

(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2004-187687  
(P2004-187687A)

(43) 公開日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/015	C O 7 K 14/015	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00	4 H O 4 5
C 1 2 N 7/00	C 1 2 Q 1/68 Z	
審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-15495 (P2004-15495)	(71) 出願人	591125371 デンカ生研株式会社
(22) 出願日	平成16年1月23日 (2004.1.23)		東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号
(62) 分割の表示	特願平4-281017の分割	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
原出願日	平成4年9月24日 (1992.9.24)	(72) 発明者	山崎 修道 東京都東大和市狭山3-1204-3
		(72) 発明者	松永 泰子 東京都杉並区上井草2-25-7-304
		(72) 発明者	武田 直和 東京都小平市喜平町2-8-3-405
		(72) 発明者	松浦 善治 埼玉県上福岡市福岡1-3-5-406
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒトパルボウイルスの検出方法及びそのためのプライマー

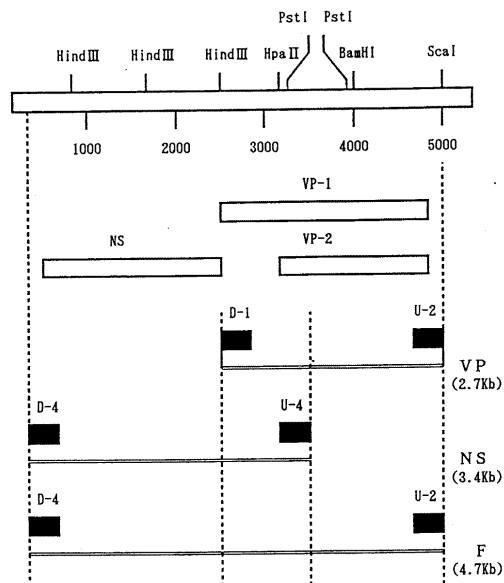
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒトパルボウイルス抗原蛋白の大量培養を可能にし、また、高感度に検体中のヒトパルボウイルス又は抗ヒトパルボウイルス抗体を測定することを可能ならしめる手段を提供する。

【解決手段】 特定のヒトパルボウイルス遺伝子、それがコードするポリペプチド及びこれを利用するヒトパルボウイルス又は抗ヒトパルボウイルス抗体の測定系を提供した。

【効果】 ヒトパルボウイルス非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域は、その全配列あるいはPCR法で得られるDNA断片を公知の発現ベクターに導入し、該発現ベクターで形質転換した宿主細胞内で発現させることにより、ラジオイムノアッセイ法、エンザイムイムノアッセイ法等の診断に使用し得る組換え抗原を得ることができる。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

下記式(1)で表されるヒトパルボウイルス遺伝子。

式(1)

10	20	30	40	50	60	
TTCCCGCCTT	ATGCAAATGG	GCAGCCATTT	TAAGTGTTTT	ACTATAATTT	TATTGGTCAG	
70	80	90	100	110	120	
TTTTGTAACG	GTAAAAATGG	GCGGAGCGTA	GGCGGGGACT	ACAGTATATA	TAGCACGGCA	
130	140	150	160	170	180	
CTGCCGCAGC	TCTTTCTTTC	TGGGCTGCTT	TTTCCTGGAC	TTTCTTGCTG	TTTTTTGTGA	10
190	200	210	220	230	240	
GCTAACTAAC	AGGTATTTAT	ACTACTTGTT	AACATACTAA	CATGGAGCTA	TTTAGAGGGG	
250	260	270	280	290	300	
TTCTTCAAGT	TTCTTCTAAT	GTTCTGGACT	GTGCTAACGA	TAATTGGTGG	TGCTCTTTAC	
310	320	330	340	350	360	
TGGATTTAGA	CACTTCTGAC	TGGGAACCAC	TAACTCATAC	TAACAGACTA	ATGGCAATAT	
370	380	390	400	410	420	
ACTTAAGCAG	TGTGGCTTCT	AAGCTTGACT	TTACCGGGGG	GCCACTAGCA	GGGTGCTTGT	
430	440	450	460	470	480	
ACTTTTTTCA	AGTAGAATGT	AACAAATTTG	AAGAAGGCTA	TCATATTCAT	GTGGTTATTG	20
490	500	510	520	530	540	
GGGGGCCAGG	GTAAATCCC	AGAAACCTCA	CTGTGTGTGT	AGAGGGGTTA	TTTAATAATG	
550	560	570	580	590	600	
TACTTTATCA	CCTTGTAACT	GAAAATGTGA	AGCTAAAATT	TTTGCCAGGM	ATGACTACAA	
610	620	630	640	650	660	
AAGGCAAATA	CTTTAGAGAT	GGAGAGCAGT	TTATAGAAAA	CTATTTAATG	AAAAAAATAC	
670	680	690	700	710	720	
CTTTAAATGT	TGTATGGTGT	GTTACTAATA	TTGATGGATA	TATAGATACC	TGTATTTCTG	
730	740	750	760	770	780	
CTACTTTTAG	AAGGGGAGCT	TGCCATGCCA	AGAAACCCCG	CATTACCACA	GCCATAAATG	30
790	800	810	820	830	840	
ATACTAGTAG	TGATGCTGGG	GAGTCTAGCG	GCACAGGGGC	AGAGGTTGTG	CCATTTAATG	
850	860	870	880	890	900	
GGAAAGGAAC	TAAGGCTAGC	ATAAAGTTTC	AACTATGGT	AACTGGCTG	TGTGAAAACA	
910	920	930	940	950	960	
GAGTGTTTAC	AGAGGATAAG	TGGAACTAG	TTGACTTTAA	CCAGTACACT	TTACTAAGCA	
970	980	990	1000	1010	1020	
GTAGTCACAG	TGGAAGTTTT	CAAATTCAAA	GTGCACTAAA	ACTAGCAATT	TATAAAGCAA	
1030	1040	1050	1060	1070	1080	
CTAATTTAGT	GCCTACTAGC	ACATTTTTAT	TGCATACAGA	CTTTGAGCAG	GTTATGTGTA	40
1090	1100	1110	1120	1130	1140	
TTAAAGACAA	TAAAATTGTT	AAATTGTTAC	TTTGTCAAAA	CTATGACCCC	CTATTGGTGG	
1150	1160	1170	1180	1190	1200	
GGCAGCATGT	GTAAAGTGG	ATTGATAAAA	AATGTGGCAA	AAAAAATACA	CTGTGGTTTT	
1210	1220	1230	1240	1250	1260	
ATGGGCCGCC	AAGTACAGGA	AAAACAACT	TGGCAATGGC	CATTGCTAAA	AGTGTTCCAG	
1270	1280	1290	1300	1310	1320	
TATATGGCAT	GGTAACTGG	AATAATGAAA	ACTTTCCATT	TAATGATGTA	GCAGGGAAAA	
1330	1340	1350	1360	1370	1380	
GCTTGGTGGT	CTGGGATGAA	GGTATTATTA	AGTCTACAAT	TGTAGAAGCT	GCAAAAGCCA	50

1390	1400	1410	1420	1430	1440	
TTTTAGGCGG	GCAACCTACC	AGGGTAGATC	AAAAAATGCG	TGGAAGTGTA	GCTGTGCCTG	
1450	1460	1470	1480	1490	1500	
GAGTACCTGT	GGTTATAACC	AGCAATGGTG	ATATTACTTT	TGTTGTAAGC	GGGAACACTA	
1510	1520	1530	1540	1550	1560	
CAACAACTGT	ACATGCTAAA	GCCTTAAAAG	AGCGCATGGT	AAAGTTAAAC	TTTACTGTAA	
1570	1580	1590	1600	1610	1620	
GATGCAGCCC	TGACATGGGG	TTACTAACAG	AGGCTGATGT	ACAACAGTGG	CTTACATGGT	
1630	1640	1650	1660	1670	1680	
GTAATGCACA	AAGCTGGGAC	CACTATGAAA	ACTGGGCAAT	AAACTACACT	TTTGATTTCC	10
1690	1700	1710	1720	1730	1740	
CTGGAATTAA	TGCAGATGCC	CTCCACCCAG	ACCTCCAAAC	CACCCCAATT	GTCACAGACA	
1750	1760	1770	1780	1790	1800	
CCAGTATCAG	CAGCAGTGGT	GGTGAAAGCT	CTGAAGAACT	CAGTGAAAGC	AGCTTTTTTA	
1810	1820	1830	1840	1850	1860	
ACCTCATCAC	CCCAGGCGCC	TGGAACACTG	AAACCCCGCG	CTCTAGTACG	CCCATCCCCG	
1870	1880	1890	1900	1910	1920	
GGACCAGTTC	AGGAGAATCA	TTTGTGCGAA	GCCCAGTTTC	CTCCGAAGTT	GTAGCTGCAT	
1930	1940	1950	1960	1970	1980	
CGTGGGAAGA	AGCCTTCTAC	ACACCTTTGG	CAGACCAGTT	TCGTGAACTG	TTAGTTGGGG	20
1990	2000	2010	2020	2030	2040	
TTGATTATGT	GTGGGACGGT	GTAAGGGGTT	TACCTGTGTG	TTGTGTGCAA	CATATTAACA	
2050	2060	2070	2080	2090	2100	
ATAGTGGGGG	AGGCTTGGGA	CTTTGTCCCC	ATTGCATTAA	TGTAGGGGCT	TGGTATAATG	
2110	2120	2130	2140	2150	2160	
GATGGAAATT	TCGAGAATTT	ACCCAGATT	TGGTGCGGTG	TAGCTGCCAT	GTGGGAGCTT	
2170	2180	2190	2200	2210	2220	
CTAATCCCTT	TTCTGTGCTA	ACCTGCAAAA	AATGTGCTTA	CCTGTCTGGA	TTGCAAAGCT	
2230	2240	2250	2260	2270	2280	
TTGTAGATTA	TGAGTAAAGA	AAGTGGCAAA	TGGTGGGAAA	GTGATGATAA	ATTTGCTAAA	30
2290	2300	2310	2320	2330	2340	
GCTGKGTATC	AGCAATTTGT	GGAATTTTAT	GAAAAGGTTA	CTGGWACAGA	CTTAGAGCTT	
2350	2360	2370	2380	2390	2400	
ATTCAAATAT	TAAAAGATCA	TTATAATATT	TCTTTAGATA	ATCCCCTAGA	AAACCCATCC	
2410	2420	2430	2440	2450	2460	
TCTCTGTTTR	ACTTAGTTGC	TCGTATTTAA	AATAACCTTA	AAAACCTCTCC	AGACTTATAT	
2470	2480	2490	2500	2510	2520	
AGTCATCATT	TTCAAAGTCA	TGGACAGTTA	TCTGACCACC	CCCATGCCTT	ATCATCCAGT	
2530	2540	2550	2560	2570	2580	
AGCAGTAATG	CAGAACCTAG	AGGAGAAAAT	GCAGTATTAT	CTAGTGAAGA	CTTACACAAG	40
2590	2600	2610	2620	2630	2640	
CCTGGGCAAG	TTAGCGTACA	ACTACCCGGT	ACTAACTATG	TTGGGCCTGG	TAATGAGTTA	
2650	2660	2670	2680	2690	2700	
CAAGCTGGGC	CCCCGCAAAG	TGCTGTTGAC	AGTGCTGCAA	GGATTCATGA	CTTTAGGTAT	
2710	2720	2730	2740	2750	2760	
AGCCAACTGG	CTAAGTTGGG	AATAAATCCA	TATACTCATT	GGACTGTAGC	AGATGAAGAG	
2770	2780	2790	2800	2810	2820	
CTTTTAAAAA	ATATAAAAAA	TGAACTGGG	TTTCAAGCAC	AAGTAGTAAA	AGACTACTTT	
2830	2840	2850	2860	2870	2880	
ACTTTAAAAG	GTGCAGCTGC	CCCTGTGGCC	CATTTTCAAG	GAAGTTTGCC	GGAAGTTCCC	50

2890	2900	2910	2920	2930	2940	
GCTTACMACG	CCTCAGAAAA	ATACCCAAGC	ATGACTTCAG	TTAATTCTGC	AGAAGCCAGC	
2950	2960	2970	2980	2990	3000	
ACTGGTGCAG	GAGGGGGGGG	CAGTAATCCT	GTCAAAAGCA	TGTGGAGTGA	GGGGGCCACT	
3010	3020	3030	3040	3050	3060	
TTTAGTGCCA	ACTCTGTAAC	TTGTACATT	TCCAGACAGT	TTTTAATTCC	ATATGACCCA	
3070	3080	3090	3100	3110	3120	
GAGCACCATT	ATAARGTGTT	TTCTCCCGCA	GCAAGTAGCT	GCCACAATGC	CAGTGGAAAA	
3130	3140	3150	3160	3170	3180	
GAGGCAAAGG	TTTGCACCAT	TAGTCCCATA	ATGGGATACT	CAACCCCATG	GAGATATTTA	10
3190	3200	3210	3220	3230	3240	
GATTTTAATG	CTTTAAATTT	ATTTTTTTCA	CCTTTAGAGT	TTCAGCACTT	AATTGAAAAT	
3250	3260	3270	3280	3290	3300	
TATGGAAGCA	TAGCTCCTGA	TGCTTTAACT	GTAACCATAT	CAGAAATTGC	TGTTAAGGAT	
3310	3320	3330	3340	3350	3360	
GTTACAGACA	AAACTGGAGG	GGGGGTACAG	GTTACTGACA	GCACTACAGG	GCGCCTATGC	
3370	3380	3390	3400	3410	3420	
ATGTTAGTAG	ACCATGAATA	CAAGTACCCA	TATGTGTTAG	GGCAAGGTCA	GGATACTTTA	
3430	3440	3450	3460	3470	3480	
GCCCCAGAAC	TTCCTATTTG	GGTATACTTT	CCCCCTCAAT	ATGCTTACTT	AACAGTAGGA	20
3490	3500	3510	3520	3530	3540	
GATGTTAACA	CACAAGGAAT	TTCTGGAGAC	AGCAAAAAAT	TAGCAAGTGA	AGAATCAGCA	
3550	3560	3570	3580	3590	3600	
TTTTATGTTT	TGGAACACAG	TTYTTTTCAG	CTTTTAGGTA	CAGGAGGTAC	AGCAACTATG	
3610	3620	3630	3640	3650	3660	
TCTTATAAGT	TTCCTCCAGT	GCCCCAGAA	AATTTAGAGG	GCTGCAGTCA	ACACTTTTAT	
3670	3680	3690	3700	3710	3720	
GAAATGTACA	ATCCCTTATA	CGGATCCCGC	TTAGGGGTCC	CTGACACATT	AGGAGGTGAC	
3730	3740	3750	3760	3770	3780	
CCAAAATTTA	GATCTTTAAC	ACATGAAGAC	CATGCAATTC	AGCCCCAAAA	CTTCATGCCA	30
3790	3800	3810	3820	3830	3840	
GGGCCACTAG	TAAACTCAGT	GTCTACAAAG	GAGGGAGACA	GCTCTAATAC	TGGAGCTGGA	
3850	3860	3870	3880	3890	3900	
AAAGCCTTAA	CAGGCCTTAG	CACAGGTACC	TCGCAAAACA	CTAGAATATC	CTTACGSCCT	
3910	3920	3930	3940	3950	3960	
GGGCCAGTGT	CTCAGCCATA	CCACCACTGG	GACACAGATA	AATATGTCAC	AGGAATAAAT	
3970	3980	3990	4000	4010	4020	
GCCATTTCTC	ATGGTCAGAC	CACTTATGGT	AACGCTGAAG	ACAAAGAGTA	TCAGCAAGGA	
4030	4040	4050	4060	4070	4080	
GTGGGTAGAT	TTCCAAATGA	AAAAGAACAG	CTAAAACAGT	TACAGGGTTT	AAACATGCAC	40
4090	4100	4110	4120	4130	4140	
ACCTATTTYC	CCAATAAAGG	AACCCAGCAA	TATACAGATC	AAATTGAGCG	CCCCCTAATG	
4150	4160	4170	4180	4190	4200	
GTGGGTCTG	TATGGAACAG	AAGAGCCCTT	CACTATGAAA	GCCAGCTGTG	GAGTAAAATT	
4210	4220	4230	4240	4250	4260	
CCAAATTTAG	ATGACAGTTT	TAAAACCTAG	TTTGCAGCCT	TAGGAGGATG	GGGTTTGCAT	
4270	4280	4290	4300	4310	4320	
CAGCCACCTC	CTCAAATATT	TTTAAAAATA	TTACCACAAA	GTGGGCCAAT	TGGAGGTATT	
4330	4340	4350	4360	4370	4380	
AAATCAATGG	GAATTACTAC	CTTAGTTCAG	TATGCTGTGG	GAATTATGAC	AGTAACTATG	50

```

4390      4400      4410      4420      4430      4440
ACATTTAAAT TGGGGCCCCG TAAAGCTACG GGACGGTGGA ATCCTCAACC TGGAGTATAT
4450      4460      4470      4480      4490      4500
CCCCCGCAGC CAGCAGGTCA TTTACCATAT GTACTATATG ACCCCACAGC TATAGATGCA
4510      4520      4530      4540      4550      4560
AAACAACACC ACAGACATGG ATATGAAAAG CCTGAAGAGT TGTGGACAGC CAAAAGCCGT
4570      4580      4590      4600      4610      4620
GTGCGCCCAT TGTAACAACCT CCCACCCGTG CCCTCAGCCA GGATGCGTAA CTAAACGCCC
4630      4640      4650      4660      4670      4680
ACCAGTACCA CCCAGACTGT ACCTGCCCCC TCCTGTACCT ATAAGACAGC CTAACAC

```

10

(ただし、式中、M は A または C、R は A または G、W は A または T、S は C または G、Y は C または T、K は G または T の塩基を示す。)

## 【請求項2】

下記式(2)のアミノ酸配列をコードするヒトパルボウイルスVP 1構造遺伝子。  
式(2)

```

1              10
Met Ser Lys Glu Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe
              20              30
Ala Lys Ala X1 Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val
              40
Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr
              50              60
Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe
              70
X2 Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp
              80              90
Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His
              100
Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser Asn Ala Glu Pro Arg Gly
              110              120
Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln
              130
Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn
              140              150
Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala
              160
Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile
              170              180
Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys
              190
Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val Lys Asp

```

20

30

40

50

	200		210	
Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln				
				220
Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr X3 Ala Ser Glu Lys Tyr				
	230		240	
Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala				
				250
Gly Gly Gly Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly				
	260		270	10
Ala Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln				
				280
Phe Leu Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser				
	290		300	
Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys				
				310
Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg				
	320		330	
Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu				
				340
Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala				
	350		360	20
Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp				
				370
Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg				
	380		390	
Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu				
				400
Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val				
	410		420	30
Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val Asn				
				430
Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu				
	440		450	
Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu Gly				
				460
Thr Gly Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro				
	470		480	
Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr				
				490
Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly				
	500		510	40
Gly Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile				
				520
Gln Pro Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser				
	530		540	
Thr Lys Glu Gly Asp Ser Ser Asn Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu				
				550
Thr Gly Leu Ser Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu				
	560		570	50

