された。イ

50

ンキュベーション後、マイクロプレートにPBS/ツイーン溶液で洗浄した。ヤギ抗(ネコIgG):ペルオキシダーゼ抱合体をウェルに加えた(100 ul/ウェル、50%胎児ウシ血清で希釈した抗ネコIgG:ペルオキシダーゼ)。プレートをさらに室温で15分間インキュベーションし、PBS/ツイーンで2回目の洗浄を行なった。ペルオキシダーゼの基質を加え(100 ul/ウェル、テトラメチル・ベンチジン・ペルオキシダーゼ基質)、プレートを室温で10分間3回目のインキュベーションを行なった。フッ酸停止液(50 ul/ウェル)をプレートに添加した。分光光度計(A650 nm)でペルオキシダーゼ活性(発色産物)を判定することによりサンプル抗体結合を測定した。サンプルに対する有意な実質的抗体結合は0.200よりA650 nm大きいこととした。参照試験としてこれらのサンプルをIDEXX PetChek(登録商標) Anti-FIV抗体試験キットでも測定した。結果を表2に示す。

10

【 0 0 7 7 】

【 表 8 】

表2

FIV感染、未ワクチン接種:							
	配列番号 1	配列番号 2	配列番号 3	配列番号 10	配列番号 4	配列番号 5	PetChek
サンプル	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	結果
58376-274	1.400	1.944	1.838	1.370	1.910	2.109	陽性
JL-60	1.139	1.906	1.433	2.127	2.014	1.639	陽性
21636	1.301	1.838	1.944	1.918	1.986	2.080	陽性
Gonzalez	0.951	1.775	1.281	1.920	1.520	1.407	陽性
2605	0.500	1.593	0.746	0.965	1.152	0.871	陽性
Stanley	0.972	1.590	0.834	0.442	1.124	1.044	陽性
2614	0.328	1.029	0.382	1.095	0.527	0.945	陽性
平均値	0.942	1.668	1.208	1.405	1.462	1.442	
標準偏差	0.398	0.314	.582	.615	.558	.520	

20

FIV陰性、未ワクチン接種:							
	配列番号 1	配列番号 2	配列番号 3	配列番号 10	配列番号 4	配列番号 5	PetChek
サンプル	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	結果
Vx 3520 D84	0.032	0.042	0.035	0.040	0.043	0.045	陽性
Vx 3519 D84	0.032	0.084	0.036	0.041	0.040	0.038	陽性
Vx 3532 D84	0.026	0.038	0.036	0.042	0.038	0.040	陽性
Vx SK4 D84	0.031	0.047	0.033	0.048	0.042	0.046	陽性
Vx G1 wk5	0.032	0.111	0.100	0.101	0.114	0.116	陽性
Vx G1 wk7	0.035	0.114	0.105	0.103	0.121	0.137	陽性
Vx G1 wk8	0.035	0.095	0.088	0.096	0.095	0.108	陽性
Vx G1 wk12	0.036	0.100	0.087	0.085	0.101	0.111	陽性
平均値	0.032	0.079	0.065	0.070	0.074	0.080	
標準偏差	0.003	0.032	0.033	0.029	0.037	0.041	

30

40

【 0 0 7 8 】

【表 9】

FIV ワクチン接種、未感染：							
	配列番号 1	配列番号 2	配列番号 3	配列番号 10	配列番号 4	配列番号 5	PetChek
サンプル	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	A(650nm)	結果
2151-05H	0.032	0.064	0.050	0.049	0.039	0.047	陰性
F6263E	0.039	0.045	0.038	0.058	0.039	0.037	陰性
Abraham	0.032	0.045	0.035	0.035	0.037	0.035	陰性
AWL 2002	0.033	0.041	0.033	0.072	0.039	0.051	陰性
14834	0.030	0.035	0.024	0.036	0.038	0.034	陰性
D1606315	0.032	0.035	0.033	0.035	0.041	0.038	陰性
2483-83-33	0.029	0.034	0.033	0.035	0.036	0.036	陰性
2483-83-23	0.032	0.033	0.033	0.035	0.038	0.039	陰性
2483-83-30	0.030	0.033	0.033	0.035	0.038	0.035	陰性
2377-1-38	0.030	0.033	0.033	0.034	0.037	0.035	陰性
769703	0.029	0.032	0.035	0.035	0.042	0.036	陰性
2377-23-3	0.026	0.032	0.032	0.033	0.036	0.035	陰性
14151	0.032	0.032	0.034	0.034	0.037	0.035	陰性
768547	0.030	0.031	0.034	0.034	0.037	0.035	陰性
768513	0.032	0.030	0.034	0.036	0.037	0.042	陰性
平均値	0.031	0.037	0.034	0.040	0.038	0.038	
標準偏差	0.003	0.009	0.005	0.011	0.002	0.005	

