

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/065261

発行日 平成30年8月2日 (2018.8.2)

(43) 国際公開日 平成29年4月20日 (2017.4.20)

(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 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	
CO 7 K 14/015 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2017-545479 (P2017-545479)	(71) 出願人	306008724
(21) 国際出願番号	PCT/JP2016/080507		富士レビオ株式会社
(22) 国際出願日	平成28年10月14日 (2016.10.14)		東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
(31) 優先権主張番号	特願2015-203432 (P2015-203432)	(74) 代理人	110001656
(32) 優先日	平成27年10月15日 (2015.10.15)		特許業務法人谷川国際特許事務所
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	顧 然
			東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内
		(72) 発明者	金子 敦
			東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内
		(72) 発明者	青柳 克己
			東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒトパルボウイルスB 1 9 抗原および抗体の同時検出方法及びキット

(57) 【要約】

ヒトパルボウイルスB19抗原とIgM型抗ヒトパルボウイルスB19抗体とを同時に検出するための新規な手段が開示されている。本発明による検体中のヒトパルボウイルスB19抗原及びIgM型抗ヒトパルボウイルスB19抗体の同時検出法は、界面活性剤の存在下、同一の反応系内で、前記検体を、

- (1) パルボウイルスB19抗原を検出するための第1のプロープ、及び
- (2) IgM型抗パルボウイルスB19抗体を検出するための第2のプロープに接触させることを含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検体中に存在する少なくとも 1 種のパルボウイルスB19抗原及び少なくとも 1 種のIgM型抗パルボウイルスB19抗体を同時に検出する方法であって、界面活性剤の存在下、同一の反応系内で、前記検体を、

(1) パルボウイルスB19抗原を検出するための第 1 のプローブ、及び

(2) IgM型抗パルボウイルスB19抗体を検出するための第 2 のプローブ

に接触させることを含む、方法。

【請求項 2】

前記界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、及び陽イオン性界面活性剤からなる群より選択される少なくとも 1 種である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

前記陰イオン性界面活性剤が、分子内に炭素原子 9 個以上のアルキル基を有する陰イオン性界面活性剤であり、前記両性界面活性剤が、分子内に炭素原子 10 個以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤であり、前記陽イオン性界面活性剤が、分子内に炭素原子 10 個以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する陽イオン性界面活性剤である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記陰イオン性界面活性剤が、分子内に炭素原子 11 個以上のアルキル基を有する陰イオン性界面活性剤であり、前記両性界面活性剤が、分子内に炭素原子 12 個以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤であり、前記陽イオン性界面活性剤が、分子内に炭素原子 12 個以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する陽イオン性界面活性剤である、請求項 3 記載の方法。

20

【請求項 5】

前記界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、N - デカノイルサルコシンナトリウム、N - ラウロイルサルコシンナトリウム、N - ミリストイルサルコシンナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸、N - デシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、N - ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、N - テトラデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、N - ヘキサデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、デシルトリメチルアンモニウムブロマイド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド、デシルトリメチルアンモニウムクロライド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド、及びヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライドからなる群より選択される少なくとも 1 種である、請求項 3 記載の方法。

30

【請求項 6】

免疫測定により行われ、前記第 1 のプローブは、パルボウイルスB19抗原に特異的に結合する少なくとも 1 種の抗体又はその抗原結合性断片を含み、前記第 2 のプローブは、パルボウイルスB19抗原の全長又は部分領域を含むポリペプチドであって、第 1 のプローブが認識する領域を含まないポリペプチド、及びヒトIgM型抗体に特異的に結合する抗ヒトIgM抗体又はその抗原結合性断片から選択される少なくとも 1 種を含む、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 7】

前記免疫測定がサンドイッチ免疫測定である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記第 2 のプローブは、パルボウイルスB19抗原の全長又は部分領域を含む少なくとも 1 種のポリペプチドを含む、請求項 6 又は 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記パルボウイルスB19抗原がVP2である、請求項 6 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方

50

法。

【請求項 1 0】

前記第 1 のプローブ及び前記第 2 のプローブが、同一の又は異なる固相担体に固定化された固相プローブとして用いられる、請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

第 2 のプローブがパルボウイルスB19抗原の部分領域を含む少なくとも 1 種のポリペプチドであり、検体を前記固相プローブと接触させた後、第 1 のプローブと異なる部位でパルボウイルスB19抗原と結合する標識された抗パルボウイルスB19抗体又はその抗原結合性断片、及びヒトIgM型抗体に特異的に結合する標識された抗ヒトIgM抗体又はその抗原結合性断片を固相と接触させることを含む、請求項 1 0 記載の方法。

10

【請求項 1 2】

前記第 2 のプローブは、第 1 のプローブが認識する領域を含まず、かつ、前記標識された抗パルボウイルスB19抗体又はその抗原結合性断片が認識する領域を含まない、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

第 2 のプローブが抗ヒトIgM抗体又はその抗原結合性断片であり、検体を前記固相プローブと接触させた後、第 1 のプローブと異なる部位でパルボウイルスB19抗原と結合する標識された抗パルボウイルスB19抗体又はその抗原結合性断片、及びパルボウイルスB19抗原の部分領域を含む標識されたポリペプチドと固相を接触させることを含む、請求項 1 0 記載の方法。

20

【請求項 1 4】

前記標識されたポリペプチドは、第 1 のプローブが認識する領域を含まず、かつ、前記標識された抗パルボウイルスB19抗体又はその抗原結合性断片が認識する領域を含まない、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記検体が血液、血清、または血漿である請求項 1 ないし 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ないし 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法に用いられるキットであって、パルボウイルスB19抗原を検出するための第 1 のプローブと、IgM型抗パルボウイルスB19抗体を検出するための第 2 のプローブと、界面活性剤とを含む、パルボウイルスB19抗原及びIgM型抗パルボウイルスB19抗体の同時検出キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、検体中に含まれるヒトパルボウイルスB19抗原および抗体を同時に検出する方法、及びヒトパルボウイルスB19抗原および抗体の同時検出キットに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ヒトパルボウイルスB19は、パルボウイルススルスコパルボウイルス属に分類される直鎖一本鎖DNAウイルスである。ウイルス粒子は正 2 0 面体構造であり、カプシドタンパク質のVP1 (83kDa) 及びVP2 (58kDa) が1:9の比率でカプシドを構成している。エンベロープは有していない。パルボウイルスB19感染による疾患・症状として、伝染性紅斑(りんご病)、関節炎、胎児水腫や流産等が知られている。

40

【0 0 0 3】

ヒトパルボウイルスB19は、一度感染すると終生免疫を獲得するため、IgG型抗体を測定しても新規感染を評価することができない。従って、ヒトパルボウイルスB19では、新規感染を評価するため、IgM型抗体が一般的に測定される。

【0 0 0 4】

検体中のヒトパルボウイルスB19を免疫学的に測定する方法として、IgM型抗ヒトパルボ

50

ウイルスB19抗体を免疫測定する方法のほかに、検体をpH4.0以下の条件で前処理した後に抗パルボウイルスB19抗体を用いて免疫測定する方法（特許文献1）、検体をpH4.5～6.5のグアニジンで前処理した後に、抗パルボウイルスB19抗体を用いて免疫測定する方法（特許文献2）が知られている。これらの方法では、検体中に含まれる抗体を不活性化する。

【0005】

また、パルボウイルスB19抗原の免疫学的測定の結果と、パルボウイルスB19のIgM抗体の免疫学的測定の結果とを併せて使用することによって、パルボウイルスB19を高感度に検出する方法が知られている（特許文献3）。

【0006】

他方、検体中のヒトC型肝炎ウイルス（HCV）抗原とIgG型の抗HCV抗体とを同時に検出する方法（特許文献4）、やヒト免疫不全ウイルス（HIV）抗原とIgG型の抗HIV抗体とを同時に検出する方法（特許文献5）が知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2001-343388

【特許文献2】特開2007-278902

【特許文献3】特開2008-145181

【特許文献4】国際公開W000/007023

【特許文献5】特表2001-504572

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

パルボウイルスB19の感染初期において、血中の抗パルボウイルスB19抗体（IgM）が検出されない期間（ウインドウ期間）が存在する。このウインドウ期間は、パルボウイルスB19抗原を検出することによって早期にパルボウイルスB19を検出することが可能である。一方、血液中のパルボウイルスB19抗原が低力価の場合は、IgM型抗体の検出を行うことにより、より高感度にパルボウイルスB19を検出することができるため、パルボウイルスB19抗原とIgM型抗パルボウイルスB19抗体の両者を検出することが望ましい。

【0009】

特許文献3には、パルボウイルスB19の抗原の免疫学的測定結果と、IgM型抗体の免疫学的測定結果とを併せて使用することが記載されているが、この方法では、抗原と抗体を別々に測定する必要があり、多くの検体量が必要となる。また2つの異なる免疫学的測定を実施する必要があり、手間を要する。

