

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02015/068715

発行日 平成29年3月9日 (2017.3.9)

(43) 国際公開日 平成27年5月14日 (2015.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 H	4 H O 4 5
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 S O 1 J	
CO 7 K 14/15 (2006.01)	CO 7 K 14/15 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

出願番号	特願2015-546653 (P2015-546653)	(71) 出願人	306008724 富士レビオ株式会社 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/079301	(74) 代理人	110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成26年11月5日 (2014.11.5)	(72) 発明者	宮川 英二 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2013-229924 (P2013-229924)	(72) 発明者	高橋 一也 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内
(32) 優先日	平成25年11月6日 (2013.11.6)	(72) 発明者	谷本 徹二 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HTLV抗体の免疫測定における非特異反応の低減方法

(57) 【要約】

HTLV抗体陽性の場合の測定値の低下を極力抑えつつ、p19に由来する非特異反応を低減させることができる手段が開示されている。本発明に係る抗HTLV抗体の免疫測定における非特異反応の低減方法は、抗原抗体反応系内に改変p19ペプチドを存在させることを含む。改変p19ペプチドとは、HTLV p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドであり、典型的には人工のポリペプチドである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗HTLV抗体の免疫測定における非特異反応の低減方法であって、抗原抗体反応系内に改変p19ペプチドを存在させることを含み、前記改変p19ペプチドは、HTLV p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドである、方法。

【請求項 2】

前記改変p19ペプチドは、p19の第114番アミノ酸及び第117番アミノ酸該当するアミノ酸残基の少なくともいずれか一方における置換変異を含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

前記改変p19ペプチドは、配列番号2～15のいずれかに示されたアミノ酸配列で構成されるポリペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記改変p19ペプチドは、配列番号17～25のいずれかに示されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項2記載の方法。

【請求項 5】

前記改変p19ペプチドが固相支持体上に固定化されている、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

改変p19ペプチドを含む、抗HTLV抗体の免疫測定試薬であって、前記改変p19ペプチドは、HTLV p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドである、免疫測定試薬。

20

【請求項 7】

改変p19ペプチドを含む、抗HTLV抗体の免疫測定用の非特異反応低減剤であって、前記改変p19ペプチドは、HTLV p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドである、非特異反応低減剤。

30

【請求項 8】

請求項6記載の免疫測定試薬又は請求項7記載の非特異反応低減剤を含む、抗HTLV抗体の免疫測定キット。

【請求項 9】

HTLV p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有する、人工のポリペプチド。

【請求項 10】

p19における第114番アミノ酸及び第117番アミノ酸に該当するアミノ酸残基の少なくともいずれか一方の置換を含む、請求項9記載の人工のポリペプチド。

40

【請求項 11】

配列番号2～15のいずれかに示されたアミノ酸配列で構成される、請求項9記載の人工のポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号17～25のいずれかに示されたアミノ酸配列からなる、請求項10記載の人工のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中の抗HTLV抗体の免疫測定における非特異反応を低減させる方法、該非特異反応の低減剤、並びに該低減剤を利用した免疫測定試薬及び免疫測定キットに関する

50

。

【背景技術】

【0002】

HTLV（ヒトT細胞白血病ウイルス、又はヒトTリンパ球向性ウイルス）は、Tリンパ球に感染するレトロウイルスであり、現在までにタイプ1～タイプ4が報告されている。このうちタイプ1（HTLV-1）は成人T細胞白血病の原因ウイルスとして知られており、HTLV-1抗体陽性者のおよそ0.3%が該疾患を発症するといわれている。発症頻度は高くはないものの、HTLV-1の抗体検査は臨床上重要である。

【0003】

HTLVのgagタンパク質の一つであるp19は、該ウイルスの構成成分の中で免疫原性が高く、HTLV抗体検査の有用な抗原成分とされてきた。特にp19のC末端領域（aa120-130）の反応性が最も高く（非特許文献1）、p19のC末端断片を抗HTLV-1抗体検出の抗原として用いる手法が知られている（特許文献1）。

【0004】

しかしながら、p19は、HTLV抗体検査において偽陽性の原因となる非特異反応にも関与している可能性が以前より指摘され、また他のウイルスとの交差反応性が指摘されており（非特許文献2）、抗体検出用抗原としての使用は制限せざるを得ない状況である。現在市販されているHTLV-1抗体検査キットでは、ネイティブ抗原（すなわち、HTLV-1感染細胞からウイルスタンパク質を抽出したもの）が用いられている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第3506252号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Palker et al., J Immunol. vol.136, p.2393-2397, 1986

