

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-513865

(P2010-513865A)

(43) 公表日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569	L 4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2009-540963 (P2009-540963)	(71) 出願人	509166571 バイオトリン・インテレクチュアル・プロ パティーズ・リミテッド アイルランド国カウンティ・ダブリン、マ ウント・メリオン、ザ・ライズ 93
(86) (22) 出願日	平成18年12月15日(2006.12.15)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(85) 翻訳文提出日	平成21年8月11日(2009.8.11)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(86) 国際出願番号	PCT/IE2006/000141	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02008/072216	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成20年6月19日(2008.6.19)	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトパルボウイルス抗原の検出方法

## (57) 【要約】

試料中のヒトパルボウイルスノエリスロウイルス抗原を検出するための方法は、pHの範囲が3.0～4.0である緩衝液、適切にはクエン酸ノクエン酸三ナトリウム緩衝液を試料と接触させ、続いて当該抗原を測定することを含む。抗原の測定は、ウイルス捕捉エンザイムイムノアッセイによることができる。当該方法は最近の感染についての良好な指標であり、それから血液産物を抽出する個々の血漿単位又はプールのスクリーニングに使用できる。

【選択図】 図2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料中のヒトパルボウイルス抗原を検出するための方法であって、pHの範囲が3.0～4.0である緩衝液を試料と接触させ、その後、前記抗原を測定することを含む方法。

## 【請求項 2】

緩衝液のpHが3.4～3.6の範囲である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

緩衝液がクエン酸緩衝液である、請求項1又は2に記載の方法。

## 【請求項 4】

緩衝液がクエン酸/クエン酸三ナトリウム緩衝液である、請求項3に記載の方法。

10

## 【請求項 5】

緩衝液を試料に4:1の比率で添加する、請求項1～4いずれか1項記載の方法。

## 【請求項 6】

試料が、全血、血漿、血清又は臍帯血から選択される、請求項1～5いずれか1項記載の方法。

## 【請求項 7】

試料が羊水、骨髄又は滑液から選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 8】

緩衝液の添加後に試料を中和する、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

20

## 【請求項 9】

抗原の測定を、イムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ又は免疫蛍光アッセイにより行う、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 10】

抗原を捕捉エンザイムイムノアッセイにより測定する、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 11】

PCRにより測定し、かつヒトパルボウイルスDNAに関するWHO国際基準に対して検量して、感度が $10^8 \sim 10^9$ ヒトパルボウイルスDNA国際単位/mlである、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 12】

実質的に本明細書に記載及び例示された、請求項1に記載の方法。

30

## 【請求項 13】

供血者をヒトパルボウイルスに関してスクリーニングするための、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒトにおけるヒトパルボウイルス感染症の検出、特に急性感染症の検出に関する。

## 【0002】

本明細書中でヒトパルボウイルスはヒトエリスロウイルスをも意味し、これら両用語は同義である。

40

## 【背景技術】

## 【0003】

ヒトパルボウイルスは無エンベロープ型の一本鎖DNAウイルスであり、骨髄及び血液の赤血球前駆細胞に感染する。その正20面体ウイルスカプシドは2種類の構造タンパク質VP1(5%)及びVP2(95%)からなる(非特許文献1)。

## 【0004】

現在、ヒトパルボウイルスの遺伝子型が3種類知られている：遺伝子型1(プロトタイプ、パルボウイルスB19)、遺伝子型2(A6及びLaIi)及び遺伝子型3(V9)

50

。当該遺伝子型はゲノムレベルでプロトタイプから約10%異なるが、それらには類似の機能特性及び免疫学的特性があり、免疫学的には明瞭に区別できないことが知られている（非特許文献2）及び（非特許文献3）。

#### 【0005】

しばしば小児期に感染症に感染し、その際、伝染性紅斑（第五病）として知られる軽症疾患を起こす可能性があり、通常は定型的（self-limiting）である。成人になるまでに血清陽性率（seroprevalence）は約70%に達し（非特許文献4）、免疫適格個体における感染により骨髄無形成性発症（aplastic crisis）及び関節障害を発症しうる（非特許文献5）。免疫無防備状態の宿主及び基礎血液疾患を伴う宿主において、ヒトパルボウイルスは重大な病原体であり、重篤な合併症、たとえば慢性貧血症、純赤血球無形成症及び血小板減少症を発症しうる。妊娠中の経胎盤胎児感染により、胎児の死亡、胎児水腫又は先天性貧血症がおりうる（非特許文献6）。現在の処置選択肢には、輸血及び免疫グロブリン静注が含まれる。これらの処置は病原性パルボウイルス伝播源にもなる。