【0010】

特許文献4および5には、HCVおよびHIVの抗原抗体同時測定方法が記載されているが、HCVやHIVはエンベロープを有し、これらの方法ではエンベロープ内の抗原を検出するため、エンベロープ膜蛋白質を破壊して、エンベロープ内部の抗原を露出させる必要がある。さらに、特許文献の方法では、測定する抗体がIgG型であり、一般的にIgG抗体に比べてIgM抗体は安定性が低い傾向がある。つまり、これら特許文献の方法に記載された免疫測定条件は、エンベロープ膜蛋白質を破壊して露出させた、エンベロープ内部の抗原と、IgG型抗体とを同時に測定するためのものであり、エンベロープを有さないパルボウイルスB19の抗原と、IgM型抗体との同時検出系に適用することはできない。

【0011】

本発明は、ヒトパルボウイルスB19抗原とIgM型抗ヒトパルボウイルスB19抗体とを同時に検出するための手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本願発明者らはヒトパルボウイルスB19抗原とIgM型抗ヒトパルボウイルスB19抗体とを

同時に検出するための免疫測定系について鋭意に検討したところ、特定の界面活性剤を抗原抗体反応液中に添加することによって、感度よくパルボウイルスB19抗原とIgM型抗パルボウイルスB19抗体とを同時に検出することができることを見出し、本発明を完成した。

【0013】

すなわち、本発明は、検体中に存在する少なくとも1種のパルボウイルスB19抗原及び少なくとも1種のIgM型抗パルボウイルスB19抗体を同時に検出する方法であって、界面活性剤の存在下、同一の反応系内で、前記検体を、

(1) パルボウイルスB19抗原を検出するための第1のプロープ、及び

(2) IgM型抗パルボウイルスB19抗体を検出するための第2のプロープ

に接触させることを含む、方法を提供する。また、本発明は、上記本発明の方法に用いられるキットであって、パルボウイルスB19抗原を検出するための第1のプロープと、IgM型抗パルボウイルスB19抗体を検出するための第2のプロープと、界面活性剤とを含む、パルボウイルスB19抗原及びIgM型抗パルボウイルスB19抗体の同時検出キットを提供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、検体中に存在する少なくとも1種のパルボウイルスB19抗原及び少なくとも1種のIgM型抗パルボウイルスB19抗体を同時に検出することができるので、検体がパルボウイルスB19陽性であるか否かを簡便な操作で感度良く検出することができる。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明のパルボウイルスB19の抗原抗体の同時検出方法は、検体中に存在する少なくとも1種のパルボウイルスB19抗原及び少なくとも1種のIgM型抗パルボウイルスB19抗体を同時に検出する方法であり、界面活性剤の存在下、同一の反応系内で、前記検体を、

(1) パルボウイルスB19抗原を検出するための第1のプロープ、及び

(2) ヒトIgM型抗パルボウイルスB19抗体を検出するための第2のプロープ

に接触させることを含む。「同一の反応系内で」とは、同一の反応液中（例えば、同一のウェル内、同一の反応セル内、など）で検体と第1のプロープと第2のプロープとを反応させることをいう。

【0016】

界面活性剤は、少なくとも、検体と、第1のプロープと、第2のプロープとを反応させる反応系内に存在させる。それ以外の反応工程（例えば、サンドイッチ免疫測定法における二次反応工程）には、界面活性剤が存在してもよいし、存在しなくてもよい。

【0017】

界面活性剤の種類は特に限定されず、パルボウイルスB19の抗原抗体同時検出系における感度を向上させるものであればよい。例えば、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、及び陽イオン性界面活性剤から選択される少なくとも1種の界面活性剤を好ましく使用することができる。1種類の界面活性剤を用いてもよいし、複数種類を組み合わせてもよい。また、他の添加剤等と組み合わせてもよい。あるいは、パルボウイルスB19の抗原抗体同時検出系における感度を向上させる界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤から選択される少なくとも1種であってもよい。Tween系界面活性剤、Triton(登録商標)系界面活性剤などの非イオン性界面活性剤には、単独使用ではパルボウイルスB19の抗原抗体同時検出系における感度を向上させる効果は認められないが（下記実施例の(12)参照）、他の添加剤として、例えば異なる目的で、パルボウイルスB19の抗原抗体同時検出系における感度を向上させる界面活性剤と組み合わせることは差し支えない。

【0018】

陰イオン性界面活性剤の好ましい例としては、分子内に炭素原子9個以上、より好ましくは炭素原子11個以上のアルキル基を有する陰イオン性界面活性剤が挙げられる。アルキル基は、好ましくは直鎖アルキル基である。炭素原子9個以上のアルキル基を有する陰イオン性界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）などのアルキル硫酸エス

10

20

30

40

50

テル塩、N-デカノイルサルコシンナトリウム（NDS）、N-ラウロイルサルコシンナトリウム（NLS）、N-ミリストイルサルコシンナトリウム等のN-アシルサルコシン塩、ドデシルベンゼンスルホン酸（SBDS）などのアルキルベンゼンスルホン酸塩などが挙げられる。

【0019】

両性界面活性剤の好ましい例としては、分子内に炭素原子10個以上、より好ましくは炭素原子12個以上のアルキル基と、第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤が挙げられる。アルキル基は、好ましくは直鎖アルキル基である。炭素原子10個以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する両性界面活性剤の好ましい例としては、 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-[(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^-]$ （nは9以上の整数）で表される構造の両性界面活性剤を挙げることができ、具体例として、N-デシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート（C10APS）、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート（C12APS）、N-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート（C14APS）、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート（C16APS）などが挙げられる。

10

【0020】

陽イオン性界面活性剤の好ましい例としては、分子内に炭素原子10個以上、より好ましくは炭素原子12個以上のアルキル基と、第四級アンモニウムとを有する陽イオン性界面活性剤が挙げられる。アルキル基は、好ましくは直鎖アルキル基である。炭素原子10個以上のアルキル基と第四級アンモニウムとを有する陽イオン性界面活性剤の好ましい例としては、 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{Br}^-$ 、及び $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{Cl}^-$ （いずれもnは9以上の整数）で表される構造の陽イオン性界面活性剤を挙げることができ、具体例として、デシルトリメチルアンモニウムブロマイド（C10TAB）、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド（C12TAB）、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド（C14TAB）、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド（C16TAB）、デシルトリメチルアンモニウムクロライド（C10TAC）、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド（C12TAC）、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド（C14TAC）、及びヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライド（C16TAC）などが挙げられる。

20

【0021】

上記の中でも特に、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート（C12APS）、N-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート（C14APS）、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、N-ラウロイルサルコシンナトリウム（NLS）、ドデシルベンゼンスルホン酸（SBDS）、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド（C12TAB）、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド（C14TAB）、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド（C12TAC）、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド（C14TAC）からなる群より選択される少なくとも1種、又は、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート（C12APS）、N-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート（C14APS）、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、及びN-ラウロイルサルコシンナトリウム（NLS）からなる群より選択される少なくとも1種を好ましく用いることができる。

30

【0022】

反応系内における界面活性剤の濃度は、パルボウイルスB19の抗原及び抗体を同時に検出できる濃度であれば特に限定されないが、例えば、0.01~10%、0.03~7%、0.05~5%、0.1~3%、または0.5~2%の範囲で行うことができる。ここで%は重量%である。パルボウイルスB19の抗原抗体同時検出系における感度を向上させる効果を有する複数の界面活性剤を組み合わせる場合は、合計の濃度が上記の範囲であればよい。

40

【0023】

本発明によるパルボウイルスB19の抗原・抗体の同時検出は、典型的には免疫測定法により行われる。免疫測定法としては、サンドイッチ法および競合法を用いることができるが、サンドイッチ法を用いることが好ましい。サンドイッチ免疫測定自体は周知の常法である。具体例を挙げると、化学発光酵素免疫測定法（chemiluminescent enzyme immunoas

50

say; CLEIA)、酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA)、ラジオイムノアッセイ、電気化学発光免疫測定法等の各種の手法があり、本発明においてはいずれの手法を用いてもよい。

【0024】

なお、本発明において、「検出」という語には、定性的検出、定量的検出、及び半定量的検出が包含される。また、「測定」という語には、定性的検出、定量及び半定量が包含される。

【0025】

第1のプローブとしては、パルボウイルスB19抗原に特異的に結合する分子を用いることができる。そのような特異結合分子の典型例として、パルボウイルスB19抗原に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片を挙げることができる。第1のプローブは、そのような分子を1種類だけ使用してもよいし、複数種類のそのような分子を組み合わせ使用してもよい。第1のプローブとして抗体を用いる場合、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、免疫測定の再現性等の観点からはモノクローナル抗体が好ましい。

