

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-278902

(P2007-278902A)

(43) 公開日 平成19年10月25日(2007.10.25)

(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 L	4 H O 4 5
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	
CO 7 K 16/08 (2006.01)	CO 7 K 16/08	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2006-106761 (P2006-106761)	(71) 出願人	000109015 アボットジャパン株式会社 東京都港区六本木1丁目9番9号
(22) 出願日	平成18年4月7日(2006.4.7)	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
		(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
		(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パルボウイルスB19抗原測定方法

(57) 【要約】

【課題】本願発明は、RHA検査およびPCR法に伴う問題点を有さないヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定方法であって、強酸性溶液(pH4.0以下)による処理工程およびアルカリ性溶液による中和工程を含まない、簡便且つ高感度な測定方法を提供するものである。

【解決手段】本発明は上記課題を解決するために、検体をグアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を含む溶液で処理することを特徴とするヒトパルボウイルスB19抗原の免疫学的測定方法を提供する。また、本測定方法に使用するキットとして、グアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を含む検体希釈液を含む、ヒトパルボウイルスB19抗原の免疫学的測定用キットを提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体をグアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を含む溶液で処理することを特徴とするヒトパルボウイルス B 19 抗原の免疫学的測定方法。

【請求項 2】

検体を処理するグアニジン、グアニジン塩またはその誘導体の測定時における最終濃度が 0.1 ~ 1 M である請求項 1 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 3】

検体を処理するグアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を含む溶液の pH が 4.5 ~ 6.5 である請求項 1 又は 2 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 4】

pH 4.5 ~ 6.5 のグアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を含む溶液で検体処理後、アルカリ溶液で中和を要しない請求項 3 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 5】

固相化抗体と標識抗体によるサンドイッチ法による請求項 1 乃至 4 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 6】

グアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を含む検体希釈液を含む、ヒトパルボウイルス B 19 抗原の免疫学的測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中のパルボウイルス B 19 抗原を高感度に検出若しくは測定する方法及び検出若しくは測定する試薬若しくはキットに関する。

【背景技術】

【0002】

パルボウイルスは飛沫感染し、赤芽球で増殖する病原性ウイルスであり、その症状・疾患として、(1) 伝染性紅斑(りんご病)(2) 関節炎(3) 造血障害発作(4) 胎児水腫(hydrops fetal)などが知られている。

【0003】

パルボウイルス B 19 (parvovirus B19) は、1975年にCossartらによって発見されたウイルスである(非特許文献 1 参照)。当該ウイルスはパルボウイルス科のパルボウイルス属に位置する一本鎖DNAウイルスで20nmの正20面体構造でエンベロープを持たない小型のウイルスである。

【0004】

B 19 ウイルスは、加熱(60 30 分)、酸(pH3)、クロロホルム、有機溶剤、界面活性剤処理に抵抗する。そのため血液製剤製造工程中での B 19 除去が困難であることから、赤十字血液センターでは原料血漿への B 19 ウイルス混入を減らすことを目的に、1997 年よりすべての献血血液について Receptor Mediated Hemagglutination (RHA) 検査法による B 19 スクリーニング検査を実施している(非特許文献 2 参照)。その他のパルボウイルス B 19 抗原の測定法としては、PCR 法によりウイルス遺伝子を増幅して測定する方法がある(非特許文献 3 参照)。また微量の抗原を抗パルボウイルス B 19 抗体で測定する方法として、検体を pH 4.0 以下の酸性条件で処理した後、免疫反応にあたってアルカリで検体を中和してから行う方法(特許文献 1 参照)等が報告されている。

【特許文献 1】特開 2001 - 343388

【非特許文献 1】Cossart, Y.E., et al.: Parvovirus-like particles in human sera. Lancet, 1: 72- 73, 1975

【非特許文献 2】武田芳於他、献血血液の RHA 検査による第 VIII 因子製剤原料血漿からのパルボウイルス B 19 除去効果、Japanese Journal of Transfusion Medicine, 1: 27-31, 2002