10

20

【0079】

実施例 3

実施例2に示した方法において、FIVが陰性と確認された感染ネコおよびFEL-0-VAX（登録商標）FIVワクチンを接種されたネコから採取した血清サンプルについてマイクロプレートELISA解析を実施した。FIV envに対する抗体は、以下のペプチドを抗原試薬として用いて検出した。

30

CNRWEWRPDFESEKSKSKSMQELGSNQNQFFSKVPPPELWKRYN [配列番号2]

TAFAMQELGSNQNQFFSK [配列番号6]

TAFAMQELGCNQQQFFCA [配列番号7]

YTAFAMQEIGCNQNQFFCA [配列番号8]

ELGCNQNQFFCK [配列番号9]

【0080】

サンプルに対する有意義な実質的抗体結合は0.200よりA650nm大きいこととした。参照試験としてこれらのサンプルをIDEXX PetChek（登録商標）抗FIV抗体試験キットでも測定した。結果を表3および表4に報告する。

40

【0081】

【表 1 0】

表 3

FIV 感染、未ワクチン接種：						
	配列番号 2	配列番号 6	配列番号 7	配列番号 8	配列番号 9	PetChek
サンプル	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	結果
2689:44 7	2.212	0.908	1.696	0.893	1.153	陽性
197	2.123	0.687	1.623	1.590	1.027	陽性
22488	2.121	0.802	1.162	1.663	1.296	陽性
23804 255	2.065	0.991	0.829	1.078	1.036	陽性
24034 283	1.973	0.663	1.436	1.318	1.202	陽性
F0-138 1/23/00	1.951	1.409	1.835	1.412	1.548	陽性
56360 60	1.881	1.391	1.553	1.270	1.298	陽性
57561 181	1.875	1.782	1.747	1.000	1.293	陽性
56897 187	1.864	0.813	1.492	0.929	1.102	陽性
21518	1.849	1.000	1.419	1.032	0.955	陽性
58178 232	1.839	1.386	1.338	1.392	1.237	陽性
58376 274 8/17	1.826	0.617	0.448	0.314	0.471	陽性
23805 253	1.796	1.005	0.562	0.721	0.599	陽性
21636	1.795	1.726	1.225	1.811	1.238	陽性
58232 242	1.724	0.454	1.580	0.686	1.297	陽性
23119	1.721	0.888	1.154	0.447	1.156	陽性
57601 215	1.659	0.725	0.987	0.722	0.601	陽性
22373 275	1.646	0.641	1.853	0.695	1.584	陽性
F9-881	1.574	0.926	0.587	1.272	0.589	陽性
23938 323	1.554	0.635	1.475	0.999	1.333	陽性
58036 224	1.418	1.387	1.218	0.828	1.102	陽性
22879	1.332	0.468	1.117	0.752	1.055	陽性
F0-162 2/13/00	1.273	1.068	1.284	0.702	1.046	陽性
23321 211	1.214	1.183	0.751	1.308	0.886	陽性
平均値	1.762	0.981	1.265	1.035	1.088	
標準偏差	0.267	0.371	0.404	0.385	0.290	

10

20

30

FIV 陰性、ワクチン接種：						
	配列番号 2	配列番号 6	配列番号 7	配列番号 8	配列番号 9	PetChek
サンプル	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	結果
Vx C3520 D35	0.211	0.058	0.142	0.065	0.116	陽性
Vx C3511 D49	0.173	0.155	0.209	0.111	0.180	陽性
Vx C3519 D35	0.110	0.053	0.091	0.058	0.055	陽性
Vx C3517 D35	0.110	0.082	0.093	0.063	0.074	陽性
Vx SK4 D21	0.066	0.035	0.082	0.038	0.044	陽性
平均値	0.134	0.077	0.123	0.067	0.094	
標準偏差	0.058	0.047	0.054	0.027	0.055	