10

#### 【0006】

感染の最初の3日間は無症候性の場合があり、この期間に末梢血におけるウイルス血症がしばしばml当たり $10^{1-2}$ ゲノム当量（geq/ml）を超える。抗体が産生されるとこの数値は急速に低下するが、DNAは感染後の数年間は検出可能な状態を維持しうる（非特許文献7）。感染したばかりの個体は意図せず、ウイルス血症性の血液を供血する可能性があり、これは受血者にとって重篤な輸血後予後をもたらす、あるいは抽出血液製剤を通して伝播される可能性がある（非特許文献8）。したがって、血液製剤のヒトパルボウイルス汚染は保健上の重大な問題である；それは主に、ヒトパルボウイルスが血漿加工に用いられる多くの処理、たとえば溶剤-界面活性剤処理、凍結乾燥及び高温に対して回復力（resilience）が高いためである。したがって、それから血液産物を抽出する個々の血漿単位又はプールにおいてパルボウイルスを検出するための迅速、高感度及び低経費のスクリーニング法が求められている（非特許文献9）。

20

#### 【0007】

現在まで、ヒトパルボウイルスの最小感染レベルもパルボウイルスIgGの防御レベルも決定又は解明されていない。供血者及び受血者における中和抗体レベルとウイルスレベルの相互関係により血液製剤が感染性であるかどうかが決まるので、両パラメーターは重要である。先に、20,000の個々の血液単位に由来する40の別個の血液プールがPCRによりスクリーニングされ（非特許文献10）、B19 DNAについて陽性である5人の供血者が明らかになった（ $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^{10}$ コピー/ml）。これらの個体は供血の3～6カ月後に血清転換した（seroconverted）（非特許文献10）。ヒトパルボウイルスは1:625～1:16,000の輸血中に存在すると推定されている（非特許文献11）。さらに、血友病患者には一般集団より高い血清有病率がみられた；その理由は、プール血漿から精製したV因子中にヒトパルボウイルスが存在するからであるという可能性が最も高い（非特許文献12）。

30

#### 【0008】

妊娠女性に関連しうる公衆衛生環境及び大発生により重篤な医療影響を重大な結果をもたらされる環境で、急性パルボウイルス感染症の診断を確認することは重要である。成人における多くのヒトパルボウイルス感染症が無症候性であるため、供血者をスクリーニングすることも重要である；高い供血者ウイルス血症は大量の血漿プールを汚染し、ウイルスを伝播する可能性があるからである。ヒト血漿又はそれに由来する血液製剤のヒトパルボウイルス汚染は、ヒトの健康に対する重大な脅威として認識されている。

40

#### 【0009】

現在、ヒトパルボウイルスカプシドタンパク質の産生は免疫蛍光（IF）染色アッセイ及び血球凝集反応（HA）アッセイにより検出されており、ウイルスDNA産生はPCR、ドットプロットハイブリダイゼーション及び定量PCRにより検出されている。RT-PCRによるRNA転写体の検出は感染の間接マーカーとして用いられる。先に、骨髄無

50

形成性発症患者からの急性期血清中のヒトパルボウイルスを検出するために抗原検出用 EIA が用いられた。電子顕微鏡及び DNA ハイブリダイゼーションにより測定すると、高力価ウイルスを含む血清検体の 6 / 16 にヒトパルボウイルスが検出されたが、ヒトパルボウイルス抗体は検出されなかった。血清転換した中力価又は低力価ヒトパルボウイルス DNA を含む血清検体 ( n = 10 ) からは、ヒトパルボウイルスは検出されなかった ( 非特許文献 13 )。ヒトパルボウイルス DNA は定量しなかったため、アッセイ感度は確立されなかったが、ヒトパルボウイルス DNA ハイブリダイゼーションアッセイより低いと報告された。ヒトパルボウイルス免疫複合体が感度低下の原因であると考えられた。

【 0010 】

V P 1 及び V P 2 モノクローナル抗体の組合わせを用いて、ヒト血清中のヒトパルボウイルスカプシドを検出するためのドットプロットアッセイが開発された。このアッセイをドットプロットハイブリダイゼーションアッセイ及び入れ子型 P C R アッセイと比較し、その後、ハイブリダイゼーションアッセイに匹敵するか又はそれよりわずかに高いが P C R より低い感度であるとみなされた ( 非特許文献 14 )。

【 0011 】

P C R ベースのアッセイの感度の方がはるかに優れるが、当該アッセイは実際には E I A にはない欠点がある。まず第 1 に、パルボウイルス B 19 及び 2 つの変異体の遺伝子多型性は、プライマーの選択が重要であることを意味する ( 非特許文献 9 ; 非特許文献 15 )。第 2 に、ウイルス血症後の血漿における DNA の有意性 ( significance ) が不明瞭である。最後に、常に DNA 交差汚染の可能性があり、これは偽陽性の結果をもたらす可能性がある。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0012 】

【 非特許文献 1 】 Ozawa, K., et al., (1987) J. Virol 61: 2395-2406

【 非特許文献 2 】 Parsyan, A. et al (2006) Journal of Clinical Microbiology 44 1367-75

【 非特許文献 3 】 Hokynar, K. et al (2006) XIth Parvovirus Workshop, Switzerland

【 非特許文献 4 】 Brown, K.E., (1997) Anderson, L.J., Young, N. S., editors. Human parvovirus B 19. Basel: Karger, p 42-60