10

20

30

40

50

【非特許文献3】齊藤由美子他、ヒトパルボウイルスB19感染の診断へのPCRの応用及びELISAによる抗体測定、臨床病理，2：203-208，1993

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

RHA検査はその原理上3～5日間のウイルス血症期には有効だが、それに続いてB19抗体の産生が始まると(抗原抗体複合期)B19のreceptorであるP抗原と抗体が競合し、RHA反応は著しく阻害され、当該期間に献血されたパルボウイルスB19陽性検体はRHA検査では検出できない。

【0006】

PCR法による検査は、ターゲットであるパルボウイルスB19遺伝子を増幅して測定する方法であり高感度な測定法ではあるが、測定するウイルスを抽出するための装置や増幅するための装置を必要とし、測定には多大な時間と高価な器機を必要とする。また、測定対象の検体へのコンタミネーションにより偽陽性が発生するおそれがある。

【0007】

B19抗原に対する抗体を用いた免疫測定法によっても、ヒトパルボウイルスを検出することが可能であるが、検体中に存在するB19に結合する因子、例えば抗体、Globoside(blood group antigen P)、Ku80、Integrin 5 1等の影響により十分な測定感度を得ることが困難である。

【0008】

上記特許文献1は、パルボウイルスB19抗原を高感度に測定する免疫測定方法を開示しているが、当該測定方法では検体を塩酸等の酸で処理した後、アルカリ性溶液で所望のpHに中和する必要がある。このような工程は、全自動血液スクリーニングシステムに本方法を適用する上で大きな障害となる。

【0009】

本願発明は、上記のようなRHA検査およびPCR法に伴う問題点を有さないヒトパルボウイルスB19抗原の免疫測定方法であって、酸性溶液による処理工程およびアルカリ性溶液による中和工程を含まない、簡便且つ高感度な測定方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、B19抗原の免疫学的測定に際して予め検体をグアニジンで処理することにより、高感度にパルボウイルスB19抗原を測定し得ることを見出した。

【0011】

本発明はかかる知見に基づいて、検体をグアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を含む溶液で処理することを特徴とするヒトパルボウイルスB19抗原の免疫学的測定方法を提供するものである。

【0012】

本発明において使用されるグアニジン塩としては、グアニジン塩酸塩、グアニジン炭酸塩、グアニジン硝酸塩、グアニジンリン酸塩、グアニジンスルファミン酸塩等があげられ、グアニジン誘導体としては、グアニジノ安息香酸、グアニジノグルタル酸、グアニジノコハク酸、グアニジノ酢酸、グアニジノプロピオン酸、グアニジノベンズイミダゾール等があげられる。

【0013】

検体処理のために添加するグアニジン、グアニジン塩またはその誘導体の濃度は最終濃度として0.1～1Mの範囲であることが好ましく、また、そのpHは4.5～6.5の範囲であることが好ましい。

【0014】

本発明において使用する免疫測定方法は、競合法、サンドイッチ法等の公知のいずれの方法であってもよいが、特にサンドイッチ法が好ましい。

【0015】

10

20

30

40

50

本測定方法において用いる抗ヒトパルボウイルスB19抗体は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれであってもよい。また、これら抗体はFab'、F(ab')₂等の抗体フラグメントであってもよい。

【0016】

抗ヒトパルボウイルスB19抗体の作製用抗原または測定標準として用いられるヒトパルボウイルスB19抗原は、公知の方法、例えば特開平7-147986号に記載されている方法にしたがって作製することができる。

【0017】

サンドイッチ法で用いる固相としては、周知のマイクロプレート、ポリスチレンビーズ、ガラスビーズ、ラテックス粒子、磁性粒子等が挙げられる。標識抗体への標識剤としては、蛍光物質、発光物質、酵素、放射性同位元素等が挙げられる。固相又は標識物への抗体を結合させる方法としては、周知の物理的吸着方法、化学的な反応による結合方法が挙げられる。

10

【発明の効果】

【0018】

本願発明は、B19抗原の免疫学的測定に際して予め検体をグアニジンで処理することにより、高感度にパルボウイルスB19抗原を測定し得るとの予期せぬ効果を奏するものである。

