

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5712513号  
(P5712513)

(45) 発行日 平成27年5月7日(2015.5.7)

(24) 登録日 平成27年3月20日(2015.3.20)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>GO 1 N 33/569</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/569	Z N A L	
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	N	
<b>CO 7 K 14/045</b>	<b>(2006.01)</b>	CO 7 K 14/045		

請求項の数 7 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2010-154937 (P2010-154937)	(73) 特許権者	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) 出願日	平成22年7月7日(2010.7.7)	(74) 代理人	110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(65) 公開番号	特開2012-18051 (P2012-18051A)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
(43) 公開日	平成24年1月26日(2012.1.26)	(72) 発明者	藤井 信之 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内
審査請求日	平成25年4月23日(2013.4.23)	(72) 発明者	本多 秀夫 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトサイトメガロウイルス感染の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列から成る人工のポリペプチドであって、ヒトサイトメガロウイルスが産生するpp28に対して生体内で誘導された抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有する人工のポリペプチドを抗原として用いた免疫測定により、被検者から分離された試料中に含まれ得る、pp28に対する抗体を測定することを含む、ヒトサイトメガロウイルス感染の検出方法。

【請求項2】

前記人工のポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸が置換され、欠失され、挿入され及び/若しくは付加されたアミノ酸配列から成る請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記人工のポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列から成る請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記人工のポリペプチドは、遺伝子工学的手法により作製された組換えポリペプチドである請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列から成る人工のポリペプチドであって、ヒトサイトメガロウイルスが産生するpp28に対して生体

10

20

内で誘導された抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有する人工のポリペプチドを含む、ヒトサイトメガロウイルス感染の検出試薬。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の検出試薬を含む、ヒトサイトメガロウイルス感染の検出キット。

【請求項 7】

検体中の抗ヒトサイトメガロウイルス抗体を検出する免疫測定における抗原として、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列から成る人工のポリペプチドであって、ヒトサイトメガロウイルスが産生する pp28 に対して生体内で誘導された抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有する人工のポリペプチドを用いることを含む、抗ヒトサイトメガロウイルス抗体の検出感度を向上させる方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトサイトメガロウイルス感染の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) を原因とする感染症の血清学的診断には、一般的に、ウイルス抗原 (native 抗原) が使用されている。しかしながら、native 抗原では、調製法により生じるロット差を無視できない。また、ウイルス自体を扱うことから、安全性や簡便さに問題がある。

20

【0003】

HCMV 血清学的診断の標準化を達成するために、抗原のリコンビナント化が望まれているが、リコンビナント抗原のみを用いた場合には、検査の感度・特異性が十分ではないことが知られている。これは、多数のウイルス抗原の中からリコンビナント化すべき適切な抗原を選択することが困難だからである。それに加えて、各抗原タンパク質の部分発現断片を使用していることも一因と考えられている。

【0004】

例えば、主要な抗原として知られている pp150 は、分子量が約 150kDa のタンパク質であるため大腸菌を用いた大量合成が不可能であり、全長タンパク質を検査に利用することは困難である。そのため、市販の検査キットでは、pp150 の断片 (典型的には 30 残基 ~ 40 残基程度) を他の HCMV タンパク質断片と適宜混合して抗原として用いている。しかしながら、部分発現断片のみでは、検査の感度が 60% 程度と不十分であることが報告されている。

30

【0005】

もっとも、免疫測定による血清検査の分野では、全長抗原を用いたからといって必ずしも検出感度が上がらないことも知られている。例えば、非特許文献 1 には、HCMV の native 抗原 (ウイルスタンパク質を全長で含む) に対して HCMV 陽性患者血清群の抗体反応性を調べ、タンパク質ごとに抗体反応性を評価した結果が示されているが、100% に近い検出感度を達成できているのは pp150 のみであり、タンパク質の種類によっては検出感度が 50% 程度以下と非常に低くなっている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】特表 2000-514300 号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】Journal of Clinical Microbiology:37(1), p179-188, 1999