【非特許文献2】Sato et al., J Gen Virol. vol.73, p.2969-2973, 1992

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、HTLV抗体陽性の場合の測定値の低下を極力抑えつつ、p19に由来する非特異反応を低減させることができる手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、p19由来の非特異反応がp19の一次アミノ酸配列に起因していること、その責任配列がp19の第112番～第118番アミノ酸の領域であることを見出し、当該領域に置換変異を導入したp19断片をHTLV抗体測定系内に添加することにより、陽性検体との反応性低下を極力抑えつつ非特異反応を大きく低減させることができることを見出し、本願発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、抗HTLV抗体の免疫測定における非特異反応の低減方法であって、抗原抗体反応系内に改変p19ペプチドを存在させることを含み、前記改変p19ペプチドは、HTLV p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドである、方法を提供する。また、本発明は、改変p19ペプチドを含む、抗HTLV抗体の免疫測定試薬であって、前記改変p19ペプチドは、HTLV p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドである、免疫測定試薬を提供する。さらに、本発明は、改変p19ペプチドを含む、抗HTLV抗体の免疫測定用の非特異反応低減剤であって、前記改変p19ペプチドは、HTLV p19のうちの第103番～第130番ア

ミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドである、非特異反応低減剤を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の免疫測定試薬又は非特異反応低減剤を含む、抗HTLV抗体の免疫測定キットを提供する。さらに、本発明は、HTLV p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する領域内に少なくとも1つの置換変異を有する、人工のポリペプチドを提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、免疫測定によるHTLV抗体検査において問題となる非特異反応を望ましく低減させることができる手段が提供された。特定の領域にアミノ酸置換を有する改変p19ペプチドを抗原抗体反応系内に存在させることにより、陽性の場合の測定値の低下を抑えつつ、非特異反応を低減させることができる。非特異反応は偽陽性の原因となるので、非特異反応を低減させることで偽陽性の発生を低減させることができる。これにより、HTLV抗体検査キットの信頼性を高めることができる。また、本発明によれば、免疫原性の高いp19を抗原として利用できるようになるので、HTLV抗体検査キットの感度の向上も可能である。

10

【発明を実施するための形態】

【0011】

p19は、HTLVのgag遺伝子から発現されるgag前駆体タンパク質が、prt遺伝子にコードされるタンパク質分解酵素によって切断されて生じる3種類のタンパク質の1つである。配列番号26及び27は、HTLV-1 gag遺伝子の塩基配列及びこれにコードされるgag前駆体タンパク質のアミノ酸配列の一例であり、GenBankにD14335のアクセッション番号で登録されている配列である。配列番号27の第1番～第130番アミノ酸の領域がp19となる。

20

【0012】

本発明において、HTLVは、典型的にはHTLV-1である。

【0013】

本発明における「改変p19ペプチド」とは、HTLV-1 p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域（配列番号1）を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する7残基の領域内（配列番号1においては第10番～第16番アミノ酸）に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドである。改変p19ペプチドは、典型的には、人工のポリペプチドである。改変p19ペプチドでは、野生型配列（ないしは天然型配列）におけるアミノ酸残基とは異なるアミノ酸に置換されていればよく、もとの残基と性質（例えば、側鎖が親水性か否か、中性アミノ酸、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸のいずれであるか、芳香族側鎖を有するか否か等）が大きく異なる残基を置換後の残基として選択する必要はない。

30

【0014】

なお、本発明において、「ポリペプチド」と「ペプチド」は同義であり、いずれも2以上のアミノ酸残基がペプチド結合により結合した分子を指す。

【0015】

また、「人工のポリペプチド」ないしは「人工のペプチド」とは、化学合成、遺伝子工学的的手法その他の方法で人為的に製造されたポリペプチドであり、HTLVに感染した細胞内でHTLVゲノムから発現し産生されたタンパク質を回収したものは含まれない。

40

【0016】

改変p19ペプチドには、天然のp19の配列中にはない1以上（例えば1～数個程度）のアミノ酸残基がペプチドの一方又は両方の末端に付加されていてもよい。そのような残基の付加は、通常、ペプチド製造過程での便宜や固相支持体上への固定化の便宜等のために行なわれ得る。「p19断片で構成される」との語には、そのようなアミノ酸残基の付加を含むペプチドが包含される。「アミノ酸配列で構成される」との語も同様であり、当該アミノ酸配列に上記のようなアミノ酸残基の付加を含むペプチドが包含される。