Arg Pro Gly Pro Val Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp	
	580
Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr	
	590 600
Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg	
	610
Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn	
	620 630
Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln Tyr Thr Asp	
	640 10
Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn Arg Arg	
	650 660
Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn Leu	
	670
Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly	
	680 690
Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu Pro Gln	
	700
Ser Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr Leu	
	710 720 20
Val Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys	
	730
Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly	
	740 750
Val Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr	
	760
Asp Pro Thr Ala Ile Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr	
	770 780
Glu Lys Pro Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val Arg Pro	
	781 30
Leu	

(ただし、式中、X1は Gly または Val、X2は Asn または Asp、X3は His または Asn を示す。

【請求項3】

下記式(3)のアミノ酸配列をコードするヒトパルボウイルスVP 2構造遺伝子。

式(3)

1	10	
Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly		
	20	30
Gly Gly Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr		40
	40	
Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu		
	50	60
Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala		
	70	
Ala Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys		
	80	90
Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu		
	100	
Asp Phe Asn Ala Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln		50

	110		120	
His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr				
	130			
Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr				
	140		150	
Gly Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys				
	160			
Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln				
	170		180	
Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe				10
	190			
Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val Asn Thr Gln				
	200		210	
Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala				
	220			
Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu Gly Thr Gly				
	230		240	
Gly Thr Ala Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu				
	250			
Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr Asn Pro				20
	260		270	
Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu Gly Gly Asp				
	280			
Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro				
	290		300	
Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys				
	310			
Glu Gly Asp Ser Ser Asn Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly				
	320		330	
Leu Ser Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro				30
	340			
Gly Pro Val Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr				
	350		360	
Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly				
	370			
Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro				
	380		390	
Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His				
	400			
Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile				40
	410		420	
Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu				
	430			
His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn Leu Asp Asp				
	440		450	
Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly Leu His				
	460			
Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu Pro Gln Ser Gly				
	470		480	
Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr Leu Val Gln				50

Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly  
 500 510  
 Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val Tyr  
 520  
 Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro  
 530 540  
 Thr Ala Ile Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys  
 550 554  
 Pro Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val Arg Pro Leu

10

## 【請求項4】

下記式(4)のアミノ酸配列をコードするヒトパルボウイルス非構造(NS)遺伝子。  
式(4)

1 10  
 Met Glu Leu Phe Arg Gly Val Leu Gln Val Ser Ser Asn Val Leu  
 20 30  
 Asp Cys Ala Asn Asp Asn Trp Trp Cys Ser Leu Leu Asp Leu Asp  
 40  
 Thr Ser Asp Trp Glu Pro Leu Thr His Thr Asn Arg Leu Met Ala  
 50 60  
 Ile Tyr Leu Ser Ser Val Ala Ser Lys Leu Asp Phe Thr Gly Gly  
 70  
 Pro Leu Ala Gly Cys Leu Tyr Phe Phe Gln Val Glu Cys Asn Lys  
 80 90  
 Phe Glu Glu Gly Tyr His Ile His Val Val Ile Gly Gly Pro Gly  
 100  
 Leu Asn Pro Arg Asn Leu Thr Val Cys Val Glu Gly Leu Phe Asn  
 110 120  
 Asn Val Leu Tyr His Leu Val Thr Glu Asn Val Lys Leu Lys Phe  
 130  
 Leu Pro Gly Met Thr Thr Lys Gly Lys Tyr Phe Arg Asp Gly Glu  
 140 150  
 Gln Phe Ile Glu Asn Tyr Leu Met Lys Lys Ile Pro Leu Asn Val  
 160  
 Val Trp Cys Val Thr Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Asp Thr Cys Ile  
 170 180  
 Ser Ala Thr Phe Arg Arg Gly Ala Cys His Ala Lys Lys Pro Arg  
 190  
 Ile Thr Thr Ala Ile Asn Asp Thr Ser Ser Asp Ala Gly Glu Ser  
 200 210  
 Ser Gly Thr Gly Ala Glu Val Val Pro Phe Asn Gly Lys Gly Thr  
 220  
 Lys Ala Ser Ile Lys Phe Gln Thr Met Val Asn Trp Leu Cys Glu  
 230 240  
 Asn Arg Val Phe Thr Glu Asp Lys Trp Lys Leu Val Asp Phe Asn  
 250  
 Gln Tyr Thr Leu Leu Ser Ser Ser His Ser Gly Ser Phe Gln Ile  
 260 270  
 Gln Ser Ala Leu Lys Leu Ala Ile Tyr Lys Ala Thr Asn Leu Val  
 280

20

30

40

50

Pro Thr Ser Thr Phe Leu Leu His Thr Asp Phe Glu Gln Val Met	
290	300
Cys Ile Lys Asp Asn Lys Ile Val Lys Leu Leu Leu Cys Gln Asn	
310	
Tyr Asp Pro Leu Leu Val Gly Gln His Val Leu Lys Trp Ile Asp	
320	330
Lys Lys Cys Gly Lys Lys Asn Thr Leu Trp Phe Tyr Gly Pro Pro	
340	
Ser Thr Gly Lys Thr Asn Leu Ala Met Ala Ile Ala Lys Ser Val	
350	360
Pro Val Tyr Gly Met Val Asn Trp Asn Asn Glu Asn Phe Pro Phe	10
370	
Asn Asp Val Ala Gly Lys Ser Leu Val Val Trp Asp Glu Gly Ile	
380	390
Ile Lys Ser Thr Ile Val Glu Ala Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly	
400	
Gln Pro Thr Arg Val Asp Gln Lys Met Arg Gly Ser Val Ala Val	
410	420
Pro Gly Val Pro Val Val Ile Thr Ser Asn Gly Asp Ile Thr Phe	
430	20
Val Val Ser Gly Asn Thr Thr Thr Thr Val His Ala Lys Ala Leu	
440	450
Lys Glu Arg Met Val Lys Leu Asn Phe Thr Val Arg Cys Ser Pro	
460	
Asp Met Gly Leu Leu Thr Glu Ala Asp Val Gln Gln Trp Leu Thr	
470	480
Trp Cys Asn Ala Gln Ser Trp Asp His Tyr Glu Asn Trp Ala Ile	
490	
Asn Tyr Thr Phe Asp Phe Pro Gly Ile Asn Ala Asp Ala Leu His	
500	510
Pro Asp Leu Gln Thr Thr Pro Ile Val Thr Asp Thr Ser Ile Ser	30
520	
Ser Ser Gly Gly Glu Ser Ser Glu Glu Leu Ser Glu Ser Ser Phe	
530	540
Phe Asn Leu Ile Thr Pro Gly Ala Trp Asn Thr Glu Thr Pro Arg	
550	
Ser Ser Thr Pro Ile Pro Gly Thr Ser Ser Gly Glu Ser Phe Val	
560	570
Gly Ser Pro Val Ser Ser Glu Val Val Ala Ala Ser Trp Glu Glu	
580	40
Ala Phe Tyr Thr Pro Leu Ala Asp Gln Phe Arg Glu Leu Leu Val	
590	600
Gly Val Asp Tyr Val Trp Asp Gly Val Arg Gly Leu Pro Val Cys	
610	
Cys Val Gln His Ile Asn Asn Ser Gly Gly Gly Leu Gly Leu Cys	
620	630
Pro His Cys Ile Asn Val Gly Ala Trp Tyr Asn Gly Trp Lys Phe	
640	
Arg Glu Phe Thr Pro Asp Leu Val Arg Cys Ser Cys His Val Gly	
650	660
	50

Ala Ser Asn Pro Phe Ser Val Leu Thr Cys Lys Lys Cys Ala Tyr  
670 671

Leu Ser Gly Leu Gln Ser Phe Val Asp Tyr Glu

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含み、宿主細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクター。

【請求項 6】

前記遺伝子が、バキュロウイルスベクター中に挿入されて成る請求項 5 記載の組換えベクター。

【請求項 7】

請求項 5 記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換体。

10

【請求項 8】

前記形質転換体の宿主が大腸菌である請求項 7 記載の形質転換体。

【請求項 9】

前記形質転換体の宿主が昆虫細胞である請求項 7 記載の形質転換体。

【請求項 10】

前記組換えベクターが請求項 6 記載の組換えベクターであり、前記形質転換体の宿主が昆虫細胞である請求項 7 記載の形質転換体。

【請求項 11】

前記昆虫細胞が T n 5 細胞である請求項 10 記載の形質転換体。

20

【請求項 12】

前記式 (2) で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 13】

前記式 (3) で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 14】

上記式 (4) で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 15】

請求項 13 のポリペプチド単独又は請求項 12 のポリペプチドと請求項 13 のポリペプチドとから構成されるヒトパルボウイルスのウイルス粒子様構造物。

【請求項 16】

請求項 12 又は 13 に記載のポリペプチド又は請求項 15 記載のウイルス粒子様構造物を抗原として用い、免疫測定法により検体中の抗ヒトパルボウイルス抗体を検出する方法。

30

【請求項 17】

請求項 12 に記載のポリペプチドと請求項 13 に記載のポリペプチドとの混合物を抗原として用いる請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記 2 種類のポリペプチドの混合比率が 1 : 10 ないし 10 : 1 である請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

請求項 12 又は 13 に記載のポリペプチド又は請求項 15 記載のウイルス粒子様構造物を免疫原として用いて抗体を作製し、該抗体を用いる免疫測定により検体中のヒトパルボウイルスを検出する方法。

40

【請求項 20】

請求項 1 記載の遺伝子の一部とそれぞれハイブリダイズする 1 対のオリゴヌクレオチドを用いて PCR 法により請求項 1 記載の遺伝子又はその一部を増幅し、該増幅された遺伝子又はその一部を検出することから成る、検体中のヒトパルボウイルスの検出方法。

【請求項 21】

前記オリゴヌクレオチドは、下記の DNA プライマー群 1 及び DNA プライマー群 2 の中からそれぞれ少なくとも 1 種ずつ選ばれる請求項 18 記載の検出方法。

50

## D N A プライマー群 1

D-1: GCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATC

D-4: TTCCCGCCTTATGCAAATGGGCAGC

## D N A プライマー群 2

U-2: GTGTTAGGCTGTCTTATAGGTACA

U-4: CTTGTATTCATGGTCTACTAAC

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、急性赤芽球ろう、慢性骨髄不全、流産、胎児水腫、肝障害、出血熱、関節炎やリウマチなど種々の疾患の病因にかかわる新規なヒトパルボウイルスの遺伝子、それがコードするポリペプチド及びその用途に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

パルボウイルスは、一本鎖の直鎖DNAゲノムを有し、ゲノムの各末端はパリンδροミック(Palindromic)DNA配列の存在により、特徴的なヘアピンループ構造を持つ最小のウイルス群(Parvoviridae科)に属する。

## 【0003】

Parvoviridae科ウイルスの粒子は立方対称形で、Cubic symmetryを示し、32個のキャプソメア(capsomere)を持ち、直径約20~25nmの小型のウイルスで、エンベロープを保有せず、エーテル抵抗性である。また熱、乾燥などに比較的耐性のウイルスである〔Intervirology, 23, 61-73(1985)〕。ウイルスの複製とカプシッドの形成は感染細胞の核内で行われる。

## 【0004】

脊椎動物のパルボウイルスは自律性及び欠損性の群に分類される。

## 【0005】

自律性のパルボウイルス<パルボウイルス属(Parvovirus)>は、宿主細胞に複製を継続しうが、欠損性のパルボウイルス<デペンドウイルス(Dependovirus)>はヘルパーウイルスによるコインフェクションが必要となる。

自律性の動物パルボウイルスには、ウシ(BPV)、ブタ(PPV)、イヌ(CPV)、ネコ(FPLV)、ラット(H-1)、ミンク(ADV)、及びヒト(HPV)が知られており、一般に病原性は似ているがこれらのウイルス間で免疫学的な交叉性は見出されていない。そこで、ヒトパルボウイルスの診断や疫学調査さらにワクチンの開発を行う場合、そのウイルスがヒトパルボウイルス由来であることが重要である。

## 【0006】

ヒトパルボウイルスは、1975年に輸血用血液中に偶然発見された〔Lancet, i:72-73(1975)〕が、病原性は不明であった。その後、鎌状赤血球貧血に生じた急性赤芽球ろうがヒトパルボウイルスによるものであることが報告された〔Lancet, i:664-665(1981)〕。また、小児に流行する伝染性紅斑症の病因ウイルスであることが確認され〔Lancet, i:1378(1983)〕、それが感染源となり成人にも感染が及び、関節炎を主症状とする病気が起こることが分かった。さらに伝染性紅斑流行後に胎児水腫で流産した症例が報告され〔Lancet, ii:1033-1034(1984)〕、妊婦のヒトパルボウイルス感染が死産や胎児水腫の原因となることが証明され、わが国においてもヒトパルボウイルス感染による胎児死亡例が報告された〔日本産婦人科学会誌, 40:99-100(1988)〕。そして、健常成人においても、不定の発疹症、出血熱様疾患、関節炎の原因となるところが知られ〔医学の歩み, 142:530-532(1987)〕、最近ではリウマチとの関係も推測されている〔Arch. Intern. Med. 148:2587-2589(1988)〕。

## 【0007】

以上のように、ヒトパルボウイルスは、臨床的にきわめて興味深いウイルスであり、人

10

20

30

40

50

の生命に影響を与えることもありうることから、治療や予防対策の必要性が明確となってきた。

【0008】

しかしながら、ヒトパルボウイルスは、人の初代骨髄細胞を用いインビトロでの培養からはじまり、慢性骨髄性白血病の患者から得られた赤血球細胞や胎児肝細胞中の赤芽細胞を用いた培養が可能であるが、産業上利用するに十分な培養系はまだ見つからない。そのため、ヒトパルボウイルス抗原の取得が困難であり、診断系の一般化が遅れており、臨床検査が容易に行えないのが現状である。

【0009】

一般的にヒトパルボウイルスは経鼻感染により起こるが、非日常的には輸血と血液製剤の注入により感染する。感染標的細胞は赤芽球系の前駆細胞であることがインビトロの造血幹細胞培養系で証明された〔Nature,302:426-429(1983)〕。

【0010】

ヒトパルボウイルスが感染した場合、1週間後にウイルス血症となるが発熱、筋肉痛、倦怠感が現れるだけで、感染後約2～3週間目から紅斑や関節痛等の症状が観察される。これらの症状はウイルス抗体による免疫複合体によるものであると考えられている。そのため、症状が現れる頃にはウイルスは殆ど駆逐されているため、ウイルス抗原の検出は困難である。

【0011】

従ってヒトパルボウイルス感染の証明は、ウイルス抗原の検出が困難であるため、血清中に抗ヒトパルボウイルス抗体を検出することによって行われている。

【0012】

ヒトパルボウイルスの診断は、伝染性紅斑流行時のウイルス血症の血清より、ウイルス粒子を精製し、それを抗原として、抗原抗体反応系を用いた以下の方法により限られた施設で行われているにすぎない。免疫電気向流法〔医学の歩み,135:317-318(1985)〕、エンザイムイムノアッセイ法〔医学の歩み,134:909-910(1985)〕、ラジオイムノアッセイ法〔感染症学雑誌,58:1213-1220(1985)〕。しかし、免疫電気向流法は検出感度が低く、エンザイムイムノアッセイ法やラジオイムノアッセイ法を用いた場合ウイルス抗原量の不足が問題になる。

【0013】

このような状況から、有用かつ大量のウイルス抗原の取得がヒトパルボウイルスの診断系の開発に有用かつ不可欠である。

【0014】

一般的にウイルス抗原の取得方法は、細胞培養でウイルスを増殖させる方法、もしくは、遺伝子組換え法、たとえばウイルス遺伝子をクローニングして、抗原蛋白や非感染性のウイルス粒子を大量に発現させる方法に大別される。

【0015】

細胞培養系は、慢性骨髄性白血病の患者から得られた赤芽球系細胞〔J.Infect.Dis.160:548(1989)〕、胎児肝細胞中の赤芽球細胞〔J.Virol.63:2422-2426(1989)〕など限定的な細胞系のみで培養が可能である。しかしウイルスの回収率はきわめて低く、また、通常の骨髄中にはウイルス標的細胞がきわめて少なく、新鮮初代培養以外の培養が困難であり、細胞培養系は使用範囲に制限がある。最近、株化細胞の1つに感受性が確認されたが、この系ではウイルスの増殖率はきわめて低い〔臨床と微生物,16:177-186(1989)〕。この様に、ヒトパルボウイルスの細胞培養系を用いた方法で、ヒトパルボウイルス抗原を有用かつ大量に取得することは不可能である。

【0016】

一方、遺伝子組換え法によってウイルス抗原を有用かつ大量に発現させて取得するためには、ヒトパルボウイルスの遺伝子が必要である。現在、ヒトパルボウイルスに感染した鎌形赤血球貧血患者血清由来のヒトパルボウイルスB19株遺伝子の全配列が報告されている〔J.Virol.,58:921-936(1986)〕。この米国でクローン化されたヒトパルボウイルス

遺伝子の塩基配列の解析から、ウイルス構造蛋白質としてウイルス粒子を構成するのは、VP-1（分子量約84KDa）及びVP-2（分子量約58KDa）の2種類の蛋白質のみであり、ヒトパルボウイルスに感染した宿主がこれらVP-1及びVP-2を標的として抗原抗体反応を惹起することが確かめられている〔J.Virol.,61:2627(1987)〕。

【0017】

そこで、伝染性紅斑患者血清からPCR法によりヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子の一部を増幅し、クローニングした報告例〔特開平4-88985〕やヒトパルボウイルス構造タンパク質遺伝子の一部の遺伝子領域から、大腸菌で発現させた抗原によるエンザイム免疫アッセイを用いた報告例〔J.Clin.Microbiol.,30:305-311(1992)〕がある。

【0018】

しかし、これらはヒトパルボウイルス構造遺伝子の一部の報告例であり、ヒトパルボウイルス構造タンパク質の一部を利用したにすぎない。そして、このエンザイム免疫アッセイを用いたヒトパルボウイルス抗体検出は、伝染性紅斑患者血清より精製したヒトパルボウイルス粒子を抗原として用いたRIAよりも検出率が低かった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

従って、本発明の目的は、ヒトパルボウイルス抗原蛋白の大量培養を可能にし、また、高感度に検体中のヒトパルボウイルス又は抗ヒトパルボウイルス抗体を測定することを可能たらしめる手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0020】

そこで、本発明者らは、ヒトパルボウイルスの非構造遺伝子及び構造遺伝子をコードする遺伝子領域を得るため検討した結果、従来公知のヒトパルボウイルス遺伝子と、アミノ酸レベル及びDNAレベルでいくつか構造の異なる新規な、また診断系の開発に有用な、たとえばヒトパルボウイルスのウイルス粒子様構造物（Empty particle）の作製も可能な、非構造遺伝子及び構造遺伝子を含むヒトパルボウイルス遺伝子領域を得ることができ、かつこの遺伝子領域から発現させた完全長の構造タンパク質VP-1、VP-2によるエンザイム免疫アッセイを用いた検討の結果、ヒトパルボウイルスの構造タンパク質VP-1とVP-2の免疫学的反応の違いを見出し、さらにEmpty particleを用いたエンザイム免疫アッセイが、ヒトパルボウイルス粒子を用いたエンザイム免疫アッセイと同等な検出感度及び特異性であることを見だし、さらに昆虫細胞Sf9よりTn5の方がヒトパルボウイルス蛋白の発現量が多いことを見だし、本発明を完成するに至った。