10

【0026】

第2のプローブは、抗パルボウイルスB19抗体が特異的に結合する分子であり得る(第2-1のプローブ)。そのような分子の典型例として、パルボウイルスB19抗原の全長又は部分領域を含むポリペプチド、好ましくはパルボウイルスB19抗原の部分領域を含むポリペプチドを挙げることができる。第2-1のプローブは、IgM型抗体以外の抗パルボウイルスB19抗体も捕捉するので、例えば検体中にIgG型抗パルボウイルスB19抗体も存在する場合には、当該IgG型パルボウイルスB19抗体も第2-1のプローブによって捕捉される。従って、IgM型の抗パルボウイルスB19抗体を特異的に検出するためには、第2-1のプローブと検出対象抗体を反応させる工程に加えて、ヒトIgM型抗体に特異的に結合する分子と検出対象抗体を反応させる工程も必要となる。ヒトIgM型抗体に特異的に結合する分子の典型例として、抗ヒトIgM抗体又はその抗原結合性断片を挙げることができる。抗ヒトIgM抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。

20

【0027】

あるいは、第2のプローブとして、ヒトIgM型抗体に特異的に結合する分子(第2-2のプローブ)を使用してもよい。そのような分子の典型例としては、上述した通り、抗ヒトIgM抗体又はその抗原結合性断片を挙げることができる。この場合には、当該第2-2のプローブと検出対象抗体を反応させる工程に加えて、第2-1のプローブとして使用され得る、上記した抗パルボウイルスB19抗体が特異的に結合する分子と検出対象抗体を反応させる工程をさらに実施する。第2-2のプローブとして用いる場合も、抗ヒトIgM抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。

30

【0028】

本発明では、第2のプローブとして、上記した第2-1のプローブ及び第2-2のプローブの少なくともいずれかを用いればよい。また第1のプローブと同様に、第2のプローブも、1種類の分子のみを用いてもよいし、複数種類の分子を組み合わせ用いてもよい。

40

【0029】

パルボウイルスB19は、構造タンパク質として、主要カプシド抗原であるVP2と、マイナカプシド抗原であるVP1とを有する。VP1は、VP2のN末端が伸長されたタンパク質である。パルボウイルスB19の主要カプシド抗原VP2のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。VP2のアミノ酸配列は、GenBankにアクセッション番号CB163309.1で登録されている。パルボウイルスB19の塩基配列は、GenBankにアクセッション番号FN598217.1で登録されている。配列番号2に示す塩基配列は、パルボウイルスB19の全長塩基配列である。VP2抗原(配列番号1)をコードする塩基配列は、配列番号2の3304~4968番目の塩基配列である。

【0030】

50

本発明における「パルボウイルスB19抗原」には、VP2とVP1の両者が包含されるが、VP2であることが好ましい。すなわち、本発明の同時検出法では、検体中のVP1抗原及びVP2抗原の少なくともいずれかと、検体中のIgM型抗VP1抗体及びIgM型抗VP2抗体の少なくともいずれかとを同時検出すればよいが、検体中のVP2抗原及びIgM型抗VP2抗体を同時検出することが好ましい。VP2と結合可能な第1のプロープとしては、例えば、VP2に特異的に結合する抗VP2抗体又はその抗原結合性断片を挙げることができる。IgM型抗VP2抗体と結合可能な第2のプロープとしては、例えば、VP2の全長又は部分領域を含むポリペプチド、好ましくはVP2の部分領域を含むポリペプチドを挙げることができる。第2-2のプロープを用いてVP2抗原及びIgM型抗VP2抗体の同時検出を実施する場合には、第2-2のプロープで検体中のIgM型抗体を捕捉した後、例えば、VP2の全長又は部分領域を含むポリペプチドに標識物質を結合させた標識VP2ポリペプチドを反応させて検出反応を行なえばよい。

10

【0031】

抗体及びその抗原結合性断片の作製方法自体は周知の常法である。抗パルボウイルスB19抗体は、例えば、パルボウイルスの主要抗原VP2又はその部分断片を適宜アジュバントと共に動物（ヒトを除く）に免疫し、該動物から採取した血液から抗血清を得て、該抗血清中のポリクローナル抗体を精製することで、VP2に特異的に結合する抗パルボウイルスB19ポリクローナル抗体を得ることができる。免疫は、被免疫動物中での抗体価を上昇させるため、通常数週間かけて複数回行なう。抗血清中の抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、アフィニティークラム精製等により行なうことができる。

20

【0032】

抗パルボウイルスB19モノクローナル抗体は、例えば、周知のハイブリドーマ法により作製することができる。具体的には、パルボウイルスB19の主要抗原VP2又はその部分断片を適宜アジュバントと共に動物（ヒトを除く）に免疫し、該動物から脾細胞やリンパ球のような抗体産生細胞を採取し、これをミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを調製し、VP2と結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、これを増殖させて培養上清から抗体を回収することで、VP2に特異的に結合する抗パルボウイルスB19モノクローナル抗体を得ることができる。

【0033】

抗ヒトIgMポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体も、ヒトIgM又はその部分断片を免疫原として用いて、上記と同様に調製することができる。

30

【0034】

また、抗パルボウイルスB19抗体や抗ヒトIgM抗体は、市販の抗体を用いることができる。

【0035】

「抗原結合性断片」は、もとの抗体の対応抗原に対する結合性（抗原抗体反応性）を維持している限り、いかなる抗体断片であってもよい。具体例としては、Fab、F(ab')₂、scFv等を挙げることができるが、これらに限定されない。FabやF(ab')₂は、周知の通り、モノクローナル抗体をパパインやペプシンのようなタンパク分解酵素で処理することにより得ることができる。scFv（single chain fragment of variable region、単鎖抗体）の作製方法も周知であり、例えば、上記の通りに作製したハイブリドーマのmRNAを抽出し、一本鎖cDNAを調製し、免疫グロブリンH鎖及びL鎖に特異的なプライマーを用いてPCRを行なって免疫グロブリンH鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を増幅し、これらをリンカーで連結し、適切な制限酵素部位を付与してプラスミドベクターに導入し、該ベクターで大腸菌を形質転換してscFvを発現させ、これを大腸菌から回収することにより、scFvを得ることができる。

40

【0036】

パルボウイルスB19抗原の全長又は部分領域を含むポリペプチドは、化学合成、遺伝子工学的手法等の常法により作製できる。

【0037】

化学合成法的具体例としては、例えばFmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法

50

）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等を挙げることができる。また、各種の市販のペプチド合成機を利用して常法により合成することもできる。化学合成の場合は、アミノ酸配列のみに基づいて所望のポリペプチドを合成できる。

【0038】

遺伝子工学的手法によるポリペプチドの作製方法も周知である。VP2の全長又は部分領域を含むポリペプチドを遺伝子工学的手法により作製する場合には、例えば次の通りに行なえばよい。あらかじめクローニングした全長VP2のDNAを鋳型とし、VP2の遺伝子配列情報に基づいて設計したプライマーを用いてPCRを行ない、VP2の全長又は所望の一部をコードするポリヌクレオチドを調製する。PCRに用いるプライマーは、配列番号2に示した塩基配列やGenBank等のデータベースに登録されているVP2配列情報等に基づいて適宜設計することができる。あるいは、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、市販の核酸合成機を用いた常法により調製することもできる。各アミノ酸をコードするコドンが公知であるから、アミノ酸配列さえ特定できれば、そのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの塩基配列も決定できる。次いで、調製したポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込み、適当な発現系にてポリペプチドを発現させ、このポリペプチドを回収することで、所望のポリペプチドを得ることができる。用いるベクターや各種の発現系（細菌発現系、酵母細胞発現系、哺乳動物細胞発現系、昆虫細胞発現系、無細胞発現系など）も周知であり、種々のベクターや宿主細胞、試薬類、キットが市販されているため、当業者であれば適宜選択して使用することができる。ヒト由来培養細胞も市販・分譲されており、入手は容易である。

10

20

【0039】

なお、本発明において、パルボウイルスB19抗原の「部分領域」とは、捕捉対象となる抗体が抗原抗体反応により結合するのに十分な長さの領域であればよい。この分野において、約7残基のサイズのポリペプチドであれば抗原性を発揮することが知られている。従って、部分領域は、7残基以上、好ましくは10残基以上の領域であり得る。ただし、部分領域のサイズがあまりに小さいと、目的外の抗体とも交差反応してしまう可能性が高くなるので、部分領域は、例えば30残基上、40残基以上、50残基以上、又は100残基以上としてもよい。