【0019】

特開平11-344493号公報は、測定可能な濃度域が一定濃度範囲に限定される凝集反応を利用した免疫的測定法において、グアニジン、グアニジン塩またはその誘導体を反応系に共存させることにより測定可能な範囲が拡大することを教示している。

20

【0020】

本発明においてグアニジン類を用いる目的はあくまで凝集法特有の問題を解決するものであり、凝集法に限らず免疫測定法一般においてヒトパルボウイルスの測定感度を改善する本願発明の効果は特開平11-344493により予見し得るものではない。

【0021】

特開平2001-33445号公報には、ウイルス抗原試薬の調製において、ウイルス抗原をタンパク質変性剤で処理した後に酸化剤で希釈または透析することにより当該ウイルス抗原の抗原活性を改善し得ることが記載されている。

30

【0022】

本願発明は、検体をグアニジン類で処理することにより、検体中に含まれる免疫反応に影響する因子を排除することによってパルボウイルス抗原の免疫測定方法の検出感度を改善するものであり、その目的、機作および構成が異なることから本願発明の効果は特開平2001-33445により予見し得るものではない。

【0023】

特開平11-108932号公報には、ウイルスを含む検体を陰イオン界面活性剤とグアニジンを含む蛋白変性剤との並存下で処理する方法が示されている。かかる方法は、検体中の蛋白質のみならずウイルスのエンベロープ膜蛋白質を強力に破壊し、膜内中の抗原蛋白質を曝露させ、中和処理後に免疫反応により当該抗原蛋白質を測定する方法に関するもので、その明細書中にはパルボウイルスの記載も認められるが、実施例に列挙されているのはC型肝炎ウイルスのみであり、本願発明のグアニジンのみによるエンベロープ膜を有さないパルボウイルス含有検体処理の有効性を何ら示唆するものではない。

40

【0024】

特開平8-50133号公報は、外殻を有するウイルス、B型肝炎ウイルスの殻内タンパク質HBcAgの免疫測定方法において、HBcAg抗体に結合し、免疫測定を阻害する内因性の抗HBcAg抗体を予めタンパク質変性剤で不活性化した後外殻を破壊し、露出したHBcAgを検出する方法を開示している。

【0025】

本願発明の測定対象であるパルボウイルスは外殻タンパク質を有さず、したがって特開

50

平 8 - 5 0 1 3 3 号に記載されたタンパク質変性剤による前処理をパルボウイルスの免疫測定において適用する合理的理由はない。

【 0 0 2 6 】

特開平 7 - 1 5 1 7 5 3 号公報は、同一アッセイ系における抗原抗体反応時間の相違に起因する測定誤差、即ち「アッセイドリフト」の影響を回避することを目的として反応系にグアニジンを追加することを開示している。

【 0 0 2 7 】

特開平 7 - 1 5 1 7 5 3 号公報に記載された発明の目的は、パルボウイルス抗原の簡便且つ高感度な測定方法を提供する本願発明の目的と全く異なるものであり、したがって本願発明の効果は特開平 7 - 1 5 1 7 5 3 号公報の記載に基づき予見し得るものではない。

10

【 実施例 】

【 0 0 2 8 】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【 0 0 2 9 】

ABBOTT PRISM システム

米国 Abbott Laboratories の PRISM アナライザーを用いて実施した実施例を示す。システムは、輸血用血液の安全性を向上させ、効率的な血液供給を行うために開発された全自動血液スクリーニングシステムである。独自の化学発光免疫測定法による優れた感度と特異性に加え、160検体 / 時という大量検体の処理を実現する。

20

【 0 0 3 0 】

本システムでは、1検体あたり2つのウエル（インキュベーションウエルとリアクションウエル）を有するリアクショントレイ（16検体用）にて、化学発光免疫測定を実施する。

【 0 0 3 1 】

本法の原理は、インキュベーションウエル上で、検体、検体希釈液、及び抗原あるいは抗体を固相化したマイクロパーティクル懸濁液をインキュベーションし、検体中の抗体あるいは抗原を特異的にマイクロパーティクル上の抗原あるいは抗体に反応させる（一次反応）。反応生成物は、リアクションウエルに移送され、リアクションウエル中のグラスファイバーマトリックスに吸着される。この反応生成物は、アクリジニウム標識コンジュゲートにより検出される（二次反応）。このコンジュゲートは、アクチベータ溶液の存在下で化学発光を引き起こし、それを光電子増倍管で検出するものである。