【0021】

すなわち、本発明は、上記式（1）で表されるヒトパルボウイルス遺伝子を提供する。また、本発明は、上記式（2）のアミノ酸配列をコードするヒトパルボウイルスVP-1構造遺伝子を提供する。さらに、本発明は、上記式（3）のアミノ酸配列をコードするヒトパルボウイルスVP-2構造遺伝子を提供する。また、本発明は、上記式（4）のアミノ酸配列をコードするヒトパルボウイルス非構造（NS）遺伝子を提供する。さらに本発明は、上記本発明のいずれかの遺伝子を含み、宿主細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクターを提供する。さらにまた、本発明は、上記本発明の組換えベクターにより形質転換された形質転換体を提供する。また、本発明は、前記式（2）ないし（4）のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、これらのポリペプチドから構成されるヒトパルボウイルスのウイルス粒子様構造物を提供する。また、本発明は、上記本発明のいずれかのポリペプチド又は上記本発明のウイルス粒子様構造物を免疫原として用いて抗体を作製し、該抗体を用いる免疫測定により検体中のヒトパルボウイルスを検出する方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のいずれかのポリペプチド又は上記本発明のウイルス粒子様構造物を抗原として用い、免疫測定法により検体中の抗ヒトパルボウイルス抗体を検出する方法を提供する。さらに、本発明は、上記式（1）で示される遺伝子の一部とそれぞれハイブリダイズする1対のオリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを用いてPCR法により式(1)で示される遺伝子又はその一部を増幅し、該増幅された遺伝子又はその一部を検出することから成る、検体中のヒトパルボウイルスの検出方法を提供する。

【発明の効果】

【0022】

本発明のヒトパルボウイルス非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域は、その全配列あるいはPCR法で得られるDNA断片を公知の発現ベクターに導入し、該発現ベクターで形質転換した宿主細胞内で発現させることにより、ラジオイムノアッセイ法、エンザイムイムノアッセイ法等の診断に使用し得る組換え抗原を得ることができる。また、ヒトパルボウイルス構造遺伝子VP-1に対するIgG抗体は、ヒトパルボウイルス構造遺伝子VP-2に対するIgG抗体に比べ、抗体量の持続性が長いことに基づいて、IgG抗体だけでも感染時期の推測が可能なヒトパルボウイルス抗体検出系の開発を行うことが出来る。また、感染初期においてはヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-2に対する抗体の方がヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1に対する抗体より抗体量が多い場合が多々あることに基づいて、ヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1、VP-2を混合することにより、従来抗ヒトパルボウイルス抗体検出系よりも検出率が高いヒトパルボウイルス抗体検出試薬を開発することが出来る。また、バキュロウイルス発現蛋白Empty particleを用いたエンザイムイムノアッセイが、ヒトパルボウイルス粒子を用いたエンザイムイムノアッセイと同等な検出感度及び特異性を示していることから、従来よりも確実かつ臨床学的に有意義なヒトパルボウイルス抗体検出試薬を開発することが出来る。また、昆虫細胞(Sf9、Tn5)を用いた発現量の検討から、Tn5細胞を用いた方がSf9細胞を用いるより発現量が多いことを見出し、ヒトパルボウイルス抗原の高収量な大量発現系を確立することが出来る。

10

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

後でより詳細に説明するが、上記式(1)ないし(4)で示される遺伝子の塩基配列は従来から公知のヒトパルボウイルス遺伝子の塩基配列とは異なっており、新規なものである。この完全長遺伝子を利用してポリペプチドを発現させ、それを利用した免疫測定により検体中のヒトパルボウイルス又は抗ヒトパルボウイルス抗体の検出を感度良く行うことができる。なお、これらの遺伝子は、各式に記載した完全長のものを用いることが好ましいが、これらの一部を欠いていても同程度に高感度の検出が可能と成ることがあることは当業者によって議論の余地なく認識されることである。従って、これらの遺伝子の一部が欠失し、置換し又は挿入があったとしても、式(1)ないし(4)の遺伝子と同様に用いることができるものは式(1)ないし(4)に記載されたものと実質的に同一であり、本発明の範囲内に入るものと解釈する。

30

【0024】

上述のように、本発明は、上記本発明の遺伝子を含み、宿主細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクターを提供する。このような組換えベクターは、市販のベクターのクローニング部位に上記遺伝子を常法により挿入することにより容易に調製することができる。ベクターとしては、pUC19のような大腸菌用ベクターを用いることもできるし、また、後述の実施例で明らかになるように、バキュロウイルスベクター(J. General Virology, Vol.68, pp.1233-1250, 1987)を用いることも好ましい。

40

【0025】

本発明の形質転換体は、上記本発明の組換えベクターで宿主細胞を常法により形質転換することにより得られる。宿主細胞は、構築した組換えベクターの宿主を利用する。すなわち、大腸菌用ベクターに遺伝子を挿入して組換えベクターを構築した場合には大腸菌が宿主となる。また、バキュロウイルスベクターを用いて組換えベクターを構築した場合には昆虫細胞を好ましく用いることができる。昆虫細胞としては特にTn5(Invitrogen社製High Five(商品名))が好ましく用いられる。

【0026】

50

上述のように、本発明は、前記式(2)ないし(4)のアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。なお、上記と同様に、式(2)ないし(4)に記載されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの一部が欠失し、置換し又は挿入があったとしても、式(2)ないし(4)に記載されたアミノ酸を有するポリペプチドと同様に用いることができるものは式(2)ないし(4)に記載されたアミノ酸を有するポリペプチドと実質的に同一であり、本発明の範囲内に入るものと解釈する。下記実施例で具体的に述べるように、これらのポリペプチドからヒトパルボウイルスのウイルス粒子様構造物を構築することができ、このウイルス粒子様構造物も本発明の範囲に含まれる。

#### 【0027】

これらのポリペプチド又はウイルス粒子様構造物を抗原として用いて、検体中の抗ヒトパルボウイルス抗体を免疫測定により検出することができる。免疫測定方法自体はこの分野において周知であり、本発明においては、従来より周知の種々の免疫測定方法、すなわち、用いる標識に基づいて分類すれば酵素免疫分析法、放射免疫分析法、蛍光抗体分析法その他を採用することができる。また、測定形式で分類すれば競合法、サンドイッチ法その他を採用することができる。なお、本願発明者らは、ヒトパルボウイルスに感染した患者の体内において、抗VP-2抗体が感染初期に多く存在し、感染後期に急速に減少するのに対し、抗VP-1抗体は感染初期には少ないが感染後期に多く存在し、抗体価が下がるのが遅いことを見出した。従って、VP-1とVP-2ポリペプチドの混合物を抗原として用いて免疫測定を行えば、感染の初期でも後期でも抗ヒトパルボウイルス抗体を検出することができ、検出率を高めることができる。この場合、VP-1とVP-2の混合比率は10:1ないし1:10が好ましく、さらには1:2ないし1:4が好ましい。なお、上記ウイルス粒子様構造物はVP-1とVP-2ポリペプチドの両方を含むので、これを抗原として用いることにより上記検出率向上効果をもたらすことができる。また、抗VP-1IgG抗体と抗VP-2IgG抗体の反応性及び抗体量に差があるので、VP-1抗原固相プレート及びVP-2抗原固相プレートを用いたIgG抗体検出により、IgG抗体検出のみで感染の時期を推測することが可能となった。

#### 【0028】

また、上記ポリペプチド又はウイルス粒子様構造物を免疫原として用いて常法によりこれらのポリペプチド又はウイルス粒子様構造物に体する抗体を作製し、この抗体を用いて免疫測定法により検体中のヒトパルボウイルスを検出することもできる。免疫測定法としては、上記と同様周知のいずれのものをも採用することができる。

#### 【0029】

また、上述のように、本発明は、上記式(1)で示される遺伝子の一部とハイブリダイズする1対のオリゴヌクレオチドを用いてPCR法により式(1)で示される遺伝子又はその一部を増幅し、増幅された遺伝子又はその一部を検出することから成る、検体中のヒトパルボウイルスの検出方法を提供する。この方法に用いられるDNAプライマー(オリゴヌクレオチド)としては、特に限定されないが、下記のDNAプライマー群1及びDNAプライマー群2の中からそれぞれ少なくとも1種ずつ選ばれるもの好ましく用いることができる。

##### DNAプライマー群1

D-1: GCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATC

D-4: TTCCCGCCTTATGCAATGGGCAGC

##### DNAプライマー群2

U-2: GTGTTAGGCTGTCTTATAGGTACA

U-4: CTTGTATTCATGGTCTACTAAC

#### 【0030】

以下、本発明を、より具体的に詳細に説明するが、本発明は下記に記載のものに限定されるものではない。

#### 【0031】

1. ヒトパルボウイルスの非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域

10

20

30

40

50

ヒトパルボウイルスは、長さ約 5.4 kb の直鎖の一本鎖 DNA ゲノムを有するウイルスで、ゲノムの各末端はパリンドロミック (Palindromic) DNA 配列により、特徴的なヘアピンループ構造で終わっている。

【0032】

ヒトパルボウイルスの非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域を得るには、例えば、伝染性紅斑 (EI) 患者の血清より、ショ糖密度勾配遠心によって精製したウイルス粒子から常法によってヒトパルボウイルス DNA を抽出精製してクローニングを行う。

【0033】

また、次の方法も可能である。それは、欧米で報告されたヒトパルボウイルス B19 の Au 株遺伝子配列 [J. Virol. 58:921-936(1986)] や Wi 株 [Virology, 157:534-538(1987)] に基づき合成した DNA プライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応 [PCR 法; Nature, 324:163(1986)] によって目的とするヒトパルボウイルスの非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域を増幅することができる。

【0034】

具体的には、たとえば、精製したヒトパルボウイルス DNA に、該遺伝子の部分配列から成る DNA プライマーと該遺伝子に相補的な部分配列から成る DNA プライマーの 2 種の DNA プライマーをアニーリングさせ、常法に従って、該 DNA プライマー間の DNA を増幅させる。

【0035】

最も好ましいプライマーは、上記した通りである。このプライマーを用いて PCR を行うとヒトパルボウイルスの非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域を増幅することができる。得られた DNA 断片を、たとえば pUC19 (宝酒造社製) などの様な一般的なクローニングベクター等に組み込んで、得られたクローンからプラスミド DNA を抽出し、該ベクターに組み込まれている DNA 配列をジデオキシ法等により決定することにより、目的とするヒトパルボウイルスの非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域の全塩基配列を決めることが出来る。

【0036】

本発明によれば、ヒトパルボウイルスの非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域は、前記式 (1) で示される塩基配列を有しており、また構造遺伝子 VP-1 は前記式 (2) で示される塩基配列及びアミノ酸配列を、また構造遺伝子 VP-2 は前記式 (3) で示される塩基配列及びアミノ酸配列を、また非構造遺伝子 NS は、前記式 (4) で示される塩基配列及びアミノ酸配列を有していた。

これら前記式 (1) ~ 前記式 (4) で表される塩基配列中、塩基レベルで 41 箇所、アミノ酸レベルで 10 ~ 13 箇所が、公知のヒトパルボウイルス B19 株 (Au 株、Wi 株) の配列と異なっていた。

【0037】

2. ヒトパルボウイルス構造タンパク質 VP-1 や VP-2 及び非構造タンパク質 NS の作製及びそれを用いた抗原、抗体検出系の構築

ウイルス構造タンパク質としてウイルス粒子に存在しているのは、量的に少ない VP-1 (84 KDa) と量的に多くウイルス粒子の主体をなしている VP-2 (58 KDa) であり、VP-1、VP-2 に対して宿主は抗体を産生する。よって、この VP-1、VP-2 抗原を用いることによりヒトパルボウイルスに対する抗体を検出することが出来る。

【0038】

ヒトパルボウイルスの VP-1, VP-2 抗原を得るためには、ヒトパルボウイルス抗原を確保しなければならない。しかし、現在までヒトパルボウイルスの細胞培養系は、特殊な遺伝的疾患患者の骨髄細胞を用いた報告例がある [Blood. 70:384-391(1987)] にすぎず、またウイルスの回収率はきわめて悪いため、実際にはその使用範囲にも限度があった。

【0039】

そこで、本発明のヒトパルボウイルス非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域を用いて以下のようにして完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1、VP-2を作製した。

【0040】

ヒトパルボウイルス非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域、前記式(1)やヒトパルボウイルス構造遺伝子VP-1、前記式(2)及びヒトパルボウイルス構造遺伝子VP-2、前記式(3)をタンパク質発現させるのに最も都合がよい制限酵素等により切断し、原核細胞(例えば大腸菌など)発現ベクターや真核細胞(例えばCHO細胞など)発現ベクター、昆虫細胞(例えばSf9, Tn5など)発現ベクターに再クローニングを行い発現させる。

10

【0041】

発現された完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1、VP-2は、不溶性になっており精製には困難を要していた。そこで、尿素バッファーで可溶化し、適当な吸着、イオン交換、分子ふるい、疎水、等電点、クロマトグラフィーを組み合わせ発現蛋白を精製し、完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1、VP-2を得た。

【0042】

発現させ、精製した完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1、VP-2を炭酸バッファー(pH9.5)で至適濃度に希釈してから、ELISA用ポリスチレンマイクロプレートに固相して、ヒトパルボウイルス抗体検出エンザイム免疫アッセイ試薬を試作した。

20

【0043】

この試作したエンザイム免疫アッセイ試薬を用いて、伝染性紅斑患者の抗ヒトパルボウイルスIgG抗体の経時変化を調べ以下の事が分かった。完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1、VP-2に対するIgG抗体は共に出現するが、完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1に対するIgG抗体の方が、完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-2に対するIgG抗体より抗体量の持続性は長いことが分かった。

【0044】

ここで、完全長のヒトパルボウイルス構造遺伝子VP-2のタンパク質のコード領域は、完全長のヒトパルボウイルス構造遺伝子VP-1のC末端部分に完全に含まれている。

30

【0045】

しかし、完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1とVP-2の免疫学的な反応性に違いがあることが分かったので、ヒトパルボウイルスのより確実な診断には、完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1のみではなく完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-2も必要であることが分かり本発明に至った。

【0046】

3. バキュロウイルスを用いた Empty particle の発現、精製及び Empty particle を用いた抗体検出系の構築

40

ヒトパルボウイルスの粒子は、構造タンパク質VP-1、VP-2で構成されていることが知られている。〔J.Virol.,58:921-936(1986)〕そして、構造タンパク質VP-1、VP-2をそれぞれ単独に同一細胞で発現させると、構造タンパク質VP-1、VP-2が同一細胞内でウイルス粒子様構造物(Empty particle)を作ることが分かった。〔Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:7601-7605(1989)〕

【0047】

そこで、バキュロウイルスによる発現系を用いて、ウイルス粒子様構造物の発現を行った。Empty particleの発現は、本発明のヒトパルボウイルス非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域を用いて以下の方法で行った。

【0048】

50

ヒトパルボウイルス非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域、前記式(1)やヒトパルボウイルス構造遺伝子VP-1、前記式(2)及びヒトパルボウイルス構造遺伝子VP-2、前記式(3)を完全長のVP-1及び完全長のVP-2タンパク質の発現に最も都合がよい制限酵素等により切断し、真核細胞(例えばCHO細胞など)発現ベクター、昆虫細胞(例えばSf9、Tn5など)発現ベクターに再クローニングして発現させる。

【0049】

次いで、昆虫細胞(Sf9、Tn5)を用いたヒトパルボウイルス蛋白の発現検討より、Tn5細胞を用いた方がSf9細胞を用いるより発現量が多いことを確認した。

【0050】

発現された Empty particle は、ウイルス粒子様構造を取っているため、ウイルス粒子の精製法が適用できる。例えば、ショ糖密度勾配遠心法や塩化セシウム密度勾配遠心法等で精製できる。

【0051】

発現させ、精製した Empty particle を炭酸バッファー(pH9.5)及びPBS等で至適濃度に希釈してから、ELISA用ポリスチレンマイクロプレートに固相して、ヒトパルボウイルス抗体検出エンザイム免疫アッセイ試薬を作製した。

【0052】

また、発現させ、精製した Empty particle をPBS等により至適濃度まで希釈して、Empty particle キャプチャー法によるエンザイム免疫アッセイ試薬を作製した。

【0053】

この試作したエンザイム免疫アッセイ試薬により、伝染性紅斑流行時の血清を用いたヒトパルボウイルス抗体検出を行った。その結果、患者血清中から精製したヒトパルボウイルス粒子を用いたエンザイム免疫アッセイとほぼ同等な検出感度及び特異性が得られた。従って、本発明であるバキュロウイルス発現蛋白 Empty particle を用いたエンザイム免疫アッセイ試薬は、最も検出感度及び特異性が高いので、従来よりも確実でかつ臨床学的に有意義なヒトパルボウイルス抗体検出試薬であることが分かった。

【0054】

以下、実施例に基づいて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0055】

ヒトパルボウイルス遺伝子のクローニング

(1) ヒトパルボウイルスゲノムDNAの調製

伝染性紅斑流行時にヒトパルボウイルスに感染した患者二人の血清(血清No.8及びNo.10)各々約200 µlをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.2)で10倍に希釈した。希釈した血清に最終濃度100 µg/mlのプロテインネースKと最終濃度1%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を加え、37°Cで約1時間反応させた。次いで、この反応液を等量に分け、TE飽和フェノール、クロロホルム及びイソアミルアルコール(25:24:1)を等量加えて混合した。混合後、15,000 rpm、約10分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清に最終濃度1 µg/mlのグリコーゲンを加え、さらに上清の1/10量の3M酢酸ナトリウムを加えた後、全溶液の2.5倍量のエタノールを加えて、-20°Cで一晩静置してエタノール沈澱を行った。

【0056】

エタノール沈澱溶液を15,000 rpm、約10分間遠心分離した。沈澱を70%エタノールで洗浄後、乾固させた。乾固後、TEバッファー(10mM Tris-HCl(pH7.5)-1mM EDTA)20 µlに溶解した。

【0057】

(2) ヒトパルボウイルス遺伝子の増幅及び塩基配列の決定

実施例1-(1)で得たヒトパルボウイルスゲノムDNA溶液1 µlを用いて、Saiki

10

20

30

40

50

らの方法 [ Nature, 324:163(1986) ] に従い、Gene Amp PCR Reagent Kit (宝酒造社製) を用いた PCR 法で、ヒトパルボウイルス非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域を増幅した。即ち、50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% ゼラチンを含む反応液中にヒトパルボウイルス DNA 溶液 1 µl と下記の 2 種類の DNA プライマーそれぞれ 100 pmol 及び Taq ポリメラーゼ 5 ユニットを加え、最終量 100 µl とした。

D-4: TTCCCGCCTTATGCAAATGGGCAGC

U-2: GTGTTAGGCTGTCTTATAGGTACA

図 1 に 2 種類の DNA プライマー位置を示した。増幅断片はヒトパルボウイルス非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域 (F)、ヒトパルボウイルス構造遺伝子を含む遺伝子領域 (VP)、ヒトパルボウイルス非構造遺伝子を含む遺伝子領域 (NS) を含む。

