世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6
C07K 7/00, G01N 33/576

A1

(11) 国際公開番号 WO 95/11918

(43) 国際公開日 1995年5月4日 (04.05.95)

(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01823
(22) 国際出願日 1994年10月28日(28. 10. 94)

(30) 優先権データ
特願平5/272864 1993年10月29日(29. 10. 93) JP
特願平6/207695 1994年8月31日(31. 08. 94) JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)
株式会社 エスアールエル (SRL, INC.) [JP/JP]
〒190 東京都 立川市曙町二丁目41番19号
Tokyo, (JP)
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)
熊澤俊明 (KUMAZAWA, Toshiaki) [JP/JP]
〒192 東京都八王子市小宮町51
株式会社エスアールエル 八王子ラボラトリー内 Tokyo, (JP)
(74) 代理人
弁理士 長谷川芳樹 (HASEGAWA, Yoshiki)
〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F
創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)

(81) 指定国
AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, KG, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN,
欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG),
ARIPO特許 (KE, MW, SD, SZ).

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : ANTIGEN PEPTIDE COMPOUND AND IMMUNOASSAY METHOD

(54) 発明の名称 抗原ペプチド化合物および免疫学的測定方法

[ckk-n5]
L S G R P A I V P D R E L L Y Q E F D E
Leu Ser Gly Arg Pro Ala Ile Val Pro Asp Arg Glu Leu Leu Thr Gln Glu Phe Asp Gln

[ckk-n51] L S G R P A I V P D
Leu Ser Gly Arg Pro Ala Ile Val Pro Asp

[ckk-n52] R E L L Y Q E F D E
Arg Glu Leu Leu Thr Gln Glu Phe Asp Gln

[ckk-n53] A I V P D R E L L Y
Ala Ile Val Pro Asp Arg Glu Leu Leu Thr

[ckk-n54] R P A I V P D R E L L Y Q E
Arg Pro Ala Ile Val Pro Asp Arg Glu Leu Leu Thr Gln Glu

[ckk-n55] P A I V P D R E L L Y Q
Pro Ala Ile Val Pro Asp Arg Glu Leu Leu Thr Gln

(57) Abstract

A hepatitis C virus (HCV) antibody in a specimen is assayed by immunoassay utilizing a specific avidity between an antigen peptide compound having the following amino acid sequence (1) or (2) and an HCV antibody: Leu-Ser-Gly-Arg-Pro-Ala-Ile-Val-Pro-Asp-Arg-Glu-Val-Leu-Tyr-Gln-Glu-Phe-Asp-Glu (1); Val-Asn-Gln-Arg-Ala-Val-Val-Ala-Pro-Asp-Lys-Glu-Val-Leu-Tyr-Glu-Ala-Phe-Asp-Glu (2). This method permits simple and accurate identification of the serotype of a specimen while suppressing the cross reaction or a nonspecific reaction, accurate estimation of a possible therapeutic effect of interferons, and simplification of observation about the healing or the progress of treatment of hepatitis C.

（５７）要約

下記式（１）又は（２）に示されるアミノ酸配列を有する抗原ペプチド化合物と、Ｃ型肝炎ウィルス（ＨＣＶ）抗体との特異的結合性を利用して、イムノアッセイ法により検体中のＨＣＶ抗体を測定する。

Ｌｅｕ- Ｓｅｒ- Ｇｌｙ- Ａｒｇ- Ｐｒｏ- Ａｌａ- Ｉｌｅ- Ｖａｌ- Ｐｒｏ- Ａｓｐ- Ａｒｇ- Ｇｌｕ- Ｖａｌ- Ｌｅｕ- Ｔｙｒ- Ｇｌｎ- Ｇｌｕ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ- Ｇｌｕ ……（１）

Ｖａｌ- Ａｓｎ- Ｇｌｎ- Ａｒｇ- Ａｌａ- Ｖａｌ- Ｖａｌ- Ａｌａ- Ｐｒｏ- Ａｓｐ- Ｌｙｓ- Ｇｌｕ- Ｖａｌ- Ｌｅｕ- Ｔｙｒ- Ｇｌｕ- Ａｌａ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ- Ｇｌｕ……（２）

上記方法によれば、交叉反応ないし非特異反応を抑制しつつ検体のserotypeを簡便且つ正確に判定することが可能となり、インターフェロン治療の効果を予め正確に予測すること、あるいはＣ型肝炎の治癒ないし治療経過を簡便に観察することが可能となる。

情報としての用途のみ
ＰＣＴに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にＰＣＴ加盟国を同定するために使用されるコード

ＡＭ	アルメニア	ＤＫ	デンマーク	ＬＩ	リヒテンシュタイン	ＰＴ	ポルトガル
ＡＴ	オーストリア	ＥＥ	エストニア	ＬＫ	スリランカ	ＲＯ	ルーマニア
ＡＵ	オーストラリア	ＥＳ	スペイン	ＬＲ	リベリア	ＲＵ	ロシア連邦
ＢＢ	バルバドス	ＦＩ	フィンランド	ＬＴ	リトアニア	ＳＤ	スーダン
ＢＥ	ベルギー	ＦＲ	フランス	ＬＵ	ルクセンブルグ	ＳＥ	スウェーデン
ＢＦ	ブルギナ・ファソ	ＧＡ	ガボン	ＬＶ	ラトヴィア	ＳＩ	スロヴェニア
ＢＧ	ブルガリア	ＧＢ	イギリス	ＭＣ	モナコ	ＳＫ	スロヴァキア共和国
ＢＪ	ベナン	ＧＥ	グルジア	ＭＤ	モルドバ	ＳＮ	セネガル
ＢＲ	ブラジル	ＧＮ	ギニア	ＭＧ	マダガスカル	ＳＺ	スワジランド
ＢＹ	ベラルーシ	ＧＲ	ギリシャ	ＭＬ	マリ	ＴＤ	チャード
ＣＡ	カナダ	ＨＵ	ハンガリー	ＭＮ	モンゴル	ＴＧ	トーゴ
ＣＦ	中央アフリカ共和国	ＩＥ	アイルランド	ＭＲ	モーリタニア	ＴＪ	タジキスタン
ＣＧ	コンゴー	ＩＴ	イタリー	ＭＷ	マラウイ	ＴＴ	トリニダード・トバゴ
ＣＨ	スイス	ＪＰ	日本	ＭＸ	メキシコ	ＵＡ	ウクライナ
ＣＩ	コート・ジボアール	ＫＥ	ケニア	ＮＥ	ニジェール	ＵＧ	ウガンダ
ＣＭ	カメルーン	ＫＧ	キルギスタン	ＮＬ	オランダ	ＵＳ	米国
ＣＮ	中国	ＫＰ	朝鮮民主主義人民共和国	ＮＯ	ノルウェー	ＵＺ	ウズベキスタン共和国
ＣＺ	チェッコ共和国	ＫＲ	大韓民国	ＮＺ	ニュー・ジーランド	ＶＮ	ヴィェトナム
ＤＥ	ドイツ	ＫＺ	カザフスタン	ＰＬ	ポーランド		

明 細 書

抗原ペプチド化合物および免疫学的測定方法

技術分野

本発明は、ＨＣＶ（Ｃ型肝炎ウィルス）関連抗体の測定に有用な抗原ペプチド化合物および免疫学的測定方法に関する。

背景技術

地球上には種々のウィルスが存在しており、そのうちの幾つかは病原体である。例えば、ウィルス性肝炎の原因となる肝炎ウィルスは、輸血、注射あるいは出産等の際に感染することが知られている。

輸血はヒトの生命維持のための重要な一手段であるが、この輸血によってウィルス性肝炎が発症した例が、現在まで数多く報告されている。このウィルス性肝炎は、一般にＡ型、Ｂ型および非Ａ非Ｂ型に分類されている。

従来においては、Ｂ型肝炎ウィルス（ＨＢＶ）も輸血時のウィルス性肝炎の原因として知られていた。近年このＨＢＶの存在を検出する検査試薬が開発され、輸血前に簡便にＨＢＶの存在を確認することが可能となったため、輸血によるＨＢＶ感染者は皆無となった。一方、明らかにウィルス性でありながら、それまで肝炎を起こす原因として考えられていたＡ型肝炎ウィルス（ＨＡＶ）によるＡ型でもＨＢＶによるＢ型でもない肝炎（非Ａ非Ｂ型；nonAnonB型）の存在も知られていたが、その発生源（ウィルス）を確認することは、従来は困難とされていた。

１９８９年に、Choo, Q-L.ら（Science, 244, 359-362, 1989）およびKuo, G.ら（Science, 244, 362-364, 1989）によって、非Ａ非Ｂ型肝炎ウィルスの存在が明らかにされた。この肝炎ウィルスはＨＣＶ（Ｃ型肝炎ウィルス）と命名されたが、このＨＣＶはヒトとチンパンジーのみに感染することが、以前から

報告されていた。

上記文献においては、以下のような実験が記載されている。すなわち、患者に投与されて非Ａ非Ｂ型肝炎を発症させた血液凝固第VIII因子製剤と同じ製剤をチンパンジーNo．１に投与し、非Ａ非Ｂ型肝炎を発症させた。更に該チンパンジーの肝臓からの抽出物をチンパンジーNo．２に投与し、同様に非Ａ非Ｂ型肝炎を発症させた後、チンパンジーNo．２の血漿を抽出した。また、このチンパンジーNo．２の血漿を更にチンパンジーNo．３に投与し、非Ａ非Ｂ型肝炎の発症を確認した。この発症が確認された血漿に対して、目的とするウィルスをフラビノウィルスと想定してウィルス粒子の濃縮操作（Bradley, D. W.ら: Gastroenterology, 88 : 773-779, 1989）を行い、ウィルスのＲＮＡを抽出した。このようにして得たＲＮＡに基づいてｃＤＮＡを合成し、λgt11ライブラリーを作製した。このλgt11ライブラリーに対して、回復期のチンパンジー血清や非Ａ非Ｂ型慢性肝炎患者血清を用いたイムノスクリーニングを行い、反応するクローンの選択を行った。この結果、5-1-1 と称されるクローンのみがＨＣＶに由来するｃＤＮＡ断片であることが確認された。

上述した操作は、特公平２－５００８８０号公報にも記載されており、遺伝子配列も明らかにされている。また、日本でもＨＣＶの遺伝子配列に関する報告がなされている（Journal of Virology, 65(3), 1105～1113, 1991）。

１９９０年６月の日本肝臓学会において、ＨＣＶ構造領域の遺伝子配列が自治医科大学の岡本らによって明らかにされた（第２６回日本肝臓学会予稿集、１９９０年）。１９９０年７月の日本癌学会においては、岡本らと同様に、ＨＣＶの構造領域の遺伝子配列が明らかされた（第４９回日本癌学会予稿集、１９９０年）。これらの発表を比較すると、ＨＣＶコア領域に関しては遺伝子の変異がほとんどないが、ＨＣＶエンベロープ領域の遺伝子配列に関しては、両者間で若干の相違が認められる。

その後、ＨＣＶ構造領域のコア抗原とＨＣＶ非構造領域の抗原部位とを組み合

わせた抗体検査が提案され（臨床病理，40(12)，1245-1251,1992）、このような抗体検査により、ほぼ完全にＨＣＶ抗体陽性者のスクリーニングを行うことが可能となった。

一方、ＨＣＶ検査と平行してＣ型肝炎のインターフェロンによる治療が行われるようになったが、ＨＣＶの遺伝子型(genotype)の種類により、インターフェロン治療の効果が異なること判明している。このgenotypeの分類は、Okamoto H.: 肝胆膵，24，7-14 (1992) によって明らかにされており、Ｉ型 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2451-2455, 1991) 、II型 (Journal of virology, 65(3) , 1105～1113, 1991) 、III 型 (Journal of General Virology, 72, 2697-2704, 1991) およびIV型 (Virology, 188 , 331-341, 1992) に分類されている。１９９３年６月に行われた日本肝臓学会では、genotypeⅠ型およびII型（インターフェロン治療：２０％有効）は、genotypeIII 型およびIV型（インターフェロン治療：８０％有効）に比べ、インターフェロンの治療効果が低いことが報告された（第２９回日本肝臓学会予稿集、第５５頁、１９９３年）。

インターフェロンの投与は脱毛や発熱などの強い副作用が伴うことが多く、患者への負担が大きいため、治療前のＨＣＶgenotypeの判定はインターフェロン投与効果の予測に極めて重要である。しかしながら、従来のgenotype判定法においては、「患者検体中のＨＣＶのＲＮＡ抽出、これに対応するｃＤＮＡの合成、該ｃＤＮＡのＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）法による増幅、電気泳動法を用いる増幅ｃＤＮＡのバンドの確認」という、通常４８時間以上にもおよぶ複雑な工程を経てgenotypeが決定されていたため、長い時間と高いコストとが必要とされていた。

一方、遺伝子組み替えの方法を用いて製造した抗原（約３００個のアミノ酸からなる）を用いて、患者血清中のＨＣＶ抗体が２つのタイプに分類できることが報告されている（肝胆膵、２２、８８３～８８９、１９９１年）が、この分類は、上記した（インターフェロン治療の判定に重要な）genotypeとの対応の点におい

て必ずしも充分ではなかった。

上述したように、インターフェロン投与には多額の費用がかかるが、このインターフェロン投与の前提となる上記genotypeの判定にも多額の費用がかかるという欠点があった。治療前にＨＣＶのgenotype判定を簡便に行うことが可能であれば、インターフェロン投与効果を簡便に予測することが可能となり、インターフェロンの投与方法や治療指針を計画的に策定することができ、更には患者への精神的、肉体的、並びに経済的負担を軽減することができるため、簡便なＨＣＶのgenotype判定が切望されていた。

したがって本発明の目的は、ＨＣＶのgenotypeＩ型およびII型と、genotypeIII 型およびIV型との区別が可能なＨＣＶ抗体の簡便な測定を可能とするＨＣＶ抗体測定用抗原を提供することにある。