50

【 0 0 1 7 】

改変p19ペプチドが有する上記した7残基の領域内の置換変異は、7残基のうちのいずれの残基の置換であってもよい。1残基のみの置換であってもよいし、2以上の残基の置換であってもよい。当該7残基の領域内のいずれの残基を置換しても、ネイティブ抗原を用いた免疫測定において生じる非特異反応を50%程度以上低減できる(下記実施例参照)。配列番号2~8に示されたアミノ酸配列で構成される改変p19ペプチドは、当該7残基の領域内の1残基をアラニンに置換した改変p19ペプチドであり、本発明で使用可能な改変p19ペプチドの一例である。

【 0 0 1 8 】

改変p19ペプチドは、好ましくは、p19における第114番アミノ酸及び第117番アミノ酸(配列番号1においてはそれぞれ第12番アミノ酸及び第15番アミノ酸)の少なくともいずれか一方の残基の置換を含む。そのような改変p19ペプチドの具体例としては、配列番号9~15に示されたアミノ酸配列で構成される改変p19ペプチド(例えば、配列番号17~25に示された、改変されたp19部分配列のN末端にLysが付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド)を挙げることができるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 9 】

本発明の方法では、検体中の抗HTLV抗体と抗原との間の抗原抗体反応の系内に改変p19ペプチドを存在させる。HTLV抗原として、改変p19ペプチドのみを用いてもよいし、改変p19ペプチドと少なくとも1種の他のHTLV抗原の両者を用いてもよい。「他のHTLV抗原」は、ネイティブ抗原でもよいし、HTLVタンパク質のアミノ酸配列に基づいて設計された人工のペプチド抗原でもよい。ここでいう「人工のペプチド抗原」の例としては、天然型配列のp19タンパク質又はその部分ペプチド、p19以外の(例えばgp21、gp46、p24、p15)天然型配列若しくは改変型配列のHTLVタンパク質又はその部分ペプチド等を挙げることができる。ネイティブ抗原を用いる場合、天然のp19を含むネイティブ抗原を改変p19ペプチドと混合して使用してもよいし、ネイティブ抗原からp19画分を除去したものを改変p19ペプチドと混合して使用してもよい。

【 0 0 2 0 】

検体は、一般的なHTLV抗体検査で用いられる検体と同じであってよく、通常、全血、血漿、血清等の血液検体である。検体は適宜希釈して用いられる。

【 0 0 2 1 】

抗体の免疫測定においては、B/F分離の便宜のため、通常、固相支持体上に固定化した抗原が用いられる。改変p19ペプチドは、そのような固相支持体上に固定化された状態で用いることができる。改変p19ペプチド及び少なくとも1種の他のHTLV抗原の両者を使用する場合、改変p19ペプチドは、当該少なくとも1種の他のHTLV抗原と組み合わせて固定化された状態で用いることができる。固相支持体が磁性粒子やラテックス粒子等の粒子の場合、「組み合わせて固定化」との語には、改変p19ペプチドと他のHTLV抗原を同時に粒子に固定化すること、及び、改変p19ペプチドと他のHTLV抗原を別々に粒子に固定化し、その後各固定化粒子を混合すること、の両者が包含される。

【 0 0 2 2 】

固相支持体は、免疫測定用に従来用いられているものであってよく、特に限定されない。例えば、プラスチックプレート、微粒子、繊維状物質等を用いることができる。これら支持体の材質としては、従来公知のものを用いることができ、特に限定されないが、微粒子であれば、例えば、ガラスビーズ、ポリスチレン等の各種プラスチックビーズ、ラテックス粒子、ゼラチン粒子及び各種フェライト粒子(例えば、特開平3-115862号公報参照)等を挙げることができる。また、繊維状物質としては、例えば、セルロース、ニトロセルロース、キトサン、ポリエチレングリコール重合体、シラン重合体等を構成成分とするものを挙げることができる。

【 0 0 2 3 】

これら支持体への改変p19ペプチドの固定化、及び使用する場合には少なくとも1種の他のHTLV抗原の固定化は、物理吸着、架橋剤を用いた化学結合等公知の方法を適宜用いる

10

20

30

40

50

ことができる。

【 0 0 2 4 】

あるいは、改変p19ペプチドは、後述する通り標識物質で標識された形態で用いられ得る。この場合も、改変p19ペプチドと少なくとも1種の他のHTLV抗原を混合して標識抗原として使用してよい。

【 0 0 2 5 】

抗体の測定方法自体は周知の常法である。免疫測定を反応様式で分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法、イムノクロマト法、ウェスタンブロット法等があり、標識で分類すると、放射免疫測定、蛍光免疫測定、酵素免疫測定(EIA)、ビオチン免疫測定等がある。また、抗原を用いた抗体検査法の具体例としては、これらに限定されないが、EIA法(ELISA、CLEIA(化学発光酵素免疫測定法)、ウェスタンブロット等)、化学発光免疫測定法(CLIA法)、凝集法(ラテックス凝集法等)、補体結合反応(CF)等が挙げられる。本発明が対象とする抗HTLV抗体の免疫測定は、検体中の抗HTLV抗体を特異的に測定することができる方法であれば、いかなる手法を用いてもよい。なお、本発明において、「測定」という語には、検出、定量及び半定量が包含される。