10

#### 【0058】

この反応液を (95、1分) - (55、2分) - (72、3分) のサイクルで増幅反応を 30 サイクル行った後、さらに 72、5分ポリメラーゼ反応を行わせ、DNA の伸長反応を完全にした。反応終了液を 1% アガロースゲル電気泳動で分画した結果、約 4.7 Kb の PCR 増幅産物を確認した。この約 4.7 Kb の PCR 増幅産物を GeneClean II [BI0101社製] で DNA を回収した後、さらに DNA Blunting Kit (宝酒造製) を用いて平滑化した。

#### 【0059】

次に pUC19 5 µg を制限酵素 SmaI 5 ユニットで 37、2時間消化後、アルカリフォスファターゼ (BRL 社製) で 5' 末端を脱リン酸化した。

20

#### 【0060】

上記 PCR 増幅断片と pUC19 断片を Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて結合させ、CaCl<sub>2</sub> 法 [Molecular Cloning, p250 Cold Spring Harbor Laboratory] によって大腸菌 XL1-Blue に導入した。得られた形質転換体を適当に 10 個選択、Birnboim らのアルカリ SDS 法 [Nucleic Acids Res., 7:1513(1979)] で DNA を精製し、制限酵素マッピングにより PCR 増幅断片を有するクローン (血清 No.10 由来: pUC19/F8、血清 No.8 由来: pUC19/C2 と命名) を得た。なお、これらの形質転換体 (Escherichia coli XL1-Blue(pUC19/F8) 及び Escherichia coli XL1-Blue(pUC19/C2) とそれぞれ命名した) は、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は、それぞれ微工研菌寄第 13125 号及び微工研菌寄第 13124 号である。

30

#### 【0061】

得られたクローンからプラスミド DNA を精製し、各 PCR 増幅断片について、Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (United State Biochemical Corporation 製) 或いは ABI 社製 DNA シーケンサー 373A で塩基配列を決定した (図 2 ~ 図 10)。その結果、非構造遺伝子及び構造遺伝子を含む遺伝子領域は、4,677 bp、構造遺伝子を含む遺伝子領域は、2,756 bp、非構造遺伝子を含む遺伝子領域は、3,383 bp であった。そこで、アメリカ及びヨーロッパで解析された既知のヒトパルボウイルス遺伝子配列 (前述) との比較を行った (表 1 ~ 3)。

#### 【0062】

表 1 Au 株 (米国) と血清 No.8 または No.10 由来株との比較

	全塩基配列	VP-1	VP-2	非構造遺伝子
DNA	41	21 ~ 22	15 ~ 16	16
アミノ酸	-	6 ~ 9	4	1

40

#### 【0063】

表 2 Wi 株 (ヨーロッパ) と血清 No.8 または No.10 由来株との比較

	全塩基配列	V P - 1	V P - 2	非構造遺伝子
D N A	4 1	2 1 ~ 2 2	1 5 ~ 1 6	1 6 ~ 1 7
アミノ酸	-	6 ~ 9	4	4

## 【 0 0 6 4 】

表 3 血清No.8由来株（日本）と血清No.10由来株（日本）との比較

	全塩基配列	V P - 1	V P - 2	非構造遺伝子
D N A	9	3	4	1
アミノ酸	-	3	0	0

10

## 【 0 0 6 5 】

表 1 ~ 3 より、式 ( 1 ) ~ ( 4 ) で表される塩基配列及びアミノ酸配列中、塩基レベルで 4 1 箇所、アミノ酸レベルで 1 0 ~ 1 3 箇所が、公知のヒトパルボウイルス B 1 9 株 ( A u 株、W i 株 ) と異なっていた。またこの結果より、ヒトパルボウイルスは欧米と日本との間で地域差の存在が示唆され、本発明である式 ( 1 ) ~ 式 ( 4 ) は、新規なヒトパルボウイルス遺伝子であることが見いだされた。

## 【 実施例 2 】

## 【 0 0 6 6 】

大腸菌を用いた V P - 1 及び V P - 2 抗原の発現

( 1 ) マルチクローニング部位を有する発現ベクターの作成

特開平 4 8 2 9 0 0 に記載の P L プロモーター発現ベクター pPLN-CSF214C 9 5  $\mu$ g を制限酵素 NdeI 及び HindIII それぞれ 5units で 3 7 、 2 時間消化後、1 % アガロースゲル電気泳動で 3.5Kb の D N A 断片を分画し、GeneClean II で D N A を回収した。次に pUC19 を同様に制限酵素 NdeI 及び HindIII で消化後、1 % アガロースゲル電気泳動を行ない、0.27Kb の断片を回収した。3.5Kb の断片と 0.27Kb の断片を Ligation Kit ( 宝酒造社製 ) を用いて結合させ、大腸菌 JM109 に導入した。

20

## 【 0 0 6 7 】

得られた形質転換体を適当に 1 0 個選択、アルカリ S D S 法で D N A を精製し、制限酵素 NdeI 及び HindIII によるマッピングにより目的のプラスミド pPLN-MCS を取得した ( 図 1 1 ) 。

30

## 【 0 0 6 8 】

( 2 ) V P - 2 抗原発現ベクターの作製

実施例 1 で得られたプラスミド pUC19/F8 5  $\mu$ g を制限酵素 HindIII 5units で 3 7 、 2 時間消化後、1 % アガロースゲル電気泳動で 5.1Kb の D N A 断片を分画し、GeneClean II で D N A を回収した。この断片を自己結合させ、大腸菌 JM109 に導入した。得られた形質転換体を適当に 1 0 個選択、アルカリ S D S 法で D N A を精製し、制限酵素 PstI 及び HindIII によるマッピングにより目的のプラスミド pVP を取得した。

## 【 0 0 6 9 】

プラスミド pVP 10  $\mu$ g を制限酵素 EcoRI 10units で 3 7 、 2 時間消化し、フェノール抽出 エタノール沈澱を行なった。D N A を溶解後、制限酵素 PstI 1unit で 3 7 、 1 0 分間部分消化し、1 % アガロースゲル電気泳動を行なった。1.8Kb の断片を分画し、GeneClean II で D N A を回収した。次にプラスミド pPLN-MCS 5  $\mu$ g を制限酵素 NdeI 及び EcoRI それぞれ 10units で 3 7 、 2 時間消化後、1 % アガロースゲル電気泳動で 3.5Kb の D N A 断片を分画し、GeneClean II で D N A を回収した。さらに D N A シンセサイザーを用いて、以下に示すオリゴヌクレオチドを合成した。

40

5' -TATGACTTCAGTGAATTCTGCA-3'

5' -GAATTCAGTGAAGTCA-3'

上記オリゴヌクレオチドをそれぞれ MEGALABEL ( 宝酒造社製 ) を用いて 5 ' 末端をリン酸化した後、リン酸化オリゴヌクレオチドをアニールした。

## 【 0 0 7 0 】

50

1.8Kb の断片、3.5Kb の断片及びアニールしたオリゴヌクレオチドを結合させ、大腸菌 N4830-1 に導入した。得られた形質転換体を適当に 24 個選択、アルカリ SDS 法で DNA を精製し、制限酵素 NdeI, PstI 及び EcoRI によるマッピングにより目的のプラスミド pVP200 を取得した (図 12)。

【0071】

(3) VP-1 抗原発現ベクターの作製

プラスミド pVP 10 µg を制限酵素 HindIII と BamHI でそれぞれ 10units で 37、2 時間消化後、1% アガロースゲル電気泳動で 1.5Kb の DNA 断片を分画し、GeneClean II で DNA を回収した。次にプラスミド M13mp19 RF 5 µg も同様に制限酵素 HindIII と BamHI で 1% アガロースゲル電気泳動を行ない、7.2Kb の断片を回収した。1.5Kb 及び 7.2Kb の断片を結合させた後、大腸菌 JM109 に感染させた。組換えファージの選択は Xgal 存在下、LacZ を指標として行った。White plaque を適当に 12 個選択、大腸菌 JM109 に再感染させた。アルカリ SDS 法で RF 型 DNA を精製し、制限酵素 HindIII 及び BamHI によるマッピングにより目的のプラスミド p19-VP を取得した。

【0072】

次にプラスミド p19-VP を大腸菌 JM109 に感染させ、ファージを取得した。これより一本鎖ファージ DNA を精製した。また変異導入プライマーとして以下の配列からなるオリゴヌクレオチドを合成した。

5' - TTACTCATATGCTACAAAGCTTGGCG -3'

一本鎖ファージ DNA と変異導入プライマーをアニールした後、T7-GEN (United States Biochemical Corporation (USB) 社製) を用いて部位特異的変異 (site-directed mutagenesis) を行った。site-directed mutagenesis の方法は USB 社のプロトコールに従った。変異導入部位は図 13 に示す通りである。得られたファージを適当に 24 個選択し、大腸菌 JM109 を再感染させた。アルカリ SDS 法で RF 型 DNA を精製し、制限酵素 NdeI によるマッピング及び DNA sequencing により目的のプラスミド mp19-VP1 を取得した。

【0073】

プラスミド mp19-VP1 20 µg を制限酵素 NdeI と BglII でそれぞれ 20units で 37、2 時間消化後、1% アガロースゲル電気泳動で 0.6Kb の DNA 断片を分画し、GeneClean II で DNA を回収した。プラスミド pVP 10 µg を制限酵素 BstXI 10units で 55、2 時間消化後、さらに制限酵素 BglII 10units で 37、2 時間消化し 1% アガロースゲル電気泳動で 1.7Kb の DNA 断片を分画し、GeneClean II で DNA を回収した。さらにプラスミド pVP200 10 µg を制限酵素 BstXI 20units で 55、2 時間消化後、さらに制限酵素 NdeI 20units で 37、2 時間消化後、1% アガロースゲル電気泳動で 3.8Kb の DNA 断片を分画し、GeneClean II で DNA を回収した。上記 0.6Kb、1.7Kb 及び 3.8Kb の DNA 断片を結合させ、大腸菌 N4830-1 に導入した。得られた形質転換体を適当に 20 個選択、アルカリ SDS 法で DNA を精製し、制限酵素 NdeI、BstXI 及び PvuII によるマッピングにより目的のプラスミド pVP100 を取得した (図 14)。

【0074】

(4) VP-1 及び VP-2 抗原の発現

大腸菌 N4830-1 [pVP100] 及び大腸菌 N4830-1 [pVP200] を 50 µg/ml Ampicilin を含む LB 培地 1 ml で 30、16 時間培養した。前培養液 1 ml を新しい LB 培地 100 ml に接種した。30、約 3 時間培養後、予め 65 に暖めた LB 培地 100 ml を加え、42 でさらに 3 時間培養した。培養後、遠心分離し菌体を回収した。

【0075】

菌体の一部を Phosphate Buffered-Saline (PBS) に懸濁し超音波破碎機で菌体を破碎した後、Laemmli の方法 [Nature, 227:680 (1970)] に従って SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [SDS-PAGE] を行った。泳動後、伝染性紅斑患者血清を用いてウエスタンブロッティング [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76:3116-3120 (1979)] を行った。その結果、分子量 84,000 及び 58,000 の位置に反応した。従って VP-1 及び VP-2 抗原の発現が確認された。

## 【0076】

また超音波破碎処理した菌体を5,500gで10分間遠心分離し、上清画分と沈澱画分に分離した。それぞれの画分をSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動シマシュー・ブリリアント・ブルー(CBB)で染色した結果、VP-1及びVP-2抗原は沈澱画分に見られ、インクルージョン・ボディを形成していた。

## 【0077】

## (5) VP-1及びVP-2抗原発現大腸菌の培養

大腸菌N4830-1[pVP100]を50µg/ml Ampicilinを含むLB培地2mlで30、7時間培養した。次に2L発酵槽を用いて1LのJAR培地(0.7% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% クエン酸ナトリウム、0.02% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O, 2.5% グルコース、0.4% 酵母抽出物、0.4% カザミノ酸、0.4% ヒスチジン、0.4% イソロイシン、0.4% バリン、50µg/ml アンピシリン)で30、約16時間培養した。さらに70L発酵槽を用いてJAR培地(40L)で35で培養した。O.D.<sub>550</sub>=5に達した時、カザミノ酸を終濃度2%、ヒスチジン、イソロイシン及びバリンをそれぞれ終濃度0.4%になるように添加した後、42、3時間培養した。

10

## 【0078】

培養液は限外ろ過装置で濃縮後、菌体を5Lの破碎buffer(50mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA, 30mM NaCl)に懸濁した。Manton Gaulin ホモジナイザーを用いて菌体を破碎した(7,500PSI x 3回)。次に5,500gで30分間遠心分離し沈澱を集めた。この沈澱を2.5LのDetergent buffer(50mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% Triton X-100)に懸濁、4、30分間攪はんの後、5,500gで15分間遠心分離し沈澱を集めた。このDetergent bufferによる懸濁-遠心分離操作を3回行った。得られた沈澱(インクルージョン・ボディ;IBs)は-20に保存した。

20

## 【0079】

大腸菌N4830-1[pVP200]についても同様に行い、インクルージョン・ボディを得た。

## 【0080】

## (6) VP-1及びVP-2抗原の精製

実施例2-(5)で得たVP-1のインクルージョン・ボディ、湿重量50mgを1mlのIBs溶解バッファー(8M尿素, 10mM DTT, 1mM EDTA, 20mM Tris-HCl(pH7.0))に溶解した。この溶液を1mlのSDS サンプルbuffer(130mM Tris-HCl(pH6.8), 4% SDS, 15% Ficoll Type 400 (Pharmacia社製), 10% -メルカプトエタノール, 0.002% ブロムフェノール)と混合し、80、20分間の熱処理を行なった。このサンプルからProSieve Gel System (FMC社製)を用いてVP-1抗原を精製した。使用説明書に従って、電気泳動を行い分子量ごとにサンプル中のタンパクを分画し、VP-1抗原を含む部分のみを切り出し、抽出バッファー(8M尿素, 10mM DTT, 1mM EDTA, 20mM Tris-HCl(pH7.0))でゲル中より抽出した。なおゲル板は14.5cm x 16.5cm x 2mmのものを用いた。抽出したタンパクをPharst System (Pharmacia社製)を用い電気泳動を行い銀染色した結果、VP-1抗原の分子量位置(84,000)にのみバンドを認めた。VP-2抗原についても同様に精製し、VP-2抗原の分子量位置(58,000)にのみバンドを認めた。

30

## 【実施例3】

40

## 【0081】

## VP-1抗原誘導体の作製

## (1) VP-1抗原誘導体ベクターの作製

本発明の式(2)のVP-1抗原(781アミノ酸)のN末端側46アミノ酸及びC末端側98アミノ酸欠失させたVP-1抗原誘導体(637アミノ酸)を作製した。

## 【0082】

実施例1-(2)で得たpUC19/F8 20µgを制限酵素Ssp I 20単位で37、2時間消化後、1%アガロースゲル電気泳動で約1.9KbのVP-1DNA断片を分画し、GeneClean IIでDNAを回収した。

## 【0083】

50

次にプラスミドpKK233-2(ファルマシア製) 5 $\mu$ g を制限酵素Nco I 5単位で37、2時間消化後、末端をBlunting Kit(宝酒造社製)で平滑末端とした。

【0084】

約1.9Kbの断片とベクターをLigation Kitを用いて結合させ、大腸菌XL1-Blueに導入した。得られた形質転換体を適当に10個選択、アルカリSDS法でDNAを精製し、制限酵素PstI及びHindIIIによるマッピングにより目的のプラスミドpVP300を取得した(図15)。

【0085】

(2) VP-1抗原誘導体の発現

大腸菌XL1-Blue[pVP300]を50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含むLB培地1mlで37、16時間培養した。前培養液1mlを新しいLB培地100mlに接種した。37、約2時間培養後、終濃度1mM IPTGになるように添加後、37でさらに3時間培養した。培養後、実施例2-(4)で示した方法で発現状況を調べた結果、VP-1抗原誘導体(VP-1/SspI抗原と命名)もインクルージョン・ボディを形成していることが確認された。さらにウエスタンブロッティング及び蛍光抗体間接法により、分子量70,000の位置に反応した。従ってVP-1/SspI抗原もVP-1、VP-2抗原と同じく抗原性を有することがわかった。

【実施例4】

【0086】

バキュロウイルスを用いたVP-1及びVP-2抗原の発現

20

(1) 組換え転移ベクターの作製

実施例1-(2)で得たpUC19/F4 20 $\mu$ g を制限酵素HindIII 20unitsで37、2時間消化後、1%アガロースゲル電気泳動で2.5KbのVP-1 DNA断片を分画し、GeneClean IIでDNAを回収した。回収したVP-1断片をBlunting Kitで平滑末端とした。

【0087】

同様にpUC19/F8 20 $\mu$ g を制限酵素HpaIIとSalIでそれぞれ20unitsで37、2時間消化後、1%アガロースゲル電気泳動で1.8KbのVP-2 DNA断片を分画し、GeneClean IIでDNAを回収した。VP-2断片をBlunting Kitで平滑末端とした。

【0088】

一方転移ベクターpAcYM1[J.Gen.Virol.,68:1233(1987)] 5 $\mu$ g を制限酵素BamHIで37、2時間消化後、Blunting Kitで平滑末端とした。さらにアルカリフォスファターゼ(BRL社製)で5'末端の脱リン酸化を行った。

30

【0089】

VP-1及びVP-2断片をそれぞれpAcYM1を結合させた後、大腸菌XL1-Blueに感染させた。得られた形質転換体を適当に20個選択、アルカリSDS法でDNAを精製し、制限酵素によるマッピングにより目的のプラスミドpAcVP1、pAcVP2を取得した(図16)。

【0090】

(2) 組換えウイルスの作製

35mmディッシュ(住友ベークライト社製)を用い、夜蛾幼虫由来株化細胞:Sf9(S podopterd frugiperda)細胞は、10%牛胎児血清(FCS)を含む培地(TC-100、またはGrace's培地)で、夜蛾幼虫由来株化細胞:Tn5:(Trichoplusia ni)細胞は、無血清培地(TC-100、またはGrace's培地)で3~4日培養した。次いで、35mmディッシュ(住友ベークライト社製)を用い、 $1 \times 10^6$ /ディッシュ、培地量約1.5mlになる様に前記述の培養細胞を調整した。この状態で30~40分静置した後、無菌的に上記培地を取り去り1.5ml無血清培地(EX-CELL 400またはGrace's培地)に交換した。

40

【0091】

ここにAcNPV(キンウラバ亜科、Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)DNA約20ng/ $\mu$ lを1 $\mu$ l、転移ベクター2-3 $\mu$ g/ $\mu$ l濃度を1 $\mu$ l、滅菌蒸留水6 $\mu$ lの計8 $\mu$ l及びリポフェクチン(BRL社製)5 $\mu$ l、滅菌蒸留水3 $\mu$ lの計8 $\mu$

50

1 をエッペンドルフチューブ内でおだやかに混和した後、上記無血清培地中に1滴ずつ静かに全体に滴下した(コ・トランスフェクション)。そしてモイスターチャンバー内へ収納し、26~26.5で3日間培養した。