発明の開示

本発明者は鋭意研究の結果、ＨＣＶ抗原部位に基づく特定のアミノ酸配列（少なくとも６個のアミノ酸を含む配列）を用いてＨＣＶ抗体型（serotype）の判定を行うことが、ＨＣＶのgenotypeＩ型およびII型と、genotypeIII 型およびIV型との簡便な区別を可能とするのみならず、抗原－抗体反応に伴う交叉反応ないし非特異反応を効果的に抑制して、上述した目的の達成に極めて効果的であることを見出した。

本発明の抗原ペプチド化合物は上記知見に基づくものであり、より詳しくは、下記式（１）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも６個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とするものである。

Ｌｅｕ- Ｓｅｒ- Ｇｌｙ- Ａｒｇ- Ｐｒｏ- Ａｌａ- Ｉｌｅ- Ｖａｌ- Ｐｒｏ- Ａｓｐ- Ａｒｇ- Ｇｌｕ- Ｖａｌ- Ｌｅｕ- Ｔｙｒ- Ｇｌｎ- Ｇｌｕ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ- Ｇｌｕ ……（１）

本発明によれば、更に、下記式（２）で示される配列に含まれるアミノ酸配列

であって、連続した少なくとも６個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Val- Asn- Gln- Arg- Ala- Val- Val- Ala- Pro- Asp- Lys- Glu- Val- Leu- Tyr- Glu- Ala- Phe- Asp- Glu……（２）

本発明によれば、更に、下記式（３）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも６個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Cys- Thr- Thr- His- His- Val- Ser- Pro- Asp- Ala- Asp- Leu- Ile- Glu- Ala- Asn- Leu- Leu- Trp- Arg……（３）

本発明によれば、更に、下記式（４）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも６個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Cys- Thr- Thr- His- Gly- Lys- Ala- Tyr- Asp- Val- Asp- Met- Val- Asp- Ala- Asn- Leu- Phe- Met- Gly…… （４）

本発明によれば、更に、下記式（５）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも６個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Gln- Glu- Phe- Asp- Glu- Met- Glu- Glu- Cys- Ala- Ser- His- Leu- Pro- Tyr- Ile- Glu- Gln- Gly- Met…… （５）

本発明によれば、更に、下記式（６）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも６個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Glu-Ala-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-Arg-Ala-Ala-Leu-Ile-Glu-Glu-Gly-Gln…… (6)

本発明によれば、更に、下記式（7）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Gly-Arg-Arg-Gln-Pro-Ile-Pro-Lys-Ala-Arg-Arg-Pro-Glu-Gly-Arg-Thr-Trp-Ala-Gln-Pro…… (7)

本発明によれば、更に、下記式（8）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Gly-Arg-Arg-Gln-Pro-Ile-Pro-Lys-Asp-Arg-Arg-Ser-Thr-Gly-Lys-Ser-Trp-Gly-Lys-Pro…… (8)

本発明によれば、更に、下記式（9）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Ile-Ile-Leu-Ser-Gly-Arg-Pro-Ala-Ile-Val-Pro-Asp-Arg-Glu-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-His-Leu-Pro-Tyr-Ile-Glu-Gln-Gly-Met-Gln-Leu-Ala…… (9) (ckk-n1(40))

(一文字表記：IILSG RPAIV PDREL LYQEF DEMEE CASHL PYIEQ GMQLA)

本発明によれば、更に、下記式（10）で示される配列に含まれるアミノ酸配

列であって、連続した少なくとも６個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物が提供される。

Leu- His- Val- Asn- Gln- Arg- Ala- Val- Val- Ala- Pro- Asp- Lys- Glu- Val- Leu- Tyr- Glu- Ala- Phe- Asp- Glu- Met- Glu- Glu- Cys- Ala- Ser- Arg- Ala- Ala- Leu- Ile- Glu- Glu- Gly- Gln- Arg- Ile- Ala…… （１０）（ckk-n2(40)）

（一文字表記：LHVNQ RAVVA PDKEV LYEAF DEMEE CASRA ALIEE GQRIA）

本発明によれば、更に上記式（１）～（１０）のいずれかに記載の抗原ペプチドを担体に結合させ、抗原－抗体反応を利用して該ペプチドに検体中のＨＣＶ抗体を結合させ、更に抗原－抗体反応を利用して該ＨＣＶ抗体に標識リガンドを結合させることにより、上記検体中のＨＣＶ抗体を測定することを特徴とするＨＣＶ抗体の免疫学的測定法が提供される。

ここに、「リガンド」とは、抗原および／又は抗体に対して特異的な結合性を有する物質（例えば抗体および／又は抗原）をいう。

上述した従来のgenotype判定においては、ＨＣＶ遺伝子の配列自体を利用してＨＣＶの型判定を行っているが、本発明においては、ＨＣＶに固有の抗原部位に対する抗体の型（serotype）を利用してＨＣＶの型判定を行っている。このような抗体型の判定は、従来のgenotype判定（ＨＣＶのＲＮＡ抽出→ｃＤＮＡの合成→該ｃＤＮＡのＰＣＲ法による増幅→電気泳動法を用いた増幅バンドの確認）に比べて著しく短時間で行うことができ、しかも作業工程も単純であるため、本発明によれば、簡便且つ低コストのＨＣＶ型（genotype）の判定方法を提供することができる。

更には、上記した従来の血清型判定法（約３００個のアミノ酸からなる抗原を用いる）と比較して、本発明においては、抗原－抗体反応に伴う交叉反応ないし

非特異反応が効果的に抑制されている。

図面の簡単な説明

図１は、実施例１において、ＨＣＶのｃｏｒｅ領域に関しHydrophilicity Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図２は、実施例１において、ＨＣＶのｃｏｒｅ領域に関しHydropathy Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図３は、実施例１において、ＨＣＶのｃｏｒｅ領域に関しAntigenicity Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図４は、実施例１において、ＨＣＶのＮＳ４領域に関しHydrophilicity Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図５は、実施例１において、ＨＣＶのＮＳ４領域に関しHydropathy Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図６は、実施例１において、ＨＣＶのＮＳ４領域に関しAntigenicity Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図７は、実施例１において、ＨＣＶのＮＳ５領域に関しHydrophilicity Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図８は、実施例１において、ＨＣＶのＮＳ５領域に関しHydropathy Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図９は、実施例１において、ＨＣＶのＮＳ５領域に関しAntigenicity Valueを計算により求めた結果を示すグラフである。

図１０は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（１）（ckk-n5）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１１は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（２）（ckk-n6）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１２は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（３）（ckk-n3）の

ＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１３は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（４）（ckk-n4）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１４は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（５）（ckk-n1）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１５は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（６）（ckk-n2）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１６は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（７）（ckk-c1）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１７は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（８）（ckk-c2）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１８は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（９）（ckk-n1(40)）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図１９は、実施例２において得られた抗原ペプチド化合物（１０）（ckk-n2(40)）のＨＰＬＣ分析結果を示すクロマトグラムである。

図２０は、実施例４ないし８で得られたserotype判定結果をまとめた集合を表す図である。

図２１は、実施例９ないし１０で得られたＣＰＨ検体に関するserotype判定結果をまとめた集合を表す図である。

図２２は、実施例９ないし１０で得られたＣＡＨ２Ａ検体に関するserotype判定結果をまとめた集合を表す図である。

図２３は、実施例９ないし１０で得られたＣＡＨ２Ｂ検体に関するserotype判定結果をまとめた集合を表す図である。

図２４（表１）は、ペプチド化合物（１）に含まれるアミノ酸配列を示す表である。

図２５（表２）は、ペプチド化合物（２）に含まれるアミノ酸配列を示す表で

ある。

図２６（表３）は、ペプチド化合物（３）に含まれるアミノ酸配列を示す表である。

図２７（表４）は、ペプチド化合物（４）に含まれるアミノ酸配列を示す表である。

図２８（表５）は、ペプチド化合物（５）に含まれるアミノ酸配列を示す表である。

図２９（表６）は、ペプチド化合物（６）に含まれるアミノ酸配列を示す表である。

図３０（表７）は、実施例４および５で得られたserotype判定結果をまとめた表である。

図３１（表８）は、実施例６で得られたserotype判定結果をまとめた表である。

図３２（表９）は、実施例７で得られたserotype判定結果をまとめた表である。

図３３（表１０）は、実施例８で得られたserotype判定結果をまとめた表である。

図３４（表１１）は、実施例９で得られたserotype判定結果をまとめた表である。

図３５（表１２）は、実施例１０で得られたserotype判定結果をまとめた表である。

図３６（表１３）は、実施例１０でＮＳ４領域抗原ペプチド、ＮＳ５領域抗原ペプチド、およびｃｏｒｅ領域抗原ペプチドを用いて得られたserotype判定結果をまとめた表である。

発明を実施するための最良の形態

以下、必要に応じて図面を参照しつつ、本発明を詳細に説明する。

本明細書における「アミノ酸配列の表記」においては、Ｎ末端（左側）からＣ

末端（右側）へ記載することとする（例えば、以下のアミノ酸配列（１）においては、ＬｅｕがＮ末端、ＧｌｕがＣ末端である）。また、本明細書においては、下記に示すアミノ酸表記を用いる。

（アミノ酸の一文字表記および三文字表記）

＜略号＞		＜名称＞	＜略号＞		＜名称＞
Ａｓｐ	Ｄ	アスパラギン酸	Ｖａｌ	Ｖ	バリン
Ａｓｎ	Ｎ	アスパラギン	Ｍｅｔ	Ｍ	メチオニン
Ｔｈｒ	Ｔ	トレオニン	Ｉｌｅ	Ｉ	イソロイシン
Ｓｅｒ	Ｓ	セリン	Ｌｅｕ	Ｌ	ロイシン
Ｇｌｕ	Ｅ	グルタミン酸	Ｔｙｒ	Ｙ	チロシン
Ｇｌｎ	Ｑ	グルタミン	Ｐｈｅ	Ｆ	フェニルアラニン
Ｐｒｏ	Ｐ	プロリン	Ｔｒｐ	Ｗ	トリプトファン
Ｇｌｙ	Ｇ	グリシン	Ｌｙｓ	Ｋ	リジン
Ａｌａ	Ａ	アラニン	Ｈｉｓ	Ｈ	ヒスチジン
Ｃｙｓ	Ｃ	システイン	Ａｒｇ	Ｒ	アルギニン

（抗原ペプチド化合物）

本発明の抗原ペプチド化合物は、下記式（１）又は（２）で示される配列（アミノ酸２０個）に含まれる配列であって、少なくとも６個の連続したアミノ酸からなる配列を有するペプチド化合物である。

Ｌｅｕ- Ｓｅｒ- Ｇｌｙ- Ａｒｇ- Ｐｒｏ- Ａｌａ- Ｉｌｅ- Ｖａｌ- Ｐｒｏ- Ａｓｐ- Ａｒｇ- Ｇｌｕ- Ｖａｌ- Ｌｅｕ- Ｔｙｒ- Ｇｌｎ- Ｇｌｕ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ- Ｇｌｕ ……（１）（ckk-n5；NS4L2-1 、ＮＳ４領域に対応）

（一文字表記：ＬＳＧＲＰＡＩＶＰＤＲＥＶＬＹＱＥＦＤＥ）

Ｖａｌ- Ａｓｎ- Ｇｌｎ- Ａｓｐ- Ａｒｇ- Ａｌａ- Ｖａｌ- Ｖａｌ- Ａｌａ- Ｐｒｏ- Ａｓｐ- Ｌｙｓ- Ｇｌｕ- Ｖａｌ- Ｌｅｕ- Ｔｙｒ- Ｇｌｕ- Ａｌａ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ…… （２）（ckk-n6；NS4L2-2 、ＮＳ４領域に対応）

（一文字表記：ＶＮＱＤＲ　ＡＶＶＡＰＤＫＥＶＬＹＥＡＦＤ）

本発明者の知見によれば、上記式（１）又は（２）で示されるアミノ酸２０個からなる配列を構成する種々の長さのアミノ酸配列であって、少なくとも６個の連続したアミノ酸を含む配列は、本発明においてペプチド（１）および／又は（２）と同様に、抗原として好適に使用可能である。

このような種々の長さのアミノ酸配列（アミノ酸６個以上２０個以下）であって、上記ペプチド化合物（１）に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、図２４（表１）に示す配列が挙げられる。

また、このような種々の長さのアミノ酸配列（アミノ酸６個以上２０個以下）であって、上記ペプチド化合物（２）に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、図２５（表２）に示す配列が挙げられる。

本発明者の知見によれば、上記した（１）又は（２）の配列を含むペプチド（アミノ酸２１個以上からなる）も上記（１）又は（２）と同様に抗原として好適に使用可能である。このようなペプチドを構成するアミノ酸の数は、化学的に合成する場合には４０個以下であることが好ましく、リコンビナント法を用いて得る場合には１００個以下であることが好ましい。

上述した抗原ペプチド化合物（少なくとも６個のアミノ酸を含むペプチド化合物）を得る方法は特に制限されない。該ペプチド化合物は化学的に合成してもよく、また遺伝子工学的手法（例えば遺伝子組替え技術、すなわちリコンビナント法）を用いて製造してもよい。化学的手法を用いる場合、中間生成物の精製等が容易な点からは、固相法によりアミノ酸を連結することが好ましく、更には自動ペプチド合成機（例えば、アプライド・バイオシステムズ社製の４３０Ａペプチド合成機）を用いて合成することが好ましい。

（抗原ペプチド化合物の抗原性の確認）

上記したペプチド化合物（１）および（２）の配列は、ＨＣＶのＮＳ４領域のアミノ酸配列からの抗原部位の抽出に基づいて見出したものである（後述の実施

例１を参照）。本発明者は、更に、これらのペプチド化合物（１）および（２）を用いた酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡないしＥＩＡ）によりＨＣＶgenotypeの検査を行い、別途ＨＣＶgenotypeの判定を行った患者の検体を用いて、その特異性を確認した（後述の実施例４および５を参照）。

（他の抗原ペプチド化合物）

上述したペプチド化合物（１）および（２）（いずれもＨＣＶのＮＳ４領域に対応する配列である）を用いることにより、後述するようにserotypeの判定が可能であるが、serotype判定の精度向上ないし適用範囲拡大の点からは、上記ペプチド化合物（１）および／又は（２）と、他の抗原ペプチド化合物とを組合わせることが好ましい。このような「他の抗原ペプチド化合物」としては、下記のペプチド（３）～（１０）が挙げられる。