10

【 0 0 2 6 】

例えば、ELISAやCLEIAの場合には、改変p19ペプチドを所望により少なくとも1種の他のHTLV抗原と組み合わせてプレート又は粒子等の固相支持体に固定化(感作)し、これを検体と反応させて検体中の抗HTLV抗体を支持体上に捕捉し、洗浄後、標識された抗免疫グロブリン抗体又は標識されたHTLV抗原と反応させる。さらに洗浄後、標識物質からのシグナルを測定する。標識物質が酵素である場合、酵素の基質物質を添加し、酵素反応量(発光、発色などの量)を測定すればよい。標識物質としてビオチン又はハプテンが用いられる場合には、酵素、蛍光物質、化学発光物質、染色物質又は放射性物質などを結合したストレプトアビジン又はハプテン抗体などを用いればよい。シグナル測定値に基づいて、支持体上に捕捉された抗HTLV抗体を測定することができる。

20

【 0 0 2 7 】

ウェスタンブロットの場合には、例えば、改変p19ペプチド、又は改変p19ペプチドと少なくとも1種の他のHTLV抗原の混合物を電気泳動後、メンブレンに転写し、このメンブレンを検体と反応させた後、標識された抗免疫グロブリン抗体又は標識されたHTLV抗原と反応させればよい。

30

【 0 0 2 8 】

凝集法の場合には、例えば、改変p19ペプチドを所望により少なくとも1種の他のHTLV抗原と組み合わせてゼラチン粒子やラテックス粒子等に固定化し、これを検体と反応させ、粒子の凝集量を吸光度等により測定すればよい。

【 0 0 2 9 】

測定対象となる抗HTLV抗体のサブクラスは特に限定されないため、標識された抗免疫グロブリン抗体を用いる場合の抗免疫グロブリン抗体の種類は特に限定されず、例えば抗IgG抗体及び抗IgM抗体のいずれか一方又は両者を混合して用いることができる。また、標識して用いるHTLV抗原としては、改変p19ペプチド、及び上記に定義した通りの他のHTLV抗原を挙げることができ、これらのうちの複数を混合して標識HTLV抗原として用いてよい。標識HTLV抗原を用いて免疫測定を行なう場合、改変p19ペプチドは、支持体に固定化する固相抗原(ウェスタンブロットの場合はメンブレンに転写する抗原)及び標識HTLV抗原の少なくともいずれか一方に使用すればよい。

40

【 0 0 3 0 】

改変p19ペプチドは、常法の化学合成法により製造することができる。化学合成法の具体例としては、例えばFmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等を挙げることができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して常法により合成することもできる。

【 0 0 3 1 】

あるいは、改変p19ペプチドは、常法の遺伝子工学的手法により製造することができる

50

。p19のアミノ酸配列及びこれをコードする塩基配列は、上記した通りデータベースに登録され公知であり、本願配列表にも記載されている。また、各アミノ酸をコードするコドンは公知であるから、特定のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの塩基配列は容易に特定することができる。従って、野生型のp19の配列とは異なる配列を有する改変p19ペプチドであっても、それをコードするポリヌクレオチドの塩基配列は容易に特定できるので、遺伝子工学的手法による製造も可能である。

【0032】

遺伝子工学的手法による製造工程を簡単に記載すると、まず、所望の改変p19ペプチドをコードするポリヌクレオチドを市販の核酸合成機により調製するか、又は野生型HTLVゲノムからPCR増幅したDNAに公知の手法で適宜変異を導入することにより調製する。該ポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに組み込み、適当な発現系を用いて発現させる。発現させたポリペプチドを回収・精製することにより、目的とする改変p19ペプチドを組換えポリペプチドとして得ることができる。

10

【0033】

改変p19ペプチドは、それ自体を抗HTLV抗体の測定のための抗原として使用することができるので、免疫測定試薬として提供することができる。該免疫測定試薬は、改変p19ペプチドのみを適当な緩衝液中に含んでいてもよいし、少なくとも1種の他のHTLV抗原をさらに含んでいてもよい。また、改変p19ペプチド等の安定化等に有用な他の成分をさらに含んでいてもよい。少なくとも1種の他のHTLV抗原をさらに含む場合、改変p19ペプチドと他のHTLV抗原は、別個の容器に封入されていてもよいし、予め混合されて同一の容器内に封入されていてもよい。あるいはまた、改変p19ペプチドが固相支持体上に固定化された形態であってもよい。