【0040】

パルボウイルスB19の抗原・抗体同時検出のためには、第1のプロープと第2のプロープとの間で結合反応が生じない構成にする必要がある。例えば、VP2抗原及びIgM型抗VP2抗体を同時検出する態様において、第2のプロープとして第2-1のプロープを使用する場合には、第1のプロープとして使用する抗VP2抗体又はその抗原結合性断片が認識する領域を含まないポリペプチドを第2-1のプロープとして用いる。すなわち、第2-1のプロープとして、VP2の部分領域を含み、かつ、第1のプロープが認識する領域を含まないポリペプチドを用いる。好ましい具体例を挙げると、例えば、第1のプロープの好ましい具体例として、VP2抗原の279番目～388番目に含まれるエピトープを認識する抗体又はその抗原結合性断片を挙げることができるが、この好ましい第1のプロープと組み合わせる第2-1のプロープの好ましい具体例としては、VP2の部分領域を含み、かつ、VP2の279番～388番アミノ酸の領域を含まないポリペプチドを挙げることができ、より具体的には、配列番号1の1番～278番アミノ酸の領域、389番～554番アミノ酸の領域、及びこれら領域の部分領域から選択される領域を含むポリペプチドを挙げることができる。

30

40

【0041】

また、本発明の同時検出法をサンドイッチ免疫測定により実施する場合、採用する第2のプロープの種類に応じて、標識抗体の他に標識抗原ポリペプチドが使用され得るが、標識抗原及び標識抗体と第1のプロープ及び第2のプロープとの間でも結合反応が生じない構成にする必要がある。

【0042】

以下、本発明のヒトパルボウイルスB19抗原・抗体同時検出方法を、第1のプロープ及び第2のプロープを固相に固定化して固相プロープとして使用するサンドイッチ免疫測定

50

により実施する場合を例に、具体的に説明する。第2のプロープとして第2-1のプロープを用いる態様と、第2-2のプロープを用いる態様に分けて、それぞれ説明する。

【0043】

A. 第2-1のプロープを用いた同時検出

第1のプロープとして、検体中のパルボウイルスB19抗原（被検抗原）と特異的に結合する抗パルボウイルスB19抗体を、第2のプロープとして、検体中のIgM型抗パルボウイルスB19抗体（被検抗体）が特異的に結合する、パルボウイルスB19抗原の部分領域を含むパルボウイルスB19抗原ポリペプチド（第2-1のプロープ）を用いる。まず、これらのプロープを固相に固定化する。固相としてプレートを用いる場合、第1のプロープ及び第2-1のプロープは、同一の固相担体（同一のウェル）に固定化される。磁性粒子などの粒子を固相として用いる場合、第1のプロープ及び第2-1のプロープは、同一の固相担体（同一の粒子）に固定化されてもいいし、あるいは、異なる固相担体（異なる粒子）にそれぞれのプロープを固定化した後、粒子を混合して用いてもよい。

10

【0044】

次いで、界面活性剤の存在下で、固相プロープと検体を接触させる（一次反応工程）。固相としてプレートを用いる場合は、2つの固相プロープを含むウェルに検体（検体希釈液により適宜希釈してもよい）と界面活性剤を添加すればよい。固相として粒子を用いる場合は、2つの固相プロープを含む粒子と検体と界面活性剤を混合すればよい。これにより、検体中のパルボウイルスB19抗原タンパク質が第1のプロープを介して、また検体中の抗パルボウイルスB19抗体（検体中にIgG型の抗パルボウイルスB19抗体も存在する場合には、IgM型抗パルボウイルスB19抗体の他にIgG型抗パルボウイルスB19抗体も含まれ得る）が第2-1のプロープを介して、それぞれ固相上に捕捉される。

20

【0045】

次に、固相上に捕捉されなかった検体中の成分を、例えば適当な緩衝液で固相を洗浄することによって除いた後、標識物質で標識された適当なプロープを固相と接触させ、固相上に捕捉された被検抗原及び被検抗体と標識プロープとをそれぞれ結合させる（二次反応工程）。被検抗原の検出のために第1のプロープと組み合わせて使用される標識プロープを便宜的に第3のプロープと呼ぶ。第3のプロープとしては、第1のプロープとは異なる部位で被検抗原に特異的に結合する分子（典型的には、第1のプロープとは異なる部位で被検抗原と結合する抗パルボウイルスB19抗体）に標識物質を結合させたものを用いることができる。また、被検抗体の検出のために第2-1のプロープと組み合わせて使用される標識プロープを便宜的に第4-1のプロープという。第4-1のプロープとしては、ヒトIgM型抗体と特異的に結合する分子（典型的には抗ヒトIgM抗体）に標識物質を結合させたものを用いることができる。二次反応工程は、界面活性剤の存在下で行なってもよいし、非存在下で行なってもよい。

30

【0046】

第3及び第4-1のプロープには、同じ標識物質を結合させてもよいし、異なる標識物質を結合させてもよい。本発明においては、パルボウイルスB19抗原とIgM型抗パルボウイルスB19抗体とを区別して検出することは必須的ではないので、第3及び第4-1のプロープには同じ標識物質を結合してよく、例えば、どちらにもALPを結合してよい。異なる標識物質を結合した場合には、各標識物質からのシグナルを区別できるので、パルボウイルスB19抗原とIgM型抗パルボウイルスB19抗体とを区別して検出することが可能である。

40

【0047】

第1のプロープと標識された第3のプロープは、互いに異なる部位でパルボウイルスB19抗原に結合する、すなわちエピトープが互いに異なる抗パルボウイルスB19抗体であるが、いずれも、第2-1のプロープとの反応性を有しない。言い換えると、第2-1のプロープとして用いるポリペプチドは、第1のプロープが認識する領域を含まず、かつ、標識された第3のプロープが認識する領域を含まない。抗体のエピトープは、短いペプチドを用いた常法のエピトープマッピングにより絞り込むことができるので、公知の抗体や新たに調製した抗体についてエピトープを調べ、認識領域が重複しない適当な組み合わせを選

50

択すればよい。

【0048】

二次反応の終了後、例えば適当な緩衝液で固相を洗浄し、未反応の成分を反応系内から除去する。次いで、標識物質からのシグナルを適当な方法で検出する。これにより、検体中に含まれるパルボウイルスB19抗原及びIgM型抗パルボウイルスB19抗体を同時に測定することが可能となる。

【0049】

上記では、一次反応工程の後に二次反応工程を行う場合について説明したが、一次反応工程の前に二次反応工程を行ってもよいし（すなわち、標識プローブと検体との反応を先に行なってもよい）、一次反応工程と二次反応工程を同時に行ってもよい。

10

【0050】

B. 第2-2のプローブを用いた同時検出

この態様では、第2のプローブとして抗ヒトIgM抗体（第2-2のプローブ）を使用する。抗ヒトIgM抗体及び第1のプローブである抗パルボウイルスB19抗体を固相に固定化して固相プローブとし、界面活性剤の存在下で固相プローブと検体を接触させる（一次反応工程）。

【0051】

二次反応工程において用いる標識された第3のプローブは、上記Aの態様と同様のものを用いればよい。被検抗体の検出のために第2-2のプローブと組み合わせて用いる標識プローブ（第4-2のプローブ）は、抗パルボウイルスB19抗体が特異的に結合する分子に標識物質を結合させたプローブであり、例えば、パルボウイルスB19抗原の部分領域を含むポリペプチドに標識物質を結合させたプローブを好ましく用いることができる。

20

第1のプローブ及び標識された第3のプローブは、第4-2のプローブとの反応性を有しない。言い換えると、第4-2のプローブとして用いるポリペプチドは、第1のプローブが認識する領域を含まず、かつ、標識された第3のプローブが認識する領域を含まない。

【0052】

その他の条件、手順等は、上述の「A. 第2-1のプローブを用いた同時検出」と同様である。

【0053】

免疫測定に用いる固相は特に限定されず、公知の免疫測定系で使用されている固相と同様でよい。固相の材質の具体例としては、ポリスチレン、ポリエチレン、セファロース等が挙げられるが、これらに限定されない。固相の物理的形狀は本質的に重要ではなく、プレート状、粒子状、膜状など種々の形状を採用できる。使用する固相は、その表面への抗体の固定化が容易で、測定中に形成される免疫複合体と未反応の成分を容易に分離できるものであることが好ましい。例えば、プレート、磁性粒子、ラテックス粒子、ビーズ、クロマトグラフィ用担体、メンブレン等を用いることができる。特に、通常の免疫測定法に使用されるプラスチックプレートや磁性粒子が好ましい。取り扱い、保存、および分離の容易性等の観点から、前述のような材質の磁性粒子を使用することが最も好ましい。これらの固相へのプローブの結合は、当業者に周知の常法によって行なうことができ、物理的吸着により行ってもよいし、共有結合を用いてもよい。例えば、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、およびピリジル・ジスルフィド法などを使用することができる。或いは、緩衝液に磁性粒子を添加して分散した粒子懸濁液に、プローブ（抗体、抗原）を適当量加え、20～37℃にて1時間程度攪拌し、その後、磁性粒子を磁力で集め、粒子を適当な緩衝液により洗浄してプローブ（抗体、抗原）結合粒子を得ることができる。使用する緩衝液の組成は抗体や抗原の固定化に使用される一般的なものでよく、pHは抗体が安定に存在し、固相への固定化を阻害しない範囲であればよい。