#### 【0092】

コ・トランスフェクション後、3日目の培養上清約1mlをチューブに移しそれらの各20 $\mu$ lを用いて $10^{-1}$ ~ $10^{-3}$ まで希釈しそれらの100 $\mu$ lを $1 \times 10^6$ /ディッシュ(35mm)に調整した細胞に接種し約1時間静置して吸着させる。その後、ウイルス液を捨て1%低融点寒天(Sea Plaque:宝酒造社製)2mlを重層し、凝固した後更に1mlの培地(Sf9細胞の場合は10%FCSを含むTC-100またはGrace's培地を用い、Tn5細胞の場合はTC-100またはGrace'sの無血清培地を用いる。)を重層し26~26.5で3~4日培養後、10mMリン酸緩衝塩溶液(10mM PBS)中0.01%(W/V)ニュートラルレッドを1ml加えブランクを染色し透明な組換え体を選択した。

10

#### 【0093】

ブラークアッセイによって得た組換え体と思われるブランクをパスツールピペットによってゲルごと採取し、それらを細胞培養用培地400 $\mu$ lに浮遊し十分攪拌を行った後、約3000rpm、約5分間の条件でアガロ-スゲルを沈澱させ、上清をブラークアッセイ時同様 $10^{-1}$ ~ $10^{-3}$ までそれぞれの培地(Sf9細胞の場合は10%FCSを含むTC-100またはGrace's培地を用い、Tn5細胞の場合はTC-100またはGrace'sの無血清培地を用いる。)で希釈し、低融点寒天を用いて同様にブラークアッセイを行い組換えウイルスを純化した。

20

#### 【0094】

ブラーク純化(plaque purify)によって得られた組換え体の力価を細胞に感染させることで上昇させた。この時も同様に35mmディッシュに約 $1 \times 10^6$ /ディッシュのSf9細胞及びTn5細胞を用意し、約30分間静置後培地の大部分を捨てそこに得られた組換え体を約100 $\mu$ l加え、更に約15分間隔でおだやかに振盪混和を行い計4回、約1時間にわたってこの操作を行った。

#### 【0095】

次に、Sf9細胞の場合は10%FCSを含む培地(TC-100またはGrace's)を、Tn5細胞の場合は無血清培地(TC-100またはGrace's)を1.5ml加え、3~4日間培養を行う。この時得られた上清を用いて75cm<sup>2</sup>培養ビン2本を用いて、同様に細胞を用意し、既に1度力価を上げてある組換えウイルス液1mlを接種し、3~4日間の培養の後、得られた上清を構造遺伝子発現用の高力価組換え体とした。

30

#### 【0096】

35mmディッシュに約 $1 \times 10^6$ /ディッシュで細胞数を調整し培地の大部分を吸引し、そこに高力価組換え体(約 $1 \times 10^7$ pfu/ml)をM.O.I.5~10になる様に接種し約15分間隔で穏やかに振盪しながら計4回、1時間にわたりこの操作を続けた。

#### 【0097】

その後、培地(Sf9細胞の場合は10%FCSを含むTC-100またはGrace's培地を用い、Tn5細胞の場合はTC-100またはGrace'sの無血清培地を用いる。)を0.5-1ml加え3~4日間、26~26.5で培養しヒトパルボウイルス構造遺伝子(VP-1、VP-2及びVP-1 + VP-2)の発現を行った。

40

#### 【0098】

発現蛋白は、伝染性紅斑患者血清より精製したヒトパルボウイルス粒子を対照として、10%SDS-PAGE用い20mAで約2時間電気泳動後、CBB染色を行い、その分子量と発現量の確認を行った。その結果、ヒトパルボウイルスのVP-1、VP-2と同分子量の発現蛋白が確認された。またTn5細胞を用いた方がSf9細胞を用いるよりも発現量が多いことが分かった。

#### 【0099】

抗原性の確認は、伝染性紅斑患者血清を用いたウエスタンブロッティング及び蛍光抗体間接法を行った。その結果、発現蛋白質と特異的に反応するバンドの存在と蛍光発色が確

50

認められ、発現蛋白がヒトパルボウイルス構造蛋白質VP-1、VP-2であることを確認した。

### 【0100】

(3) ヒトパルボウイルス発現蛋白質 Empty particle の精製と電子顕微鏡を用いた Empty particle の確認

昆虫細胞 Sf9、Tn5等を用いて、好ましくはTn5細胞を用いて、表面積75cm<sup>2</sup>のプラスチック製細胞培養用ボトル(住友ベークライト社製)により大量にヒトパルボウイルス構造蛋白質を発現させ精製に供した。大量発現させた発現蛋白質(75cm<sup>2</sup>プラスチック製細胞培養用ボトル20本分)はピペティングによって細胞培養液を用いて培養細胞ごと8-ベストし容量500mlの遠心沈澱用ボトル(日立社製)2本に移し(約300ml)これらを1000~3000rpm, 20, 15分間の遠心条件で細胞成分を沈澱させ上清は廃棄した。沈澱細胞はPBS(-)(りん酸緩衝食塩液、日水製薬社製)またはHanks'BSS(ハンクス緩衝塩類液, 自家製)10mlに浮遊させ充分混和した後-80の超低温冷凍庫を用いて2~3回の凍結融解操作を行った。次に凍結融解後の細胞浮遊液を5本のプラスチック製スピッツ管(栄研器材社製)に各々2ml分注し100~500W, 0, 5~20分間の条件で超音波処理(オリンパス社製)を合計2~4回行った。この際、各細胞浮遊液から約50μlずつ各々採取し、スライドグラス上に滴下した後カバーグラスを置き倍率200倍にて光学顕微鏡(Nikon社製)により観察し細胞の破碎状態を確認した。ここで細胞浮遊液から細胞成分を分離する為に約10000rpm, 20, 15分間の遠心沈澱を行った。この操作によって得られた上清約10mlをサンプルとして次の精製操作を行った。まず、超遠心用13PAチューブ(日立工機社製)に40%シュクロ-ス(W/V)(PBS(-)またはHanks'BSSに浮遊)(ナカライテスク社製)を2~3ml分注しこれらシュクロ-スクッションの上へ上記サンプルを重層し約35000rpm, 20, 16~20時間超遠心を行い微量雑蛋白質を除外すると共にヒトパルボウイルス発現蛋白質を沈澱させた。沈澱させたヒトパルボウイルス発現蛋白質は13PAチューブ管底に接着している為PBS(-)各2mlを滴下しピペティング及び振とうにより充分混和した。更にこの時肉眼で大分子が確認されるため100~500W, 0, 2~10分間の超音波処理を行い浮遊溶液とした。次に、予め超純水(mili-Q ミリポア社)に密度1.2, 1.3, 1.4(g/cm<sup>3</sup>)となる様調製したCsCl溶液(ナカライテスク社製)を密度の大きい順にチューブの管底から2, 5, 2ml各々重層しグラジエントをプレフォ-ミングした後サンプル2mlを2本の超遠心チューブに重層し約35000rpm, 20, 40~45時間の条件下で一度目の超遠心による精製を行った。超遠心後、各サンプルをおよそ20本のフラクションにペリスタポンプ等を用いて分離し、抗VP1モルモット抗体(1.5μg/ml)固相化プレート及び抗VP1モルモットPOD標識抗体(自家製)を用いて抗原検索を行った。その結果、横軸にフラクションNo.を縦軸にO.D. 492/630nmでの測定結果をグラフ化した場合1峰性のカ-ブが得られた為ピ-クの存在するフラクションを用いて同様に二回目の超遠心操作及び抗原検索を行った。この際、各フラクションに於けるCsClの重量パーセントを糖度計(ATAGO社製)により測定しレファレンスとなる密度1.2, 1.3, 1.4(g/cm<sup>3</sup>)の各CsCl溶液の重量パーセントの値から各フラクション溶液の密度を換算しグラフ化した。この時、横軸にはフラクションNo.を縦軸には各フラクションの密度値をとった。その結果、チューブの管底から管口に向かって密度が低下する関係が確認された。更にこれらの関係から抗原を含むフラクション溶液の密度は、約1.3g/cm<sup>3</sup>であることが確認された。次にこのサンプルを13PAチューブ内でPBS(-)によって15~20倍に希釈し約35000rpm, 20, 10~20時間超遠心を行いヒトパルボウイルス精製発現蛋白質を沈澱させた。これらの発現蛋白質は最終的に1~2ml PBS(-)に浮遊し発現蛋白質原液とした。電子顕微鏡による確認は、上記発現蛋白質液を試料とし、4% Uranyl acetateにより陰性染色を行い、倍率50000倍にして透過型電子顕微鏡(日立製)で検鏡した。その結果、図17に示したような約23nmの中空円型のウイルス様構造物いわゆる"Empty particle"の存在を確認した。

【実施例 5】

【0101】

大腸菌発現抗原 VP - 1、VP - 2 抗原を用いた抗ヒトパルボウイルス Ig G 抗体検出 (1) VP - 1、VP - 2 抗原固相プレートの作製

実施例 2 - (6) に記載の大腸菌で発現された VP - 1、VP - 2 抗原を 50mM 炭酸バッファ (pH9.5) で各々 1-10 μg/ml 濃度に希釈し、ポリスチレン平型マイクロプレート (ヌンク社製) に 100 μl/ウェルで分注し、4 で一晩静置した。18 時間以上静置したマイクロプレートを最終濃度 0.05% Tween20 を含む PBS 200 μl/ウェルで 3 ~ 4 回洗浄後、最終濃度 0.05% 牛血清アルブミン (BSA) と 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS 200 μl/ウェル加えて 4 一晩静置し、VP - 1、VP - 2 固相マイクロプレートを作製した。

10

【0102】

(2) 伝染性紅斑患者血清を用いた抗ヒトパルボウイルス Ig G 抗体検出

前記述の抗原固相マイクロプレートウェル中のプレート保存液を除いた後、伝染性紅斑患者血清を 0.05% BSA と 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS で 200 倍に希釈し、その 100 μl を抗原固相マイクロプレートのウェルに加え、室温 (15 ~ 25 ) で約 1 時間反応させた。反応後、0.05% Tween20 含む 5mM PBS 200 μl/ウェルで 3 ~ 4 回洗浄した。ついで、0.05% Tween20 含む 5mM PBS で約 40000 倍に希釈した抗ヒト Ig G ヤギパーオキシダーゼ標識抗体 (MBL 社) を 100 μl/ウェル加え、室温で約 1 時間反応させた。反応後、0.05% Tween20 含む 5mM PBS 200 μl/ウェルで 3 ~ 4 回洗浄した。洗浄後、3.3mg/ml O - フェニレンジアミン含む 0.1 M クエン酸 - リン酸緩衝液 (pH 5.0) に、0.02% 過酸化水素水を加えた基質液を 100 μl/ウェル加えて室温で約 30 分間反応させた。反応後、1.5 N 硫酸を 100 μl/ウェル加えて反応を停止させ、マイクロプレート用比色計を用いて主波長 492 nm、副波長 630 nm で各ウェルの O.D. 値を測定した (表 5)

20

【0103】

表 5 伝染性紅斑流行時の血清を用いた VP - 1 及び VP - 2 抗原固相マイクロプレートによる抗ヒトパルボウイルス Ig G 抗体検出

	VP - 1		VP - 2	
	+	-	+	-
ウイルス 粒子	48	6	44	10
	4	30	4	30

30

ウイルス粒子は患者血清より精製。

【0104】

この結果より完全長ヒトパルボウイルス構造タンパク質 VP - 1 を用いたエンザイムイムノアッセイの方が完全長ヒトパルボウイルス構造タンパク質 VP - 2 を用いたエンザイムイムノアッセイよりも Ig G 抗体検出率が高かった。

40

【0105】

しかし、完全長ヒトパルボウイルス構造タンパク質 VP - 1 に対する反応性よりも、完全長ヒトパルボウイルス構造タンパク質 VP - 2 に対する反応性の強い血清が存在することが分かったので、ヒトパルボウイルス構造タンパク質 VP - 1 のみでなくヒトパルボウイルス構造タンパク質 VP - 2 を至適濃度に加え、好ましくは VP - 1 を 1 ~ 10 μg/ml、VP - 2 を 1 ~ 20 μg/ml 加え、実施例 5 - (1) の方法で ELISA 用マイクロプレートに固相した。そこで、VP - 1 抗原を用いたエンザイムイムノアッセイでは陰性、VP - 2 抗原を用いたエンザイムイムノアッセイでは陽性になる血清を用い、VP - 1 と VP - 2 抗原を混合固相したマイクロプレートを用いた Ig G 抗体検出を行った (表 6)。

【0106】

50

表 6 大腸菌発現抗原 V P - 1、V P - 2 抗原混合固相マイクロプレートによる I g G 抗体検出

		V P - 1	V P - 2	VP-1+VP-2
陽性血清		+	+	+
陰性血清		-	-	-
検体番号	1	-	+	+
	2	+	-	+
	3	-	+	+
	4	-	+	+
	5	-	+	+
	6	+	-	+

10

その結果、V P - 1 または V P - 2 抗原のどちらか一方にしか強く反応しない血清も効率よく検出することが出来た。即ち V P - 1 (または V P - 2) 抗原を用いたエンザイムイムノアッセイは陽性で、完全長ヒトパルボウイルス構造タンパク質 V P - 2 (または V P - 1) 抗原を用いたエンザイムイムノアッセイは陰性であった血清が、V P - 1 と V P - 2 抗原を混合したエンザイムイムノアッセイでは、すべて陽性になることが判明した。

【 0 1 0 7 】

( 3 ) V P - 1 抗原誘導体を用いた抗パルボウイルス I g G 抗体検出

実施例 3 - ( 2 ) に記載の大腸菌で発現された V P - 1 抗原誘導体を 50mM 炭酸バッファ (pH9.5) で各々 1-10  $\mu$ g/ml 濃度に希釈し、ポリスチレン平型マイクロプレート (ヌンク社製) に 100  $\mu$ l/well で分注し、4 で一晩静置した。18 時間以上静置したマイクロプレートを最終濃度 0.05% Tween20 を含む PBS 200  $\mu$ l/well で 3 ~ 4 回洗浄後、最終濃度 0.05% 牛血清アルブミン (BSA) と 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS 200  $\mu$ l/well 加えて 4 一晩静置し、V P - 1 抗原誘導体固相マイクロプレートを作製した。

20

【 0 1 0 8 】

次いで伝染性紅斑流行時の血清を用い、前記マイクロプレートによる抗パルボウイルス I g G 抗体検出を行った。はじめに V P - 1 抗原誘導体固相マイクロプレートウエル中のプレート保存液を除き、その後伝染性紅斑患者血清を 0.05% BSA と 0.05% Tween20 を含む 10mM PBS で 200 倍に希釈し、その 100  $\mu$ l を抗原固相マイクロプレートのウエルに加え、室温 ( 1 5 ~ 2 5 ) で約 1 時間反応させた。反応後、0.05% Tween20 含む 5mM PBS 200  $\mu$ l/well で 3 ~ 4 回洗浄した。ついで、0.05% Tween20 含む 5mM PBS で約 4000 倍に希釈した抗ヒト I g G ヤギパーオキシダーゼ標識抗体 ( M B L 社 ) を 100  $\mu$ l/well 加え、室温で約 1 時間反応させた。反応後、0.05% Tween20 含む 5mM PBS 200  $\mu$ l/well で 3 ~ 4 回洗浄した。洗浄後、3.3mg/ml O - フェニレンジアミン含む 0.1 M クエン酸 - リン酸緩衝液 (pH 5.0) に、0.02% 過酸化水素水を加えた基質液を 100  $\mu$ l/well 加えて室温で約 30 分間反応させた。反応後、1.5 N 硫酸を 100  $\mu$ l/well 加えて反応を停止させ、マイクロプレート用比色計を用いて主波長 492 nm、副波長 630 nm で各ウエルの O. D. 値を測定した (表 4)。

30

【 0 1 0 9 】

表 4 伝染性紅斑流行時の血清を用いた V P - 1 抗原誘導体固相

40

マイクロプレートによる抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体検出

		V P - 1 抗原誘導体	
		+	-
ウイルス	+	4 1	1 3
粒子	-	1	3 3

50

ウイルス粒子は患者血清より精製。

【0110】

この結果よりウイルス粒子を用いたエンザイムイムノアッセイよりも抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体検出率がかなり低いことが分かった。また、実施例 5 - (2) の結果から、完全長ヒトパルボウイルス構造タンパク質 V P - 1 を用いたエンザイムイムノアッセイの方が部分発現である V P - 1 抗原誘導体を用いたエンザイムイムノアッセイより抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体検出率が高く、かつウイルス粒子を用いたエンザイムイムノアッセイとの一致率も高いことが分かった。このことは同じ発現抗原、例えば V P - 1 抗原と V P - 1 抗原誘導体の場合、抗原部位の数及び立体構造が抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体検出率の差の原因であると思われる。よって、エンザイムイムノアッセイに用いる発現抗原としては、抗原部位の数及び立体構造がウイルス粒子の抗原部位の数及び立体構造に近いという条件が重要となる。従って、同じ発現抗原でも部分発現抗原より、完全長発現抗原の方が前記条件を満たしていると思われる。

10

【0111】

(4) 伝染性紅斑患者血清を用いた抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体の経時的变化の検討  
実施例 5 - (1) 記載の抗原固相マイクロプレートを用い、実施例 5 - (2) 記載のエンザイムイムノアッセイ法で、伝染性紅斑患者血清の抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体の経時的变化を調べた(図 18)。なお、V P - 1 は 5  $\mu$ g / ml で、V P - 2 は 10  $\mu$ g / ml で、M i x は V P - 1 を 5  $\mu$ g / ml、V P - 2 を 10  $\mu$ g / ml で固相した。

【0112】

その結果、V P - 1、V P - 2 抗原に対する I g G 抗体は共に出現するが、V P - 1 抗原に対する I g G 抗体の方が、V P - 2 抗原に対する I g G 抗体より抗体量の持続性は長いことが分かった。

20

【0113】

ところで、V P - 2 抗原のタンパク質のコード領域は、V P - 1 抗原の C 末端部分に完全に含まれている。そこで、以前よりヒトパルボウイルスの抗体検出には、V P - 1 抗原のみで十分可能であると思われていた。しかし、V P - 1 と V P - 2 抗原は免疫学的な反応性に違いがあることが分かり、かつ I g G 抗体量の持続性にも違いがあることが分かり、ヒトパルボウイルスのより確実な診断には、V P - 1 抗原のみを用いたエンザイムイムノアッセイではなく、V P - 2 抗原も加えたエンザイムイムノアッセイが必要であることが分かった。即ち V P - 1 及び V P - 2 抗原混合系の方が V P - 1 または V P - 2 抗原単独系よりもヒトパルボウイルスに対する I g G 抗体の検出率は高くなることが判明した。

30

【実施例 6】

【0114】

大腸菌発現抗原 V P - 1、V P - 2 抗原を用いた抗ヒトパルボウイルス I g M 抗体検出  
(1) 抗ヒトパルボウイルス構造タンパク質 V P - 1、V P - 2 抗体に対するパーオキシダーゼ標識