20

【0034】

また、改変p19ペプチドは、抗HTLV抗体の免疫測定用の非特異反応低減剤として提供することができる。該非特異反応低減剤は、改変p19ペプチドを含み、さらに、例えば該ペプチドの安定化等に有用な他の成分を含んでよい。該非特異反応低減剤は、抗HTLV抗体の免疫測定における抗原抗体反応系内に添加して用いることができる。例えば、HTLV抗原に非特異反応低減剤を添加して検体との反応を行なうことができる。あるいは、HTLV抗原と組み合わせる固相支持体上に固定化して用いることができる。あるいはまた、非特異反応低減剤は、標識された形態で標識抗原として用いることもできる。抗HTLV抗体の免疫測定における抗原抗体反応系内に非特異反応低減剤を共存させることにより、非特異反応を低減し、偽陽性の発生を抑えることができる。

30

【0035】

また、上記の免疫測定試薬、又は上記の非特異反応低減剤は、他の試薬類等と適宜に組み合わせ、検体中の抗HTLV抗体の免疫測定キットとして提供することができる。免疫測定に必要な他の試薬類は周知である。例えば、本発明のキットには、上記した免疫測定試薬又は非特異反応低減剤のほか、検体希釈液、洗浄液、及び、標識抗体に使用されている標識物質が酵素の場合には該酵素の基質液等がさらに含まれ得る。

【0036】

本発明の人工のポリペプチドは、上記した改変p19ペプチドとして好ましく用いられるポリペプチドである。該人工のポリペプチドは、HTLV-1 p19のうちの第103番～第130番アミノ酸の領域（配列番号1）を含むp19断片で構成され、かつ、p19の第112番～第118番アミノ酸に該当する7残基の領域内（配列番号1においては第10番～第16番アミノ酸）に少なくとも1つの置換変異を有するポリペプチドである。該人工のポリペプチドの好ましい態様は、改変p19ペプチドについて上述した態様と同じである。

40

【実施例】

【0037】

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

【0038】

50

1. HTLV-1の抗体検査におけるp19中の非特異責任配列の検索

p19のC末端領域（aa103-130）は、HTLV-1抗体検査で抗原として利用可能であることが知られている。この領域内で非特異反応の吸収に重要な領域を特定するため、表1に示すp19断片を化学合成により調製し、非特異反応を生じることが確認されている非特異検体を用いて非特異反応の吸収試験を行なった。

【0039】

HTLVウイルスNative抗原感作粒子懸濁液に表1に示した各ペプチドを10 µg/mL又は100 µg/mL添加し、非特異検体2例および低値陽性検体1例に対する反応性を確認した。ネガティブコントロール（N.C.）としてHTLV-1陰性脱脂血清を、ポジティブコントロール（P.C.）としてHTLV-1陽性血清（ネガティブコントロール液にて希釈）を使用した。実際の測定は市販の全自動化学発光酵素免疫測定システム「ルミパルス」（登録商標）（富士レビオ社製）にて行なった。ペプチドを添加しない条件で各サンプルを同様に測定して基準の測定値（基準カウント値）を算出し、この基準カウント値に対する比率（％）で非特異反応の抑制効果を評価した。

10

【0040】

【表1】

ペプチド No.		p19 タンパク質 における位置
7	PSSPTHDPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL	aa103-130
13	PTHDPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL	aa106-130
14	DPPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL	aa109-130
15	DSDPQIPPPYVEPTAPQVL	aa112-130
16	PQIPPPYVEPTAPQVL	aa115-130
17	PPPYVEPTAPQVL	aa118-130
18	YVEPTAPQVL	aa121-130
19	PSSPTHDPDSDPQIPPPYVEPTAP	aa103-127
20	PSSPTHDPDSDPQIPPPYVEP	aa103-124
21	PSSPTHDPDSDPQIPPPY	aa103-121
22	PSSPTHDPDSDPQIP	aa103-118
23	PSSPTHDPDSDP	aa103-115
24	PSSPTHDPD	aa103-112

20

30

【0041】

その結果、No.13～15、No.19～22のペプチドを粒子に添加して測定を行なった場合に非特異反応が低下することが確認された（表2）。特に、No.20～22のペプチドでは、低値陽性検体No.53のカウント低下がほとんどなく、非特異検体No.0045のカウントは大きく低下するという良好な結果であった。この結果から、非特異反応を低下させるためにはaa112-118のアミノ酸領域（以下、この領域を「非特異責任配列」と呼ぶ）が必須であると考えられた。