Ｃｙｓ- Ｔｈｒ- Ｔｈｒ- Ｈｉｓ- Ｈｉｓ- Ｖａｌ- Ｓｅｒ- Ｐｒｏ- Ａｓｐ- Ａｌａ- Ａｓｐ- Ｌｅｕ- Ｉｌｅ- Ｇｌｕ- Ａｌａ- Ａｓｎ- Ｌｅｕ- Ｌｅｕ- Ｔｒｐ- Ａｒｇ……（３）（ckk-n3；NS5L2-1、ＮＳ５領域に対応）

（一文字表記：ＣＴＴＨＨＶＳＰＤＡＤＬＩＥＡＮＬＬＷＲ）

Ｃｙｓ- Ｔｈｒ- Ｔｈｒ- Ｈｉｓ- Ｇｌｙ- Ｌｙｓ- Ａｌａ- Ｔｙｒ- Ａｓｐ- Ｖａｌ- Ａｓｐ- Ｍｅｔ- Ｖａｌ- Ａｓｐ- Ａｌａ- Ａｓｎ- Ｌｅｕ- Ｐｈｅ- Ｍｅｔ- Ｇｌｙ…… （４）（ckk-n4；NS5L2-2、ＮＳ５領域に対応）

（一文字表記：ＣＴＴＨＧＫＡＹＤＶＤＭＶＤＡＮＬＦＭＧ）

Ｇｌｎ- Ｇｌｕ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ- Ｇｌｕ- Ｍｅｔ- Ｇｌｕ- Ｇｌｕ- Ｃｙｓ- Ａｌａ- Ｓｅｒ- Ｈｉｓ- Ｌｅｕ- Ｐｒｏ- Ｔｙｒ- Ｉｌｅ- Ｇｌｕ- Ｇｌｎ- Ｇｌｙ- Ｍｅｔ…… （５）（ckk-n1；NS4L3-1、ＮＳ４領域に対応）

（一文字表記：ＱＥＦＤＥＭＥＥＣＡ　ＳＨＬＰＹＩＥＱＧＭ）

Ｇｌｕ- Ａｌａ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ- Ｇｌｕ- Ｍｅｔ- Ｇｌｕ- Ｇｌｕ- Ｃｙｓ- Ａｌａ- Ｓｅｒ- Ａｒｇ- Ａｌａ- Ａｌａ- Ｌｅｕ- Ｉｌｅ- Ｇｌｕ- Ｇｌｕ- Ｇｌｙ- Ｇｌｎ…… （６）（ckk-n2；NS4L3-2、ＮＳ４領域に対応）

(一文字表記：EAFDEMEECASRAALIEEGQ)

Gly-Arg-Arg-Gln-Pro-Ile-Pro-Lys-Ala-Arg-Arg-Pro-Glu-Gly-Arg-Thr-Trp-Ala-Gln-Pro…… (7) (ckk-c1；core-1、ｃｏｒｅ領域に対応)

(一文字表記：GRRQPIPKARRPEGRTWAQP)

Gly-Arg-Arg-Gln-Pro-Ile-Pro-Lys-Asp-Arg-Arg-Ser-Thr-Gly-Lys-Ser-Trp-Gly-Lys-Pro…… (8) (ckk-c2；core-2、ｃｏｒｅ領域に対応)

(一文字表記：GRRQPIPKDRRSTGKSWGKP)

Ile-Ile-Leu-Ser-Gly-Arg-Pro-Ala-Ile-Val-Pro-Asp-Arg-Glu-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-His-Leu-Pro-Tyr-Ile-Glu-Gln-Gly-Met-Gln-Leu-Ala…… (9) (ckk-n1(40)、ＮＳ４領域に対応)

(一文字表記：IILSG RPAIV PDREL LYQEF DEMEE CASHL PYIEQ GMQLA)

Leu-His-Val-Asn-Gln-Arg-Ala-Val-Val-Ala-Pro-Asp-Lys-Glu-Val-Leu-Tyr-Glu-Ala-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-Arg-Ala-Ala-Leu-Ile-Glu-Glu-Gly-Gln-Arg-Ile-Ala…… (10) (ckk-n2(40)、NS4領域に対応)

(一文字表記：LHVNQ RAVVA PDKEV LYEAF DEMEE CASRA ALIEE GQRIA)

上記ペプチド（３）～（１０）についても、ＮＳ４領域対応のペプチド（１）

および（２）の場合と同様にして、抗原性の確認、製造等を行うことができる。

また、本発明者の知見によれば、上記式（３）～（１０）で示されるアミノ酸２０個からなる配列を構成する種々の長さのアミノ酸配列であって、少なくとも６個の連続したアミノ酸を含む配列は、本発明においてペプチド（３）、（４）、（５）、（６）、（７）、（８）、（９）、および／又は（１０）のいずれかと同様に、抗原ペプチドとして好適に使用可能である。

このような種々の長さのアミノ酸配列（アミノ酸６個以上２０個以下）であって、上記ペプチド化合物（３）に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、図２６（表３）に示す配列が挙げられる。

また、このような種々の長さのアミノ酸配列（アミノ酸６個以上２０個以下）であって、上記ペプチド化合物（４）に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、図２７（表４）に示す配列が挙げられる。

また、このような種々の長さのアミノ酸配列（アミノ酸６個以上２０個以下）であって、上記ペプチド化合物（５）に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、図２８（表５）に示す配列が挙げられる。

また、このような種々の長さのアミノ酸配列（アミノ酸６個以上２０個以下）であって、上記ペプチド化合物（６）に含まれるアミノ酸配列としては、例えば、図２９（表６）に示す配列が挙げられる。

本発明者の知見によれば、上記した（３）ないし（１０）のいずれか配列を含むペプチド（アミノ酸２１個以上からなる）も上記（３）ないし（１０）の配列を有するペプチドと同様に、抗原として好適に使用可能である。このようなペプチドを構成するアミノ酸の数は、化学的に合成する場合には４０個以下であることが好ましく、リコンビナント法を用いて得る場合には１００個以下であることが好ましい。

本発明者の知見によれば、上記ペプチド化合物（１）～（１０）をそれぞれ単独で抗原として用いる場合、serotype判定の精度の点から、抗原として好ましい

順は以下の通りである（この欄の記載においては、「（１）および／又は（２）」をまとめて「ＮＳ４－１」と表し、「（３）および／又は（４）」をまとめて「ＮＳ５」と表し、「（５）および／又は（６）」をまとめて「ＮＳ４－２」と表し、「（９）および／又は（１０）」をまとめて「ＮＳ４－４０」と表し、「（７）および／又は（８）」をまとめて「ｃｏｒｅ」と表す）。

好ましい順：　ＮＳ４－１＞ＮＳ５＞ＮＳ４－２＞ｃｏｒｅ

一方、上記ペプチド化合物ＮＳ４－１、ＮＳ５、ＮＳ４－２、およびｃｏｒｅのいずれか２種類を組合わせて抗原として用いる場合、serotype判定の精度の点から、抗原として好ましい順は以下の通りである

好ましい順：（ＮＳ４－１）＋（ＮＳ５）＞（ＮＳ４－２）＋（ＮＳ５）＞（ＮＳ４－１）＋（ｃｏｒｅ）＞（ＮＳ４－２）＋（ｃｏｒｅ）＞（ＮＳ５）＋（ｃｏｒｅ）

また、上記ペプチド化合物ＮＳ４－１、ＮＳ５、ＮＳ４－２、およびｃｏｒｅのいずれか３種類を組合わせて抗原として用いる場合、serotype判定の精度の点から、抗原として好ましい順は以下の通りである

好ましい順：　（ＮＳ４－１）＋（ＮＳ５）＋（ｃｏｒｅ）＞（ＮＳ４－２）＋（ＮＳ５）＋（ｃｏｒｅ）

前記ペプチド化合物「ＮＳ４－４０」（アミノ酸数＝４０）は、上記した組合せにおいて、「ＮＳ４－１」の代わりに好適に使用可能である。このように「ＮＳ４－４０」を用いた場合には、「ＮＳ４－１」を用いた場合に比べ、より高い判定率（＝（判定出来た検体数）／（総検体数））を得ることができる。

（ＨＣＶ抗体の測定方法）

上記した抗原ペプチド化合物のＨＣＶ抗体との特異的結合性を利用して、試料ないし検体中のＨＣＶ抗体を免疫学的に測定することが可能である。本発明において使用する免疫学的測定法は特に制限されないが、例えば、公知のイムノアッセイ法を特に制限なく使用することが可能である。このようなイムノアッセイ法

としては、例えば、酵素免疫測定法、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、蛍光免疫測定法（ＦＩＡ）等が使用できる。このイムノアッセイにおいては公知の測定技術（例えば、競合法、二抗体法、サンドイッチ法等）を特に制限なく使用することが可能である。このような公知の測定技術に関しては、文献（ＥＩＡに関しては、例えば、石川榮治「酵素免疫測定法」（第３版）、１８０頁、医学書院）を参照することができる。

本発明によれば、上記抗原ペプチド化合物を用いてＨＣＶ抗体を免疫学的に測定することにより、検体のＨＣＶ抗体の種類（serotype）を判定することができる（例えば後述するように、ＨＣＶのserotypeがgroup Ｉであるか、group IIであるか判定できる）。後述するように、ＨＣＶserotypeのgroup Ｉ はＨＣＶgenotype IおよびIIに対応し、ＨＣＶserotypeのgroup IIはＨＣＶgenotype IIIおよびIVに対応するため、簡便なＨＣＶgenotypeの判定が可能となる。

上記イムノアッセイにおいては、必要に応じて、上記抗原ペプチド化合物を担体（ないし支持体）に結合ないし固相化して、そのＨＣＶ抗体との特異的結合性を利用して、ＨＣＶ抗原に対する抗体の種類（すなわちＨＣＶのserotype）を判定することができる。この際の担体ないし支持体としては、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、好ましくは分子量５万から１０万程度のポリペプチド、マイクロプレートのウェル、好ましくは直径０．１μｍから６ｍｍ程度のポリスチレンボール（ないしポリスチレンビーズ）等が好ましく用いられる。

上記ペプチド（１）～（１０）は、上述したようにＨＣＶ抗体測定に好適に用いることができるが、更には、例えばＨＣＶに対するワクチン製造用の抗原ないし免疫原として用いることも可能である。この場合のワクチンは、例えば、遺伝子工学的手法を用いて作製することができる（リコンビナント法）。

以下、実施例に基づき本発明を更に具体的に説明する。

実施例１

（Hydrophilicity Valueによる抗原部位の特定）

Geoffrey RS, Nature, 302, 490-495 (1983) で合成された抗原性を有するペプチドの配列と、ＨＣＶの遺伝子配列（第２６回日本肝臓学会予稿集、１９９０年；第４９回日本癌学会予稿集、１９９０年；Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2451-2455, 1991 ; Journal of virology, 65(3), 1105～1113, 1991 ; Journal of General Virology, 72, 2697-2704,1991 ; Virology, 188, 331-341, 1992 ）とに基づき、ＨＣＶの非構造領域および構造領域のアミノ酸配列を決定した。

このように求めたアミノ酸配列に基づき、その抗原部位をHopp TP, Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3824-3828 (1981) の方法で算出した。より具体的には、各アミノ酸のHydrophlicity Value を用い、以下のようにして行った。

上記により求めたＨＣＶを構成するアミノ酸配列に基づき、連続する６個のアミノ酸の Hyrdrophilicity Valueを合計した。この計算をＨＣＶアミノ酸配列の全領域について行い、親水性および疎水性の強度を算出した。親水性が高い部分を、抗原性を示す部位とした。

この際、Jack K., Mol. Biol. 157, 105 (1982) に示されている Hydropathy Value や Alan MS., Science, 227, 429 (1985) に示されている Antigenicity Value 等も、上記Hydrophilicity Valueと同様に算出することが可能であった。上記Hydrophilicity Valueを用いた計算により求めた結果を図１～３（ｃｏｒｅ領域）、図４～６（ＮＳ４領域）および図７～９（ＮＳ５領域）のグラフに示す（上記Hydropathy ValueおよびAntigenicity Valueを用いた結果をも併せて示す）。

上記図１ないし図９で得られた結果に基づいてＣ型肝炎の抗原となり得る領域を抽出し、更に、このようにして求めた領域のうち、genotype Iおよびgenotype IIで共通のアミノ酸配列を有する領域と、genotype IIIおよび genotype IVで共通のアミノ酸配列を有する領域とを求めた。この結果、このような条件を満たした抗原のアミノ酸配列として、ＮＳ４領域に関して下記のckk-n5およびckk-n6が

求められた。

Leu-Ser-Gly-Arg-Pro-Ala-Ile-Val-Pro-Asp-Arg-Glu-Val-Leu-Tyr-Gln-Glu-Phe-Asp-Glu ……. (ckk-n5)

Val-Asn-Gln-Arg-Ala-Val-Val-Ala-Pro-Asp-Lys-Glu-Val-Leu-Tyr-Glu-Ala-Phe-Asp-Glu…… (ckk-n6)

同様の手法により、抗原のアミノ酸配列として、ＮＳ５領域に関して下記のckk-n3およびckk-n4が求められた。

Cys-Thr-Thr-His-His-Val-Ser-Pro-Asp-Ala-Asp-Leu-Ile-Glu-Ala-Asn-Leu-Leu-Trp-Arg…… (ckk-n3)

Cys-Thr-Thr-His-Gly-Lys-Ala-Tyr-Asp-Val-Asp-Met-Val-Asp-Ala-Asn-Leu-Phe-Met-Gly…… (ckk-n4)

同様の手法により、抗原のアミノ酸配列として、ＮＳ４領域に関して下記のckk-n1およびckk-n2が求められた。

Gln-Glu-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-His-Leu-Pro-Tyr-Ile-Glu-Gln-Gly-Met…… (ckk-n1)

Glu-Ala-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-Arg-Ala-Ala-Leu-Ile-Glu-Glu-Gly-Gln…… (ckk-n2)