【 非特許文献 5 】 Kerr, S., et al (1999) Journal of Medical Virology 57 179-185

【 非特許文献 6 】 Anand, A., et al, (1987) 316 183-186

【 非特許文献 7 】 Cassinotti, P. and Siegl, G., (2000) Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19, 886-7

【 非特許文献 8 】 Hayakawa, F., et al, (2000) British Journal of Hematology 118(4) 1187-9

【 非特許文献 9 】 Aubin, J.T., et al, (2000) Vox Sanguinis 78 7-12

【 非特許文献 10 】 McOmish, F. et al, (1993) J. Clin Microbiol 31(2): 323-328

【 非特許文献 11 】 Thomas, I. et al, (2003) Vox Sang 84: 300-7

【 非特許文献 12 】 Laub, R. and Strengers, P. (2002) Pathol Biol (Paris) 50(5): 339-48

【 非特許文献 13 】 Anderson, M.J., et al, (1986) J infect Disease 152: 257-265

【 非特許文献 14 】 Gentilomi, G. et al, (1997) J Clin Microbiol. 35: 1575-8

【 非特許文献 15 】 Nguyen, Q.T., et al, (2002) Virology Sep 30 301(2) 2374-80

【 発明の概要 】

【 0013 】

本発明は、試料中のヒトパルボウイルス抗原を検出するための方法であって、 pH の範囲が 3 . 0 ~ 4 . 0 である緩衝液を試料と接触させ、その後、当該抗原を測定することを含む方法を提供する。

【 0014 】

10

20

30

40

50

本発明の方法は、ヒトパルボウイルス抗原検出に際して発生する信号を著しく改善し、アッセイ感度がより高まる。

【0015】

本発明の方法は、免疫複合体の存在下及び不存在下でヒトパルボウイルス抗原を検出するのに有効であることが認められた。

【0016】

好ましくは、緩衝液のpHは3.4～3.6の範囲である。

【0017】

さらに、好ましくは、緩衝液はクエン酸緩衝液である。

【0018】

最も好ましくは、緩衝液は、クエン酸/クエン酸三ナトリウム緩衝液である。

【0019】

好ましくは、緩衝液を試料に4:1の比率で添加する。

【0020】

試料は、好ましくは全血、血漿、血清又は臍帯血から選択される。

【0021】

あるいは、試料は羊水、骨髄又は滑液から選択される。

【0022】

1の態様では、緩衝液の添加後に試料を中和する。

【0023】

好ましくは、抗原の測定をイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ又は免疫蛍光アッセイにより行う。

【0024】

最も好ましくは、抗原を捕捉エンザイムイムノアッセイにより測定する。

【0025】

本発明は、ヒトパルボウイルスの直接検出のための簡易かつ使用しやすいヒトパルボウイルス捕捉アッセイを提供する。

【0026】

1の態様では、本方法は、PCRにより測定し、かつヒトパルボウイルスDNAに関するWHO国際基準に対して検量して、 $10^8 \sim 10^9$  ヒトパルボウイルスDNA国際単位/mlの感度がある。

【0027】

本発明の方法は、供血者をヒトパルボウイルスにスクリーニングする際に使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、実施例1に記載する、2つの異なるバッチの組換えVP2(rVP2)における低pHと通常の試料希釈液の比較である(OD450/630nm - 対 - rVP2タンパク質濃度ng/ml)。

【図2】図2は、実施例1に記載する、qPCRにより測定した種々のウイルス濃度の天然ヒトパルボウイルスを検出する際の低pHと通常の試料希釈液の比較である(OD450/630nm - 対 - ヒトパルボウイルスDNA(IU/ml))。

【図3】図3は、実施例1に記載する、ヒトパルボウイルスIgM抗体を含有する試料又は含有しない試料中の天然ヒトパルボウイルスを検出する際の低pHと通常の試料希釈液の比較である(OD450/630nm - 対 - ヒトパルボウイルスDNA(IU/ml))。

【図4】図4は、実施例1に記載するウイルス捕捉指数値 - 対 - ヒトパルボウイルスDNA(IU/ml)のグラフである。

【図5】図5は、実施例1に記載するIgM指数値 - 対 - ヒトパルボウイルスDNA(IU/ml)のグラフである。

【図6】図6は、実施例2に記載する本発明によるウイルス捕捉アッセイで試験した2バ

10

20

30

40

50

ッチの組換えVP2に関するO.D. 450/630nm - 対 - VP2タンパク質濃度 (ng/ml) のグラフである。

【図7】図7は、実施例3に記載する本発明によるウイルス捕捉アッセイにおけるパルボウイルス遺伝子型1と遺伝子型3のVP2の検出の比較である。

【図8】図8は、実施例3に記載する本発明によるウイルス捕捉アッセイにおけるパルボウイルス遺伝子型1と遺伝子型2の反応性の比較である。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明をさらに下記の実施例により説明する。