40

【0042】

【表 2】

	ペプチド No.13		ペプチド No.14		ペプチド No.15		ペプチド No.16		ペプチド No.17		ペプチド No.18	
	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL
N.C.	58.6%	49.9%	53.5%	53.7%	92.3%	89.7%	92.8%	91.9%	99.0%	88.5%	94.7%	91.5%
P.C.	42.2%	40.2%	41.7%	41.0%	72.9%	62.6%	76.5%	69.8%	77.1%	73.4%	86.5%	85.9%
非特異 No.148	37.1%	36.2%	37.8%	36.7%	94.3%	79.7%	96.6%	89.7%	98.2%	89.8%	96.4%	97.8%
非特異 No.0045	0.4%	0.3%	0.4%	0.3%	65.0%	15.9%	87.3%	39.0%	91.4%	53.8%	99.1%	96.6%
低値陽性 No.53	57.5%	54.4%	56.2%	54.9%	56.2%	53.5%	58.8%	54.6%	63.4%	60.7%	82.0%	65.1%
	ペプチド No.19		ペプチド No.20		ペプチド No.21		ペプチド No.22		ペプチド No.23		ペプチド No.24	
	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL
N.C.	53.7%	60.3%	54.1%	53.4%	53.0%	55.0%	78.7%	57.9%	94.5%	87.2%	102.9%	96.4%
P.C.	55.6%	53.9%	61.1%	59.9%	68.2%	65.3%	81.6%	71.0%	99.9%	100.7%	102.0%	102.1%
非特異 No.148	40.6%	40.8%	40.1%	40.1%	40.4%	40.1%	48.1%	41.4%	99.2%	97.9%	99.3%	99.9%
非特異 No.0045	0.4%	0.4%	0.4%	0.3%	0.4%	0.3%	3.4%	0.7%	99.2%	99.7%	100.1%	98.1%
低値陽性 No.53	58.0%	55.1%	98.1%	94.2%	103.9%	101.9%	103.0%	102.9%	102.4%	103.8%	104.0%	100.0%

2. 非特異責任配列中に置換変異を有する改変p19ペプチドを用いた吸収試験

非特異責任配列中の残基を1つずつアラニンで置換した改変p19ペプチド(表3)を作製し、上記と同様に非特異吸収試験を実施した。

【0044】

【表3】

ペプチド No.		
7	PSSPTHDPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 1
34	PSSPTHDPD A SDPQIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 2
35	PSSPTHDPD A DPQIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 3
36	PSSPTHDPDSD A PQIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 4
37	PSSPTHDPDSD A QIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 5
38	PSSPTHDPDSDP A IPPPYVEPTAPQVL	配列番号 6
39	PSSPTHDPDSDPQ A PPPYVEPTAPQVL	配列番号 7
40	PSSPTHDPDSDPQIP A PPYVEPTAPQVL	配列番号 8

10

【0045】

結果を表4に示す。いずれも100 µg/mLの添加で非特異反応を50%以上低減できた。特に、No.36とNo.39のペプチドでは、他のペプチドと比べてポジティブコントロールの測定値の低下が少なかった。

20

【0046】

【表 4】

	ペプチド No.7		ペプチド No.34		ペプチド No.35		ペプチド No.36		ペプチド No.37	
	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL
N.C.	59.5%	59.9%	91.4%	79.9%	59.1%	56.8%	79.7%	69.9%	85.4%	64.4%
P.C.	50.5%	44.9%	54.9%	43.9%	42.5%	41.6%	71.2%	61.6%	66.9%	50.6%
非特異 No.148	40.6%	40.2%	53.9%	38.9%	38.3%	37.0%	74.6%	46.0%	51.7%	39.2%
非特異 No.0045	0.5%	0.4%	56.8%	13.0%	0.4%	0.4%	70.6%	22.7%	15.6%	2.5%
低値陽性 No.53	57.6%	54.2%	57.9%	53.8%	55.3%	53.2%	57.8%	54.2%	57.7%	54.5%

	ペプチド No.38		ペプチド No.39		ペプチド No.40	
	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL
N.C.	57.9%	57.7%	91.3%	75.7%	84.2%	67.5%
P.C.	44.3%	42.5%	73.5%	61.6%	62.6%	45.6%
非特異 No.148	37.5%	36.8%	93.6%	76.7%	38.6%	36.7%
非特異 No.0045	1.2%	0.4%	21.4%	3.6%	2.7%	0.6%
低値陽性 No.53	64.0%	61.3%	58.6%	54.4%	56.8%	53.4%