実施例 2 - (6) に記載の大腸菌で発現された V P - 1、V P - 2 抗原各々 200  $\mu$ g/ml 1ml と完全アジュバント (D i f c o 社製) 1ml を等量混合し、エマルジョンを作製して、モルモットに免疫した。ついで不完全アジュバント (D i f c o 社製) 1ml を前述の抗原溶液と等量混合しエマルジョンを作製して 2 回追加免疫した。追加免疫した後、モルモットを全採血した。その血液を血清分離し、硫酸分画後、50mM Tris-HCl (pH7.6) で 4、一晚透析した。次ぎに 50mM Tris-HCl (pH7.6) で平衡化した D E A E セファロースクロマトグラフィーにかけ、U V 波長 280 nm でモニタリングし、O. D. のピークを集めて、D E A E 精製 I g G 抗体画分とした。

40

【0115】

この I g G 抗体画分を過ヨース酸改良法 [酵素免疫測定法, 2: 91 (1982)] でパーオキシダーゼ標識した。即ちパーオキシダーゼ 4mg/ml になるように蒸留水で溶解した。ついで、0.1M 過ヨース酸ナトリウム 0.2ml を加え、室温で約 20 分反応させ、1mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) で一晚透析した。透析後、0.2M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.5)

50

を0.02ml加え、pH9-9.5 にすると同時に前記述で精製した I g G 抗体を8mg 加えた。

【0116】

室温で約2時間反応させ、4mg/ml 水酸化ホウ素ナトリウムを0.1ml 加え、4 で約2時間反応させた。反応後、10mM リン酸バッファーを用いてセファクリルS-200によるゲル濾過を行い、UV波長280nmでモニタリングしてパーオキシダーゼ標識抗体画分を集めた。

【0117】

(2) 伝染性紅斑流行時の血清88検体を用いた抗ヒトパルボウイルス I g M 抗体検出  
抗ヒト I g M モノクローナル抗体 (M I L S 社製) を50mM 炭酸バッファー (pH9.5) で500~1000倍に希釈し、ヌンク社製ポリスチレン平型分割マイクロプレート (高結合タイプ) に100 µl/ウェル 分注し、4、18時間以上静置した。静置後、マイクロプレートを0.05% Tween20 含む5mM PBS 200 µl/ウェルで3~4回洗浄後、0.5% BSAと0.05% Tween20 含む5mM PBS 200 µl/ウェル加えて4、一晩静置し、抗ヒト I g M モノクローナル固相マイクロプレートを作製した。ついで、この抗ヒト I g M モノクローナル抗体固相マイクロプレートを用いて、抗ヒトパルボウイルス I g M 抗体検出試薬を試作した。

10

【0118】

次に、この試作した抗ヒトパルボウイルス I g M 抗体検出試薬を用いて、伝染性紅斑流行時の血清88検体を用いた抗ヒトパルボウイルス I g M 抗体検出を行った。前記述の抗原固相マイクロプレートウェル中のプレート保存液を除き、ついで、伝染性紅斑患者血清を0.2% BSAと0.05% Tween20 含む10mM PBSで200倍に希釈し、その100 µl を前記述の抗ヒト I g M モノクローナル抗体固相マイクロプレートに100 µl/ウェル加え、室温 (15~25) で約1時間反応させた。反応後、0.05% Tween20 含む5mM PBS 200 µl/ウェルで3~4回洗浄した。ついで、前記述で精製した完全長のヒトパルボウイルス構造タンパク質VP-1、VP-2を0.5% BSAと0.05% Tween20 を含む5mM PBS で5 µg/ml濃度に希釈し100 µl/ウェル加え、室温で約1時間反応させた。反応後、0.05% Tween20 を含む5mM PBS 200 µl/ウェルで3~4回洗浄した。0.5% BSAと0.05% Tween20 を含む5mM PBS で2000~5000倍に希釈した前記述、実施例5-(1)のVP-1、VP-2抗原に対するパーオキシダーゼ標識モルモット抗体を100 µl/ウェル加え、室温で約1時間反応させた。反応後、0.05% Tween20 を含む5mM PBS 200 µl/ウェルで3~4回洗浄した。洗浄後、3.3mg/ml O-フェニレンジアミンを含む0.1M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH5.0) に、終濃度0.02%の過酸化水素水を加えた基質液を100 µl/ウェル加えて室温で約30分間反応させた。反応後、1.5N硫酸を100 µl/ウェル加えて反応を停止させ、マイクロプレート用比色計で主波長492nm、副波長630nmを用いて各ウェルのO.D. 値を測定した (表7)。

20

30

【0119】

表7 伝染性紅斑患者血清を用いた大腸菌発現抗原VP-1抗原による I g M 抗体検出

		V P - 1	
		+	-
ウイルス粒子	+	8	4
	-	1	75

40

【0120】

その結果、伝染性紅斑患者血清より精製したヒトパルボウイルス粒子を用いた抗ヒトパルボウイルス I g M 抗体検出エンザイムイムノアッセイと比較したところ、検出感度がやや低いものの特異性は高かった。

【0121】

50

従って、本発明である大腸菌で発現させた構造タンパク質は、抗ヒトパルボウイルス I g M 抗体検出に有用である事が分かった。

【実施例 7】

【0122】

バキュロウイルス発現蛋白 Empty particle を用いた抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体検出

(1) バキュロウイルス発現蛋白 Empty particle 固相プレートの作製

実施例 4 - (3) に記載のバキュロウイルス発現蛋白 Empty particle を 10 mM P B S (pH 7.2) で各々 0.1 ~ 10  $\mu$ g/ml 濃度に希釈し、ポリスチレン平型マイクロプレート(ヌンク社製)に 100  $\mu$ g/ウェルで分注し、4 で 1 ~ 2 日間静置した。1 ~ 2 日間静置したマイクロプレートを最終濃度 0.05% Tween 20 を含む P B S 200  $\mu$ l/ウェルで 3 ~ 4 回洗浄後、最終濃度 0.05% 牛血清アルブミン(BSA)と 0.05% Tween 20 を含む 10 mM P B S 200  $\mu$ l/ウェル加えて 4 一晚静置し、バキュロウイルス発現抗原 Empty particles 固相マイクロプレートを作製した。

10

【0123】

(2) 伝染性紅斑患者血清 88 検体を用いた抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体検出

前記述の抗原固相マイクロプレートウェル中のプレート保存液を除いた後、伝染性紅斑患者血清を 0.5% BSA と 0.05% Tween 20 を含む 10 mM P B S (pH 7.2) で 200 倍に希釈し、その 100  $\mu$ l を抗原固相マイクロプレートのウェルに加え、室温(15 ~ 25 )で約 1 時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20 を含む 5 mM P B S 200  $\mu$ l/ウェルで 3 ~ 4 回洗浄した。ついで、0.05% Tween 20 を含む 5 mM P B S で約 20000 ~ 40000 倍に希釈した抗ヒト I g G ヤギパーオキシダーゼ標識抗体(MBL社)を 100  $\mu$ l/ウェル加え、室温で約 1 時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20 を含む 5 mM P B S 200  $\mu$ l/ウェルで 3 ~ 4 回洗浄した。洗浄後、3.3 mg/ml の O-フェニレンジアミン含む 0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.0)に、0.02% 過酸化水素水を加えた基質液を 100  $\mu$ l/ウェル加えて室温で約 30 分間反応させた。反応後、1.5 N 硫酸を 100  $\mu$ l/ウェル加えて反応を停止させ、マイクロプレート用比色計を用いて主波長 492 nm、副波長 630 nm で各ウェルの O. D. 値を測定した(表 8)。

20

30

【0124】

表 8 伝染性紅斑患者血清 88 検体を用いた抗ヒトパルボウイルス I g G 抗体検出

	バキュロウイルス Empty particle	
	+	-
ウイルス 粒子	54	0
ウイ ルス 粒 子	0	34

40

【0125】

この結果より、伝染性紅斑患者血清中より精製したヒトパルボウイルス粒子を用いた I g G 抗体検出エンザイム免疫アッセイとバキュロウイルス発現蛋白 Empty particle を用いた I g G 抗体検出エンザイム免疫アッセイの成績を比較したところ、陽性一致率が 100% で陰性一致率も 100% であった。

以上より、バキュロウイルス発現蛋白 Empty particle を用いた I g G 抗体検出エンザイム免疫アッセイは、検出感度及び特異性ともに、文献など他のヒトパルボウイルス I g G 抗体検出エンザイム免疫アッセイよりも高いので、より確実な I g G 抗体検出が可能と成った。

50

## 【実施例 8】

## 【0126】

バキュロウイルス発現蛋白 Empty particlesを用いた抗ヒトパルボウイルス Ig M 抗体検出

(1) 抗バキュロウイルス発現蛋白 Empty particles 抗体に対するパーオキシダーゼ標識

実施例 4 - (3) に記載のバキュロウイルス発現蛋白 Empty particles 各々 10 ~ 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を 1 ml と完全アジュバント (Difco 社製) 1 ml を等量混合し、エマルジョンを作製して、モルモットに免疫した。ついで不完全アジュバント (Difco 社製) 1 ml を前述の抗原溶液と等量混合しエマルジョンを作製して 2 回追加免疫した。追加免疫した後、モルモットを全採血した。その血液を血清分離し、硫酸分画後、50 mM Tris - HCl (pH 7.6) で 4 晩、一晚透析した。次に 50 mM Tris - HCl (pH 7.6) で平衡化した DEAE セファロースクロマトグラフィーにかけ、UV 波長 280 nm でモニタリングし、O. D. のピークを集めて、DEAE 精製 Ig G 抗体画分とした。

10

## 【0127】

この Ig G 抗体画分を過ヨウ素酸改良法 [酵素免疫測定法, 2: 91(1982)] でパーオキシダーゼ標識した。即ちパーオキシダーゼ 4 mg / ml になるように蒸留水で溶解した。ついで、0.1 M 過ヨウ素酸ナトリウム 0.2 ml を加え、室温で約 20 分反応させ、1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で一晚透析した。透析後、0.2 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を 0.02 ml 加え、pH 9 ~ 9.5 にすると同時に前記述で精製した Ig G 抗体を 8 mg 加えた。

20

## 【0128】

室温で約 2 時間反応させ、4 mg / ml 水酸化ホウ素ナトリウムを 0.1 ml 加え、4 晩で約 2 時間反応させた。反応後、10 mM リン酸バッファーを用いてセファクリル S - 200 によるゲル濾過を行い、UV 波長 280 nm でモニタリングしてパーオキシダーゼ標識抗体画分を集めた。

## 【0129】

(2) 伝染性紅斑流行時の血清 88 検体を用いた抗ヒトパルボウイルス Ig M 抗体検出

30

抗ヒト Ig M モノクローナル抗体 (MILS 社製) を 50 mM 炭酸バッファー (pH 9.5) で 500 ~ 1000 倍に希釈し、ヌンク社製ポリスチレン平型分割マイクロプレート (高結合タイプ) に 100  $\mu\text{l}$  / ウェル分注し、4 晩、18 時間以上静置した。静置後、マイクロプレートを 0.05 % Tween 20 含む 5 mM PBS 200  $\mu\text{l}$  / ウェルで 3 ~ 4 回洗浄後、0.5 % BSA と 0.05 % Tween 20 含む 5 mM PBS 200  $\mu\text{l}$  / ウェル加えて 4 晩、一晚静置し、抗ヒト Ig M モノクローナル固相マイクロプレートを作製した。ついで、この抗ヒト Ig M モノクローナル抗体固相マイクロプレートを用いて、抗ヒトパルボウイルス Ig M 抗体検出試薬を試作した。

## 【0130】

次に、この試作した抗ヒトパルボウイルス Ig M 抗体検出試薬を用いて、伝染性紅斑流行時の血清 88 検体を用いた抗ヒトパルボウイルス Ig M 抗体検出を行った。はじめに、前記述の抗ヒト Ig M モノクローナル抗体固相マイクロプレートウェル中のプレート保存液を除いた。ついで、伝染性紅斑患者血清を 0.2 % BSA と 0.05 % Tween 20 含む 10 mM PBS で 200 倍に希釈し、前記述の抗ヒト Ig M モノクローナル抗体固相マイクロプレートに 100  $\mu\text{l}$  / ウェル加え、室温 (15 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$ ) で約 1 時間反応させた。反応後、0.05 % Tween 20 含む 5 mM PBS 200  $\mu\text{l}$  / ウェルで 3 ~ 4 回洗浄した。ついで、前記述で精製したバキュロウイルス発現抗原 Empty particles を 0.5 % BSA と 0.05 % Tween 20 含む 5 mM PBS で 0.05 ~ 5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度に希釈し、それを 100  $\mu\text{l}$  / ウェル加え、室温で約 1 時間反応させた。反応後、0.05 % Tween 20 を含む 5 mM PBS 200  $\mu\text{l}$  / ウェルで 3 ~ 4 回洗浄

40

50

した。0.5% BSAと0.05% Tween 20を含む5 mM PBSで2000~20000倍に希釈した前記述、実施例8-(1)のパキユロウイルス発現抗原 Empty particle に対するパーオキシダーゼ標識モルモット抗体を100  $\mu$ l / ウェル加え、室温で約1時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20を含む5 mM PBS 200  $\mu$ l / ウェルで3~4回洗浄した。洗浄後、3.3 mg / ml O-フェニレンジアミンを含む0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) に、終濃度0.02%の過酸化水素水を加えた基質液を100  $\mu$ l / ウェル加えて室温で約30分間反応させた。反応後、1.5 N 硫酸を100  $\mu$ l / ウェル加えて反応を停止させ、マイクロプレート用比色計で主波長492 nm、副波長630 nm を用いて各ウェルのO.D. 値を測定した(表9)

10

## 【0131】

表9 伝染性紅斑流行時の血清88検体を用いた抗ヒトパルボウイルスIgM抗体検出

		パキユロウイルス Empty particles	
		+	-
ウイルス 粒子	+	12	0
	-	0	76

20

## 【0132】

この結果より、伝染性紅斑患者血清中より精製したヒトパルボウイルス粒子を用いたIgM抗体検出エンザイム免疫アッセイとパキユロウイルス発現蛋白 Empty particle を用いたIgM抗体検出エンザイム免疫アッセイの成績を比較したところ、陽性一致率が100%で陰性一致率も100%であった。

## 【0133】

以上より、パキユロウイルス発現蛋白 Empty particle を用いたIgM抗体検出エンザイム免疫アッセイは、検出感度及び特異性ともに、文献などのヒトパルボウイルス抗体検出エンザイム免疫アッセイよりも高いので、より確実な抗体検出が可能となった。

30

## 【実施例9】

## 【0134】

ヒトパルボウイルス抗原検出

(1) VP-1、VP-2 抗原に対する抗体固相マイクロプレートの作製

実施例6-(1)記載の抗ヒトパルボウイルスモルモット抗体を50 mM 炭酸バッファー (pH 9.5) で、0.1~5.0  $\mu$ l / ml に希釈した。希釈後、ポリスチレン平型マイクロプレート(ヌンク社製)に100  $\mu$ l / ウェル分注し、4 で18時間以上静置した。静置後、マイクロプレートを0.05% Tween 20を含む5 mM PBS 200  $\mu$ l / ウェルで3~4回洗浄後、0.5% BSAと0.05% Tween 20を含む5 mM PBSを200  $\mu$ l / ウェル加えて4 一晚静置し、抗体固相マイクロプレートを作製した。

40

## 【0135】

(2) 伝染性紅斑流行時の血清を用いたヒトパルボウイルス抗原検出

次に、抗体固相プレートを用いて、伝染性紅斑流行時の血清によるヒトパルボウイルス抗原検出を行った。前記述の抗体固相マイクロプレートウェル中のプレート保存液を除き、ついで、伝染性紅斑流行時の血清を0.2% BSAと0.05% Tween 20を含む10 mM PBSで200倍に希釈し、前記述の抗ヒトパルボウイルス抗体固相マイクロプレートに100  $\mu$ l / ウェル加え、室温(15 ~ 25 )で約1時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20を含む5 mM PBS 200  $\mu$ l / ウェルで3~4回洗浄した。

50

## 【0136】

0.05% BSAと0.05% Tween 20を含む5mM PBSで2000～5000倍に希釈したVP-1、VP-2抗原に対するパーオキシダーゼ標識モルモット抗体を100 $\mu$ l/ウェル加え、室温で約1時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20を含む5mM PBS 200 $\mu$ l/ウェルで3～4回洗浄した。

## 【0137】

洗浄後、3.3mg/ml O-フェニレンジアミンを含む0.1M クエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.0)に、終濃度0.02%の過酸化水素水を加えた基質液を100 $\mu$ l/ウェル加えて室温で約30分間反応させた。反応後、1.5N 硫酸を100 $\mu$ l/ウェル加えて反応を停止させ、マイクロプレート用比色計で主波長492nm、副波長630nmを用いて各ウェルのO.D.値を測定した(表10)。

## 【0138】

表10 伝染性紅斑患者血清を用いたVP-1、VP-2抗原に対する抗体固相プレートによるヒトパルボウイルス抗原の検出

血清番号	ヒトパルボウイルスモノクローナル抗体	抗VP-1モルモット抗体
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
13	+	+

## 【0139】

抗ヒトパルボウイルスモノクローナル抗体固相マイクロプレートを用いたエンザイムイムノアッセイ〔第37回日本ウイルス学会総会抄録(1989)〕を陽性コントロールとした。

## 【0140】

その結果、VP-1、VP-2抗原で免疫した抗ヒトパルボウイルス抗体を用いたヒトパルボウイルス抗原検出は有用であることが分かった。

## 【実施例10】

## 【0141】

PCR法によるヒトパルボウイルス遺伝子の検出

伝染性紅斑流行時の血清を用い、実施例1-(1)記載の方法によりヒトパルボウイルスDNAを抽出した。次に下記のDNAプライマー群1及びDNAプライマー群2の中からヒトパルボウイルスのPCR増幅プライマー-DNA対(D-4とU-2及びD-1とU-4)を用いて実施例1-(2)記載の方法に従い、ヒトパルボウイルス遺伝子領域を増幅した。なお図1に4種類のプライマーの位置を示す。

## 【0142】

## DNAプライマー群1

D-1: GCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATC  
D-4: TTCCCGCCTTATGCAAATGGGCAGC

## DNAプライマー群2

U-2: GTGTTAGGCTGTCTTATAGGTACA  
U-4: CTTGTATTCATGGTCTACTAAC

D-4とU-2のプライマーで増幅させた場合、4.6Kbの増幅断片が得られ、一方、D-1とU-4のプライマーで増幅させた場合、2.6Kbの増幅断片が得られた(表11)。

## 【0143】

表11 伝染性紅斑患者血清を用いたPCRによるヒトパルボウイルスの検出

10

20

30

40

50

	E I A	P C R	
		(D-4)-(U-2)	(D-1)-(U-2)
抗原陽性血清	+	+	+
抗原陰性血清	-	-	-
血清番号 8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
13	+	+	+

10

## 【0144】

表11の結果より、ヒトパルボウイルスDNA断片の増幅と実施例9-(2)のエンザイムイムノアッセイ抗原検出の結果が一致していた事により、ヒトパルボウイルス遺伝子の塩基配列をもとに、DNAプライマーを作製し、PCR法で増幅させたDNA断片を検出することで、ヒトパルボウイルス遺伝子の検出が出来ることを見いだした。