30

【 0 0 3 2 】

以下、[パルボウイルス測定プロトコール] PRISMアナライザー上でのステップを示す。

【 0 0 3 3 】

1) 一次反応 リアクショントレイのインキュベーションウエル上で、以下に示す容量の検体、検体希釈液、及び抗パルボウイルス抗体を固相化したマイクロパーティクル懸濁液を混合する。

【 0 0 3 4 】

検体（血清、または血漿） 50uLまたは、100uL
 検体希釈液（ Guanidine 溶液） 50uL
 抗パルボウイルス抗体固相化マイクロパーティクル懸濁液 50uL

40

【 0 0 3 5 】

2) インキュベーション 37℃、18分間インキュベーションし、検体中の抗体あるいは抗原を特異的にマイクロパーティクル上の抗原あるいは抗体に反応させる。

【 0 0 3 6 】

3) 移送 / 洗浄 移送 / 洗浄液（トランスファーウォッシュ液）300uLを2回で、反応生成物をインキュベーションウエルからリアクションウエルに移送し、リアクションウエル中のグラスファイバーマトリックスに吸着させると同時に洗浄する。

50

【0037】

4) 二次反応 アクリジニウム標識コンジュゲート(アクリジニウム化抗パルボウイルス抗体)溶液 50 μ Lをリアクションウエル中のグラスファイバーマトリックスに吸着し洗浄された反応生成物に滴下する。

【0038】

5) インキュベーション 37、22.7分間インキュベーションし、反応生成物とアクリジニウム標識コンジュゲートの反応を進行させ、検体中にパルボウイルス抗原が存在した場合、抗体固相化マイクロパーティクル-パルボウイルス抗原-コンジュゲート複合体を形成させる。

【0039】

6) 洗浄 コンジュゲート浄液(コンジュゲートウォッシュ液)200 μ Lを1回、次いで100 μ Lを3回で、未反応のコンジュゲートを洗い流し、複合体を浄化する。

【0040】

7) アクリジニウムの活性化 アクチベータ溶液 50 μ Lを滴下し、複合体上のアクリジニウムを活性化する。

【0041】

8) 検出 アクリジニウムの活性化により引き起こされた化学発光を光電子増倍管で検出する(化学発光度は、RLU(相対的発光単位)値として数値化される)。

【0042】

実施例1 以下に実施例1で用いる試薬の調製に関して記述する。

【0043】

1) パネル検体の調製: 陽性検体(パルボウイルス B 1 9 DNAレベル 10^{13} IU/mL)を陰性検体(パルボウイルス B 1 9 DNAレベル0 IU/mL)にて希釈し、 10^{11} 、 10^{10} 、 10^9 、 10^8 、 10^7 IU/mLの感度パネルを調製した。

【0044】

2) 検体希釈液(Guanidine 溶液)の調製: クエン酸/リン酸緩衝液にグアニジン濃度が2Mとなるようにグアニジン塩酸塩を溶解させ、pHを5.5に調整した。

【0045】

3) 抗パルボウイルス抗体固相化マイクロパーティクルの調製: 反応pH 6.1(50mM MES緩衝液)容量10mLで、Merck社製蛋白質固相化用マイクロパーティクル(顆粒0.4 μ m)固形分1.0%、EDAC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)0.3mg/mL、Sulfo-NHS(N-hydroxysulfosuccinimide)0.45mg/mLの存在下、抗体0.5mg/mLを固相化した。室温で2時間反応後10mMリン酸、150mM NaClで洗浄し、オーバーコート緩衝液(10mMリン酸、150mM NaCl、1% BSA、5% ショ糖、0.1% Proclin 300, pH 7.2)中に固形分1.0%で保管した。PRISMアッセイ時は、マイクロパーティクル希釈液(10mMリン酸、150mM NaCl、13.6% ショ糖、0.05% Tween20、0.1% NaN₃、pH 7.0)にて固形分0.2%に調製した。