40

【表 1 1】

FIV 陰性、未ワクチン接種：						
	配列番号 2	配列番号 6	配列番号 7	配列番号 8	配列番号 9	PetChek
サンプル	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	A (650nm)	結果
F9-1164	0.061	0.038	0.054	0.039	0.036	陰性
57435 272 8/17	0.058	0.039	0.046	0.035	0.039	陰性
57975 236	0.048	0.035	0.040	0.043	0.036	陰性
57323 174	0.046	0.046	0.032	0.042	0.034	陰性
56728 200	0.045	0.039	0.049	0.044	0.042	陰性
58238 251 8/14	0.044	0.031	0.032	0.033	0.033	陰性
56956 209	0.044	0.035	0.049	0.038	0.036	陰性
F9-1638 143119	0.042	0.035	0.037	0.036	0.039	陰性
F9-1191	0.041	0.027	0.040	0.037	0.037	陰性
57528 197	0.041	0.033	0.039	0.035	0.035	陰性
57095 125	0.041	0.034	0.038	0.035	0.035	陰性
56704 154	0.039	0.033	0.040	0.027	0.035	陰性
57911 235	0.039	0.040	0.056	0.050	0.038	陰性
F9-1455 11/14/99	0.038	0.034	0.037	0.037	0.033	陰性
F0-53 1/23/00	0.038	0.035	0.038	0.037	0.036	陰性
57222 153	0.038	0.036	0.041	0.037	0.036	陰性
56746 226	0.038	0.036	0.038	0.036	0.034	陰性
F9-1278	0.037	0.024	0.038	0.036	0.034	陰性
57238	0.037	0.035	0.037	0.036	0.035	陰性
2873	0.037	0.034	0.036	0.033	0.034	陰性
22151 80	0.036	0.026	0.039	0.036	0.047	陰性
57611 216	0.036	0.035	0.067	0.043	0.044	陰性
57211 147	0.036	0.035	0.039	0.037	0.034	陰性
F9-1211	0.035	0.033	0.036	0.035	0.031	陰性
平均値	0.041	0.035	0.042	0.037	0.036	
標準偏差	0.007	0.005	0.008	0.005	0.004	

10

20

30

【 0 0 8 3 】

本発明の様々な特異的实施形態をここに記述したが、本発明はそれらの厳密な実施形態に限られるわけではなく、本発明の範囲や精神からかけ離れることなく、この技術に練達した者によってそれらに様々な変更や修飾を行うことができる。

【配列表】

[2007505320000001.xml](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC/JS2004/029570

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/569		
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) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	YAMAMOTO J K ET AL: "EXPERIMENTAL VACCINE PROTECTION AGAINST HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS STRAINS OF FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS" JOURNAL OF VIROLOGY, NEW YORK, US, US, vol. 67, no. 1, 1993, pages 601-605, XP000609625 ISSN: 0022-538X figures 1-3 page 601, right-hand column, line 5 - page 604, left-hand column, line 9 -/--	1-31
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C	<input checked="" type="checkbox"/>
* Special categories of cited documents		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*G* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 9 February 2005		Date of mailing of the international search report 28/02/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weber, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PC/US2004/029570