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

50

本発明の目的は、HCMV感染を高感度に検出できる実用性の高い新規な手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本願発明者らは、15種類ものHCMVタンパク質について全長タンパク質を合成し、HCMV感染患者血清との反応性を鋭意検討した結果、pp28全長タンパク質を抗原として用いた場合に全ての感染患者を漏れなく検出可能であること、pp28全長タンパク質は大腸菌を用いて組換えタンパク質として大量合成・精製が可能であり、HCMV検査のための抗原として商業利用が可能であることを見出し、本願発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列から成る人工のポリペプチドであって、ヒトサイトメガロウイルスが産生するpp28に対して生体内で誘導された抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有する人工のポリペプチドを抗原として用いた免疫測定により、被検者から分離された試料中に含まれ得る、pp28に対する抗体を測定することを含む、ヒトサイトメガロウイルス感染の検出方法を提供する。また、本発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列から成る人工のポリペプチドであって、ヒトサイトメガロウイルスが産生するpp28に対して生体内で誘導された抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有する人工のポリペプチドを含む、ヒトサイトメガロウイルス感染の検出試薬を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の検出試薬を含む、ヒトサイトメガロウイルス感染の検出キットを提供する。

【発明の効果】

【0011】

本発明により、検出感度が極めて優れたHCMV感染の検出手段が提供された。本発明によれば、簡便な免疫測定によって、全てのHCMV感染患者を漏れなく確実に検出することができる。公知の抗体検査方法には、pp28断片を抗原として用いる方法があり、例えば非特許文献1にもpp28を30残基程度のサイズの断片で用いて血清中の抗HCMV抗体を検出する方法が記載されている。しかしながら、非特許文献1によると、pp28断片では1割以上の患者で偽陰性が発生している。偽陰性が発生すると感染患者を見落とすことになるため、臨床検査では重大な問題である。本発明の方法によれば、感染患者を見落とすことなく確実に検出可能になり、臨床検査に大いに貢献できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】大腸菌で発現させたpp28組換えタンパク質を抗体カラムで精製した過程をウエスタンブロットにより確認した結果である。左は実施例で調製した抗pp28モノクローナル抗体を使用して検出、右は大腸菌抗原に対する抗体を使用して検出した結果である。Ma: マーカー、元: カラム添加前、pass: 通過画分、elute: 溶出画分、conc.: 濃縮画分。

【発明を実施するための形態】

【0013】

pp28は、HCMVの構造タンパク質のうちの一つである28 kDaのリンタンパク質であり、UL99遺伝子にコードされていることからUL99と呼ばれることもある。配列番号2に示されるアミノ酸配列は、HCMV AD169株が有するpp28のアミノ酸配列であり、GenBankにもX17403 (complete genome) 等のアクセッション番号で登録されている。配列番号2のアミノ酸配列をコードするウイルスDNAの塩基配列を配列番号1に示す。

【0014】

本発明では、配列番号2に示すアミノ酸配列から成る人工のpp28を抗原として用いる。あるいは、配列番号2のアミノ酸配列のうち少数のアミノ酸残基が置換され、欠失され、挿入され及び/又は付加されたアミノ酸配列から成り、且つ、HCMVが産生するpp28に対し生体内で誘導された抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有する人工のポリペプチドを抗原として用いる。後者のポリペプチドは、配列番号2との同一性が90%以上、好

10

20

30

40

50

ましくは95%以上、より好ましくは98%以上である。後者のポリペプチドとしては、配列番号2のアミノ酸配列のうち1個又は数個のアミノ酸残基が置換され、欠失され、挿入され及び/又は付加されたアミノ酸配列から成るものも好ましい。

#### 【0015】

実施例では、配列番号2に示すアミノ酸配列から成るpp28全長タンパク質のみを抗原として用いて、HCMV感染患者由来の100検体を全て検出可能であった。ウイルスはゲノムの変異が頻繁であり、pp28のアミノ酸配列についても臨床分離株で種々の変異配列が見出されている。そのため、これらの検体を採取した100人の感染患者間でも、HCMVのpp28のアミノ酸配列には一部相違があるものと考えられる。そのような種々のアミノ酸配列から成る天然のpp28に対して生体内で誘導された抗体であっても、いずれも、配列番号2に示すアミノ酸配列から成るポリペプチドと反応して検出されるのであるから、配列番号2とはアミノ酸配列に一部相違があるポリペプチドを抗原とした場合であっても、やはり同様にpp28に対する抗体(抗pp28抗体)を検出できると考えられる。配列番号2との同一性が十分に高いポリペプチドであれば、HCMV感染者体内で誘導された抗pp28抗体との反応性が、もとの配列番号2から成るpp28と同等である蓋然性が高い。

10

#### 【0016】

なお、任意のアミノ酸配列から成るポリペプチドが、HCMVが産生するpp28に対し生体内で誘導された抗体と抗原抗体反応により結合する反応性を有するかどうかは、例えば、既知のHCMV感染患者から分離した血清等の試料とそのポリペプチドとを反応させることで容易に確認できる。血清中に存在する抗体とポリペプチドとの結合が確認できれば、該ポリペプチドは上記した反応性を有すると判断できる。