【0046】

4) トランスファーウォッシュ液の調製: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.1% NaN₃, pH 8.0の溶液を調製した。

【0047】

5) アクリジニウム標識コンジュゲートの調製: 反応pH 8.0(100mM PBS緩衝液)容量0.2mLで、Acridinium ester、250 μ g/mLと抗体5mg/mLを室温で3時間反応させた。10mMリン酸、150mM NaClで透析後、TSKgel G300SWXL(トソー株式会社)のカラムクロマトグラフィー、移動相0.1% CHAPS/PBS, pH 6.3、流速1.0mL/分で主要ピークを分取して精製した。PRISMアッセイ時は、アクリジニウム標識コンジュゲート希釈液(10mMリン酸、150mM NaCl、1% BSA、0.05% Tween20、0.1% NaN₃、pH 7.0)にて蛋白質濃度100ng/mLに調製した。

【0048】

6) コンジュゲートウォッシュ液の調製: 60mM Borate, 150 mM NaCl, 0.01% Lithium

10

20

30

40

50

Dodecyl Sulfate, 0.1% NaN₃, pH 8.5の溶液を調製した。

【0049】

7) アクチベータ溶液の調製：A液(0.4% Hydrogen Peroxide/0.06% Diethylenetriaminepentaacetic acid)とB液(0.3N Sodium Hydroxide)を等量、用事混合して調製した。

【0050】

実施例1： パルボウイルス陰性、パルボウイルス B19 DNAレベル：10¹¹、10¹⁰、10⁹、10⁸、10⁷ IU/mLの感度パネルを上述のABBOTT PRISMシステム[パルボウイルス測定プロトコール]に従いPRISM上で測定した。グアニジン処理の有無で比較した結果を表1に示す。抗体は抗パルボウイルス B19 マウスモノクローナル抗体 Mab-8 および Mab-10 を用いた。

【0051】

抗体 Mab-8 / Mab-10 および Mab-10 / Mab-10 いずれの組合わせにおいてもグアニジン溶液で希釈することにより検出感度が大きく改善されることが確認された。

【0052】

【表1】

表1 感度パネル(パルボウイルス陰性、パルボウイルス B19 DNAレベル:10¹¹、10¹⁰、10⁹、10⁸、10⁷ IU/mL)

アッセイシステム		PRISM					
マイクロパーティクル	抗体 No(固形分%)	Mab-8 (0.20% solids)			Mab-10 (0.20% solids)		
コンジュゲート	抗体 No(濃度)	Mab-10 (100ng/ml)			Mab-10 (100ng/ml)		
トランスファーウォッシュ液	組成	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.1% NaN ₃ , pH 8.0					
コンジュゲートウォッシュ液	組成	60mM Borate, 150 mM NaCl, 0.01% Lithium Dodecyl Sulfate, 0.1% NaN ₃ , pH 8.5					
	検体(感度パネル)	平均 RLU	%CV	S/N	平均 RLU	%CV	S/N
検体希釈液 なし	陰性	146	4.84	1.00	319	23.94	1.00
	10 ⁷	NT			NT		
	10 ⁸	NT			NT		
	10 ⁹	148	9.11	1.01	340	4.16	1.07
	10 ¹⁰	141	2.52	0.96	331	7.26	1.04
	10 ¹¹	287	3.70	1.96	584	2.42	1.83
検体希釈液 あり 2M Guanidine HCl in Citrate/Phosphate buffer, pH 5.5	陰性	200		1.00	341		1.00
	10 ⁷	293	10.62	1.46	392	10.66	1.15
	10 ⁸	1038	11.04	5.18	797	0.00	2.34
	10 ⁹	7468	6.13	37.28	4693	13.11	13.77
	10 ¹⁰	40394	3.89	201.63	42174	9.32	123.74
	10 ¹¹	NT			NT		

S/N: (MEAN RLU of the Sample) / (MEAN RLU of SEN-0511-NEG)