【実施例】

【0030】

実施例1

供血者集団におけるヒトパルボウイルス性ウイルス血症のレベルのスクリーニング

ドイツ人供血者を17カ月間にわたり、ドイツ血液銀行がスクリーニングし、これにより、供血時にヒトパルボウイルスDNAレベルが $10^6$  IU/mlより多い70人の個体が同定された。これら70人の供血者からの試料検体を、さらに、本発明により、ウイルス抗原捕捉EIAでヒトパルボウイルスについて検査し、ヒトパルボウイルスIgM及びIgG抗体についても検査した。

【0031】

ヒトパルボウイルス抗体産生

パキウウイルスにおいて発現させた組換えヒトパルボウイルスVP2を上記記載により精製し(非特許文献5)、ウサギ及びヒツジの免疫化に使用した。十分な力価が得られたら、血清を採集し、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによりIgGを精製した。精製した抗ヒツジポリクローナルIgGをマイクロタイタープレートのウェル上にコーティングして、ヒトパルボウイルス捕捉抗体として用いた。西洋わさびペルオキシダーゼにコンジュゲートさせたウサギ抗VP2(Hermanson G.T. 1996. Heterobifunctional Cross-linkers, Bioconjugate Techniques 第1版, California Academic Press p 236-237)を用いて、抗原捕捉EIAにおいて捕捉されたウイルスを検出した。

【0032】

プレートのコーティング

ウサギ抗VP2 IgGをマイクロタイタープレート(Nunc Maxisorp)上に50mM炭酸ナトリウム、pH9.6(コーティング用緩衝液)中においてコーティングし、2~8で18時間インキュベートした。次いで、0.15MのNaCl及び0.1%(v/v)のTween(Tweenは商標である)-20(TBST)を含有する20mM Tris-HCl、pH7.2でマイクロウェルを2回洗浄し、1%(w/v)のウシ血清アルブミン(Sigma)を含有するコーティング用緩衝液中において37で1時間遮断した。続いてTBSTによる洗浄サイクルの後、プレートを37で乾燥させ、必要になるまで保存した。

【0033】

パルボウイルス捕捉アッセイ操作

被験血漿及び対照検体を低pH希釈剤(100mMクエン酸/クエン酸三ナトリウム緩衝液、pH3.6; 0.1%(v/v)のTriton X(Triton Xは商標である)-100、0.4%(v/v)のTween-20及び10mMのEDTAを含有する)中に1:5希釈した後、抗-VP2 IgGコーティングしたマイクロウェルに添加した(100µl/ウェル)。

【0034】

希釈した検体を37で1時間インキュベートした。TBSTで4回洗浄して結合していない物質を除去した後、ウサギ抗VP2ヒトパルボウイルスIgG-HRPコンジュゲート(100µl/ウェル)をウェルに添加し、37で30分間インキュベートした。ウェルを洗浄し(4×TBST)、テトラメチルベンジジン(TMB)基質((100µ

10

20

30

40

50

1 / ウェル ; B i o F X ) をウェルに添加し、37 で30分間インキュベートした。次いで1 N 硫酸 ( 1 0 0 μ l / ウェル ) を用いて反応を停止し、450 / 630 nm で吸光度を測定した。試料中のヒトパルボウイルスの存在は、検体吸光度をアッセイカットオフ検量体吸光度のもので割った比率により判定した。指数が1.1より大きい検体を陽性と分類し、指数が1.1未満のものを陰性とみなした。

#### 【0035】

##### アッセイの最適化

非ウイルス血症試料と対比して検出可能な最低レベルのヒトパルボウイルス性ウイルス血症血漿を調べることにより、最適なプレートコーティング濃度及びコンジュゲート希釈度を確立した。T B S T 中における1000 ng / ml から1 pg / ml までのバキュロウイルス発現 V P 2 カプシド10進希釈液を最適 E I A について同様に試験して、タンパク質濃度に関する検出限界を判定した。201の正常ヒト血漿のパネルの平均アッセイ吸光度プラス3標準偏差をカットオフ値として採用した。

10

#### 【0036】

##### 抗体試験

各試料のヒトパルボウイルス I g M 及び I g G の状態を市販の E I A ( B i o t r i n I n t e r n a t i o n a l L i m i t e d 、アイルランド、ダブリン) により測定した。

#### 【0037】

##### 試料

全試料のうち、抜き取ったミニプールを用いて供血者集団をスクリーニングした。当該プールは  $1.4 \times 10^6$  の供血者から構成され、 $> 10^6$  I U / ml より大きいと評価される反応性プールを次いでインハウスアルゴリズムにより解いて、反応性プールの個々の供血源を判定した。スクリーニング期間中に70の試料がヒトパルボウイルス DNA について陽性と評価された。次いでこれらの試料をヒトパルボウイルスのウイルス粒子 ( ウイルス捕捉 E I A ) 、ヒトパルボウイルス I g M 及びヒトパルボウイルス I g G について、本発明方法に従ってスクリーニングした。