30

40

【0054】

標識物質も特に限定されず、公知の免疫測定系で使用されている標識物質と同様のものを用いることができる。具体例としては、酵素、蛍光物質、化学発光物質、染色物質、放

50

射性物質などが挙げられる。酵素としては、アルカリホスファターゼ（ALP）、パーオキシダーゼ、βガラクトシダーゼ等、公知のものを用いることができるが、これに限定されるものではない。高い検出感度の測定系を提供するためには、ALPを用いることが望ましい。上述した通り、第3のプロブ及び第4のプロブ（第4-1のプロブ、又は第4-2のプロブ）には、同じ標識物質を結合してよい。これらの標識物質の抗体又は抗原への結合は、当業者に周知の常法によって行なうことができる。標識物質の結合は、共有結合が好ましく、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、およびピリジル・ジスルフィド法などを使用することができる。抗体に標識物質を結合させる場合には、例えば、抗体をペプシン処理および還元処理して得られた抗体断片と、マレイミド化したALPを混合して、標識物質で標識された抗体を調製することができる。

10

【0055】

標識物質として酵素を用いる場合、該酵素に対応した発色基質、蛍光基質又は発光基質等の基質を該酵素と反応させ、その結果発生するシグナルを測定することにより、酵素活性を求め測定対象物を測定することができる。例えば、標識物質としてALPを用いる場合、3-(4-メトキシスピロ(1,2-ジオキセタン-3,2'-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン)-4-イル)フェニルホスフェート2ナトリウム（例えば商品名AMPPD）などの発光基質を用いることができる。

【0056】

標識物質としてビオチン又はハプテンが用いられる場合には、酵素、蛍光物質、化学発光物質、染色物質又は放射性物質などを結合したストレプトアビジン又はハプテン抗体などを用いて検出することができる。

20

【0057】

シグナルの検出は、標識物質の種類に応じて適宜選択される。例えば、シグナルが発色であれば比色計や吸光度計を、蛍光であれば蛍光光度計を、発光であればフォトンカウンターを、放射線であれば放射線測定装置をそれぞれ用いればよい。

【0058】

陰性コントロールとして、パルボウイルスB19に感染歴のない健常人由来の検体を本発明の同時検出法に付してもよい。健常人検体から得られたシグナル値と、被検者検体から得られたシグナル値を比較し、被検者検体のシグナル値が高かった場合には、被検者検体中にパルボウイルスB19抗原及びIgM型抗パルボウイルスB19抗体の少なくともいずれかが存在する（パルボウイルスB19陽性）、と判定することができる。予め複数の健常人検体について測定を行ない、得られたシグナル値から、パルボウイルスB19陽性か否かを判定するためのカットオフ値を算出してもよい。カットオフ値としては、陰性コントロールのシグナル値の平均値、あるいは平均値+2SD（SDは標準偏差）などを用いることができる。被検者検体から得られたシグナル値がカットオフ値以上の場合、パルボウイルスB19陽性と判定することができる。さらにカットオフ値と被検者検体から得られたシグナル値を比較し、適当な計算式によって判別値を求めてもよい。この場合、判別値が、予め設定した値以上になる場合には、パルボウイルスB19陽性と判定することができる。

30

【0059】

さらに陽性コントロールを本発明の同時検出法に付してもよい。陽性コントロールとしては、パルボウイルスB19抗原陽性検体、リコンビナントパルボウイルスB19抗原、IgM型抗パルボウイルスB19抗体陽性の検体、精製IgM型抗パルボウイルスB19抗体、他の動物種で免疫して得られたIgM型抗パルボウイルスB19抗体、およびこれらの混合物などを適切な濃度で含む溶液を用いることができる。

40

【0060】

カットオフ値は、陽性コントロールと陰性コントロールから得られたシグナル値から設定することもできる。この場合も、被検者検体から得られたシグナル値がカットオフ値以上となる場合には、パルボウイルスB19陽性と判定することができる。さらに判別値を求め、該判別値が予め設定した値以上となる場合には、パルボウイルスB19陽性と判定することができる。あるいはまた、複数の陽性コントロール及び複数の陰性コントロールにつ

50

いてそれぞれシグナル値を求めて、それらシグナル値の平均値等から陽性基準値及び陰性基準値を設定してもよい。被検者検体のシグナル値が陰性基準値未満であればパルボウイルスB19陰性（被検者検体中にパルボウイルスB19抗原及びIgM型抗パルボウイルスB19抗体のいずれも存在しない）、陽性基準値以上であればパルボウイルスB19陽性、陰性基準値以上～陽性基準値未満であれば感染の疑いあり、のように判定することも可能である。

【0061】

本発明の抗原抗体同時検出法が適用される検体は、被検者から分離された検体である。被検者がパルボウイルスB19に感染していた場合に該ウイルスの抗原及び抗体を含むと予想される試料であれば特に限定されず、好ましい具体例としては、全血、血漿及び血清を挙げることができる。検体は、必要に応じ適宜希釈して使用してよい。

10

【0062】

被検者は、哺乳動物であれば特に限定されないが、一般的にはヒトであり、例えば、パルボウイルスB19感染者又は感染の疑いのある患者であり得る。

【0063】

本発明によるパルボウイルスB19抗原・抗体の同時検出キットは、パルボウイルスB19抗原と結合可能な第1のプロープと、IgM型抗パルボウイルスB19抗体と結合可能な第2のプロープと、界面活性剤とを含む。該キットは、免疫測定による同時検出、好ましくはサンドイッチ免疫測定による同時検出キットであり得る。例えば、該キットは、プレート状の固相担体をさらに含み、第1のプロープ及び第2のプロープがプレートの同一のウェル内に固定化された形態でこれらプロープを含み得る。あるいは、該キットは、固相担体として、磁性粒子やラテックス粒子、ビーズ等の粒子状担体をさらに含み、第1のプロープ及び第2のプロープが同一の又は異なる担体粒子に固定化された形態でこれらプロープを含み得る。異なる担体粒子に固定化されている場合、粒子を混合して第一反応工程に用いる。

20

【実施例】

【0064】

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

【0065】

(1) リコンビナントVP2抗原の調製

30

パルボウイルスの主要構成タンパク質であるVP2の発現は以下のようにして行った。即ち、クローニングしておいたVP2全長DNAを、制限酵素で切断し、対応する制限酵素で切断したBaculovirus Transfer Vector (pAcYM1) に組み込んだ。このプラスミドをリポフェクチン法により、Baculo Gold Linarized Baculovirus DNA (Pharmagen社製) と共に、昆虫細胞Sf9細胞に導入した。導入細胞を数日培養後、培養上清のウイルスを回収した。さらにこのウイルスを純化するために、限外希釈法を用いてウイルスのクローニングを行った。この純化した組換えウイルスを昆虫細胞Sf21細胞に感染させ、培養後の昆虫細胞から組換えタンパク (VP2) を回収・精製した。

【0066】

昆虫細胞からのVP2の回収・精製は、以下のように行った。即ち、昆虫細胞を遠心回収後、超音波破碎を行い遠心分離後、沈殿物を回収した。沈殿物を洗浄し、リコンビナントVP2抗原を含む粗画分を回収した。事前の平板SDS-PAGEにより精製用SDS-PAGE Model 491 Prep Cell (BIO-RAD社製) の分離ゲル濃度を10 %と決め、円柱状分離ゲルの作製を行った。リコンビナントVP2粗画分をSDS濃度2 %としたサンプルバッファー2 mLに溶解後、泳動を行い、円柱状のゲル先端より溶出するVP2を回収した。回収したVP2を、セントリプレップ (アミコン社製) を用いて濃縮し、リコンビナントVP2抗原を得た。

40

【0067】

(2) リコンビナントVP2部分ポリペプチドの調製

パルボウイルスVP2抗原の部分配列を有するリコンビナントVP2部分ポリペプチドの発現は以下のようにして行った。クローニングしておいたVP2全長DNAを鋳型に、目的の部分配

50

列（配列番号2の3304～4137番目の核酸配列、および配列番号2の4468～4968番目の核酸配列）を含むようにPCR増幅し、DNA断片をそれぞれ発現用ベクターpETBA (biodynamics) にクローニングした。得られた発現用プラスミドを大腸菌に導入し、VP2部分ポリペプチドを誘導発現させた。その後、大腸菌を遠心分離にて回収し、超音波破碎を行い遠心分離後、沈殿を回収した。沈殿物を洗浄し、リコンビナントVP2部分ポリペプチドを含む粗画分を回収した。粗画分をゲルろ過カラムにより精製し、配列番号2の1～278番目のアミノ酸配列を含むリコンビナントVP2部分ポリペプチド1と、配列番号2の389～554番目のアミノ酸配列を含むリコンビナントVP2部分ポリペプチド2を得た。