20

#### 【0017】

ここで、アミノ酸配列の「同一性」とは、比較すべき2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基ができるだけ多く一致するように両アミノ酸配列を整列させ、一致したアミノ酸残基数を全アミノ酸残基数で除したものを百分率で表したものである。上記整列の際には、必要に応じ、比較する2つの配列の一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このような配列の整列化は、例えばBLAST、FASTA、CLUSTAL W等の周知のプログラムを用いて容易に行なうことができる。ギャップが挿入される場合、上記全アミノ酸残基数は、1つのギャップを1つのアミノ酸残基として数えた残基数となる。このようにして数えた全アミノ酸残基数が、比較する2つの配列間で異なる場合には、相同性(%)は、長い方の配列の全アミノ酸残基数で、一致したアミノ酸残基数を除いて算出される。

30

#### 【0018】

なお、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸は、低極性側鎖を有する中性アミノ酸(Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、親水性側鎖を有する中性アミノ酸(Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, Lys, His)、芳香族アミノ酸(Phe, Tyr, Trp)のように類似の性質を有するものにグループ分けでき、これらの間での置換であればポリペプチドの性質が変化しないことが多いことが知られている。従って、配列番号2の少数のアミノ酸残基がこれらの各グループ内で置換されている場合には、HCMVが産生するpp28に対して生体内で誘導された抗体との反応性が、もとの配列番号2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと同等である可能性が特に高い。このように置換されたアミノ酸配列から成るポリペプチドは、本発明で抗原として用いられるポリペプチドのうち、配列番号2とは異なるアミノ酸配列から成るものの好ましい一例である。

40

#### 【0019】

「人工のポリペプチド」とは、化学合成、遺伝子工学的的手法その他の方法で人為的に製造されたポリペプチドであり、HCMVに感染した細胞内でHCMVゲノムから発現し産生されたタンパク質を回収したものは包含されない。pp28のアミノ酸配列及びこれをコードする塩基配列は、上記した通りデータベースに登録され公知であり、本願配列表にも記載されている。また、各アミノ酸をコードするコドンに公知であるから、特定のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの塩基配列は容易に特定することができる。従って、配列番号

50

2とは異なるアミノ酸配列から成るポリペプチドであっても、それをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を容易に特定できる。本発明で抗原として用いるポリペプチドは、これらの配列情報に基づき、いずれの方法によっても製造することができる。

【0020】

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

【0021】

遺伝子工学的的手法によるポリペプチドの作製方法も周知であり、簡単に記載すると、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製し、該ポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに組み込み、適当な発現系を使用して発現させ、これを回収・精製することにより、目的とする抗原ポリペプチドを組換えポリペプチドとして得ることができる。本発明で抗原として用いるポリペプチドは百数十残基以上のサイズを有するので、低コストで大量合成するためには遺伝子工学的的手法により大腸菌等の宿主細胞を用いて組換えポリペプチドを作製することが好ましい。使用する宿主細胞の種類に応じて、組換えポリペプチドは各種の翻訳後修飾（N末端メチオニンの脱離、N末端アセチル化、糖鎖付加、細胞内プロテアーゼによる限定分解、ミリスチル化、イソプレニル化、リン酸化など）を受け得るが、そのような翻訳後修飾された形態のポリペプチドも、HCMVが産生するpp28に対し生体内で誘導された抗体との反応性を有する限り、本発明の方法で抗原として使用できる。

【0022】

配列番号2に示すアミノ酸配列から成るポリペプチドを遺伝子工学的的手法で作製する場合、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号1）は、例えば、配列番号2のアミノ酸配列から成るpp28を有するHCMV（AD169株等）を適当な宿主細胞に感染させ、この感染細胞からウイルスDNAを抽出し、PCRによりDNAを合成することで調製できる。PCRに使用するプライマーは、当業者であれば、配列番号1に示した塩基配列に基づいて容易に設計・調製でき、例えば実施例で用いている配列番号3及び4に示す塩基配列から成るプライマーを使用できる。他のアミノ酸配列から成るpp28を発現するHCMV株を用いれば、配列番号2とは異なるアミノ酸配列から成るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを調製できる。また、所望のアミノ酸配列から成る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て、又は上記の通りに調製したDNAに常法により適宜変異を導入して得ることができる。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、適当な発現系にて発現させ、これを回収・精製することで、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。HCMV株も市販されており、また、感染患者から分離して得ることもできるので、入手は容易である。ウイルスDNAの抽出、PCR、ベクターへのDNAの組み込み、宿主細胞へのベクターの導入、発現させたポリペプチドの回収・精製等の手法自体は周知の常法である。