## 【0145】

以下に明細書及び図中のポリペプチド及び塩基配列等の符号及び記号は以下の通りであるほか、慣用的に当該分野で用いられるものである。

## 【0146】

20

表12

## アミノ酸略号

アミノ酸	略号	
	3文字	1文字
アスパラギン	A s n	N
アスパラギン酸	A s p	D
アラニン	A l a	A
アルギニン	A r g	R
イソロイシン	I l e	I
グリシン	G l y	G
グルタミン	G l n	Q
グルタミン酸	G l u	E
システイン	C y s	C
スレオニン	T h r	T
セリン	S e r	S
チロシン	T y r	Y
トリプトファン	T r p	W
バリン	V a l	V
ヒスチジン	H i s	H
フェニールアラニン	P h e	F
プロリン	P r o	P
メチオニン	M e t	M
リジン	L y s	K
ロイシン	L e u	L

30

40

## 【0147】

表13

## 核酸略号

核酸	略号
アデニン	A
チミン	T
グアニン	G
チミン	T

## 【0148】

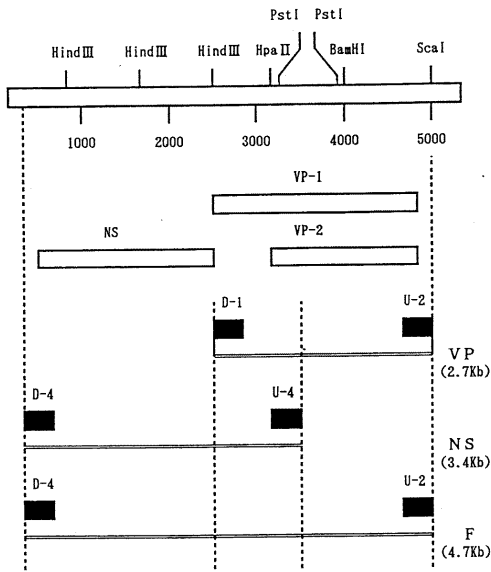
- HPV : ヒトパルポウイルス  
DNA : デオキシリボ核酸  
RNA : リボ核酸 10  
EDTA : エチレンジアミン四酢酸  
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム  
IPTG : イソプロピル - D - ガラクトシド  
Xgal : 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトシド PCR  
: ポリメラーゼ・チェーン・リアクション  
Ap<sup>r</sup> : アンピシリン耐性遺伝子  
LacZ : - ガラクトシダーゼ遺伝子  
VP - 1 : ヒトパルポウイルス構造タンパク質遺伝子 VP - 1  
VP - 2 : ヒトパルポウイルス構造タンパク質遺伝子 VP - 2  
NS : ヒトパルポウイルス非構造遺伝子 20  
N' : Nタンパク質のN末端の33個のアミノ酸に対応する ファージNタンパク質遺伝子  
Ptac : Tacプロモーター  
PL : PLプロモーター

## 【図面の簡単な説明】

## 【0149】

- 【図1】本発明の遺伝子のクローニング領域を示した概略図である。  
【図2】本発明の遺伝子の塩基配列及びその遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列の最初の部分を示したものである。  
【図3】図2の続きの配列を示す図である。 30  
【図4】図3の続きの配列を示す図である。  
【図5】図4の続きの配列を示す図である。  
【図6】図5の続きの配列を示す図である。  
【図7】図6の続きの配列を示す図である。  
【図8】図7の続きの配列を示す図である。  
【図9】図8の続きの配列を示す図である。  
【図10】図9の続きの配列を示す図である。  
【図11】プラスミドpPLN-MCSの構築の模式図である。  
【図12】プラスミドpVP200の構築の模式図である。  
【図13】VP - 1発現ベクター作製時の部位特異的変異を示した模式図である。 40  
【図14】プラスミドpVP100の構築の模式図である。  
【図15】プラスミドpVP300の構築の模式図である。  
【図16】プラスミドpAcVP1、pAcVP2の構築の模式図である。  
【図17】バキュロウイルスによって産生されたウイルス粒子様構造物の電子顕微鏡写真である。  
【図18】伝染性紅斑患者のVP - 1、VP - 2に対するIgG抗体の経時変化を示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】

```

10      20      30      40      50      60
TTCCCGCCTATGCAAAATGGGCGAGCCATTTTAAAGTGTTTACTATAATTTATTGGTCAG
70      80      90      100     110     120
TTTTGTAACGGTAAAAATGGGCGGAGCGTAGCGGGGACTACAGTATATATAGCAGCGCA
130     140     150     160     170     180
CTGCCGACGCTCTTCTTCTGGGCTGCTTTTCTGGGACTTCTGTGCTGTTTTTGTGA
190     200     210     220     230     240
GCTAACTAACAGGTATTATACTACTTGTAAACATACTAACATGGAGCTTTAGAGGGG
M E L F R G
NS →
250     260     270     280     290     300
TTCTCAAGTTTCTCTAATGTTCTGGACTGTGCTAACGATAATGGTGGCTCTTTAC
V L Q V S S N V L D C A N D N W W C S L
310     320     330     340     350     360
TGGATTTAGACACTTCTGACTGGGAACCACTAECTACTAACAGACTAATGGCAATAT
L D L D T S D W E P L T H T N R L M A I
370     380     390     400     410     420
ACTTAAGCAGTGTGGCTTCTAAGCTTGACTTTACGGGGGCCACTAGCAGGGTCTTGT
Y L S S V A S K L D F T G G P L A G C L
430     440     450     460     470     480
ACTTTTTCAAGTAGAATGTAACAAATTTGAAGAAGGCTATCATATCATGTGGTTATTG
Y F F Q V E C N K F E E G Y H I H V V I
490     500     510     520     530     540
GGGGCCAGGGTAAATCCCGAAACCTCACTGTGTGTAGAGGGGTATTTAATAATG
G G P G L N P R N L T V C V E G L F N N
550     560     570     580     590     600
TACTTTACCTTGTAACTGAAAATGGAAGCTAAAATTTTGCAGGATGACTACAA
V L Y H L V T E N V K L K F L P G M T T
610     620     630     640     650     660
AAGCAAACTTTAGAGATGGAGAGCATTATAGAAAATTTAAGAAAAAATAC
K G K Y F R D G E Q F I E N Y L M K K I
670     680     690     700     710     720
CTTTAAATGTTGATGGTGTACTAATATTGATGATATATAGATACTGTATTCTG
P L N V V W C V T N I D G Y I D T C I S

```

【 図 3 】

```

730     740     750     760     770     780
CTACTTTAGAAAGGGAGCTGCGCATGCCAAGAAACCCCGCATACCACAGCCATAAATG
A T F R R G A C H A K K P R I T T A I N
790     800     810     820     830     840
ATACTAGTAGTGCTGGGAGTCTAGCGGCACAGGGCAGAGTTGTGCCATTTAATG
D T S S D A G E S S G T G A E V V P P N
850     860     870     880     890     900
GGAAAGGAAGCTAAGGCTAGCAATAAGTTTCAAACTATGTTAACTGGCTGTGAAAACA
G K G T K A S I K F Q T M V N W L C E N
910     920     930     940     950     960
GAGTGTTCAGAGGATAAGTGGAACTAGTGTACTTTAAACAGTACACTTTACTAAGCA
R V F T E D K W K L V D F N Q Y T L L S
970     980     990     1000    1010    1020
GTAGTCACAGTGGAAAGTTTCAAAATCAAAAGTCAAACTAGCAATTTAATAAGCAA
S S H S G S F Q I Q S A L K L A I Y K A
1030    1040    1050    1060    1070    1080
CTAATTTAGTGCCTACTAGCACATTTTTATTGCATACAGACTTGAGCAGGTTATGTGTA
T N L V P T S T F L L H T D F E Q V M C
1090    1100    1110    1120    1130    1140
TTAAAGCAATAAAAATGTTAAATGTTACTTTGTGAAAATATGACCCCTATTGGTGG
I K D N K I V K L L L C Q N Y D P L L V
1150    1160    1170    1180    1190    1200
GGCAGCATGTGTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGCCAAAAAATACTGTGGTTTTT
G Q H V L K W I D K K C G K K N T L W F
1210    1220    1230    1240    1250    1260
ATGGGCGCCAAGTACAGAAAAACAACCTGGCAATGGCCATTGCTAAAAGTGTCCAG
Y G P P S T G K T N L A M A I A K S V P
1270    1280    1290    1300    1310    1320
TATATGGCATGGTTAACTGGAATAAATGAAAATTTCCATTAATGATGTAGCAGGAAAA
V Y G M V N W N N E N F P F N D V A G K
1330    1340    1350    1360    1370    1380
GCTTGGTGGTCTGGGATGAAGTATTATTAAGTCTACATTTGTAGAGCTGCAAAAAGCA
S L V V W D E G I I K S T I V E A A K A
1390    1400    1410    1420    1430    1440
TTTTAGCGGGCAACTACCGGGTAGATCAAAAATGCGTGAAGTGTAGCTGTGCTGCTG
I L G G Q P T R V D Q K M R G S V A V P

```

【 図 4 】

```

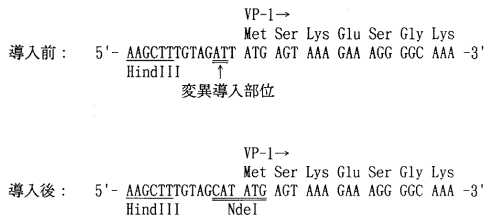
1450    1460    1470    1480    1490    1500
GAGTACCTGTGGTTATAACCAAGCAATGGTGATATTACTTTGTAAAGCGGGAACACTA
G V P V V I T S N G D I T F V V S G N T
1510    1520    1530    1540    1550    1560
CAACAAGTACATGCTAAAGCCTAAAAGCGCCATGGTAAAGTTAACTTTACTGTAA
T T T V H A K A L K E R M V K L N F T V
1570    1580    1590    1600    1610    1620
GATGCAGCCCTGACATGGGTTACTAACAGAGGCTGATGACACAGCTGGCTACATGTT
R C S P D M G L L T E A D V Q Q W L T W
1630    1640    1650    1660    1670    1680
GTAATGCACAAAGCTGGGACCCTATGAAAACCTGGCAATAAAGTAACTTTGATTTCC
C N A Q S W D H Y E N W A I N Y T F D F
1690    1700    1710    1720    1730    1740
CTGGAATTAATGCAGATGCCCTCCACCCAGCCTCCAAACCCCAATGTCAACAGACA
P G I N A D A L H P D L Q T T P I V T D
1750    1760    1770    1780    1790    1800
CCAGTATCAGCAGCAGTGGTGAAGCTCTGAAGAAGCTCAGTGAAGCAGCTTTTITA
T S I S S S G G E S S F F
1810    1820    1830    1840    1850    1860
ACCTCATACCCCGGCGCTGGAACACTGAAAACCCCGGCTCTAGTACGCCCATCCCGG
N L I T P G A W N T E T P R S S T P I P
1870    1880    1890    1900    1910    1920
GGACAGTTCAGGAGAATCATTTGCGGAAGCCAGTTCTCCCGAAGTTGTAGCTGCTAT
G T S S G E S F V G S P V S S E V V A A
1930    1940    1950    1960    1970    1980
CGTGGGAAGAAGCCTCTACACACCTTTGGCAGACCACTTCTGAACTGTAGTTGGGG
S W E E A F Y T P L A D Q F R E L L V G
1990    2000    2010    2020    2030    2040
TTGATTAATGTTGGGACGGTAAAGGGTTTACCTGTGTGTGTGCAACATAATAACA
V D Y V W D G V R G L P V C C V Q H I N
2050    2060    2070    2080    2090    2100
ATAGTGGGAGGCTTGGGACTTTGCCCATTCATTAATGAGGGCTTGGTATAATG
N S G G G L G L C P H C I N V G A W Y N
2110    2120    2130    2140    2150    2160
GATGGAAATTCGAGAATTAACCCAGATTTGCGGGTGTAGCTGCCATGGGAGCTT
G W K F R E F T P D L V R C S C H V G A

```

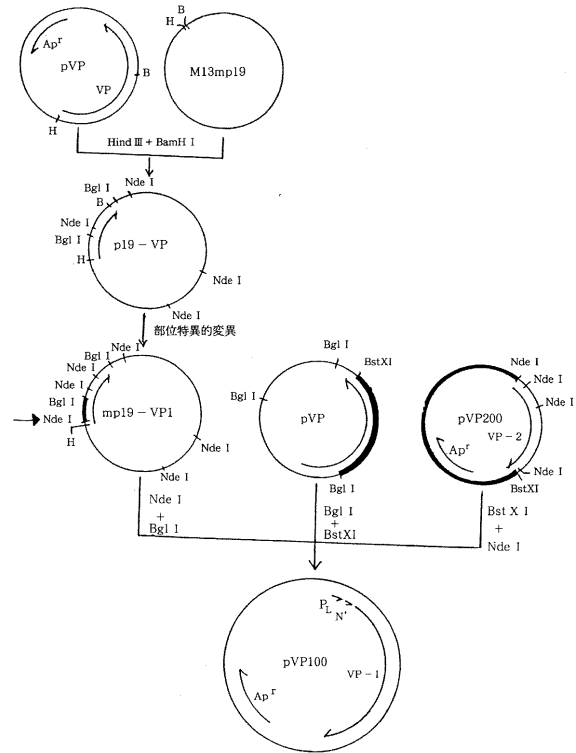




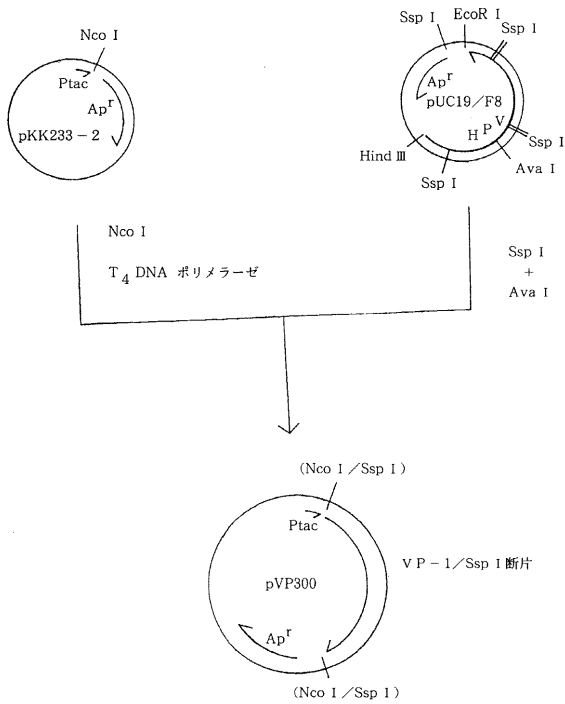
【 図 1 3 】



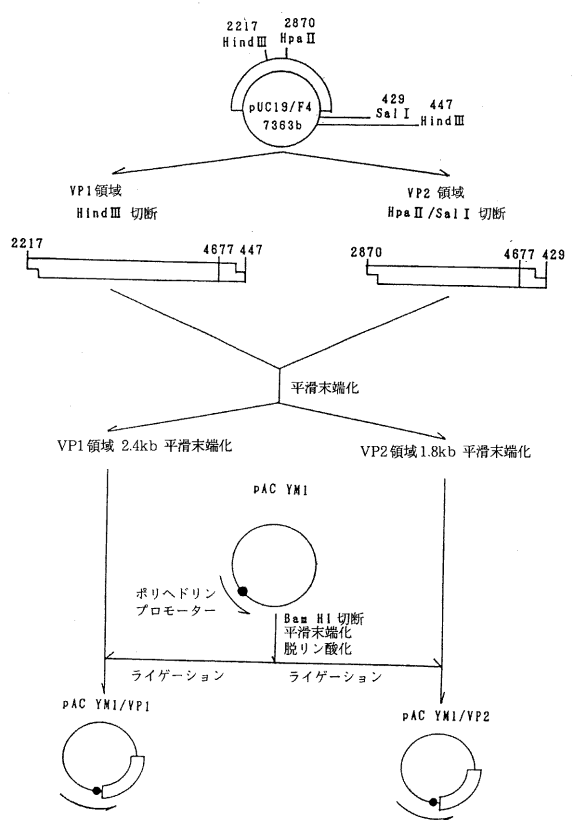
【 図 1 4 】



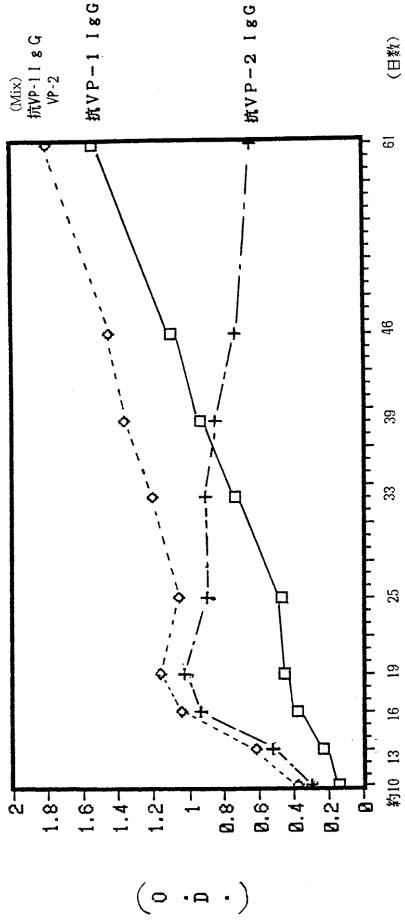
【 図 1 5 】



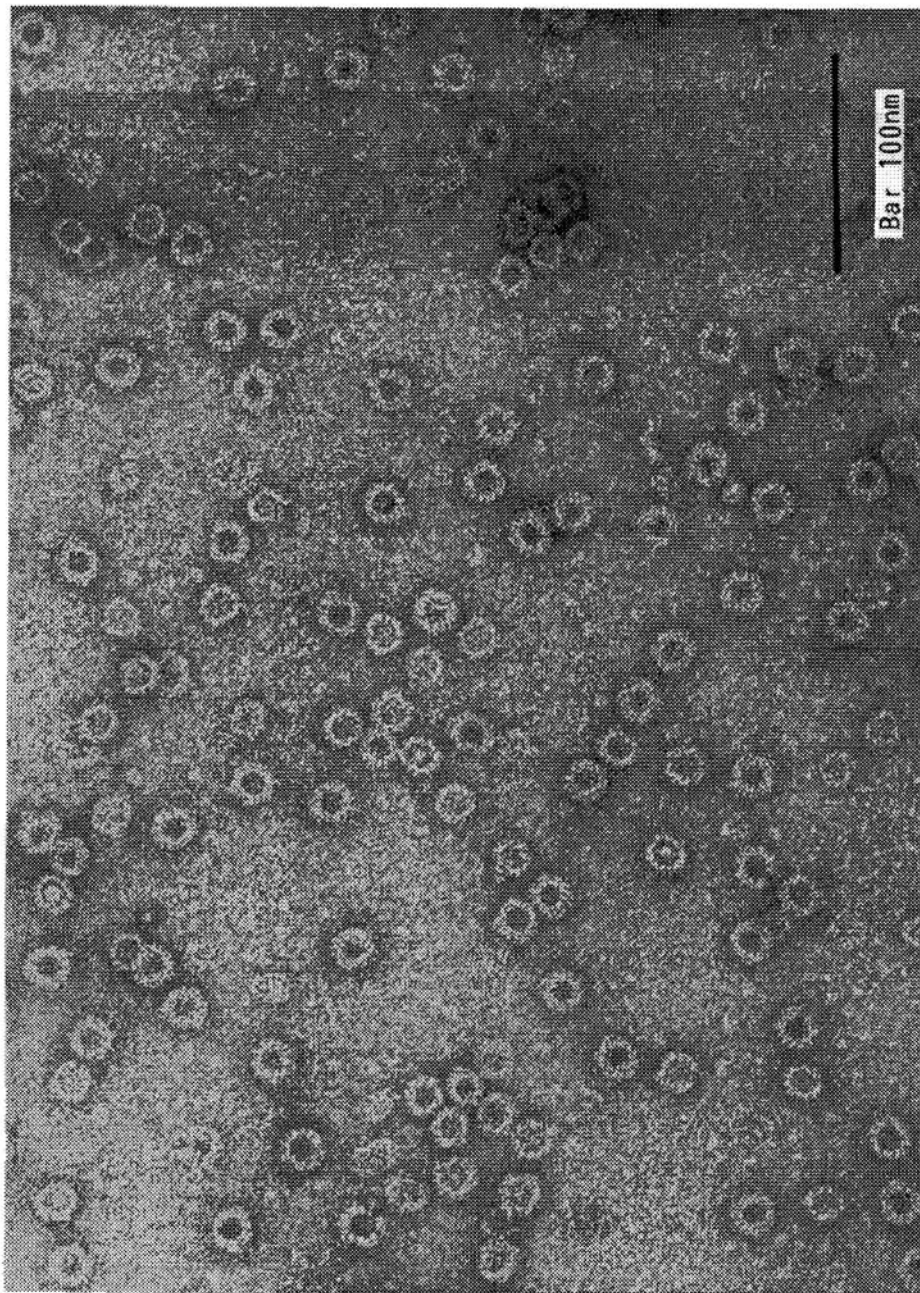
【 図 1 6 】



【 図 1 8 】



【図 17】



## 【手続補正書】

【提出日】平成16年2月23日(2004.2.23)