NT: Not Tested

【0053】

実施例2： パルボウイルス B19 陽性検体(パルボウイルス B19 DNA陽性検体21種)を上述のABBOTT PRISMシステム[パルボウイルス測定プロトコール]に従いPRISM上で測定した。グアニジン処理の有無で比較した結果を表2に示す。測定に使用した各試薬は、実施例1で作製したものをものを用いた。各検体中の抗パルボウイルス B19 抗体(IgG及びIgM)の陽性・陰性の判定を併せて示す。尚、抗体測定方法は、デンカ生研株式会社製キットの添付文書に従った。

【0054】

抗パルボウイルス抗体陽性検体中では、パルボウイルス抗原(主にキャプシド構造蛋白質VP1、VP2)に抗体が結合していると予想されるが、本願発明の方法ではグアニジン処理によりこれら因子間相互作用が破壊され、検査用抗体(抗パルボウイルス抗体固相化マイクロパーティクル、及びアクリジニウム標識コンジュゲート)による抗原の直接的な認識が可能になった。

【0055】

【表 2】

表2 パルボウイルス B19 DNA 陽性血漿の PRISM による評価結果

検体番号	パルボウイルス B19 DNAレベル 10 ¹⁰ IU/mL	PRISM測定 RLU 値 マイクロパーティクル: Mab-8 コンジュゲート: Mab-10	PRISM測定 RLU 値 マイクロパーティクル: Mab-10 コンジュゲート: Mab-10	抗パルボウイルス B19 抗体検査結果(ELISA 法: デン カ生研株式会社製キット)	
				IgM	IgG
1	13.06	100,762	114,134	陰性	陰性
2	13.05	113,269	127,954	陰性	陰性
3	13.02	102,134	119,049	陰性	陰性
4	13.02	107,158	117,152	陰性	陰性
5	13.00	119,663	114,654	陰性	陰性
6	12.90	173,824	122,407	陰性	陰性
7	12.50	90,090	112,397	陰性	陰性
8	11.88	72,121	102,974	陽性	陽性
9	11.80	43,416	134,972	陰性	陰性
10	11.70	82,694	131,240	陰性	陰性
11	11.70	25,291	6,824	陽性	陰性
12	11.60	58,722	47,959	陽性	陰性
13	11.20	85,414	99,850	陰性	陰性
14	8.40	2,587	5,551	陽性	陰性
15	8.00	1,120	820	陽性	陰性
16	7.60	701	1,538	陽性	陽性
17	7.00	358	564	陽性	陽性
18	6.60	1,789	4,966	陽性	陽性
19	6.40	633	925	陽性	陽性
20	5.70	2,148	43,859	陽性	陽性
21	4.50	801	8,084	陽性	陽性
陰性コントロール検体	0.00	200	341	陰性	陰性

10

20

【0056】

実施例 3 : 検体希釈液 (Guanidine 溶液) の濃度並びに pH の最適化検討

実施例 1 の 2) に示す検体希釈液 (Guanidine 溶液) のグアニジン濃度とリン酸緩衝液又はクエン酸 / リン酸緩衝液による pH 調整を検討した。2) 以外の試薬は、実施例 1 で作製したもののものを用いた。検討に用いたのはパルボウイルス B19 陽性パネル (DNA レベル: 10¹⁰) 並びに陰性パネルを用いた。pH 5.5 ~ 6.5 の検討は、クエン酸緩衝液で実施、pH 4.5 ~ 6.0 はクエン酸 / リン酸緩衝液で実施した。