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	HOHDATSU TSUTOMU ET AL: "Effect of dual-subtype vaccine against feline immunodeficiency virus infection" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 58, no. 2-4, November 1997 (1997-11), pages 155-165, XP002312712 ISSN: 0378-1135 page 157, paragraph 2 - paragraph 3 page 158, last paragraph page 159, paragraph 2 figures 1,2 -----	1-31
X	UHL E W ET AL: "FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: A review FIV vaccine 2002 update and review." VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, vol. 90, no. 3-4, December 2002 (2002-12), pages 113-132, XP002312660 ISSN: 0165-2427 figure 1 page 125, right-hand column, last paragraph - page 126, right-hand column, last paragraph -----	1-3,5,6, 8-11, 13-17, 19-23, 25-27, 29-31
X	US 6 458 528 B1 (O'CONNOR THOMAS P ET AL) 1 October 2002 (2002-10-01) cited in the application the whole document -----	14-18, 20-24
A	MURRAY DOROTHY M: "Identifying FIV vaccinates." JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, vol. 222, no. 6, 15 March 2003 (2003-03-15), page 710, XP008040878 ISSN: 0003-1488 the whole document -----	1-38
A	MOON DEBRA: "Another solution to identify FIV-vaccinated cats." JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. 1 MAY 2003, vol. 222, no. 9, 1 May 2003 (2003-05-01), page 1207; author reply 1207, XP008040879 ISSN: 0003-1488 the whole document -----	1-38

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
 PCT/US2004/029570

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>CALANDRELLA M ET AL: "Densitometric analysis of Western blot assays for feline immunodeficiency virus antibodies" VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, vol. 79, no. 3-4, 30 May 2001 (2001-05-30), pages 261-271, XP002312661 ISSN: 0165-2427 the whole document</p> <p>-----</p>	1-38
A	<p>HARTMANN K ET AL: "Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections." THE VETERINARY RECORD. 15 SEP 2001, vol. 149, no. 11, 15 September 2001 (2001-09-15), pages 317-320, XP008040870 ISSN: 0042-4900 the whole document</p> <p>-----</p>	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/029570**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 5-7, 9-13, 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 5-7, 9-13, 29 relate at least partially to a diagnostic method practised on the animal body. The search has been carried out in as far as ex vivo methods are concerned.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US2004/029570

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6458528	B1	01-10-2002	
		AT 246359 T	15-08-2003
		AU 754309 B2	14-11-2002
		AU 2806799 A	25-11-1999
		CA 2271449 A1	15-11-1999
		DE 69909897 D1	04-09-2003
		DE 69909897 T2	27-05-2004
		EP 0962774 A1	08-12-1999
		ES 2200472 T3	01-03-2004
		JP 3374101 B2	04-02-2003
		JP 2000002707 A	07-01-2000

フロントページの続き

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

(72)発明者 グロート, ランドール, ジー

アメリカ合衆国 04032 メイン州 フリーポート, ホルブルック ストリート 19, ナンバー 11

(72)発明者 トネリ, クウェンティン, ジェイ

アメリカ合衆国 04103 メイン州 ポートランド, ウェリントン ロード 37

Fターム(参考) 4H045 AA11 BA10 CA01 DA86 EA29 EA31 EA52 FA74

专利名称(译)	检测猫免疫缺陷病毒的方法和装置		
公开(公告)号	JP2007505320A	公开(公告)日	2007-03-08
申请号	JP2006526311	申请日	2004-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	艾德克斯实验室公司		
申请(专利权)人(译)	IDEXX Laboratories , Inc.的		
[标]发明人	グロートランドールジー トネリクウエンティンジェイ		
发明人	グロート,ランドール,ジー トネリ,クウエンティン,ジェイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K14/155 A61K38/00 A61K38/04 A61K39/21 C07K1/00 C07K5/00 C07K7/00 C07K14/00 C07K16/00 C07K17/00 C12Q1/70 G01N33/544 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K14/005 C12N2740/15022 G01N33/56988 G01N2333/155 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.521 C07K14/155.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 北野 健		
优先权	60/501982 2003-09-11 US 60/584106 2004-06-30 US		
其他公开文献	JP2007505320A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于确定动物中猫免疫缺陷病毒的感染或疫苗接种的方法和装置。该方法包括使猫科动物生物样品与各种FIV多肽接触，并测定样品中抗体和多肽的结合。通过测量对动物的FIV env多肽的免疫应答，可以确定动物是否被FIV感染或已经用FIV疫苗接种。提供了一种用于检测FIV抗体的装置。

	<u>gagタンパク質</u>	<u>envタンパク質</u>
ワクチン未接種または未感染	-	-
ワクチン接種	+	-
最近ワクチン接種した可能性	+	+
感染	+	+
感染およびワクチン接種	+	+