20

#### 【0038】

図1は、r V P 2 検出における低 pH ( 3 . 6 ) ( 中実ボックス ) と通常の試料希釈液 ( 中空ボックス ) の比較を示す。組換えパルボウイルス V P 2 抗原の検出に際して低 pH による有意の増強はみられなかったことが認められるであろう。

30

#### 【0039】

しかし、図2に示すように、ウイルス血症血漿を同じアッセイ様式で試験した場合、ウイルス血症試料の多くが低 pH 緩衝液でのみ検出された。

#### 【0040】

図2は、ヒトパルボウイルスカプシドの検出に用いた試料希釈用緩衝液の比較である。試料を下記のいずれかに希釈した：20 mM T r i s - H C l 、 pH 7 . 2 : 0 . 1 5 M の N a C l 及び 0 . 1 % ( v / v ) の T w e e n - 2 0 ( T B S T ) を含有 ( 中空ボックス ) 、又は 100 mM クエン酸 / クエン酸三ナトリウム緩衝液、pH 3 . 6 : 0 . 1 % ( v / v ) の T r i t o n X - 1 0 0 、 0 . 4 % ( v / v ) の T w e e n - 2 0 及び 10 mM の E D T A を含有 ( 中実ボックス ) 。誤差バーは平均からの標準偏差を表わす。低 pH クエン酸希釈液 pH ( 3 . 6 ) 中にウイルス血症試料を希釈することにより、大部分の試料において信号がかなり増強された ( 0 ~ 30 倍 ) 。1 試料 (  $3.9 \times 10^{10}$  I U / ml ) は処理後に有意の信号増強を示さなかったが、依然として陽性であった。非ウイルス血症血漿は同じ前処理を施した場合、依然として陰性であった。

40

#### 【0041】

図3に示すように、試料中に I g M が存在するか存在しないかはヒトパルボウイルスの検出に影響を及ぼさなかった。被験試料は P C R 陽性試料のサブセットであった。

#### 【0042】

図3は、I g M の存在下及び不存在下での低 pH の影響を示す。図2の場合と同様に、

50

試料を一般的な T B S T 希釈剤 (中空ボックス) 又は低 pH (3.6) (中実ボックス) で処理した。T B S T で希釈した最高の吸光度値をもつ 2 つの試料は、I g M 陰性であった。

【0043】

供血者試料の評価

17 カ月間にわたって、 $10^6$  IU/ml より多い種々のレベルのヒトパルボウイルス DNA を含む 70 例の無症候性供血者を同定した。これらのウイルス血症供血者からの血清を分析し、70% (49/70) がヒトパルボウイルスについて陽性と評価されることが E I A によって明らかになった (範囲:  $3.2 \times 10^{1.2} \sim 3.1 \times 10^6$ 、平均値  $1.1 \times 10^{1.2}$ 、中央値:  $1.2 \times 10^{1.2}$ )。結果を図 4 に示す。

10

【0044】

図 4 は、ヒトパルボウイルス捕捉 E I A に対するウイルス血症供血者の反応性を示す。1.1 より大きい指数値は陽性であり、1.1 未満の指数値は陰性とみなされる。

【0045】

図 5 に示すように、供血者試料のうち 27 (38.6%) は、E I A によりヒトパルボウイルス I g M 抗体について陽性又は境界域陽性 (2 試料は不確実) と評価された。70 のウイルス血症試料のうち、ヒトパルボウイルス I g G 抗体について陽性のものはなかった。

【0046】

図 5 はウイルス血症供血者の I g M 反応性を示す。1.1 より大きい指数値は陽性であり、0.9 未満の指数値は陰性である。この範囲内の試料はいずれも不確実とみなされる。I g M について境界域にある試料は抗原 E I A に対して強く反応した ( $> 19$  の指数値)。2 グループ間の重なりがかなりあり、17% は I g M とヒトパルボウイルスの両方について陽性と判定された。一方又は両方のアッセイにおいて陽性である供血者の数は 91% であった。

20

【0047】

P C R により測定した DNA レベルとウイルス捕捉アッセイにより得た指数値の間に直接的な相関性はなかったため、このアッセイについて判定された感度カットオフはなかった。高ウイルス血症試料の希釈液を用いて、アッセイ感度は約  $10^8$  ゲノム当量/ml と推定された。ウイルス血症試料のウイルス捕捉指数値は、P C R 測定したパルボウイルス性ウイルス血症レベルに対して強い正の相関性を示した ( $r = 0.81$ )。このアッセイの検出限界は定量 P C R により測定した DNA レベルと直接的に相関しなかったため、アッセイのカットオフを決定するのは困難であった。 $3.1 \times 10^6$  IU/ml と定量された 1 試料がウイルス捕捉アッセイで検出されたが、 $10^7 \sim 10^9$  IU/ml の範囲の多数の検体がピックアップされなかった。P C R により測定したヒトパルボウイルス DNA レベルは感染性カプシドに対応するとは考えられない。