同様の手法により、抗原のアミノ酸配列として、ｃｏｒｅ領域に関して下記のckk-c1およびckk-c2が求められた。

Gly-Arg-Arg-Gln-Pro-Ile-Pro-Lys-Ala-

Arg- Arg- Pro- Glu- Gly- Arg- Thr- Trp- Ala-
Gln- Pro····· (ckk-c1)

Gly- Arg- Arg- Gln- Pro- Ile- Pro- Lys- Asp-
Arg- Arg- Ser- Thr- Gly- Lys- Ser- Trp- Gly-
Lys- Pro····· (ckk-c2)

実施例2

(C型肝炎の抗原の作製)

上記したHCVの抗原ペプチド化合物 (ckk-n5) および (ckk-n6) を以下に示す方法で合成した。

ペプチドの合成は、自動ペプチド合成機Applied Biosystems 430A Peptide Synthesizer を用い、t-Boc アミノ酸の対称性無水物を試薬として用いて行った。得られた合成ペプチドをアニソール・ジメチルサルファイド・パラチオクレゾール内に溶解した後、フッ化水素酸の存在下で、0～5℃で1時間反応させて脱保護を行った (S. Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Jpn. 40, 2164 (1967) 参照)。

脱保護により得られた粗結晶を2N酢酸に溶解してエーテルで抽出し、抽出物を凍結乾燥した。この凍結乾燥物をHPLC (高性能液体クロマトグラフィー) を用いて精製した。

このHPLC精製は、カラム (SISEIDO カプセルパックC18SG120、直径46mm、長さ250mm) を用い、純水中に0.1%トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid; TFA) と5%アセトニトリル (CH_3CN) が含まれる溶液と、純水中に0.1%TFAと50%アセトニトリルが含まれる溶液とを用い、流量12ml/minで移動相にグラジェントをかけることによって行った。

この際に得られたクロマトグラムを図10に示す。図10中に示したメインピークが本実施例の合成抗原ペプチドckk-n5である。

上記と同様にして合成抗原ペプチドckk-n6をHPLCを用いて精製した。この際に得られたクロマトグラムを図11に示す。図11中に示したメインピークが

本実施例の合成抗原ペプチドckk-n6である。

上記と同様にして、上記した６種類の合成抗原ペプチドckk-n3、ckk-n4、ckk-n1、ckk-n2、ckk-c1、およびckk-c2を合成した。

それぞれの精製時のＨＰＬＣクロマトグラムを図１２（ckk-n3）、図１３（ckk-n4）、図１４（ckk-n1）、図１５（ckk-n2）、図１６（ckk-c1）、および図１７（ckk-c2）に示す。

上記と同様にして、下記２種類の抗原ペプチドckk-n1（40）、およびckk-n2（40）を合成した。

Ｉｌｅ- Ｉｌｅ- Ｌｅｕ- Ｓｅｒ- Ｇｌｙ- Ａｒｇ- Ｐｒｏ- Ａｌａ- Ｉｌｅ- Ｖａｌ- Ｐｒｏ- Ａｓｐ- Ａｒｇ- Ｇｌｕ- Ｌｅｕ- Ｌｅｕ- Ｔｙｒ- Ｇｌｎ- Ｇｌｕ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ- Ｇｌｕ- Ｍｅｔ- Ｇｌｕ- Ｇｌｕ- Ｃｙｓ- Ａｌａ- Ｓｅｒ- Ｈｉｓ- Ｌｅｕ- Ｐｒｏ- Ｔｙｒ- Ｉｌｅ- Ｇｌｕ- Ｇｌｎ- Ｇｌｙ- Ｍｅｔ- Ｇｌｎ- Ｌｅｕ- Ａｌａ…… （９）（ckk-n1(40)）

Ｌｅｕ- Ｈｉｓ- Ｖａｌ- Ａｓｎ- Ｇｌｎ- Ａｒｇ- Ａｌａ- Ｖａｌ- Ｖａｌ- Ａｌａ- Ｐｒｏ- Ａｓｐ- Ｌｙｓ- Ｇｌｕ- Ｖａｌ- Ｌｅｕ- Ｔｙｒ- Ｇｌｕ- Ａｌａ- Ｐｈｅ- Ａｓｐ- Ｇｌｕ- Ｍｅｔ- Ｇｌｕ- Ｇｌｕ- Ｃｙｓ- Ａｌａ- Ｓｅｒ- Ａｒｇ- Ａｌａ- Ａｌａ- Ｌｅｕ- Ｉｌｅ- Ｇｌｕ- Ｇｌｕ- Ｇｌｙ- Ｇｌｎ- Ａｒｇ- Ｉｌｅ- Ａｌａ…… （１０）（ckk-n2(40)）

それぞれの精製時のＨＰＬＣクロマトグラムを図１８（ckk-n1(40)）、および図１９（ckk-n2(40)）に示す。

実施例３

（ELISA 用プレートの作製）

実施例２で得た抗原ペプチドckk-n5を、０．１５ＭＮａＣｌ－０．１０ＭＮａ$_2$ＨＰＯ$_4$ －ＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$・２Ｈ$_2$Ｏ緩衝液（ＰＢＳ）ｐＨ７．０に、０．０４ｇ／ｍｌの濃度となるように溶解した。このペプチド溶液を、９６－ウエルマイクロプレート（商品名：ELISA PLATE 68667 、ＮＵＮＣ社製）に１ウエルあ

たり１００μｌずつ分注し、３７℃で６０分間静置して上記抗原ペプチドをマイクロプレートに固相化した。

余剰の前記ペプチド溶液を除去した後、マイクロプレートを０．０１ＭＰＢＳ（ｐＨ７．０）で３回洗浄した。洗浄液を除去した後、濃度０．１％のゼラチンの０．０１ＭＰＢＳ（ｐＨ７．０）溶液を１ウエルあたり３００μｌずつ分注し、３７℃６０分間静置してゼラチンをプレート上にコーティングした。余剰の前記ゼラチン溶液を除去した後、濃度０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含有する０．０１ＭＰＢＳ溶液（ｐＨ７．０）で３回洗浄した。

このようにしてゼラチンをコーティングしたプレートを２５℃で６時間乾燥した後、４℃で検体分析時まで保存した。

実施例４

（検体の分析）

検体（約１００種類）は、予め株式会社エスアールエル八王子ラボラトリーにおいて、前記文献記載（Okamoto H.、肝胆膵，24，7-14（1992））のＰＣＲを用いる方法ＨＣＶ genotype の検査を行い、ＨＣＶgenotypeの判定を得た。

このようにしてＰＣＲ法によりＨＣＶgenotypeの判定を行った検体を用いて、以下のようにして実施例２で得た抗原ペプチドの特異性を確認した。この検討においては、実施例３で作製した抗原ペプチド固相化マイクロプレートを用い、以下のような手順で分析を行った。

上記した各検体をそれぞれ０．０１％ＢＳＡおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有する０．０１ＭＰＢＳ（ｐＨ７．０）で５０倍に希釈して、各ウエルに１００μｌずつ分注して、上記抗原ペプチドと３７℃で６０分間反応させた（抗原ペプチドーＨＣＶ抗体の反応）。

反応後、マイクロプレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．０１ＭＰＢＳ（ｐＨ７．０）で５回洗浄し、洗浄液を除去した後、濃度０．１μｇ／２０ｍｌのペルオキシダーゼ標識抗ヒトＩｇＧ抗体（ＫＰＬ社製）を１００μｌずつ各ウ

ェルに注入し、３７℃で６０分間反応させた（ＨＣＶ抗体－ＰＯＤ標識抗ヒトＩｇＧ抗体の反応）。

反応後、マイクロプレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０含有０．０１ＭＰＢＳ（ｐＨ７．０）で５回洗浄し、洗浄液を除去した後、各ウェルに０．０２３％過酸化水素、および０．００５％ｏ－フェニレンジアミン（ＯＰＤ）を含有する０．１Ｍクエン酸－Na_2HPO_4緩衝液を１００μｌずつ分注し３７℃で３０分間反応させた（ペルオキシダーゼの活性測定反応）。反応後、５Ｎ硫酸を５０μｌずつ添加して反応を停止させ、波長４９１ｎｍの吸光度（ＡＢＳないしＯＤ）を分光光度計（商品名：プレートリーダー、日本インターメッド社製ＮＪ－２００１）で測定した。

実施例５

（抗原ペプチドckk-n2を用いた検体の測定）

実施例３で用いた抗原ペプチドckk-n5に代えて、実施例２で得た抗原ペプチドckk-n6を用いた以外は、実施例３と同様にして抗原ペプチドckk-n6を固相化したマイクロプレートを作製した。このようにして得たマイクロプレートを用いた以外は実施例４と同様にして、予めＨＣＶgenotypeの判定を行った検体（７８種類）を分析した。

上記実施例４および５で得られた結果をまとめて図３０（表７）に示す。

上記表７において、第１列は検体番号を示し、第２列は抗原ペプチドckk-n5（NS4L2-1 ）を用いた場合の検体の吸光度（ＯＤ値）を示し、第３列は抗原ペプチドckk-n6（NS4L2-2 ）を用いた場合の検体の吸光度を示し、第４列は予め求めておいたＰＣＲ法による判定結果（genotype）を示し、第５列は本発明の方法による判定結果（serotype）を示す。

本発明の方法によるserotype判定においては、第１列の吸光度（ckk-n5）と、第２列の吸光度（ckk-n6）とを比較して、いずれか一方の値が他方の値の１．５倍以上であった場合に、吸光度の高い方のタイプ（ckk-n5の方であればserotype

1、ckk-n6の方であればserotype２）とした。

上記実施例４および５で得られたserotype判定の結果をまとめて、genotype判定結果と比較したところ、以下の対応関係が得られた（Hepatology, 16(4) ,886, 1992参照）。

＜serotypeとgenotypeとの対応＞

genotype判定 (ＰＣＲ)	serotype判定 (ＮＳ４)
I	group I
II	group I
III	group II
IV	group II
V	−

（表中、「genotypeＶ」は、ＰＣＲ法によるgenotype判定において型判定不能ないし不明（混在のものを含む）のものを示す。）

実施例６

（抗原ペプチドckk-n3およびckk-n4を用いた検体の測定）

実施例３で用いた抗原ペプチドckk-n1に代えて、実施例２で得たＮＳ５領域の抗原ペプチドckk-n3およびckk-n4をそれぞれ用いた以外は、実施例３と同様にしてそれぞれの抗原ペプチドを固相化したマイクロプレートを作製した。このようにして得たマイクロプレートを用いた以外は実施例４と同様にして、予めＨＣＶgenotypeの判定を行った検体（４８種類）を分析した。

本実施例で得られた結果をまとめて図３１（表８）に示す。

本実施例の方法によるserotype判定においては、表７の場合と同様に、第１列の吸光度（ckk-n3；NS5L2-1 ）と、第２列の吸光度（ckk-n2；NS5L2-2 ）とを比較して、いずれか一方の値が他方の値の１．５倍以上であった場合に、吸光度の高い方のタイプ（ckk-n3の方であればserotype１、ckk-n4の方であればserotype

2）とした。

本実施例で得られたserotype判定の結果をまとめて、genotype判定結果と比較したところ、実施例４および５の結果と同様に、以下の対応関係が得られた。

＜serotypeとgenotypeとの対応＞

genotype判定 (ＰＣＲ)	serotype判定 (ＮＳ５)
I	group I
II	group I
III	group II
IV	group II
V	−

実施例７

（抗原ペプチドckk-n1およびckk-n2を用いた検体の測定）

実施例３で用いた抗原ペプチドckk-n5に代えて、実施例２で得たＮＳ４領域の抗原ペプチドckk-n1およびckk-n2をそれぞれ用いた以外は、実施例３と同様にしてそれぞれの抗原ペプチドを固相化したマイクロプレートを作製した。このようにして得たマイクロプレートを用いた以外は実施例４と同様にして、予めＨＣＶgenotypeの判定を行った検体（４５種類）を分析した。

本実施例で得られた結果をまとめて図３２（表９）に示す。

本実施例の方法によるserotype判定においては、表７の場合と同様に、第１列の吸光度（ckk-n1；NS4L3-1 ）と、第２列の吸光度（ckk-n2；NS4L3-2 ）とを比較して、いずれか一方の値が他方の値の１．５倍以上であった場合に、吸光度の高い方のタイプ（ckk-n1の方であればserotype１、ckk-n2の方であればserotype２）とした。

本実施例で得られたserotype判定の結果をまとめて、genotype判定結果と比較したところ、実施例４および５の結果と同様に、以下の対応関係が得られた。

＜serotypeとgenotypeとの対応＞

genotype判定 (ＰＣＲ)	serotype判定 (ＮＳ４)
I	group I
II	group I
III	group II
IV	group II
V	−

実施例８

(抗原ペプチドckk-c1およびckk-c2を用いた検体の測定)

実施例３で用いた抗原ペプチドckk-n5に代えて、実施例２で得たｃｏｒｅ領域の抗原ペプチドckk-c1およびckk-c2をそれぞれ用いた以外は、実施例３と同様にしてそれぞれの抗原ペプチドを固相化したマイクロプレートを作製した。このようにして得たマイクロプレートを用いた以外は実施例４と同様にして、予めＨＣＶgenotypeの判定を行った検体（４２種類）を分析した。

本実施例で得られた結果をまとめて図３３（表１０）に示す。

本実施例の方法によるserotype判定においては、表１の場合と同様に、第１列の吸光度（ckk-c1；core-1）と、第２列の吸光度（ckk-c2；core-2）とを比較して、いずれか一方の値が他方の値の１．５倍以上であった場合に、吸光度の高い方のタイプ（ckk-c1の方であればserotype１、ckk-c2の方であればserotype２）とした。

本実施例で得られたserotype判定の結果をまとめて、genotype判定結果と比較したところ、実施例４および５の結果と同様に、以下の対応関係が得られた。

＜serotypeとgenotypeとの対応＞

genotype判定 (ＰＣＲ)	serotype判定 (ｃｏｒｅ)

I	group I
II	group I
III	group II
IV	group II
V	−

上記実施例４～８で得られたserotype判定の結果をまとめて図３２に示す。

図３２において、それぞれの集合を示す円の中の数字は、それぞれの領域の抗原ペプチドを用いた際に識別できた検体の数を示す。各集合の共通部分は、それぞれの領域の抗原ペプチドを用いた際に共通に識別できた検体の数を示す。