3. 改変p19ペプチドと非特異検体との反応性の検討

ポジティブコントロールの測定値の低下が少ないNo.36とNo.39のペプチドを選択し、下記表5の通りさらに変異ペプチドを調製した（N末端のKは、そのアミノ基を介してカルボキシル化粒子に固定するためにペプチドに付加した）。

【0048】

以下の手順により、表5の改変p19ペプチドそれぞれを磁性粒子に感作し、改変p19ペプチド感作粒子を調製した。

- (1) カルボキシル化磁性粒子（富士レビオ社製）15 mgをMilliQ水で3回洗浄した。
- (2) EDC（1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride）4 mgを添加し、25℃で30分間ゆるやかに攪拌しながらインキュベートした。
- (3) 改変p19ペプチド7.5 mgを添加し、25℃で60分間ゆるやかに攪拌しながらインキュベートした。
- (4) 2% BSA/Tris（pH 7.2）で3回洗浄し、これを改変p19ペプチド感作粒子とした。

【0049】

改変p19ペプチド感作粒子を用いて非特異検体8例に対する反応性を確認した。測定操作は、市販の全自動化学発光酵素免疫測定システム「ルミパルス」（登録商標）（富士レビオ社製）にて行なった。

【0050】

【表 5】

K + Peptide 7 (p19 aa103-130)	KPSSPTHDPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 16
K + Peptide 36 (p19 aa103-130, D114A)	KPSSPTHDPDSDAPQIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 17
K + Peptide 39 (p19 aa103-130, I117A)	KPSSPTHDPDSDPQAIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 18
K + Peptide 41 (p19 aa103-130, D114A & I117A)	KPSSPTHDPDSDAPQAIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 19
K + Peptide 42 (p19 aa103-130, D114N)	KPSSPTHDPDSDNPQIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 20
K + Peptide 43 (p19 aa103-130, I117L)	KPSSPTHDPDSDPQLIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 21
K + Peptide 44 (p19 aa103-130, D114N & I117L)	KPSSPTHDPDSDNPQLIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 22
K + Peptide 45 (p19 aa103-130, D114E)	KPSSPTHDPDSEPPQIPPPYVEPTAPQVL	配列番号 23
K + Peptide 46 (p19 aa103-130, D114N & I117E)	KPSSPTHDPDSDNPQEPPPYVEPTAPQVL	配列番号 24
K + Peptide 47 (p19 aa103-130, D114E & I117E)	KPSSPTHDPDSEPPQEPPPYVEPTAPQVL	配列番号 25

Peptide 41～47 の配列はそれぞれ配列番号 9～15 の通り

10

20

30

40

【0051】

結果を表 6 に示す。いずれの変異ペプチドも、ポジティブコントロールの測定値を大幅に低下させることなく、かつ、使用した非特異検体全般に対して非特異反応を 50 % 程度以下に抑制する効果があることが確認された。

【0052】

【表 6】

p19 ペプチド No. 7 に対するカウント比 (%)

	No. 7	No. 36	No. 39	No. 41	No. 42	No. 43	No. 44	No. 45	No. 46	No. 47
ネガティブコントロール	100	81.9	82.6	85.8	83.9	87.7	84.5	78.7	80.6	85.8
ポジティブコントロール	100	64.7	46.9	63	61	53.7	56.2	38.9	67.4	59.1
非特異検体1	100	3.9	3.7	3.7	4	6.7	3.7	4.1	3	3.3
非特異検体2	100	26.4	26.2	27.2	32.5	33.8	25	25.7	26.7	26
非特異検体3	100	46.5	47.9	47.1	41	49.3	45.2	45.4	41	39.6
非特異検体4	100	4.2	3.9	3.8	4.5	5.8	4	3.9	3.6	3.5
非特異検体5	100	15.8	13.7	18.1	13.6	13.5	13.9	13.8	15.6	15.4
非特異検体6	100	51.6	51.9	49	44.5	52.2	51.3	51.6	42.7	46.6
非特異検体7	100	36.6	38.1	38.1	33.8	146.1	38.7	37.9	35.1	37.4
非特異検体8	100	0.6	0.5	0.5	0.8	0.8	0.5	0.5	0.4	0.4

【配列表】

10

20

30

40

50

2015068715000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年4月12日(2016.4.12)

【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】請求項 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2】

前記改変p19ペプチドは、p19の第114番アミノ酸及び第117番アミノ酸に該当するアミノ酸残基の少なくともいずれか一方における置換変異を含む、請求項 1 記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 7】

ウエスタンブロットの場合には、例えば、改変p19ペプチド、又は改変p19ペプチドと少なくとも 1 種の他のHTLV抗原の混合物を電気泳動後、メンブレンに転写し、このメンブレンを検体と反応させた後、標識された抗免疫グロブリン抗体又は標識されたHTLV抗原と反応させればよい。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/079301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01)i, C07K14/15(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