30

【0048】

フルヤケンジ (日本赤十字社 血漿分画センター提示データ (2004 年 5 月 S O G A T) 「Analysis of human parvovirus B 19 components and strategies of non-enveloped virus removal from Factor VIII concentrates」) は、塩及び pH 勾配クロマトグラフィーを用いてヒトパルボウイルス性ウイルス血症血清を分画し、その後、無傷のカプシド、破壊されたカプシド/DNA 複合体、及び大きな割合の遊離 DNA の 3 つの異なる画分を同定した。これにより、本明細書に記載した P C R により定量したウイルス血症とウイルス捕捉吸光度値が直接的に相関しない理由が説明される。精製した組換え V P 2 を希釈することによりヒトパルボウイルス捕捉アッセイの検出限界を判定し、 $10 \sim 100$  pg/ml の範囲であることが計算された。最近、Lowin, T. et al, (2005) J. Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 52(7-8): 348-52 は、同様な様式を用いて、組換え酵母に発現した V P 2 とパキユロウイルス発現ベクターからの V P 2 を比較した。組換え V P 2 の検出可能レベルは  $120$  ng/ml の範囲であると思われた。異例なことに、本発明による低 pH 緩衝液の使用はウイルス捕捉アッセイにおいて組換え V P 2 検出を増強し

40

50

ない。試験した免疫個体からの201のヒト血漿検体はいずれも陽性ではなかったので、アッセイの特異性は100%であった。

【0049】

#### 実施例2

##### アッセイ感度の判定

下記により、組換えVP2のバッチを調製した：

感染Sf9細胞を感染の3日後に収穫し、PBS中での超音波処理により溶解した。細胞屑を3000gで10分間の遠心分離により除去し、得られた上清をPEG/NaClで一夜沈殿させた。次いでVP2を含有するペレットをPBSに再懸濁し、定量した。アッセイ感度を推定するために、2つの別個のバッチのVP2を1μg/mlに希釈し、次いで1pg/mlまで10進希釈して、アッセイのカットオフを判定した。実施例1に記載する本発明によるウイルス捕捉EIAは、組換えVP2を10pg/mlの濃度まで検出できた。結果を図6に示す；図6にはカットオフが明瞭に示されている。

10

【0050】

#### 実施例3

3種類のパルボウイルス変異体を実施例1によりウイルス捕捉アッセイにより分析した。遺伝子型3 VP2はJean Pierre Allain, Cambridge Blood Centre, Cambridge, Long Road, CB2 2PT, United Kingdom (非特許文献2)から入手した。遺伝子型2(A6)試料を寄贈品として受け取った(Baxter)；これは予め懸濁及び定量されていた(2.8×10<sup>11</sup> IU/mlの力価)。遺伝子型1はドイツ血液銀行から入手された。

20

【0051】

遺伝子型1 VP2カプシドタンパク質は、ウイルス捕捉EIAに対して遺伝子型3と類似の反応性を示すことが認められた。結果を図7に示す。

【0052】

前記のように、図7は遺伝子型1(中空ボックス)と遺伝子型3(中実ボックス)の組換えVP2の比較である。試料を低pH(3.6)緩衝液中にタンパク質1000、100及び10ng/mlに希釈した。誤差バーは平均からの標準偏差を表わす。両遺伝子型とも、このウイルス捕捉アッセイに対してきわめて反応性が類似することが示された。これは、このウイルス捕捉アッセイが遺伝子型1と遺伝子型3のカプシドタンパク質を区別しないため、これらのいずれの変異体により起きた急性感染症も検出できることを証明する。

30

【0053】

遺伝子型1と遺伝子型2のウイルス血症試料もウイルス捕捉EIAに対して類似の反応性を示すことが認められた。結果を図8に示す。

【0054】

前記のように、図8は、ウイルス捕捉EIAに対する遺伝子型1(中空ボックス)と遺伝子型2(中実ボックス)のウイルス血症試料の反応性を示す。遺伝子型1と遺伝子型2のウイルス血症試料を共に、パルボウイルス陰性試料で10進希釈し、次いでウイルス捕捉アッセイで比較した。誤差バーは平均からの標準偏差を表わす。遺伝子型1と2は共に、このウイルス捕捉アッセイに対して反応性がきわめて類似することが示された。これは、このウイルス捕捉アッセイが遺伝子型1と遺伝子型2のカプシド検出を区別せず、したがってこれらのいずれの変異体により起きた急性感染症も検出できることを証明する。

40

【0055】

実施例1に示したように、試料を酸性化することによりヒトパルボウイルス検出が著しく増強された。これは、たとえばアフィニティークロマトグラフィーにおいて抗原-抗体複合体を解離させるために低pH緩衝液がしばしば用いられるので、矛盾するように見えるかもしれない。酸性化はコーティング抗体によるウイルス捕捉を促進するのではなくむしろ阻害すると予想された。本発明の何らかの理論的説明により拘束されたくはないが、低pH条件により、ウイルスカプシドは構造サブユニットにまで破壊され、それにより、捕捉抗体にさらに近づきやすくしている可能性がある。これまでは、ヒトパルボウイルス