上述したように、genotype Ⅰおよび genotype IIは serotype Ⅰと良く相関し、一方、genotype IIIおよび genotype IVは serotype IIと良く相関していた。

上述したＮＳ４領域（ＮＳ４－１およびＮＳ４－２を合せたもの）、ＮＳ５領域、およびｃｏｒｅ領域の抗原ペプチド化合物を用いたserotype判定結果を組合わせた場合、genotypeで型判定できた検体のうち８６％が本発明の方法によるserotype判定が可能であった。

実施例９

（抗原ペプチドckk-n1（40）およびckk-n2（40）を用いた検体の測定）

実施例３で用いた抗原ペプチドckk-n5に代えて、実施例２で得たＮＳ４領域の抗原ペプチドckk-n1（40）およびckk-n2（40）（アミノ酸数４０）をそれぞれ用いた以外は、実施例３と同様にしてそれぞれの抗原ペプチドを固相化したマイクロプレートを作製した。

このようにして得たマイクロプレートを用いた以外は実施例４と同様にして、予め実施例４（抗原ペプチドckk-n5使用）、および実施例５（抗原ペプチドckk-n6使用）の方法でＨＣＶserotypeの判定を行った検体（１００種類）を分析した。該１００種類の検体の内訳は、ＣＡＨ（慢性活動型肝炎）患者の検体８３種類、およびＣＰＨ（慢性持続性肝炎）患者の検体１７種類であった。

本実施例で得られた結果をまとめて図３４（表１１）に示す。

表１１においては、実施例４および５の方法（ＮＳ４抗原ペプチドとして、アミノ酸数が２０のckk-n5およびckk-n6を使用）による判定結果を「ＮＳ４（２０）」として表し、本実施例の方法（ＮＳ４抗原ペプチドとして、アミノ酸数が４０のckk-n1(40)およびckk-n2(40)を使用）による判定結果を「ＮＳ４（４０）」として表した。

本実施例の方法による上記serotype判定においては、表１の場合と同様に、ckk-n1(40)を用いた場合の吸光度と、ckk-n2(40)を用いた場合の吸光度とを比較して、いずれか一方の値が他方の値の１．５倍以上であった場合に、吸光度の高い方のタイプ（ckk-n1(40)の方であればserotype１、ckk-n2(40)の方であればserotype２）とした。

上記表１１に示したように、ＣＡＨの検体（８３種類）ではＮＳ４（２０）の場合の判定率が６２％（＝５２÷８３）であったものが、ＮＳ４（４０）の場合の判定率８３％（＝６９÷８３）へと向上した。一方、ＣＰＨの検体（１７種類）ではＮＳ４（２０）の場合の判定率７５％（＝１３÷１７）であったものが、ＮＳ４（４０）の場合の判定率８８％（＝１５÷１７）へと向上した。

実施例１０

ＣＨ２Ａ（慢性活動型肝炎ＣＡＨであって、後述するＣＨ２Ｂより進行していないもの）患者の検体４８種類、ＣＨ２Ｂ（慢性活動型肝炎ＣＡＨであって、前記ＣＨ２Ａより進行したもの）患者の検体３６種類、およびＣＰＨ（慢性持続性肝炎）患者の検体１７種類を用いて、serotypeの判定（実施例９と同様の方法で実施、下記表において「TYPE」として示す）、genotype（実施例４と同様の方法で実施、下記表において「SUBTYPE 」として示す）、およびインターフェロン（ＩＦＮ）の有効性の程度（下記表において、Ｎ＝効果なし、Ｐ（partially effective ）＝有効、およびＣ（completely effective）＝著効）の判定を行った。

結果を図３５（表１２）に示す。

更に、上記表１２に示した検体と同じ検体について、ＮＳ５領域抗原ペプチドを用いた方法（実施例６の方法）、およびｃｏｒｅ領域抗原ペプチドを用いた方法（実施例８の方法）によるserotype判定を併せて行った。結果を図３６（表１３）に示す（本実施例における上記「ＮＳ４領域抗原ペプチド」たるckk-n1(40)およびckk-n2(40)を用いた場合の判定結果は、「ＮＳ４」として示した）。

なお、上記表１３中、ＣＨ２Ａ（４０検体）およびＣＨ２Ｂ（２９検体）の検体数を合計した数が、前記表１１のＮＳ４（４０）判定数（６９検体）に対応している。

上記実施例９～１０で得られたserotype判定の結果をまとめて図２１（ＣＰＨ検体）、図２２（ＣＡＨ２Ａ検体）、および図２３（ＣＡＨ２Ｂ検体）にそれぞれ示す。図１９～２１では、「ＮＳ４領域抗原ペプチド」たるckk-n1(40)およびckk-n2(40)を用いた際の判定結果は、「ＮＳ４」として示してある。

図２１～２３において、それぞれの集合を示す円の中の数字は、それぞれの領域の抗原ペプチドを用いた際に識別できた検体の数を示す。各集合の共通部分は、それぞれの領域の抗原ペプチドを用いた際に共通に識別できた検体の数を示す。

産業上の利用可能性

上述したように本発明によれば、ＨＣＶに固有の特定のアミノ酸配列を有する抗原ペプチド化合物およびこれを用いるＨＣＶ抗体測定方法が提供される。

本発明によれば、交叉反応ないし非特異反応を抑制しつつ検体のserotypeを簡便且つ正確に判定することが可能となる。したがって本発明によれば、正確且つ簡便なserotype判定に基づき、例えば、インターフェロン治療の効果をあらかじめ予測することが可能となる。

更には、本発明によるＨＣＶ抗体価測定に基づき、Ｃ型肝炎の治癒ないし治療経過を簡便に観察することが可能となる。

更には、本発明によれば、ＨＣＶのgenotypeＩ型およびII型と、genotypeIII

型およびIV型との区別が可能で、しかも交叉反応ないし非特異反応が抑制されたＨＣＶ抗体の測定を可能とするＨＣＶ抗体測定用抗原が提供される。

更には、本発明によれば、ＨＣＶのgenotypeＩ型およびII型と、genotypeIII型およびIV型との区別が可能なＨＣＶ抗体の簡便な測定法が提供される。

更には、本発明によれば、ＨＣＶのgenotypeＩ型およびII型と、genotypeIII型およびIV型との区別が可能で、しかも交叉反応ないし非特異反応が抑制されたＨＣＶ抗体の測定法が提供される。

更には、本発明によれば、ＨＣＶのgenotypeＩ型およびII型と、genotypeIII型およびIV型との区別が可能な低コストのＨＣＶ抗体の測定法が提供される。

請 求 の 範 囲

1． 下記式（1）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Leu- Ser- Gly- Arg- Pro- Ala- Ile- Val- Pro- Asp- Arg- Glu- Val- Leu- Tyr- Gln- Glu- Phe- Asp- Glu ……（1） (ckk-n5)

2． 下記式（2）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Val- Asn- Gln- Arg- Ala- Val- Val- Ala- Pro- Asp- Lys- Glu- Val- Leu- Tyr- Glu- Ala- Phe- Asp- Glu……（2） (ckk-n6)

3． 下記式（3）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Cys- Thr- Thr- His- His- Val- Ser- Pro- Asp- Ala- Asp- Leu- Ile- Glu- Ala- Asn- Leu- Leu- Trp- Arg……（3） (ckk-n3)

4． 下記式（4）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Cys- Thr- Thr- His- Gly- Lys- Ala- Tyr- Asp- Val- Asp- Met- Val- Asp- Ala- Asn- Leu- Phe- Met- Gly…… （4） (ckk-n4)

5． 下記式（5）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Gln-Glu-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-His-Leu-Pro-Tyr-Ile-Glu-Gln-Gly-Met…… (5) (ckk-n1)

6． 下記式（6）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Glu-Ala-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-Arg-Ala-Ala-Leu-Ile-Glu-Glu-Gly-Gln…… (6) (ckk-n2)

7． 下記式（7）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Gly-Arg-Arg-Gln-Pro-Ile-Pro-Lys-Ala-Arg-Arg-Pro-Glu-Gly-Arg-Thr-Trp-Ala-Gln-Pro…… (7)

8． 下記式（8）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Gly-Arg-Arg-Gln-Pro-Ile-Pro-Lys-Asp-Arg-Arg-Ser-Thr-Gly-Lys-Ser-Trp-Gly-Lys-Pro…… (8)

9． 下記式（9）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化

合物。

Ile-Ile-Leu-Ser-Gly-Arg-Pro-Ala-Ile-Val-Pro-Asp-Arg-Glu-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-His-Leu-Pro-Tyr-Ile-Glu-Gln-Gly-Met-Gln-Leu-Ala…… (9) (ckk-n1(40))

10. 下記式（10）で示される配列に含まれるアミノ酸配列であって、連続した少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含むことを特徴とする抗原ペプチド化合物。

Leu-His-Val-Asn-Gln-Arg-Ala-Val-Val-Ala-Pro-Asp-Lys-Glu-Val-Leu-Tyr-Glu-Ala-Phe-Asp-Glu-Met-Glu-Glu-Cys-Ala-Ser-Arg-Ala-Ala-Leu-Ile-Glu-Glu-Gly-Gln-Arg-Ile-Ala…… (10) (ckk-n2(40))

11. 化学的手法を用いて製造した請求の範囲第1項ないし第10項のいずれかに記載の抗原ペプチド化合物。

12. 遺伝子工学的手法を用いて製造した請求の範囲第1項ないし第10項のいずれかに記載の抗原ペプチド化合物。

13. 請求の範囲第1項ないし第10項のいずれかに記載の抗原ペプチドを担体に結合させ、抗原－抗体反応を利用して該ペプチドに検体中のＨＣＶ抗体を結合させ、更に抗原－抗体反応を利用して該ＨＣＶ抗体に標識リガンドを結合させることにより、上記検体中のＨＣＶ抗体を測定することを特徴とするＨＣＶ抗体の免疫学的測定法。

14. 前記標識リガンドとして、酵素で標識したリガンドを用いる請求の範囲第13項に記載のＨＣＶ抗体の免疫学的測定法。

15. 前記標識リガンドとして、放射性物質で標識したリガンドを用いる請求

の範囲第１３項に記載のＨＣＶ抗体の免疫学的測定法。

１６．　前記標識リガンドとして、蛍光物質で標識したリガンドを用いる請求の範囲第１３項に記載のＨＣＶ抗体の免疫学的測定法。

１７．　請求の範囲第１項ないし第１０項のいずれかに記載の抗原ペプチドから選択されたいずれか２以上の抗原ペプチドを用いて、ＨＣＶのセロタイプ（serotype）を判定する請求の範囲第１３項に記載のＨＣＶ抗体の免疫学的測定法。

１８．　請求の範囲第１項ないし第１０項のいずれかに記載のＨＣＶのＮＳ４領域、ＮＳ５領域、およびｃｏｒｅ領域に対応する抗原ペプチドから選択された、異なる領域に対応する２以上の抗原ペプチドを用いて、ＨＣＶのセロタイプ（serotype）を判定する請求の範囲第１３項に記載のＨＣＶ抗体の免疫学的測定法。

図1

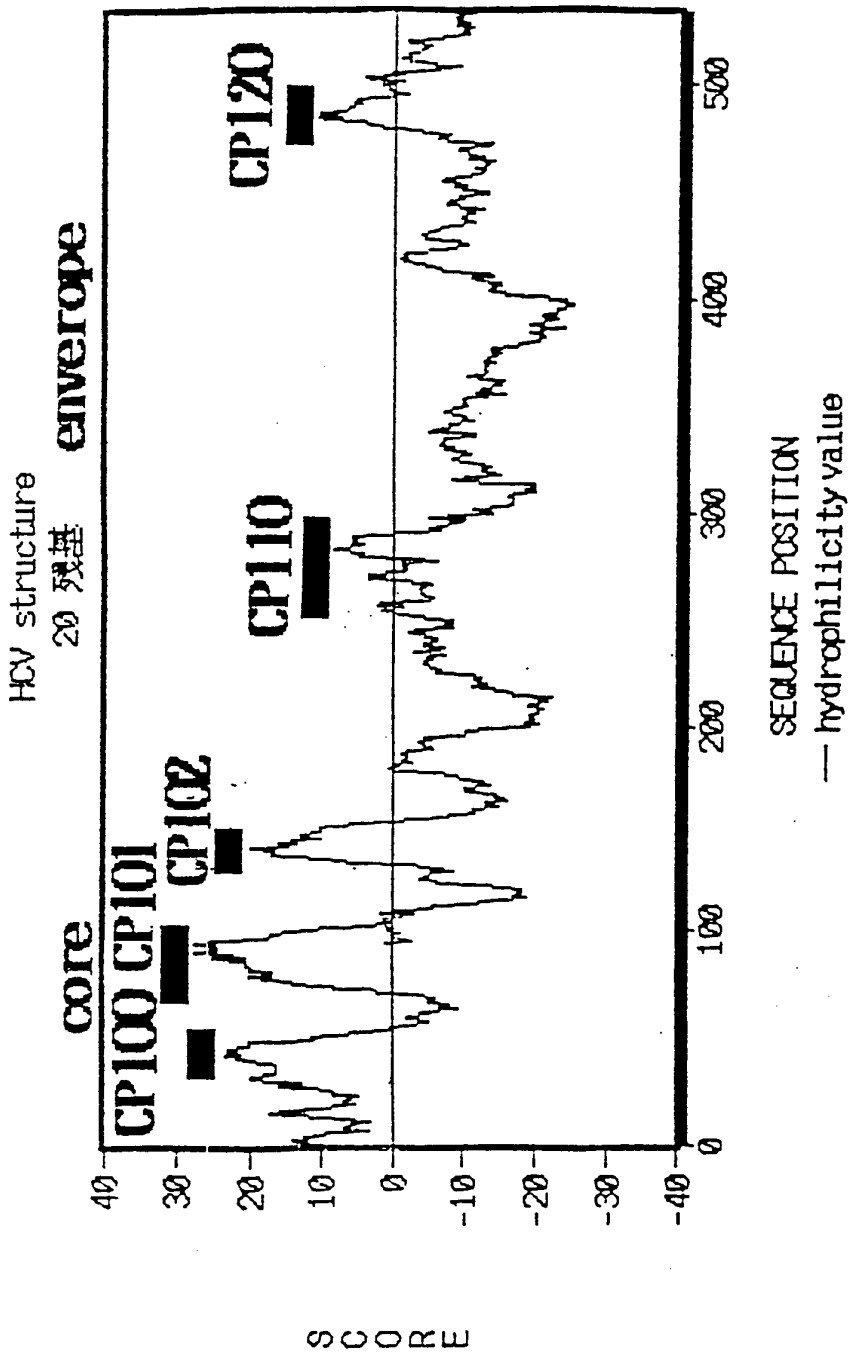

HCV structure
20 残基
core
envelope
CP100
CP101
CP102
CP110
CP120
SCORE
SEQUENCE POSITION
— hydrophilicity value
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
0
100
200
300
400
500