【0023】

下記実施例に具体的に記載されるように、配列番号2に示すアミノ酸配列から成る組換えポリペプチドは、大腸菌発現系を用いて発現させることができ、この発現させたポリペプチドは、例えばpp28と特異的に結合するモノクローナル抗体を固定化した抗体カラムを用いて簡便に精製できる。こうして得られた組換えポリペプチドを免疫測定抗原として用いると、HCMV感染患者を漏れなく全て検出できる。なお、モノクローナル抗体の作製方法は周知の常法であり、当業者であれば容易に作製できる。例えば、下記実施例にも記載されるように、不活化ウイルスを動物に免疫し、該動物から脾細胞等の抗体産生細胞を採取し、これをミエロマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、所望の結合性を有する抗体を産生するハイブリドーマを選択して増殖させることで、培養上清からpp28に特異

10

20

30

40

50

的に結合するモノクローナル抗体を回収することができる。

【0024】

免疫測定自体はこの分野で周知である。免疫測定を反応様式で分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法、イムノクロマト法、ウエスタンプロット法等があり、標識で分類すると、放射免疫測定、蛍光免疫測定、酵素免疫測定（EIA）、ビオチン免疫測定等がある。また、抗原を用いた抗体検査法も各種の手法が知られており、具体例としては、これらに限定されないが、EIA（ELISA、CLEIA（化学発光酵素免疫測定法）、ウエスタンプロット等）、凝集法（ラテックス凝集法等）、補体結合反応（CF）等が挙げられる。本発明の方法で試料中の抗pp28抗体を測定する際には、公知の免疫測定法のいずれを用いてもよい。なお、本発明において、「測定」という語には、検出、定量及び半定量が包含される。

10

【0025】

免疫測定において用いる際には、上記した人工ポリペプチド抗原は、任意のアミノ酸配列が片末端又は両末端に付加された形態で（そのような付加配列を含んだアミノ酸配列から成るポリペプチドとして）使用することができる。この分野において、異なるタンパク質と融合させた融合タンパク質であっても、一方のタンパク質を認識する抗体で検出可能であることは広く知られた事実である。従って、このような形態で上記人工ポリペプチドを用いても、試料中の抗pp28抗体を免疫測定することができる。例えば、他のタンパク質との融合タンパク質の形態で用いた場合でも、その融合タンパク質の中で抗pp28抗体の抗原として機能しているのは上記人工ポリペプチドの部分であるから、「人工のポリペプチドを抗原として用いる」ことに包含される。このように、上記人工ポリペプチド抗原を任意のアミノ酸配列が片末端又は両末端に付加された形態で用いる場合も、本発明の方法に包含される。上記人工ポリペプチドに付加されるアミノ酸配列は、何らかの機能性タンパク質又はその機能性断片を構成するものであってよいし、リンカー等の生理活性のない配列であってもよい。組換えポリペプチドの場合は、製造工程でGSTやHis等のタグ配列が付加されることがあるが、そのようなタグ配列が付加されたままの状態であっても抗原として使用可能である。

20

【0026】

例えば、ELISAやCLEIAの場合には、上記人工ポリペプチド抗原を、それぞれプレートまたは粒子等に固相化し、これを試料と反応させて試料中の抗pp28抗体を固相上に捕捉し、洗浄後、酵素標識された抗IgG抗体及び/又は抗IgM抗体と反応させ、洗浄後、基質物質を添加する。酵素反応量に基づき、固相上に捕捉された抗pp28抗体を測定することができる。ウエスタンプロットの場合には、上記人工ポリペプチド抗原を電気泳動後メンブレンに転写し、このメンブレンを試料と反応させた後、上記と同様に酵素標識された抗IgG抗体及び/又は抗IgM抗体と反応させればよい。凝集法の場合には、例えばラテックス粒子等により上記人工ポリペプチド抗原を固定化し、これを試料と反応させ、粒子の凝集量を吸光度等により測定すればよい。