50

は物理化学的処理、たとえば酸性化 (pH 3.5) に対して、及び熱処理 (56 で1時間) に対しても、抵抗性が高いと考えられていた (Siegl, G. (1976) *Virology Monographs* 15: 1-109)。より最近になって、低pH処理に対するヒトパルボウイルスの感受性が調べられ、処理後に感染性及びカプシド統合性の両方がモニターされた (Boschetti, N., et al (2004) *Transfusion* 44: 1079-86)。低pH処理後にエンドヌクレアーゼを添加してウイルスDNAを開裂させ、カプシド内包ウイルスDNAが定量された。ヒトパルボウイルスはpH4で2時間後、5 logより大きく不活性化され、感染性も低下した。さらに、酸性化は被験試料中に存在するいずれかの免疫複合体の解離を引き起こす可能性があり、これはコーティング抗体によるウイルス捕捉を妨げる可能性がある。図3に示すように、低pH条件で、IgM又はIgGのいずれの存在によっても (高濃度ですら) ウイルス捕捉は有意に阻害されなかった。ウイルス捕捉アッセイを生理的pHの緩衝液中で実施した場合、最高の吸光値を示した試料はヒトパルボウイルスIgMを含まなかった；これは、免疫複合体が検出を妨げることを示唆する。P抗原を介した赤血球 (RBC) へのヒトパルボウイルス受容体の結合を利用した血球凝集反応 (HA) アッセイは、ヒトパルボウイルス粒子を検出する一般法である。パルボウイルスIgG又はIgM抗体の存在により生じる免疫複合体はウイルス-RBC結合を阻害するので、この系について主要な問題である (Sakata, H., et al, (1999) *Vox Sanguinis* 77: 197-203)。したがって、HAアッセイの感度は血清転換した検体によって著しく影響される。

10

#### 【0056】

ウイルス捕捉EIAの感度を、定量PCR分析により測定した検体DNAレベルから推定した。実施例1に記載するアッセイの感度は $10^8 \sim 10^9$ ゲノム当量/mlである。PCR測定したDNAレベルとウイルス捕捉EIAの反応性との間に直接的な相関性はなかった。ウイルスカプシドは試料を低pH緩衝液で前処理した場合にのみ検出された。このアッセイはIgM抗体の存在下でウイルスを検出でき、正常ヒト血漿を検査した場合に偽陽性結果は得られなかった。ウイルス捕捉アッセイの結果をヒトパルボウイルスIgMアッセイの結果と合わせると、91%の急性ヒトパルボウイルス感染症を検出できた。ウイルスに関する既存の定量PCR試験はより感度が高いが、EIAの使用には多数の利点がある。PCRは、感染後6~40カ月間、低レベルで持続する可能性のあるDNAを検出し、したがって非感染性ではあるけれどもウイルス血症である血漿ユニットを感染後の数年間検出するので、血漿スクリーニングには適さない可能性がある。したがって、本発明によるウイルス捕捉EIAの方が最近の感染のより良好な指標となることができる。

20

30

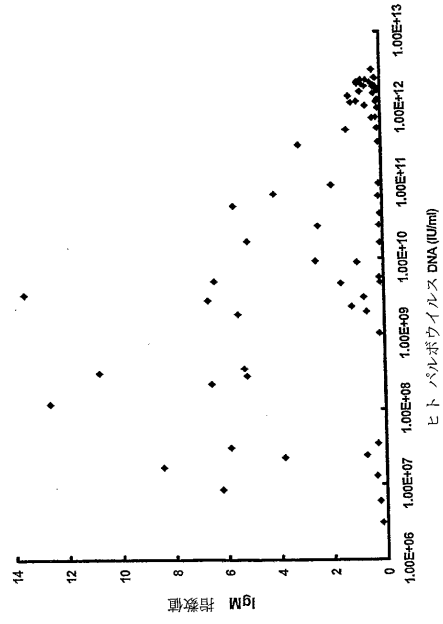
#### 【0057】

ウイルス捕捉の結果をIgMの結果と合わせると、91%の試料が急性感染症と診断されるであろう。実験的感染は、ヒトパルボウイルス感染が2つの主病期をもつことを示した。第1期は感染の5~7日後に起き、高いウイルス血症 (約 $10^{11}$ コピー/ml血清) 及びほとんど症状がないことを特徴とする。第2期は、IgM抗体が最初に検出可能になった数日後、接種後2週目に起きる。第2期の症状には、発疹及び関節痛が含まれる (Anderson, MJ., et al, (1986) *J Infect Disease* 152: 257-265)。IgM応答の発現により、ウイルス力価が低下する。IgM応答は感染後、約1カ月で低下し始め、4~6カ月間持続する可能性がある。本明細書に記載する70のウイルス血症検体は、典型的なウイルス血症及びIgM血清転換パターンを示した。