図2

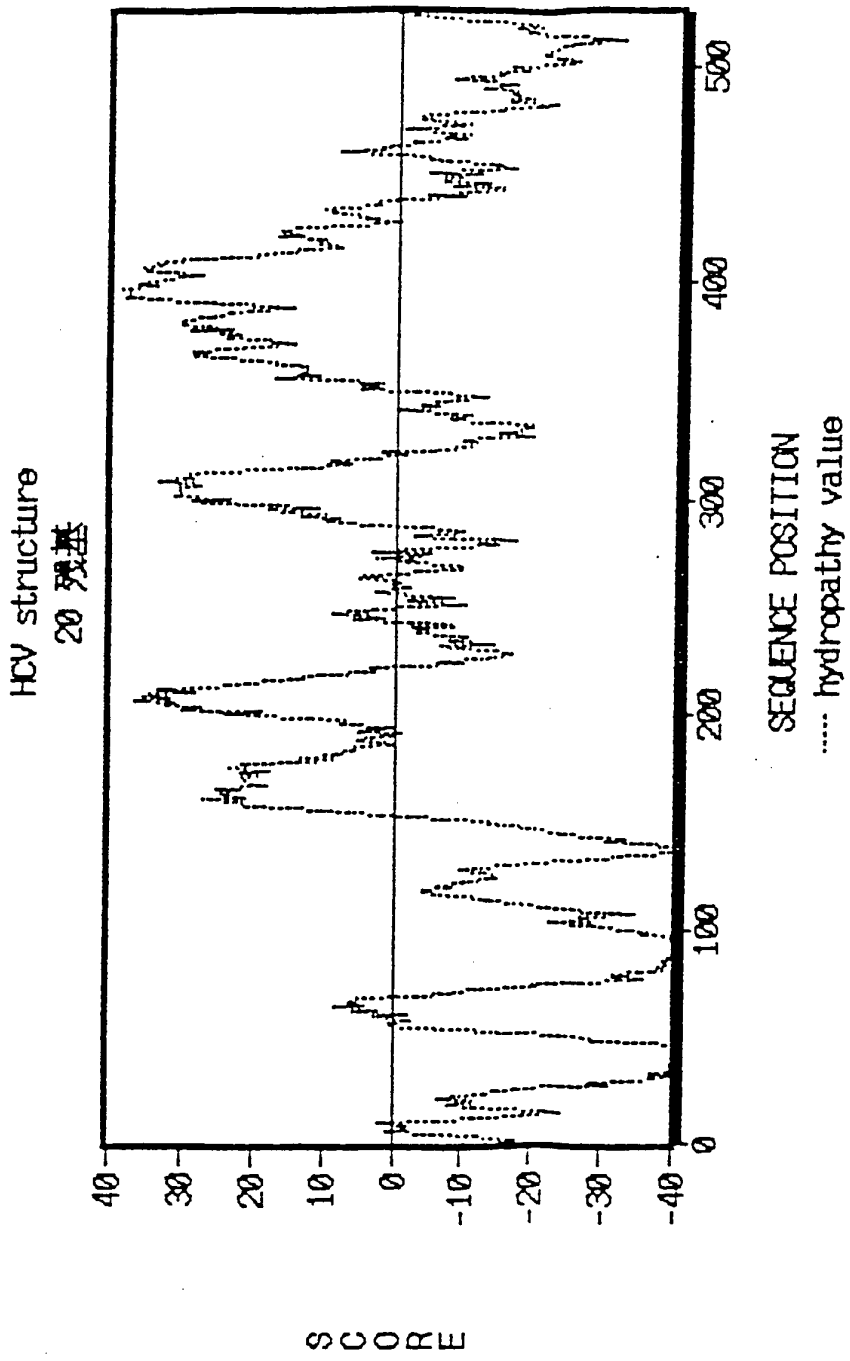

HCV structure
20 残基
SEQUENCE POSITION
---- hydropathy value
SCORE
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
0
100
200
300
400
500

図3

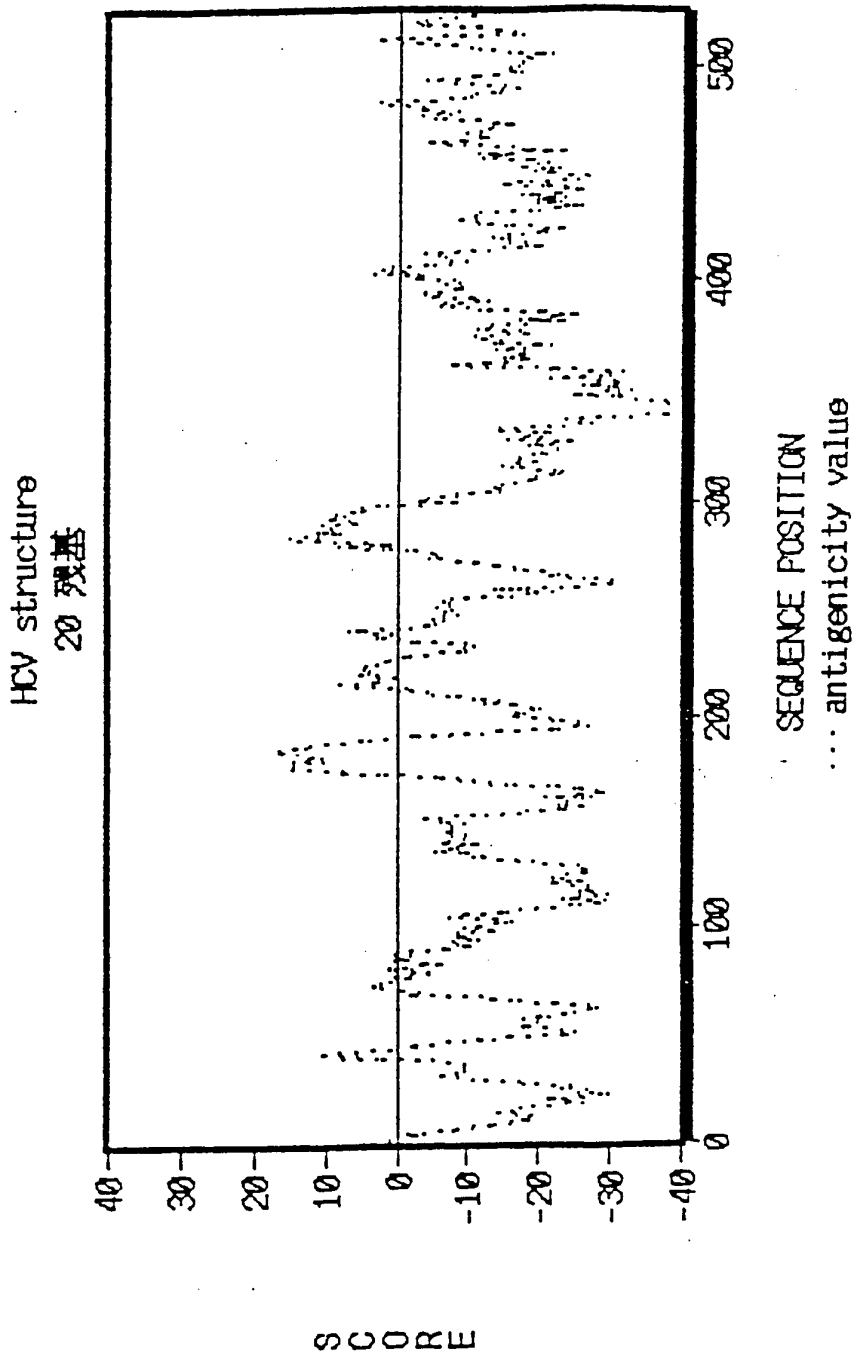

HCV structure
20 残基
SCORE
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
0
100
200
300
400
500
SEQUENCE POSITION
... antigenicity value

図4

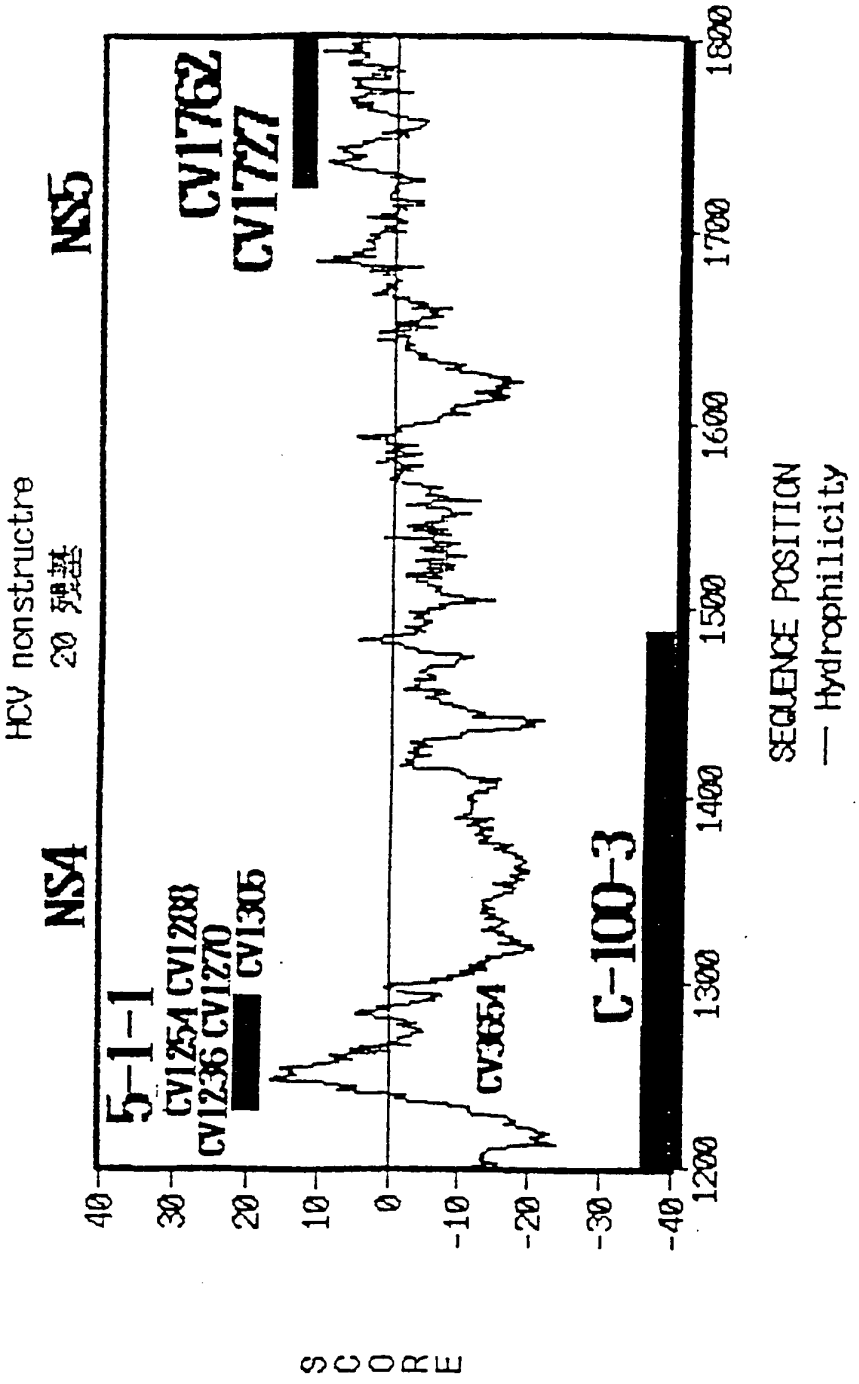

HCV nonstructre
20 残基
NS4
NS5
5-1-1
CV1254 CV1288
CV1236 CV1270
CV1305
CV3654
C-100-3
CV1762
CV1777
SCORE
SEQUENCE POSITION
— Hydrophilicity
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800