30

【0027】

生体内でHCMVに対して誘導される抗体は主にIgGとIgMである。初感染の場合、まずIgMが上昇し、感染数日後にピークに達してそれ以後は減少、IgGは感染後1週間程度で上昇し始め以後長期間持続する。従って、試料中の抗pp28抗体をIgGとIgMに分けて検出可能な手法の場合（例えば上記のELISAやウエスタンプロット等）、HCMV感染を確実に検出する観点からは、抗原で補足した抗pp28抗体の検出に抗IgG抗体及び抗IgM抗体の両者を用いることが好ましい。

40

【0028】

本発明の方法が適用される試料は、被検者から分離された試料であり、好ましくは血液試料（全血、血漿、血清等）である。

【0029】

本発明の方法を実施する際には、上記人工ポリペプチド以外のHCMV抗原タンパク質又はその断片を同時に用いてもよい。例えば、ELISAの場合には、抗原を全て混合してプレー

50

トに固相化するか、又は別個のウェルにそれぞれ固相化し、これを試料と反応させてもよい。CLEIAの場合には、抗原を全て混合して粒子に固相化し、これを試料と反応させてもよい。ウエスタンブロットの場合には、例えば抗原を全て混合して電気泳動した後にメンブレンに転写し、これを試料と反応させてもよい。凝集法の場合には、混合した抗原を粒子に固定化するか、又は抗原をそれぞれ単独で固定化した粒子を混合し、この粒子を試料と反応させてもよい。

【0030】

上記した人工のポリペプチドは、HCMV感染の検出試薬として提供することができる。該試薬は、上記したポリペプチドのみを含んでいてもよいし、pp28以外の1種以上の抗原タンパク質又はその断片をさらに含んでいてもよい。また、これらのポリペプチドの安定化等に有用な他の成分をさらに含んでいてもよい。さらにまた、抗原ポリペプチドがプレートや粒子等の固相上に固定化された形態で提供することもできる。

10

【0031】

上記検出試薬は、他の試薬類等と適宜に組み合わせてHCMV感染の検出キットとして提供することができる。免疫測定に必要な他の試薬類は周知である。

【実施例】

【0032】

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。

【0033】

20

1. 抗原候補の選択

HCMVタンパク質のうち15種類(下記表1)のタンパク質について、小麦胚芽無細胞発現系により全長タンパク質を合成した。合成にはセルフリースサイエンス社のProtomist DTを使用した。ベクターに挿入するインサートDNAは、HCMV AD169株(理研バイオリソースセンターより購入)をMRC-5細胞に感染させ、この感染細胞からウイルスDNAを抽出し、市販のキットを用いたPCRにより、各全長タンパク質をコードするDNAを増幅して得た。SP6プロモーターを含むプラスミドベクターに各DNAをクローニングし、得られたプラスミドDNAを用いて、5mLの反応系(プラスミドDNA 25µg)にて37℃、6時間の転写反応及び15℃、20時間の翻訳を行ない、それぞれの全長タンパク質を合成した。なお、pp28のDNAの増幅には、配列番号3及び4に示す塩基配列から成るプライマー(それぞれ、BamHI認識配列及びNotI認識配列を含む)を使用し、Pfu Ultra DNA polymerase(Agilent Technologies社)を用いて95℃2分間の変性処理、95℃20秒 - 55℃20秒 - 72℃1分を30サイクル、最後に72℃3分間の反応条件でPCRを行なった。

30

【0034】

【表 1】

タンパク質名	アミノ酸数
ppUL32(pp150)	1048
ppUL44(pp52)	433
ppUL83(pp65)	561
ppUL80a(pp38)	373
ppUL99(pp28)	190
ppUL55(gp130)	907
UL75	743
UL123	491
UL122	411
pUL57	1235
UL115	306
UL100	372
UL73	138
UL74	466
<b>UL82</b>	559

10

## 【 0 0 3 5 】

20

## 2 . 候補抗原の決定

上記で合成した各全長タンパク質について、ウエスタンブロット法によりHCMV感染患者血清100例との反応性を調べた。各全長タンパク質を電気泳動してメンブレンに転写し、メンブレンをHCMV感染患者血清100例と反応させた後、anti-Human IgG + IgMにて検出した。その結果、下記表 2 に示す通り、pp150, pp28, gp130の3種類が100%の反応性を示した。

## 【 0 0 3 6 】

【表 2】

HCMV感染患者血清100例結果		
	血清陽性数	%
ppUL32(pp150)	100	100
ppUL44(pp52)	52	52
ppUL83(pp65)	67	67
ppUL80a(pp38)	65	65
ppUL99(pp28)	100	100
ppUL55(gp130)	100	100
UL75	25	25
UL123	65	65
UL122	67	67
pUL57	27	27
UL115	2	2
UL100	95	95
UL73	1	1
UL74	0	0
UL82	18	18