40



【 図 5 】



【 図 6 】

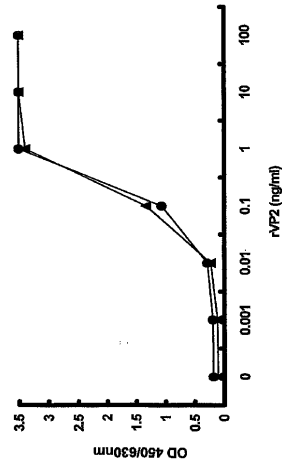


Fig. 6

【 図 7 】

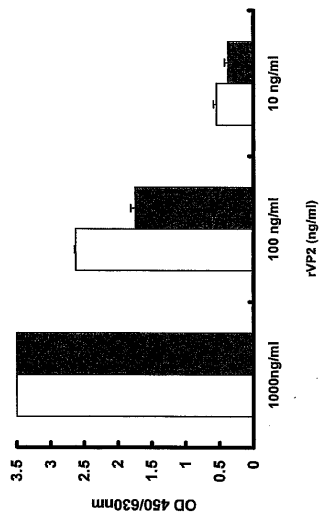
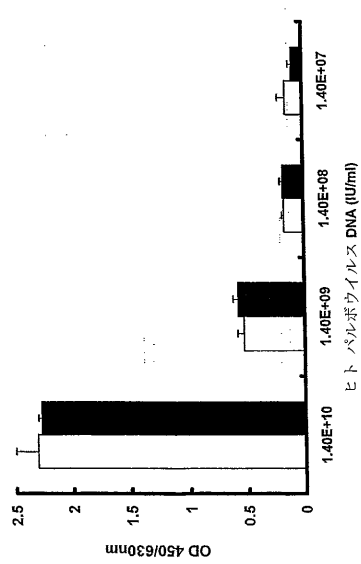


Fig. 7

【 8 】



【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IE2006/000141

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/569 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	O'NEILL H J ET AL: "TWO ANTI-PARVOVIRUS B19 IGM CAPTURE ASSAYS INCORPORATING A MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR B19 VIRAL CAPSID PROTEINS VP1 AND VP2" ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 123, no. 1-2, 1992, pages 125-134, XP009082200 ISSN: 0304-8608 abstract page 126, paragraphs 2,3 page 128, paragraph 4 page 132, paragraph 1 ----- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	*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	
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*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	
*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)	*V* 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.	
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
18 April 2007	27/04/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3018	Authorized officer  Bigot-Maucher, Cora	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IE2006/000141

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NOZOMU ETO ET AL: "Immuno-Chromatographic Assay for Diagnosis of Feline Leukemia Virus Infection" CYTOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 43, no. 1-3, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 65-72, XP019236806 ISSN: 1573-0778 abstract page 67, column 1, paragraph 2</p>	1-13
A	<p>SAKATA H ET AL: "Efficiency of donor screening for human parvovirus B19 by the receptor-mediated hemagglutination assay method" VOX SANGUINIS, vol. 77, no. 4, December 1999 (1999-12), pages 197-203, XP009082076 ISSN: 0042-9007 abstract</p>	1-13
A	<p>SLOOTS T ET AL: "Evaluation of four commercial enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies to human parvovirus B19" EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, vol. 15, no. 9, 1996, pages 758-761, XP009082101 ISSN: 0934-9723 abstract page 758, column 2, paragraph 3 page 759, column 1, paragraph 2</p>	1-13
A	<p>FERGUSON M ET AL: "Report of a collaborative study to calibrate the Second International Standard for parvovirus B19 antibody" BIOLOGICALS, ACADEMIC PRESS LTD., LONDON, GB, vol. 32, no. 4, December 2004 (2004-12), pages 207-212, XP004657308 ISSN: 1045-1056 abstract</p>	11

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100124305

弁理士 押鴨 涼子

(72)発明者 バトラー, メアリー・ベルナデット

アイルランド国カウンティ・ダブリン, サガート, フォーチューンズタウン・レイン, キャリグモア・クレッセント 35

(72)発明者 コーコラン, アマンダ・マリー

アイルランド国カウンティ・ミース, アシュボーン, レースヒル・マナー, レースヒル・パーク 88

(72)発明者 エリオット, イアン・ゴードン

アイルランド国カウンティ・キルデア, セルブリッジ, ウォルスタン・ヘブン, ザ・ビュー 9

(72)発明者 カール, シェーン

アイルランド国カウンティ・ダブリン, レオパースタウン, ザ・ギャロップス, グレンケアン・ドライブ 20

(72)発明者 キルティ, コーマック・ジェラード

アイルランド国カウンティ・ダブリン, サンディコーブ, ダンデラ・パーク, 34

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ10 QQ42 QQ58 QQ79 QR32 QR48

QR55 QR62 QS25 QS33 QS34