図5

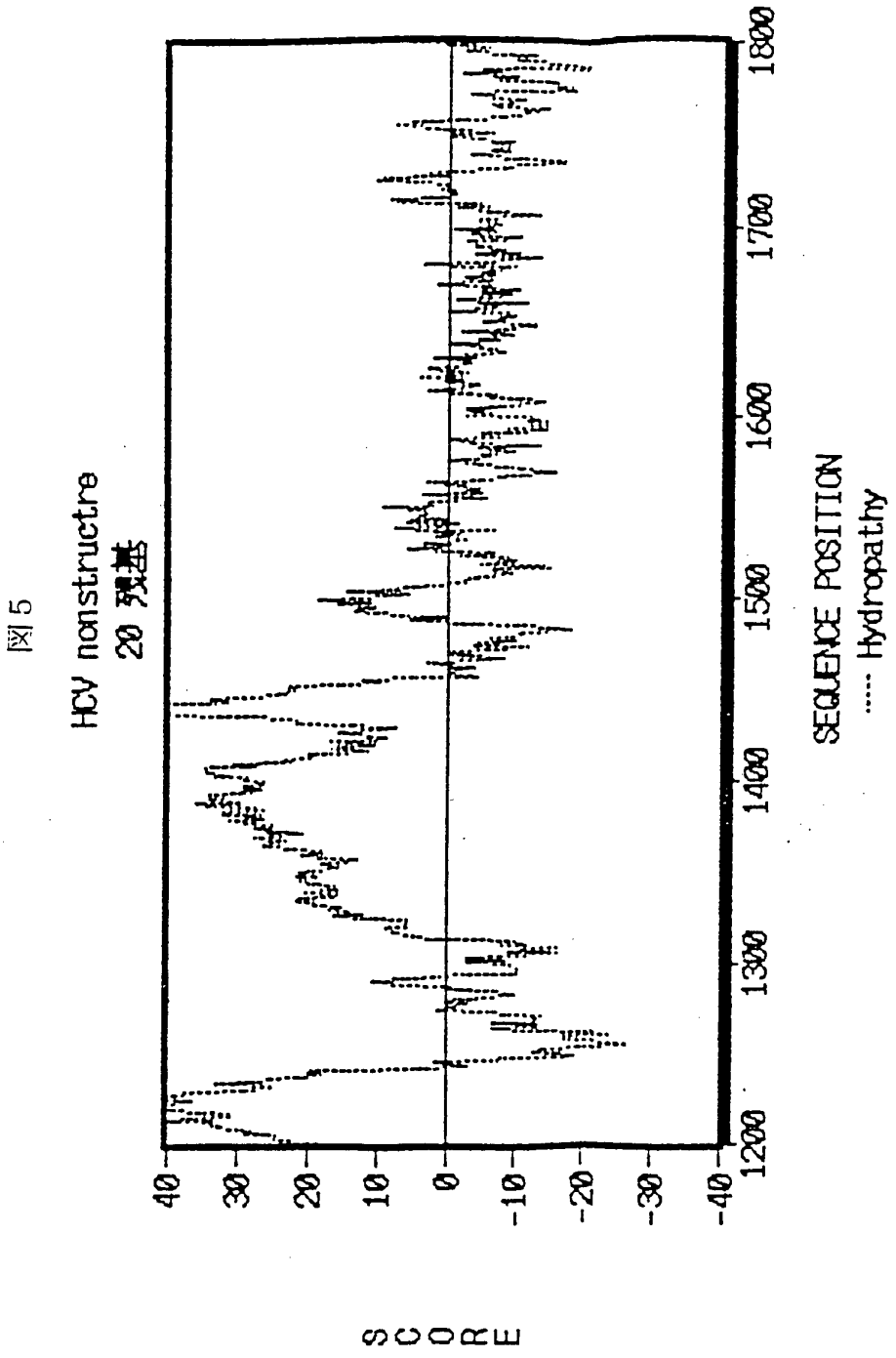

HCV nonstructre
20 残基
SEQUENCE POSITION
---- Hydropathy
SCORE
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40

図6

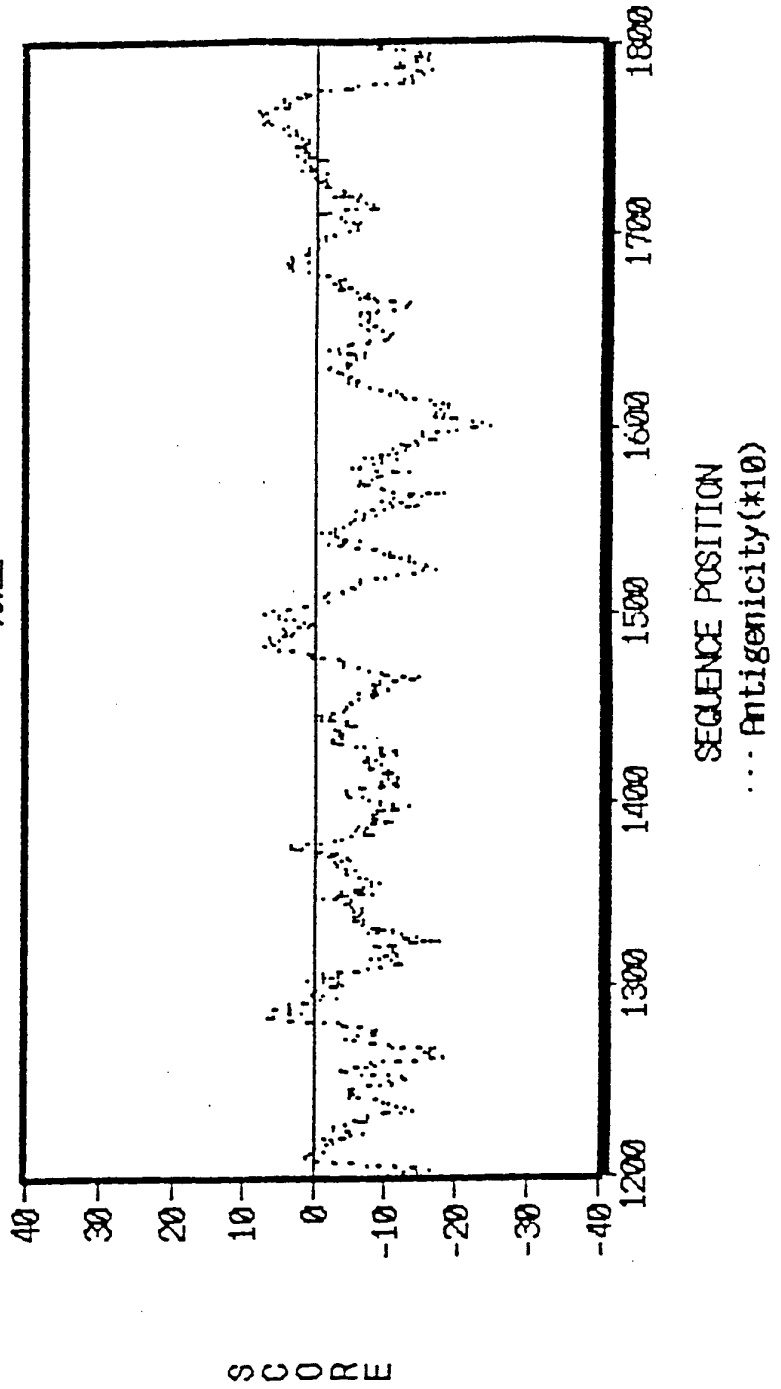

HCV nonstructre
20 残基
SCORE
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800
SEQUENCE POSITION
--- Antigenicity(*10)

図7

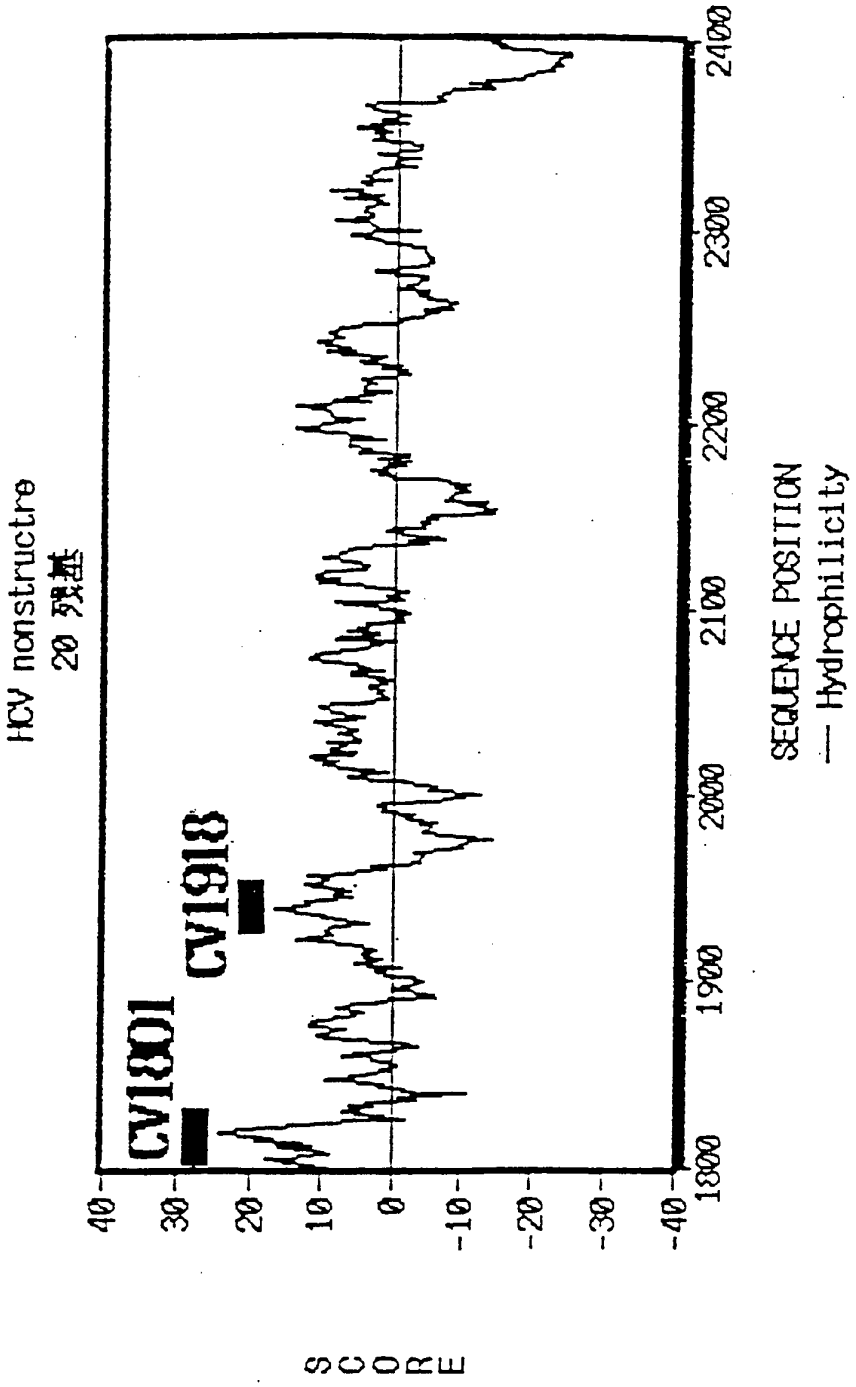

HCV nonstructre
20 残基
CV1801
CV1918
SCORE
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
1800
1900
2000
2100
2200
2300
2400
SEQUENCE POSITION
— Hydrophilicity

図8

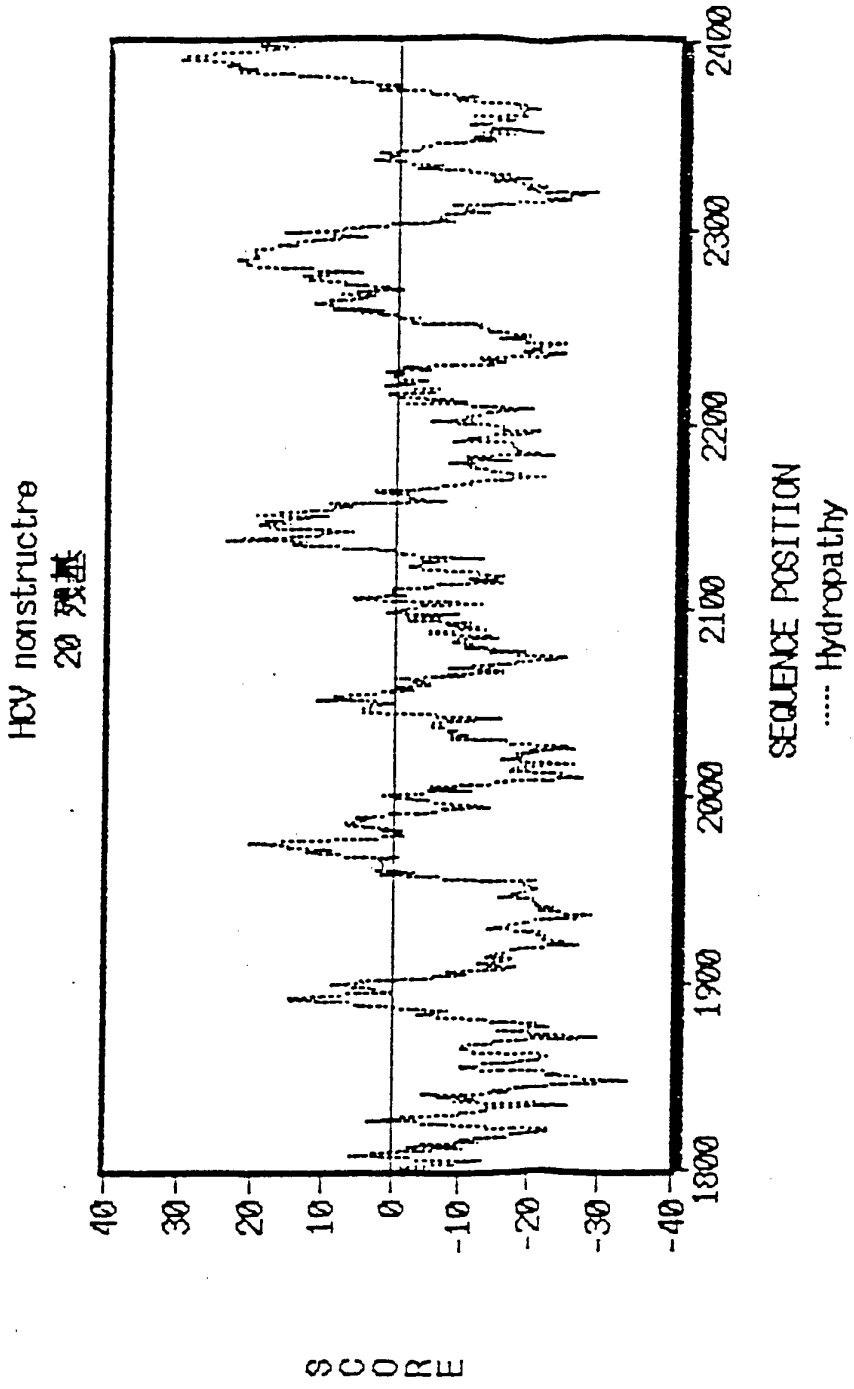

HCV nonstructre
20 残基
SEQUENCE POSITION
---- Hydropathy
SCORE
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
1800
1900
2000
2100
2200
2300
2400