30

40

## 【 0 0 3 7 】

## 3 . 大腸菌発現系による抗原の作製

組換えタンパク質の大量生産のためには大腸菌発現系を利用することが望ましい。そこ

50

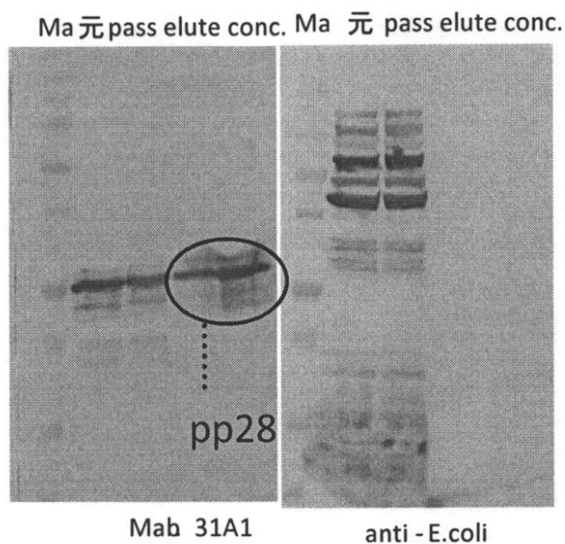
で、100%の反応性を示した3種類の抗原について、常法の大腸菌発現系を用いて全長タンパク質の作製を検討した。上記で調製した各抗原タンパク質をコードするcDNAを大腸菌用の発現ベクターに組み込み、大腸菌に導入して発現させた。その結果、pp28の発現を確認することができた。一方、pp150, gp130(膜タンパク質)は大腸菌で発現不可能であった。

【0038】

大腸菌で発現できたpp28は、抗体カラムを用いて精製を行なった。不活化ウイルスをマウスに免疫して常法によりpp28抗原特異的モノクローナル抗体を作製し、この抗体をCNBr-Activated Sepharose 4Bカラム(GE Healthcare社)に固定化して精製の抗体カラムとした。その結果、一回のカラム処理のみで、大腸菌由来タンパク質のコンタミもなくpp28タンパク質を精製することができた(図1)。この組換えpp28タンパク質によっても、HC MV感染患者を100%検出することができた。

10

【図1】



【配列表】

[0005712513000001.app](#)

---

フロントページの続き

- (72)発明者 内田 好昭  
東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内
- (72)発明者 小見 和也  
東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特表2000-514300(JP,A)  
特表2010-517544(JP,A)  
特開2008-263983(JP,A)  
特開昭63-022192(JP,A)  
MEYER H. et al., Identification and Procaryotic Expression of theGene Coding for the H  
ighly Immunogenic 28-Kilodalton StructuralPhosphoprotein(pp28) of Human Cytomegaloviru  
s, J. Virol., 1988年 7月, Vol.62, No.7, P.2243-2250

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	检测人巨细胞病毒感染的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5712513B2</a>	公开(公告)日	2015-05-07
申请号	JP2010154937	申请日	2010-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
当前申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	藤井信之 本多秀夫 内田好昭 小見和也		
发明人	藤井 信之 本多 秀夫 内田 好昭 小見 和也		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 C07K14/045		
CPC分类号	G01N33/6854 C07K14/005 C12N2710/16122 G01N33/56994 G01N2333/045 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/569.ZNA.L G01N33/53.N C07K14/045 G01N33/569.LZN.A		
F-TERM分类号	4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	谷川荣次郎		
其他公开文献	JP2012018051A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供具有高实用性的新方法，能够以高灵敏度检测HCMV感染。溶解：通过合成全长蛋白质检查HCMV感染患者的血清反应性的结果15种HCMV蛋白，发现当使用pp28全长蛋白作为抗原时，可以无遗漏地检测所有感染患者。pp28全长蛋白质可以通过使用大肠杆菌作为重组蛋白质大量合成和精制，并且可以在商业上用作检测HCMV的抗原。

	血清陽性数	%
ppUL32(pp150)	100	100
ppUL44(pp52)	52	52
ppUL83(pp65)	67	67
ppUL80a(pp38)	65	65
ppUL99(pp28)	100	100
ppUL55(gp130)	100	100
UL75	25	25
UL123	65	65
UL122	67	67
pUL57	27	27
UL115	2	2
UL100	95	95
UL73	1	1
UL74	0	0
UL82	18	18