【0068】

(3) 抗VP2モノクローナル抗体の確立

抗VP2モノクローナル抗体は、上記(1)で得たリコンビナントVP2抗原をBALB/cマウスに免疫し、その脾臓リンパ球とミエローマ細胞を融合することにより作製した。すなわち、フロイント完全アジュバントでエマルジョン化したリコンビナントVP2抗原を25～100 μg/マウスで初回免疫を行い、2週間後、フロイント不完全アジュバントでエマルジョン化した同抗原で追加免疫を行った。さらに、約2週間後、生理食塩水に溶解したリコンビナントVP2抗原を静脈内投与し、その3～4日後、マウスから脾臓を取り出し脾細胞を調製した。前もってRPMI-1640培地で培養していたマウスミエローマ細胞(P3U1)と脾細胞を1:2～1:5の比率で混合し、ポリエチレングリコールを用い細胞融合を行った。融合した細胞はヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含むHAT培地に浮遊した後、96ウェル培養プレートに分注し37℃、CO₂インキュベーターで培養した。

【0069】

その後、培養上清の一部をとり、上記(1)で調製したリコンビナントVP2抗原を固相化した96ウェルELISAプレートを用いたELISA法により、抗VP2抗体を産生するウェルをスクリーニングし、VP2に対する反応性を有するモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマを得た。得られたハイブリドーマについて、常法の限界希釈法に従い、単一クローン化を行い、3種類の抗VP2抗体（VP2-1、VP2-2、VP2-3）産生ハイブリドーマを得た。

【0070】

(4) モノクローナル抗体の作製

上記(3)で得たハイブリドーマを、あらかじめプリスタン0.5mLを腹腔に投与したマウス腹腔に1匹当たり約 1×10^7 個移植し、腹水中に産生されてくるモノクローナル抗体を取得した。該モノクローナル抗体の精製は、プロテインAを結合させたセファロースカラム（バイオラッド社製）によりIgGフラクションを分離することにより行った。

【0071】

次に、得られたモノクローナル抗体それぞれについて、20～30アミノ酸からなるペプチドマッピングにより、各ポリペプチドに対する反応性を調べた。その結果、モノクローナル抗体VP2-1は、配列番号1の279番目～298番目のアミノ酸配列に含まれるエピトープを認識する抗体であり、モノクローナル抗体VP2-2は、配列番号1の329番目～358番目のアミノ酸配列に含まれるエピトープを認識する抗体であり、モノクローナル抗体VP2-3は、配列番号1の359番目～388番目のアミノ酸配列に含まれるエピトープを認識する抗体であることが確認された。

【0072】

(5) 標識モノクローナル抗体の調製

マウス抗ヒトIgMモノクローナル抗体とウシ小腸由来アルカリホスファターゼ（オリエンタル酵母社製）とをヨシタケらの方法（Yoshitake et al., J. Biochem. 1982, 92(5), p.1413-1424）により結合させ、ALP酵素標識抗ヒトIgMモノクローナル抗体を調製した。

【0073】

具体的には、脱塩処理したマウス抗ヒトIgMモノクローナル抗体（終濃度3mg/mL）とペプシン（終濃度6 μg/mL）を0.1M クエン酸バッファー（pH3.5）中で混合し、37℃で1時間静置してペプシン消化を行った。反応を停止させた後にゲルろ過精製を行い、Fc領域

10

20

30

40

50

を除去した抗体を得た。次に、2 -メルカプトエタノール（終濃度10mM）を添加して37にて3時間静置し、チオール化を行った。更に脱塩処理し、マウス抗ヒトIgMモノクローナル抗体のFab'を得た。

【0074】

一方、脱塩したアルカリホスファターゼとN -（4 -マレイミドブチリロキシ） - スクシンイミド（GMBS）（終濃度0.3mg/mL）を混合し、30で1時間静置してマレイミド化を行った。

【0075】

脱塩した後、Fab'とマレイミド化アルカリホスファターゼをモル比1:1の割合で混合し、25にて30分静置してカップリングを行った。カップリング液に2 -メルカプトエタノール（終濃度10mM）を添加して4にて一晩静置し、反応を停止させた。濃縮および脱塩後、1% BSA、1mM NaCl、0.1mM ZnCl₂を含有する100mM MES（pH6.8）を加えて200 μg/mLに調製し、ALP標識抗ヒトIgMモノクローナル抗体溶液とした。

10

【0076】

抗VP2モノクローナル抗体VP2-1についても、同様に処理し、ALP標識抗VP2モノクローナル抗体VP2-1を得た。

【0077】

（6） パルボウイルスB19抗原および抗パルボウイルスB19抗体の同時測定用サンドイッチELISAの確立、ならびに両性界面活性剤および陰イオン性界面活性剤の添加の評価

NUNC社製ELISAプレートに、1ウェルあたり、2 μg/mLのリコンビナントVP2部分ポリペプチド1および2と、1 μg/mLのVP2-2抗体及びVP2-3抗体を含む100 μL PBS（pH7.4）を添加し、4で一晩インキュベートした。その後、各ウェルを350 μLのPBSで3回洗浄し、ブロッキング溶液（0.5% カゼイン、3% スクロース、0.05% プロクリンを含むPBS）300 μL/ウェルを添加して、室温で2時間インキュベートした。洗浄後、下記表1及び表2に示す各界面活性剤をそれぞれ含む1次反応溶液（1% BSA、0.05% カゼイン、0.05% プロクリンを含むPBSに各界面活性剤を終濃度0.5%で添加）により20倍希釈した検体100 μLをウェルにそれぞれ添加し、37で1時間インキュベートした。その後、洗浄液（0.1% Tween20を含むPBS）300 μLで洗浄後、1 μg/mLのALP標識抗VP2モノクローナル抗体VP2-1と0.5 μg/mLのALP標識抗IgMモノクローナル抗体とを含む2次反応溶液（1% BSA、0.05% カゼイン、0.05% プロクリンを含むPBS）100 μLをウェルにそれぞれ添加し、37で1時間インキュベートした。その後、洗浄液300 μLで洗浄し、PNPP Substrate Tablets（Thermo Fisher Scientific社製）1タブレットを5mLの希釈液（0.1 M 炭酸バッファー、2.0 mM MgCl₂、pH 9.8）で希釈した基質液100 μLを添加し、37で30分間インキュベートしたのちに、1N NaOHを50 μL添加して反応を止めた。分光光度計により、各ウェルの吸光度（A415/630 nm）を測定した。

20

30

【0078】

陽性検体としては購入検体を使用した。各陽性検体の抗パルボウイルスB19抗体のIgM価とIgG価、及びパルボウイルスB19のDNAレベル（IU/mL）を表1及び表2に示す。

【0079】

複数の陰性検体も各界面活性剤について同様に測定し、各界面活性剤について陰性検体の平均カウント値とSDを算出した。検体が陽性か否かを判定するためのカットオフ値を、陰性検体の平均カウント値 + 2SDの値に設定した。なお、カットオフ値は添加する界面活性剤の種類によって異なるため、界面活性剤毎に設定した。さらに、各陽性検体について、カウント値をカットオフ値で除した値を求めて判別値とした。この判別値が1以上の場合には、検体中にパルボウイルスB19抗原及び抗パルボウイルスB19抗体の少なくともいずれかが存在する（パルボウイルスB19陽性）と判別することができる。

40

【0080】

結果を表1及び表2に示す。表1及び表2には、各界面活性剤を添加した条件における判別値を示す。界面活性剤を添加した際の効果は、界面活性剤添加した時の判別値を非添加の時の判別値で除したものの百分率で判断した。両性界面活性剤又は陰イオン性界面活

50

性剤を反応液中に添加することによって、非添加条件に対し、複数の検体において、検出感度の上昇が認められた。特に、C12APS、C14APSの添加では、検出感度の顕著な上昇が認められた。また、SDS、NLSの添加でも、検出感度が大幅に上昇した。