【0057】

pH 4.5 ~ 6.5 の範囲で所望の効果が得られ、好ましくは 5.5 ~ 6.5 の範囲で

30

【0058】

【表 3】

表3 検体希釈液(Guanidin 溶液)の濃度並びにpHの最適化検討

グアニジン濃度			パネル		
pH	Base buffer	Guanidine -HCl	RLU		S/N
			NEG	10 ¹⁰	
No SDB			119	116	1
pH 6.5	クエン酸緩衝液	1 M	128	1,492	12
		2 M	172	16,400	95
		3 M	357	10,507	29
pH 6.0		1 M	127	3,303	26
		2 M	168	18,438	110
		3 M	383	10,416	27
pH 5.5		1 M	112	3,058	27
		2 M	186	16,821	90
		3 M	428	9,540	22
pH 6.0	クエン酸/リン酸緩衝液	0.5 M	137	714	5
		1 M	142	2,904	20
		2 M	170	18,604	109
		3 M	365	10,622	29
pH 5.5		0.5 M	132	653	5
		1 M	137	2,055	15
		2 M	205	17,525	85
pH 5.0		3 M	425	10,644	25
		0.5 M	142	590	4
		1 M	137	1,525	11
pH 4.5		2 M	265	13,320	50
		3 M	582	10,538	18
	0.5 M	155	577	4	
pH 4.5	1 M	173	2,225	13	
	2 M	271	13,512	50	
	3 M	713	8,960	13	

10

20

30

40

フロントページの続き

(72)発明者 半沢 幹朗

千葉県松戸市松飛台 2 7 6 アボットジャパン株式会社松戸工場内

(72)発明者 吉田 栄作

千葉県松戸市松飛台 2 7 6 アボットジャパン株式会社総合研究所内

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA10 CA01 DA76 EA53 FA72

专利名称(译)	测定细小病毒B19抗原的方法		
公开(公告)号	JP2007278902A	公开(公告)日	2007-10-25
申请号	JP2006106761	申请日	2006-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	雅培日本		
申请(专利权)人(译)	雅培日本有限公司		
[标]发明人	半沢幹朗 吉田栄作		
发明人	半沢 幹朗 吉田 栄作		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 C07K16/08		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/531.B C07K16/08		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/EA53 4H045/FA72		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
其他公开文献	JP4855126B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种人细小病毒B19抗原的免疫分析方法，该方法不存在与RHA测试和PCR方法相关的问题，该方法包括用强酸性溶液（pH 4.0以下）和碱性溶液进行处理的步骤。旨在提供一种不包括求和步骤的简单且高度灵敏的测量方法。为了解决上述问题，本发明提供了人细小病毒B19抗原的免疫学测定方法，该方法包括用含有胍，胍盐或其衍生物的溶液处理样品。此外，作为用于本测定方法的试剂盒，提供了用于人细小病毒B19抗原的免疫学测定的试剂盒，其包括含有胍，胍盐或其衍生物的样品稀释剂。[选择图]无

表1 感度ハネル(パルボウイルス陰性、パルボウイルス B19 DNAレベル: 10¹、10²、10³、10⁴ IU/mL)

アッセイシステム		PRISM					
マイクロパーティクル	抗体 No(固形分%)	Mab-8 (0.20% solids)			Mab-10 (0.20% solids)		
コンジュゲート	抗体 No(濃度)	Mab-10 (100ng/ml)			Mab-10 (100ng/ml)		
トランスファーウォッシュ液	組成	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, 0.1% NaN ₃ , pH 8.0					
コンジュゲートウォッシュ液	組成	60mM Borate, 150 mM NaCl, 0.01% Lithium Dodecyl Sulfate, 0.1% NaN ₃ , pH 8.5					
	検体(感度/ハネル)	平均RLU	%CV	S/N	平均RLU	%CV	S/N
検体希釈液 なし	陰性	146	4.84	1.00	319	23.94	1.00
	10 ⁷	NT			NT		
	10 ⁸	NT			NT		
	10 ⁹	148	9.11	1.01	340	4.16	1.07
	10 ¹⁰	141	2.52	0.96	331	7.26	1.04
	10 ¹¹	287	3.70	1.96	584	2.42	1.83
検体希釈液 あり 2M Guanidine HCl in Citrate/Phosphate buffer, pH 5.5	陰性	200		1.00	341		1.00
	10 ⁷	293	10.62	1.46	392	10.66	1.15
	10 ⁸	1038	11.04	5.18	797	0.00	2.34
	10 ⁹	7468	6.13	37.28	4693	13.11	13.77
	10 ¹⁰	40394	3.69	201.63	42174	9.32	123.74
	10 ¹¹	NT			NT		

S/N: (MEAN RLU of the Sample) / (MEAN RLU of SEN-0511-NEG)

NT: Not Tested