## 【手続補正2】

【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】

下記のDNAプライマー群1及びDNAプライマー群2の中からそれぞれ少なくとも1種ずつ選ばれる1対のオリゴヌクレオチドを用いてPCR法により下記式(1)で示される塩基配列を有する遺伝子を増幅し、該増幅された遺伝子を検出することから成る、検体中のヒトバルボウウイルスの検出方法。

DNAプライマー群1

D-1: GCTGCCATGTGGGAGCTTCTAATC

D-4: TTCCCGCCTTATGCAAATGGGCAGC

## D N A プライマー群 2

U-2: GTGTTAGGCTGTCTTATAGGTACA

U-4: CTTGTATTCATGGTCTACTAAC

式 (1)

10	20	30	40	50	60
TTCCCGCCTT	ATGCAAATGG	GCAGCCATTT	TAAGTGTTTT	ACTATAATTT	TATTGGTCAG
70	80	90	100	110	120
TTTTGTAAACG	GTTAAAATGG	GCGGAGCGTA	GGCGGGGACT	ACAGTATATA	TAGCACGGCA
130	140	150	160	170	180
CTGCCGCAGC	TCTTTCTTTC	TGGGCTGCTT	TTTCTGGAC	TTTCTTGCTG	TTTTTTGTGA
190	200	210	220	230	240
GCTAACTAAC	AGGTATTTAT	ACTACTTGTT	AACATACTAA	CATGGAGCTA	TTTAGAGGGG
250	260	270	280	290	300
TTCTTCAAGT	TTCTTCTAAT	GTTCTGGACT	GTGCTAACGA	TAATTGGTGG	TGCTCTTTAC
310	320	330	340	350	360
TGGATTTAGA	CACTTCTGAC	TGGGAACCAC	TAACTCATA	TAACAGACTA	ATGGCAATAT
370	380	390	400	410	420
ACTTAAGCAG	TGTGGCTTCT	AAGCTTGACT	TTACCGGGGG	GCCACTAGCA	GGGTGCTTGT
430	440	450	460	470	480
ACTTTTTTCA	AGTAGAATGT	AACAAATTTG	AAGAAGGCTA	TCATATTCAT	GTGGTTATTG
490	500	510	520	530	540
GGGGGCCAGG	GTTAAATCCC	AGAAACCTCA	CTGTGTGTGT	AGAGGGGTTA	TTTAATAATG
550	560	570	580	590	600
TACTTTATCA	CCTTGTAAC	GAAAATGTGA	AGCTAAAATT	TTTGCCAGGM	ATGACTACAA
610	620	630	640	650	660
AAGGCAAATA	CTTTAGAGAT	GGAGAGCAGT	TTATAGAAAA	CTATTTAATG	AAAAAATAC
670	680	690	700	710	720
CTTTAAATGT	TGTATGGTGT	GTTACTAATA	TTGATGGATA	TATAGATACC	TGTATTTCTG
730	740	750	760	770	780
CTACTTTTAG	AAGGGGAGCT	TGCCATGCCA	AGAAACCCCG	CATTACCACA	GCCATAAATG
790	800	810	820	830	840
ATACTAGTAG	TGATGCTGGG	GAGTCTAGCG	GCACAGGGGC	AGAGGTTGTG	CCATTTAATG
850	860	870	880	890	900
GGAAAGGAAC	TAAGGCTAGC	ATAAAGTTTC	AAACTATGGT	AAACTGGCTG	TGTGAAAACA
910	920	930	940	950	960
GAGTGTTTAC	AGAGGATAAG	TGGAACTAG	TTGACTTTAA	CCAGTACACT	TTACTAAGCA
970	980	990	1000	1010	1020
GTAGTCACAG	TGGAAGTTTT	CAAATTCAAA	GTGCACTAAA	ACTAGCAATT	TATAAAGCAA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CTAATTTAGT	GCCTACTAGC	ACATTTTTAT	TGCATACAGA	CTTTGAGCAG	GTTATGTGTA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTAAAGACAA	TAAAATTGTT	AAATTGTTAC	TTTGTCAAAA	CTATGACCCC	CTATTGGTGG
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GGCAGCATGT	GTTAAAGTGG	ATTGATAAAA	AATGTGGCAA	AAAAAATACA	CTGTGGTTTT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ATGGGCCGCC	AAGTACAGGA	AAAACAAACT	TGGCAATGGC	CATTGCTAAA	AGTGTTCCAG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
TATATGGCAT	GGTAACTGG	AATAATGAAA	ACTTTCCATT	TAATGATGTA	GCAGGGAAAA

1330	1340	1350	1360	1370	1380
GCTTGGTGGT	CTGGGATGAA	GGTATTATTA	AGTCTACAAT	TGTAGAAGCT	GCAAAAAGCCA
1390	1400	1410	1420	1430	1440
TTTTAGGCGG	GCAACCTACC	AGGGTAGATC	AAAAAATGCG	TGGAAGTGTA	GCTGTGCCTG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GAGTACCTGT	GGTTATAACC	AGCAATGGTG	ATATTACTTT	TGTTGTAAGC	GGGAACACTA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
CAACAACCTGT	ACATGCTAAA	GCCTTAAAAG	AGCGCATGGT	AAAGTTAAAC	TTTACTGTAA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
GATGCAGCCC	TGACATGGGG	TTACTAACAG	AGGCTGATGT	ACAACAGTGG	CTTACATGGT
1630	1640	1650	1660	1670	1680
GTAATGCACA	AAGCTGGGAC	CACTATGAAA	ACTGGGCAAT	AAACTACACT	TTTGATTTCC
1690	1700	1710	1720	1730	1740
CTGGAATTAA	TGCAGATGCC	CTCCACCCAG	ACCTCCAAAC	CACCCCAATT	GTCACAGACA
1750	1760	1770	1780	1790	1800
CCAGTATCAG	CAGCAGTGGT	GGTGAAAGCT	CTGAAGAACT	CAGTGAAAGC	AGCTTTTTTA
1810	1820	1830	1840	1850	1860
ACCTCATCAC	CCCAGGCGCC	TGGAACACTG	AAACCCCGCG	CTCTAGTACG	CCCATCCCCG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
GGACCAGTTC	AGGAGAATCA	TTTGTCTGGAA	GCCCAGTTTC	CTCCGAAGTT	GTAGCTGCAT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
CGTGGGAAGA	AGCCTTCTAC	ACACCTTTGG	CAGACCAGTT	TCGTGAACTG	TTAGTTGGGG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TTGATTATGT	GTGGGACGGT	GTAAGGGGTT	TACCTGTGTG	TTGTGTGCAA	CATATTAACA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
ATAGTGGGGG	AGGCTTGGGA	CTTTGTCCCC	ATTGCATTAA	TGTAGGGGCT	TGGTATAATG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
GATGGAAATT	TCGAGAATTT	ACCCAGATT	TGGTGCGGTG	TAGCTGCCAT	GTGGGAGCTT
2170	2180	2190	2200	2210	2220
CTAATCCCTT	TTCTGTGCTA	ACCTGCAAAA	AATGTGCTTA	CCTGTCTGGA	TTGCAAAGCT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TTGTAGATTA	TGAGTAAAGA	AAGTGGCAAA	TGGTGGGAAA	GTGATGATAA	ATTTGCTAAA
2290	2300	2310	2320	2330	2340
GCTGKGTATC	AGCAATTTGT	GGAATTTTAT	GAAAAGGTTA	CTGGWACAGA	CTTAGAGCTT
2350	2360	2370	2380	2390	2400
ATTCAAATAT	TAAAAGATCA	TTATAATATT	TCTTTAGATA	ATCCCCTAGA	AAACCCATCC
2410	2420	2430	2440	2450	2460
TCTCTGTTTR	ACTTAGTTGC	TCGTATTA	AATAACCTTA	AAAACCTCTCC	AGACTTATAT
2470	2480	2490	2500	2510	2520
AGTCATCATT	TTCAAAGTCA	TGGACAGTTA	TCTGACCACC	CCCATGCCTT	ATCATCCAGT
2530	2540	2550	2560	2570	2580
AGCAGTAATG	CAGAACCTAG	AGGAGAAAAT	GCAGTATTAT	CTAGTGAAGA	CTTACACAAG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CCTGGGCAAG	TTAGCGTACA	ACTACCCGGT	ACTAACTATG	TTGGGCCTGG	TAATGAGTTA
2650	2660	2670	2680	2690	2700
CAAGCTGGGC	CCCCGCAAAG	TGCTGTTGAC	AGTGCTGCAA	GGATTCATGA	CTTTAGGTAT
2710	2720	2730	2740	2750	2760
AGCCAACCTGG	CTAAGTTGGG	AATAAATCCA	TATACTCATT	GGACTGTAGC	AGATGAAGAG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CTTTTAAAAA	ATATAAAAAA	TGAAACTGGG	TTTCAAGCAC	AAGTAGTAAA	AGACTACTTT

2830	2840	2850	2860	2870	2880
ACTTTAAAAG	GTGCAGCTGC	CCCTGTGGCC	CATTTTCAAG	GAAGTTTGCC	GGAAGTTCCC
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GCTTACMACG	CCTCAGAAAA	ATACCCAAGC	ATGACTTCAG	TTAATTCTGC	AGAAGCCAGC
2950	2960	2970	2980	2990	3000
ACTGGTGCAG	GAGGGGGGGG	CAGTAATCCT	GTCAAAAGCA	TGTGGAGTGA	GGGGGCCACT
3010	3020	3030	3040	3050	3060
TTTAGTGCCA	ACTCTGTAAC	TTGTACATTT	TCCAGACAGT	TTTTAATTCC	ATATGACCCA
3070	3080	3090	3100	3110	3120
GAGCACCATT	ATAARGTGT	TTCTCCCGCA	GCAAGTAGCT	GCCACAATGC	CAGTGGAAAA
3130	3140	3150	3160	3170	3180
GAGGCAAAGG	TTTGCACCAT	TAGTCCATA	ATGGGATACT	CAACCCCATG	GAGATATTTA
3190	3200	3210	3220	3230	3240
GATTTTAATG	CTTTAAATTT	ATTTTTTTCA	CCTTTAGAGT	TTCAGCACTT	AATTGAAAAT
3250	3260	3270	3280	3290	3300
TATGGAAGCA	TAGCTCCTGA	TGCTTTAACT	GTAACCATAT	CAGAAATTGC	TGTTAAGGAT
3310	3320	3330	3340	3350	3360
GTTACAGACA	AAACTGGAGG	GGGGGTACAG	GTTACTGACA	GCACTACAGG	GCGCCTATGC
3370	3380	3390	3400	3410	3420
ATGTTAGTAG	ACCATGAATA	CAAGTACCCA	TATGTGTTAG	GGCAAGGTCA	GGATACTTTA
3430	3440	3450	3460	3470	3480
GCCCCAGAAC	TTCCTATTTG	GGTATACTTT	CCCCCTCAAT	ATGCTTACTT	AACAGTAGGA
3490	3500	3510	3520	3530	3540
GATGTTAACA	CACAAGGAAT	TTCTGGAGAC	AGCAAAAAAT	TAGCAAGTGA	AGAATCAGCA
3550	3560	3570	3580	3590	3600
TTTTATGTTT	TGGAACACAG	TTCYTTTCAG	CTTTTAGGTA	CAGGAGGTAC	AGCAACTATG
3610	3620	3630	3640	3650	3660
TCTTATAAGT	TTCCTCCAGT	GCCCCAGAA	AATTTAGAGG	GCTGCAGTCA	ACACTTTTAT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
GAAATGTACA	ATCCCTTATA	CGGATCCCGC	TTAGGGGTCC	CTGACACATT	AGGAGGTGAC
3730	3740	3750	3760	3770	3780
CCAAAATTTA	GATCTTTAAC	ACATGAAGAC	CATGCAATTC	AGCCCCAAAA	CTTCATGCCA
3790	3800	3810	3820	3830	3840
GGGCCACTAG	TAAACTCAGT	GTCTACAAAG	GAGGGAGACA	GCTCTAATAC	TGGAGCTGGA
3850	3860	3870	3880	3890	3900
AAAGCCTTAA	CAGGCCTTAG	CACAGGTACC	TCGCAAACA	CTAGAATATC	CTTACGSCCT
3910	3920	3930	3940	3950	3960
GGGCCAGTGT	CTCAGCCATA	CCACCACTGG	GACACAGATA	AATATGTCAC	AGGAATAAAT
3970	3980	3990	4000	4010	4020
GCCATTTCTC	ATGGTCAGAC	CACTTATGGT	AACGCTGAAG	ACAAAGAGTA	TCAGCAAGGA
4030	4040	4050	4060	4070	4080
GTGGGTAGAT	TTCCAAATGA	AAAAGAACAG	CTAAAACAGT	TACAGGGTTT	AAACATGCAC
4090	4100	4110	4120	4130	4140
ACCTATTTYC	CCAATAAAGG	AACCCAGCAA	TATACAGATC	AAATTGAGCG	CCCCCTAATG
4150	4160	4170	4180	4190	4200
GTGGGTCTG	TATGGAACAG	AAGAGCCCTT	CACTATGAAA	GCCAGCTGTG	GAGTAAAATT
4210	4220	4230	4240	4250	4260
CCAAATTTAG	ATGACAGTTT	TAAAACTCAG	TTTGCAGCCT	TAGGAGGATG	GGGTTTGCAT
4270	4280	4290	4300	4310	4320
CAGCCACCTC	CTCAAATATT	TTTAAAAATA	TTACCACAAA	GTGGGCCAAT	TGGAGGTATT

4330 4340 4350 4360 4370 4380  
AAATCAATGG GAATTACTAC CTTAGTTCAG TATGCTGTGG GAATTATGAC AGTAACTATG  
4390 4400 4410 4420 4430 4440  
ACATTTAAAT TGGGGCCCCG TAAAGCTACG GGACGGTGGA ATCCTCAACC TGGAGTATAT  
4450 4460 4470 4480 4490 4500  
CCCCCGCAGC CAGCAGGTCA TTTACCATAT GTACTATATG ACCCCACAGC TATAGATGCA  
4510 4520 4530 4540 4550 4560  
AAACAACACC ACAGACATGG ATATGAAAAG CCTGAAGAGT TGTGGACAGC CAAAAGCCGT  
4570 4580 4590 4600 4610 4620  
GTGCGCCCAT TGTAACACT CCCACCGTG CCCTCAGCCA GGATGCGTAA CTAACGCC  
4630 4640 4650 4660 4670 4680  
ACCAGTACCA CCCAGACTGT ACCTGCCCCC TCCTGTACCT ATAAGACAGC CTAACAC

(ただし、式中、M は A または C、R は A または G、W は A または T、S は C または G、Y は C または T、K は G または T の塩基を示す。)

【請求項2】

前記プライマーD-4とU-2を用いる請求項1記載の方法。

【請求項3】

請求項1記載のプライマーD-1、D-4、U-2又はU-4。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 5/00	B

(72)発明者 小川 博之

東京都町田市森野5 - 2 5 - 1 8 電気化学町田寮

(72)発明者 清水 英晴

東京都町田市玉川学園4 - 1 6 - 4 4

(72)発明者 鎌田 公仁夫

新潟県五泉町南本町1丁目2番2号 デンカ生研株式会社新潟工場内

(72)発明者 黒沢 大介

新潟県五泉町南本町1丁目2番2号 デンカ生研株式会社新潟工場内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 CA02 CA05 DA02 DA06 EA02 EA03 HA11

4B063 QA13 QA18 QQ10 QQ42 QR32 QR62 QR79 QS25 QS34

4B065 AA26X AA90X AA95Y AB01 CA24 CA44 CA46

4H045 AA10 AA20 BA10 CA01 DA86 EA29 EA52 FA74 GA30

专利名称(译)	检测人细小病毒的方法及其引物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004187687A</a>	公开(公告)日	2004-07-08
申请号	JP2004015495	申请日	2004-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	デンカ生研株式会社		
[标]发明人	山崎修道 松永泰子 武田直和 松浦善治 小川博之 清水英晴 鎌田公仁夫 黒沢大介		
发明人	山崎 修道 松永 泰子 武田 直和 松浦 善治 小川 博之 清水 英晴 鎌田 公仁夫 黒沢 大介		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/015 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/569		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/015 C12N1/21 C12N7/00 C12Q1/68.Z G01N33/53.N G01N33/569.L C12N5/00.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/10 C12N7/01		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/HA11 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QR79 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA30		
代理人(译)	谷川荣次郎		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供能够大规模培养人类细小病毒抗原蛋白，并能够高度敏感地测量人类细小病毒或抗人类细小病毒抗体的手段。提供一种特定的人细小病毒基因，由该基因编码的多肽，以及使用该基因的人细小病毒或抗人细小病毒抗体的测量系统。[效果]包含人类细小病毒非结构基因和结构基因的基因区域在通过PCR方法获得的整个序列或DNA片段转化为已知表达载体并转化为表达载体的宿主细胞中表达。这样，可以获得可以用于放射免疫分析和酶免疫分析等诊断的重组抗原。[选型图]图1