【 0 0 8 1 】

【 表 1 】

		IgM値	IgG値	DNA	非添加 コントロール	両性 (濃度0.5%)	
						C12APS	C14APS
カットオフ値					0.058	0.073	0.075
カウント値	PVP201-07	7.5	0.6	1.1×10^4	0.102	2.548	2.344
	PVP201-09	5.5	2.6	4.9×10^5	0.125	0.792	0.795
	PVP201-11	4.4	0.8	3.7×10^4	0.050	0.608	0.565
	PVP201-12	6.2	0.3	2.5×10^6	0.084	0.586	0.522
	PVP201-13	2.4	0.1	2.3×10^9	0.055	0.190	0.180
	PVP201-15	0.9	0.1	2.9×10^{10}	0.047	0.109	0.100
	PVP201-16	0.1	0	4.4×10^{11}	0.083	0.112	0.115
判別値	PVP201-07	7.5	0.6	1.1×10^4	1.8	34.9	31.3
	PVP201-09	5.5	2.6	4.9×10^5	2.2	10.8	10.6
	PVP201-11	4.4	0.8	3.7×10^4	0.9	8.3	7.5
	PVP201-12	6.2	0.3	2.5×10^6	1.4	8.0	7.0
	PVP201-13	2.4	0.1	2.3×10^9	0.9	2.6	2.4
	PVP201-15	0.9	0.1	2.9×10^{10}	0.8	1.5	1.3
	PVP201-16	0.1	0	4.4×10^{11}	1.4	1.5	1.5
界面活性剤添加 時の判別値／非 添加時の判別値(%)	PVP201-07	7.5	0.6	1.1×10^4		1938.9	1738.9
	PVP201-09	5.5	2.6	4.9×10^5		490.9	481.8
	PVP201-11	4.4	0.8	3.7×10^4		922.2	833.3
	PVP201-12	6.2	0.3	2.5×10^6		571.4	500.0
	PVP201-13	2.4	0.1	2.3×10^9		288.9	266.7
	PVP201-15	0.9	0.1	2.9×10^{10}		187.5	162.5
	PVP201-16	0.1	0	4.4×10^{11}		107.1	107.1

10

20

30

【 0 0 8 2 】

【表 2】

		IgM価	IgG価	DNA	非添加 コントロール	陰性イオン (0.5%)	
						SDS	NLS
カットオフ値					0.058	0.166	0.096
カウント値	PVP201-07	7.5	0.6	1.1*10 ⁴	0.102	1.998	1.416
	PVP201-09	5.5	2.6	4.9*10 ⁵	0.125	0.873	0.363
	PVP201-11	4.4	0.8	3.7*10 ⁴	0.050	0.620	0.251
	PVP201-12	6.2	0.3	2.5*10 ⁶	0.084	0.656	0.236
	PVP201-13	2.4	0.1	2.3*10 ⁹	0.055	0.267	0.134
	PVP201-15	0.9	0.1	2.9*10 ¹⁰	0.047	0.120	0.073
	PVP201-16	0.1	0	4.4*10 ¹¹	0.083	0.508	0.333
判別値	PVP201-07	7.5	0.6	1.1*10 ⁴	1.8	12.0	14.8
	PVP201-09	5.5	2.6	4.9*10 ⁵	2.2	5.3	3.8
	PVP201-11	4.4	0.8	3.7*10 ⁴	0.9	3.7	2.6
	PVP201-12	6.2	0.3	2.5*10 ⁶	1.4	4.0	2.5
	PVP201-13	2.4	0.1	2.3*10 ⁹	0.9	1.6	1.4
	PVP201-15	0.9	0.1	2.9*10 ¹⁰	0.8	0.7	0.8
	PVP201-16	0.1	0	4.4*10 ¹¹	1.4	3.1	3.5
界面活性剤添加 時の判別値／非 添加時の判別値(%)	PVP201-07	7.5	0.6	1.1*10 ⁴		666.7	822.2
	PVP201-09	5.5	2.6	4.9*10 ⁵		240.9	172.7
	PVP201-11	4.4	0.8	3.7*10 ⁴		411.1	288.9
	PVP201-12	6.2	0.3	2.5*10 ⁶		285.7	178.6
	PVP201-13	2.4	0.1	2.3*10 ⁹		177.8	155.6
	PVP201-15	0.9	0.1	2.9*10 ¹⁰		87.5	100.0
	PVP201-16	0.1	0	4.4*10 ¹¹		221.4	250.0

10

20

【 0 0 8 3 】

(7) 両性界面活性剤 (C12APS) の添加濃度の評価

30

次いでC12APSの添加濃度について評価した。測定は、上記 (6) と同様に行った。結果を表 3 に示す。表中、「対非添加」は、界面活性剤添加時の判別値 / 非添加時の判別値 (%) である (表 4 ~ 表 1 0 でも同様) 。検討したC12APSの添加濃度0.05% ~ 5.0%の全ての範囲で、非添加条件に対し、検出感度の上昇が認められた。

【 0 0 8 4 】

【表 3】

	非添加 コントロール	0.05 %	0.1 %	0.5 %	1.0 %	2.0 %	3.0 %	4.0 %	5.0 %
カットオフ値	0.043	0.038	0.048	0.064	0.059	0.062	0.056	0.053	0.047
カウント値	PVP201-07	0.115	0.146	1.756	1.508	1.001	0.658	0.422	0.375
	PVP201-11	0.049	0.093	0.524	0.494	0.330	0.244	0.186	0.177
	PVP201-15	0.036	0.034	0.088	0.083	0.064	0.055	0.046	0.046
	PVP201-16	0.083	0.067	0.120	0.113	0.129	0.116	0.109	0.096
判別値	PVP201-07	2.7	3.8	27.4	25.6	16.1	11.8	8.0	8.0
	PVP201-11	1.1	1.2	8.2	8.4	5.3	4.4	3.5	3.8
	PVP201-15	0.8	0.9	1.4	1.4	1.0	1.0	0.9	1.0
	PVP201-16	1.9	1.8	1.9	1.9	2.1	2.1	2.1	2.0
対非添加	PVP201-07		140.7	344.4	1014.8	596.3	437.0	296.3	296.3
	PVP201-11		109.1	172.7	745.5	481.8	400.0	318.2	345.5
	PVP201-15		112.5	100.0	175.0	125.0	125.0	112.5	125.0
	PVP201-16		94.7	100.0	100.0	110.5	110.5	110.5	105.3

【 0 0 8 5 】

(8) 陰イオン性界面活性剤 (NLS) の添加濃度の評価

NLSの添加濃度について評価した。測定は、ブロッキング溶液 (2.0% BSA、3% スクロース、0.05% プロクリンを含むPBS)、1次反応液 (2% BSA、0.1% プロクリンを含むPBS) 及

10

20

30

40

50

び2次反応液(2% BSA、0.1% プロクリンを含むPBS)を用いた点を除いて上記(6)と同様に行った。結果を表4に示す。検討したNLSの添加濃度0.05%~5.0%のほぼ全ての範囲で、非添加条件に対し、検出感度の上昇が認められた。

【0086】

【表4】

		非添加 コントロール	0.05 % NLS	0.1 % NLS	0.5 % NLS	1.0 % NLS	5.0 % NLS
カットオフ値		0.127	0.118	0.130	0.113	0.114	0.086
カウント値	PVP201-07	0.516	0.552	0.594	0.936	0.624	0.174
	PVP201-16	0.336	0.366	0.414	0.486	0.528	0.552
判別値	PVP201-07	4.1	4.7	4.6	8.3	5.5	2.0
	PVP201-16	2.6	3.1	3.2	4.3	4.6	6.4
対非添加	PVP201-07		114.6	112.2	202.4	134.1	48.8
	PVP201-16		119.2	123.1	165.4	176.9	246.2

10

【0087】

(9) 両性界面活性剤および陰イオン性界面活性剤の添加の評価

分子内にアルキル基と第四級アンモニウムを含む両性界面活性剤について、アルキル基の鎖長を更に評価した。測定は、上記(6)と同様に行った。結果を表5および表6に示す。C10APSおよびC16APSを反応液に添加することによって、界面活性剤非添加条件に対し、検出感度の上昇が認められ、C10以上のアルキル基を有する両性界面活性剤では検出感度の上昇効果があることが示された。

20

【0088】

さらにC12のアルキル基を有する陰イオン性界面活性剤SDBS、及びC9のアルキル基を有する陰イオン性界面活性剤NDSの添加効果を評価した。測定は、上記(6)と同様に行った。結果を表6および表7に示す。SDBSおよびNDSを反応液に添加することによって、界面活性剤非添加条件に対し、検出感度の上昇が認められ、C9以上のアルキル基を有する陰イオン性界面活性剤では検出感度の上昇効果があることが確認された。

30

【0089】

【表5】

		非添加 コントロール	0.5 % C10APS	0.5 % C8APS
カットオフ値		0.043	0.037	0.036
カウント値	PVP201-07	0.115	0.133	0.099
	PVP201-16	0.083	0.064	0.077
判別値	PVP201-07	2.7	3.6	2.8
	PVP201-16	1.9	1.7	2.1
対非添加	PVP201-07		133.3	103.7
	PVP201-16		89.5	110.5

40

【0090】

【表 6】

		非添加 コントロール	0.5 % C16APS	0.5 % SDBS
カットオフ値		0.038	0.042	0.077
カウント値	PVP201-07	0.105	0.209	0.371
	PVP201-16	0.081	0.095	0.416
判別値	PVP201-07	2.8	5.0	9.3
	PVP201-16	2.1	2.3	10.4
対非添加	PVP201-07		178.6	290.6
	PVP201-16		109.5	416.0