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)

G01N33/543, C07K14/15, G01N33/53

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Le Blanc I et al, The PPPY motif of human T-cell leukemia virus type 1 Gag protein is required early in the budding process, J Virol, 2002.10, 76(19), 10024-10029	9-10 1-8, 11-12
A	JP 2008-249603 A (Sysmex Corp.), 16 October 2008 (16.10.2008), entire text; all drawings (Family: none)	1-12
A	JP 2000-78973 A (Tonen Corp.), 21 March 2000 (21.03.2000), paragraph [0005] (Family: none)	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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
21 January 2015 (21.01.15)Date of mailing of the international search report
03 February 2015 (03.02.15)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/JP2014/079301

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 5-508838 A (Biochem Pharma, Inc.), 09 December 1993 (09.12.1993), entire text; all drawings & US 5359029 A & EP 539405 A & WO 1992/001713 A1 & DE 69110891 C & AU 8211991 A & CA 2087436 A	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 9 3 0 1	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, C07K14/15(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
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. G01N33/543, C07K14/15, G01N33/53			
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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) PubMed			
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	Le Blanc I et al, The PPPY motif of human T-cell leukemia virus	9-10	
A	type 1 Gag protein is required early in the budding process, J Virol, 2002.10, 76(19), 10024-10029	1-8, 11-12	
A	JP 2008-249603 A (シスメックス株式会社) 2008.10.16, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-12	
A	JP 2000-78973 A (東燃株式会社) 2000.03.21, 段落【0005】 (ファミリーなし)	1-12	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ 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 21.01.2015		国際調査報告の発送日 03.02.2015	
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) 赤坂 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 9 3 0 1
C (続き) . 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
A	JP 5-508838 A (バイオケム ファーマ インコーポレイテッド) 1993.12.09, 全文、全図 & US 5359029 A & EP 539405 A & WO 1992/001713 A1 & DE 69110891 C & AU 8211991 A & CA 2087436 A	1-12

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

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA18 CA04 DA86 EA53 FA33

(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)	减少抗HTLV抗体免疫测定中的非特异性反应的方法		
公开(公告)号	JPWO2015068715A1	公开(公告)日	2017-03-09
申请号	JP2015546653	申请日	2014-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
当前申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	宮川英二 高橋一也 谷本徹二		
发明人	宮川 英二 高橋 一也 谷本 徹二		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543 C07K14/15		
CPC分类号	G01N33/56988 C07K14/005 C12N2740/14022 G01N33/5306		
FI分类号	G01N33/569.H G01N33/531.A G01N33/543.501J C07K14/15.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA18 4H045/CA04 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA33		
优先权	2013229924 2013-11-06 JP		
其他公开文献	JP6519478B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种能够减少源自p19的非特异性反应同时在尽可能多地抑制HTLV抗体阳性的情况下测量值降低的方法。根据本发明的用于减少抗HTLV抗体的免疫测定中的非特异性反应的方法包括使修饰的p19肽存在于抗原-抗体反应系统中。修饰的p19肽是由p19片段组成的肽，所述p19片段在HTLV p19中含有103至130个氨基酸的区域，并且在对应于p19的氨基酸112至118的区域内的至少一个氨基酸残基具有取代突变的多肽，通常是人工多肽。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号 WO2015/068715	
発行日 平成29年3月9日 (2017.3.9)		(43) 国際公開日 平成27年5月14日 (2015.5.14)			
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考) 4 H 0 4 5	
G O 1 N 33/569 (2006.01)		G O 1 N 33/569 H			
G O 1 N 33/531 (2006.01)		G O 1 N 33/531 A			
G O 1 N 33/543 (2006.01)		G O 1 N 33/543 5 0 1 J			
C O 7 K 14/15 (2006.01)		C O 7 K 14/15 Z N A			
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)			
出願番号 特願2015-546653 (P2015-546653)		(71) 出願人 306008724			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/079301		富士レビオ株式会社			
(22) 国際出願日 平成26年11月5日 (2014.11.5)		東京都新宿区西新宿二丁目1番1号			
(31) 優先権主張番号 特願2013-229824 (P2013-229824)		(74) 代理人 110001656			
(32) 優先日 平成25年11月6日 (2013.11.6)		特許業務法人 谷川国際特許事務所			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		(72) 発明者 宮川 英二			
		東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内			
		(72) 発明者 高橋 一也			
		東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内			
		(72) 発明者 谷本 徹二			
		東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内			
		最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗HTLV抗体の免疫測定における非特異反応の低減方法