10

【 0 0 9 1 】

【表 7】

		非添加 コントロール	NDS 0.5 %
カットオフ値		0.105	0.117
カウント値	PVP201-07	0.124	0.187
	PVP201-16	0.143	0.295
判別値	PVP201-07	1.2	1.6
	PVP201-16	1.4	2.5
対非添加	PVP201-07		133.3
	PVP201-16		178.6

20

【 0 0 9 2 】

(1 0) 陽イオン性界面活性剤の添加の評価

陽イオン性界面活性剤の添加効果を評価した。上記(8)と同様の方法で行った。結果を表 8 に示す。陽イオン性界面活性剤を反応液中に添加することによって、非添加条件に対し、複数の検体において、検出感度の上昇が認められた。

30

【 0 0 9 3 】

【表 8】

		非添加 コントロール	0.5 % C12TAB	0.5 % C14TAB	0.5 % C14TAC
カットオフ値		0.134	0.081	0.050	0.057
カウント値	PVP201-07	0.326	0.150	0.174	0.189
	PVP201-11	0.095	0.059	0.054	0.058
	PVP201-15	0.091	0.081	0.066	0.074
	PVP201-16	0.349	0.710	0.460	0.465
判別値	PVP201-07	2.4	1.9	3.5	3.3
	PVP201-11	0.7	0.7	1.1	1.0
	PVP201-15	0.7	1.0	1.3	1.3
	PVP201-16	2.6	8.8	9.2	8.2
対非添加	PVP201-07		79.2	145.8	137.5
	PVP201-11		100.0	157.1	142.9
	PVP201-15		142.9	185.7	185.7
	PVP201-16		338.5	353.8	315.4

10

20

【 0 0 9 4 】

(1 1) 陽イオン性界面活性剤 (C12TAB) の添加濃度の評価

C12TABの添加濃度について評価した。測定は、上記 (1 0) と同様に行った。結果を表 9 に示す。陽イオン性界面活性剤は、DNA 価の高い検体 (PVP201-16) における改善効果が大きいことから、検体PVP201-16を用いて評価したところ、検討した界面活性剤の添加濃度0.05%～5.0%の全ての範囲で、非添加条件に対し、検出感度の上昇が認められた。

【 0 0 9 5 】

【表 9】

		非添加 コントロール	0.05 % C12TAB	0.1 % C12TAB	0.5 % C12TAB	1.0 % C12TAB	5.0 % C12TAB
カットオフ値		0.127	0.097	0.102	0.073	0.092	0.096
カウント値	PVP201-16	0.336	0.738	0.792	0.954	2.316	1.548
判別値	PVP201-16	2.6	7.6	7.8	13.1	25.2	16.1
対非添加	PVP201-16		292.3	300.0	503.8	969.2	619.2

30

【 0 0 9 6 】

(1 2) 非イオン性界面活性剤 (Triton(登録商標)、Tween) の添加の評価

非イオン性界面活性剤の添加効果を評価した。測定は、上記 (6) と同様に行った。結果を表 1 0 に示す。非イオン性界面活性剤を添加した場合は、非添加条件と同等の検出感度を示し、検出感度の上昇は認められなかった。

40

【 0 0 9 7 】

【表 10】

		非添加 コントロール	0.5 % Triton100	0.5 % Triton705	0.5 % Tween20	0.5 % Tween40	0.5 % Tween60	0.5 % Tween80
カットオフ値		0.038	0.039	0.036	0.040	0.037	0.041	0.040
カウント値	PVP201-07	0.105	0.096	0.090	0.106	0.108	0.108	0.106
	PVP201-15	0.044	0.043	0.043	0.044	0.046	0.043	0.043
	PVP201-16	0.081	0.079	0.078	0.078	0.079	0.090	0.079
判別値	PVP201-07	2.8	2.5	2.5	2.7	2.9	2.6	2.7
	PVP201-15	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.0	1.1
	PVP201-16	2.1	2.0	2.2	2.0	2.1	2.2	2.0
対非添加	PVP201-07		89.3	89.3	96.4	103.6	92.9	96.4
	PVP201-15		91.7	100.0	91.7	100.0	83.3	91.7
	PVP201-16		95.2	104.8	95.2	100.0	104.8	95.2

10

【配列表】

2017065261000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/080507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N33/569(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>G01N33/569, G01N33/50, G01N33/53, C12N15/02, C12N15/09</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <i>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016</i> <i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016</i> Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2000/007023 A1 (Tonen Corp.), 10 February 2000 (10.02.2000), & US 2002/0173493 A1 & EP 1020727 A1 & CN 1274424 A	1-16
A	JP 2008-145181 A (Abbott Japan Co., Ltd.), 26 June 2008 (26.06.2008), (Family: none)	1-16
A	JP 08-304397 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 22 November 1996 (22.11.1996), (Family: none)	1-16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 December 2016 (21.12.16)		Date of mailing of the international search report 10 January 2017 (10.01.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/080507

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-501151 A (Bio-Rad Pasteur), 12 January 2006 (12.01.2006), & WO 2003/095968 A2 & US 2004/0072267 A1 & EP 1504266 A2 & CN 1659440 A	1-16

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 0 5 0 7										
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/569(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n												
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/569, G01N33/50, G01N33/53, C12N15/02, C12N15/09												
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2016年											
日本国実用新案登録公報	1996-2016年											
日本国登録実用新案公報	1994-2016年											
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) PubMed												
C. 関連すると認められる文献												
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
A	WO 2000/007023 A1 (東燃株式会社) 2000.02.10, & US 2002/0173493 A1 & EP 1020727 A1 & CN 1274424 A	1-16										
A	JP 2008-145181 A (アボットジャパン株式会社) 2008.06.26, (ファミリーなし)	1-16										
A	JP 08-304397 A (住友製薬株式会社) 1996.11.22, (ファミリーなし)	1-16										
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。												
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 </td> <td> の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 </td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献							
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 21.12.2016		国際調査報告の発送日 10.01.2017										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		<table border="1"> <tr> <td>特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td>2 J</td> <td>5 7 0 4</td> </tr> <tr> <td>西浦 昌哉</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101</td> <td>内線</td> <td>3252</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J	5 7 0 4	西浦 昌哉			電話番号 03-3581-1101	内線	3252
特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J	5 7 0 4										
西浦 昌哉												
電話番号 03-3581-1101	内線	3252										

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 0 5 0 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2006-501151 A (バイオロード パストゥール) 2006.01.12, & W0 2003/095968 A2 & US 2004/0072267 A1 & EP 1504266 A2 & CN 1659440 A	1-16

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/08 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	
	C 0 7 K 16/08	

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

F ターム(参考) 4H045 AA30 BA10 CA01 DA76 EA53 FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于同时检测人细小病毒B19抗原和抗体的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2017065261A1	公开(公告)日	2018-08-02
申请号	JP2017545479	申请日	2016-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	顧然 金子敦 青柳克己		
发明人	顧 然 金 子 敦 青 柳 克 己		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/531 C12N15/09 C07K14/015 C07K16/08		
CPC分类号	C12N15/02 C12N15/09 G01N33/5306 G01N33/56983 G01N2333/015 G01N2469/10 G01N2469/20 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/53.N G01N33/53.D G01N33/531.B C12N15/00.ZNA.A C07K14/015 C07K16/08		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/EA53 4H045/FA74		
优先权	2015203432 2015-10-15 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于同时检测人细小病毒B19抗原和IgM抗人细小病毒B19抗体的新颖手段。在同一反应系统中存在表面活性剂的情况下，根据本发明的样品中人细小病毒B19抗原和IgM抗人细小病毒B19抗体的同时检测方法，（1）用于检测细小病毒B19抗原的第一探针，和（2）用于检测IgM抗细小病毒B19抗体的第二探针 包括接触。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号 WO2017/065261	
発行日 平成30年8月2日 (2018. 8. 2)		(43) 国際公開日 平成29年4月20日 (2017. 4. 20)			
(51) Int. Cl.		F 1		テーマコード (参考) 4 H 0 4 5	
G O 1 N 33/569 (2006. 01)		G O 1 N 33/569		L	
G O 1 N 33/53 (2006. 01)		G O 1 N 33/53		N	
G O 1 N 33/531 (2006. 01)		G O 1 N 33/53		D	
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)		G O 1 N 33/531		B	
C O 7 K 14/015 (2006. 01)		C 1 2 N 15/00		Z N A A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く					
出願番号 特願2017-545479 (P2017-545479)					
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/080507		(71) 出願人 306008724 富士レビオ株式会社 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号			
(22) 国際出願日 平成28年10月14日 (2016.10.14)		(74) 代理人 110001656 特許業務法人 谷川国際特許事務所			
(31) 優先権主張番号 特願2015-203432 (P2015-203432)		(72) 発明者 顧 然 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内			
(32) 優先日 平成27年10月15日 (2015.10.15)		(72) 発明者 金子 敦 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		(72) 発明者 青柳 克己 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士 レビオ株式会社内			
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 ヒトパルボウイルスB 1 9 抗原および抗体の同時検出方法及びキット					