図9

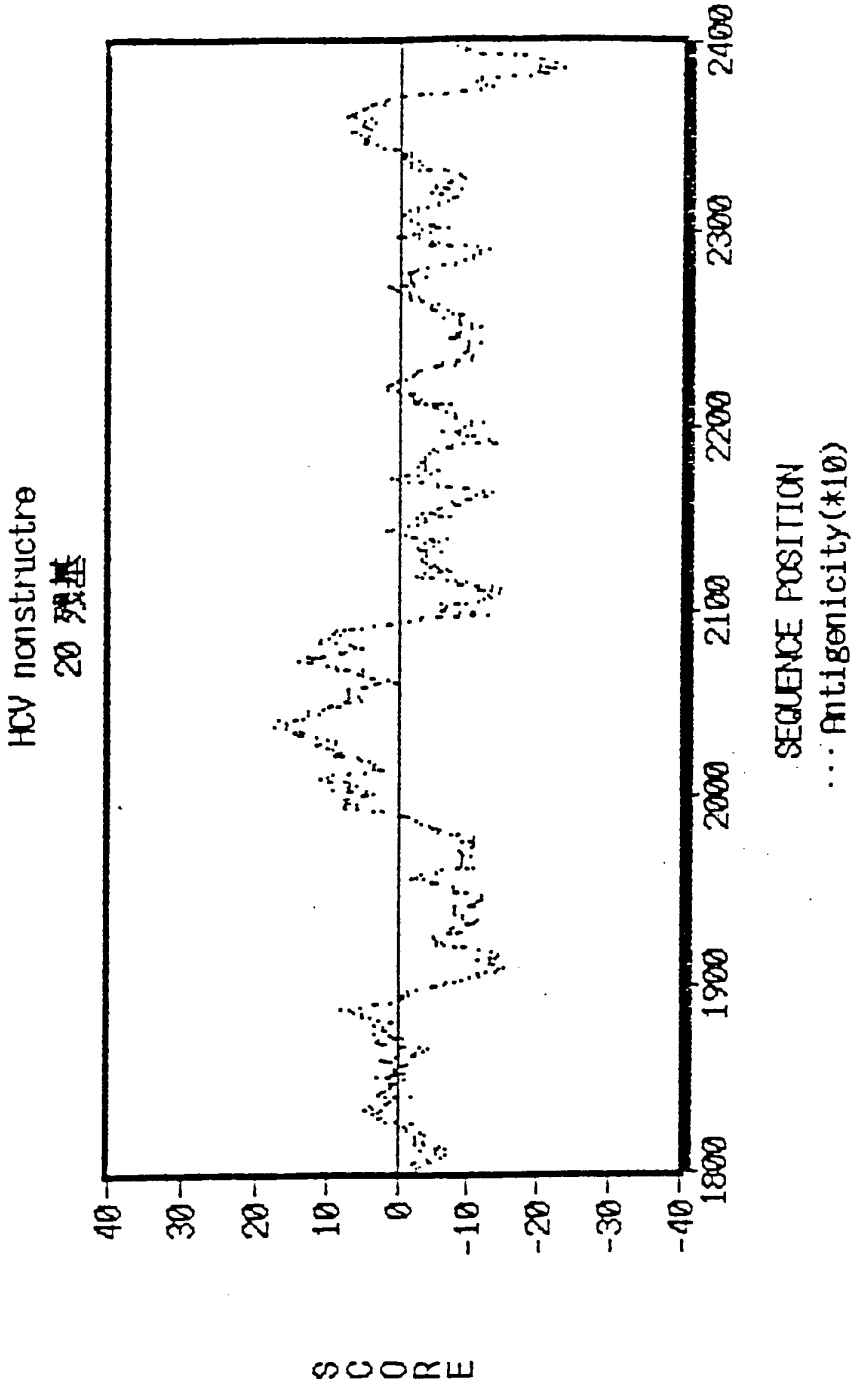
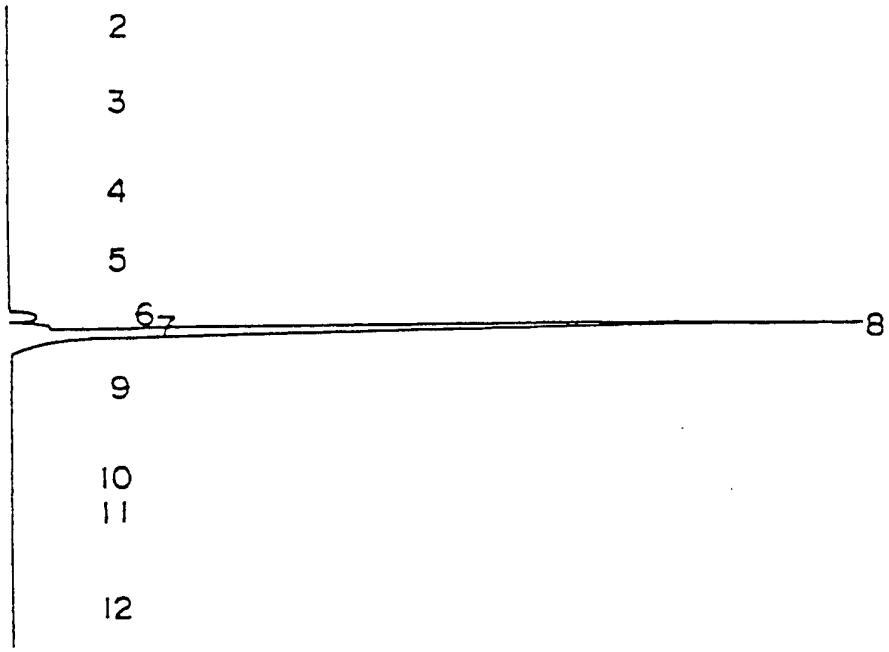

HCV nonstructre
20 残基
SCORE
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
1800
1900
2000
2100
2200
2300
2400
SEQUENCE POSITION
.... Antigenicity(*10)

図10

807-IT PARAM FILE#0 RUN#839 CHROMATOGRAM REPLOT
CHART SPEED 5mm/min
START DELAY 0.00min ATTENUATION 512mV F.S.

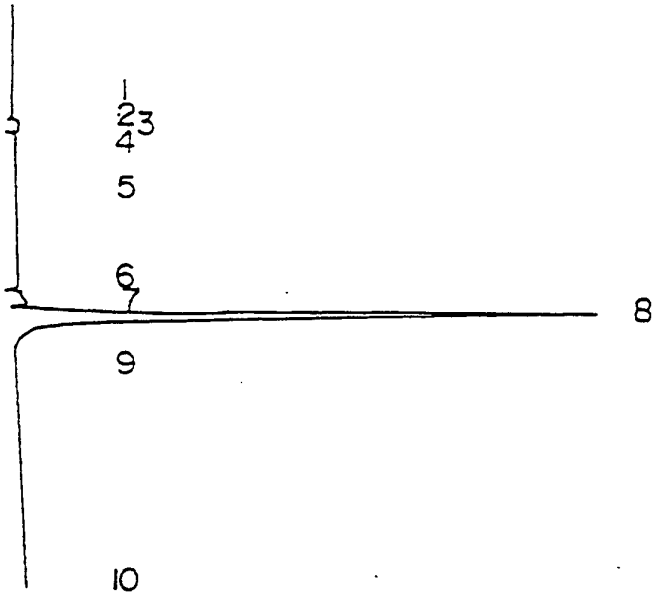


% CALCULATION RESULT
WINDOW=0 % SCALE FACTOR=1.0000 PEAK AREA

PEAK#	RT(min)	AREA	HEIGHT	MK	AREA%
1	0.542	10328	1283	V	0.1844
2	0.833	3460	331	V	6.1773E-02
3	3.200	1535	171		2.7393E-02
4	6.100	1905	183		3.3998E-02
5	8.325	4536	420		8.1872E-02
6	10.192	92249	9103	L	1.6468
7	10.458	24785	5433	L	0.4424
8	10.733	5453539	453558	LLL	97.3544
9	12.517	1563	189		2.7902E-02
10	15.517	2838	212		5.0663E-02
11	16.517	3364	240		6.0044E-02
12	19.917	1587	164		2.8326E-02
	TOTAL	5601737	471289		100.0000

図11

807-IT PARAM FILE#0 RUN#827 CHROMATOGRAM REPLOT
CHART SPEED 5mm/min
START DELAY 0.00min ATTENUATION 128mV F.S.



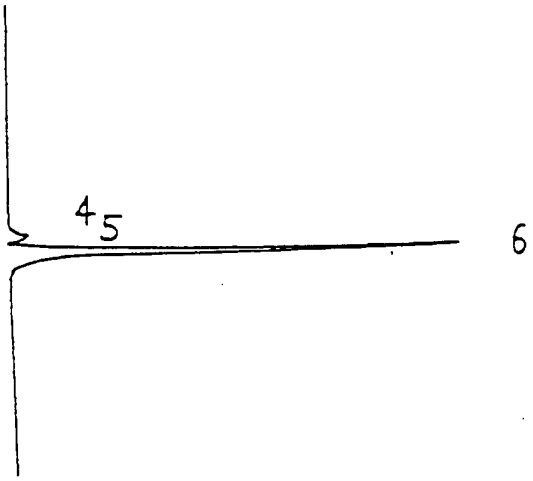
% CALCULATION RESULT

WINDOW=0% SCALE FACTOR=1.0000 PEAK AREA

PEAK#	RT(min)	AREA	HEIGHT	MK	AREA%
1	2.542	1406	179		0.1345
2	3.425	2348	193	V	0.2247
3	3.742	2108	285	V	0.2017
4	4.233	2594	192	V	0.2482
5	5.825	2726	192		0.2608
6	8.908	2968	174	L	0.2840
7	9.450	6296	645	L	0.6024
8	9.992	1018162	76549	LLL	97.4261
9	11.508	2183	233		0.2089
10	18.767	4271	361		0.4086
	TOTAL	1045060	79004		100.0000

図12

807 IT PARAM FILE#0 RUN#946 CHROMATOGRAM REPLOT
CHART SPEED 5mm/min
START DELAY 0.00min ATTENUATION 128mV F.S.



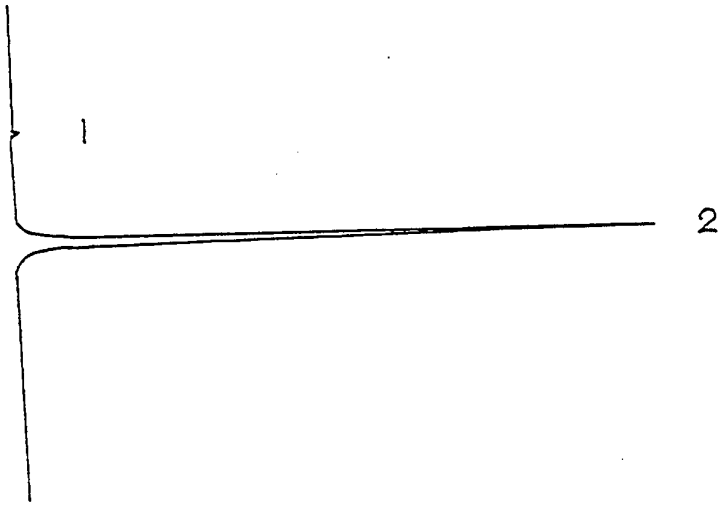
CALCULATION RESULT

WINDOW=0% SCALE FACTOR=1.0000 PEAK AREA

PEAK#	RT(min)	AREA	HEIGHT	MK	AREA%
1	2.883	1114	167		0.1490
2	3.758	1178	161		0.1575
3	4.108	2907	443		0.3888
4	6.750	1543	182	L	0.2064
5	7.267	19684	1792	L	2.6327
6	7.800	719575	60311	LLL	96.2405
7	9.300	168	181		0.2251
	TOTAL	747684	63238		100.0000

図13

807-IT PARAM FILE# 0 RUN# 959 CHROMATOGRAM REPLOT
CHART SPEED 5mm/min
ATTENUATION 128mV F.S.
START DELAY 0.00min

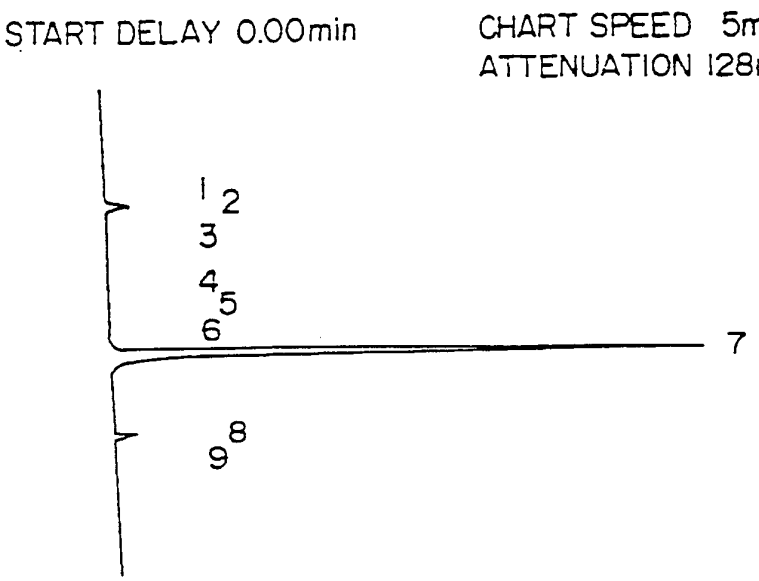


%CALCULATION RESULT

WINDOW=0% SCALE FACTOR=1.0000 PEAK AREA

PEAK#	RT(min)	AREA	HEIGHT	MK	AREA %
1	4.083	10673	1497		1.0765
2	7.750	980743	82731		98.9235
	TOTAL	991416	84228		100.0000

図14



% CALCULATION RESULT

WINDOW=0% SCALE FACTOR=1.0000 PEAK AREA

PEAK#	RT (min)	AREA	HEIGHT	MK	AREA %
1	3.708	1758	329		0.1747
2	4.100	34324	4049		3.4100
3	5.208	5079	273		0.3058
4	6.833	2449	213		0.2433
5	7.517	1273	172		0.1264
6	8.158	3314	332		0.3292
7	9.475	928591	84784		92.2556
8	12.742	29916	3427		2.9722
9	13.725	1840	225		0.1828
	TOTAL	1006542	93803		100.0000

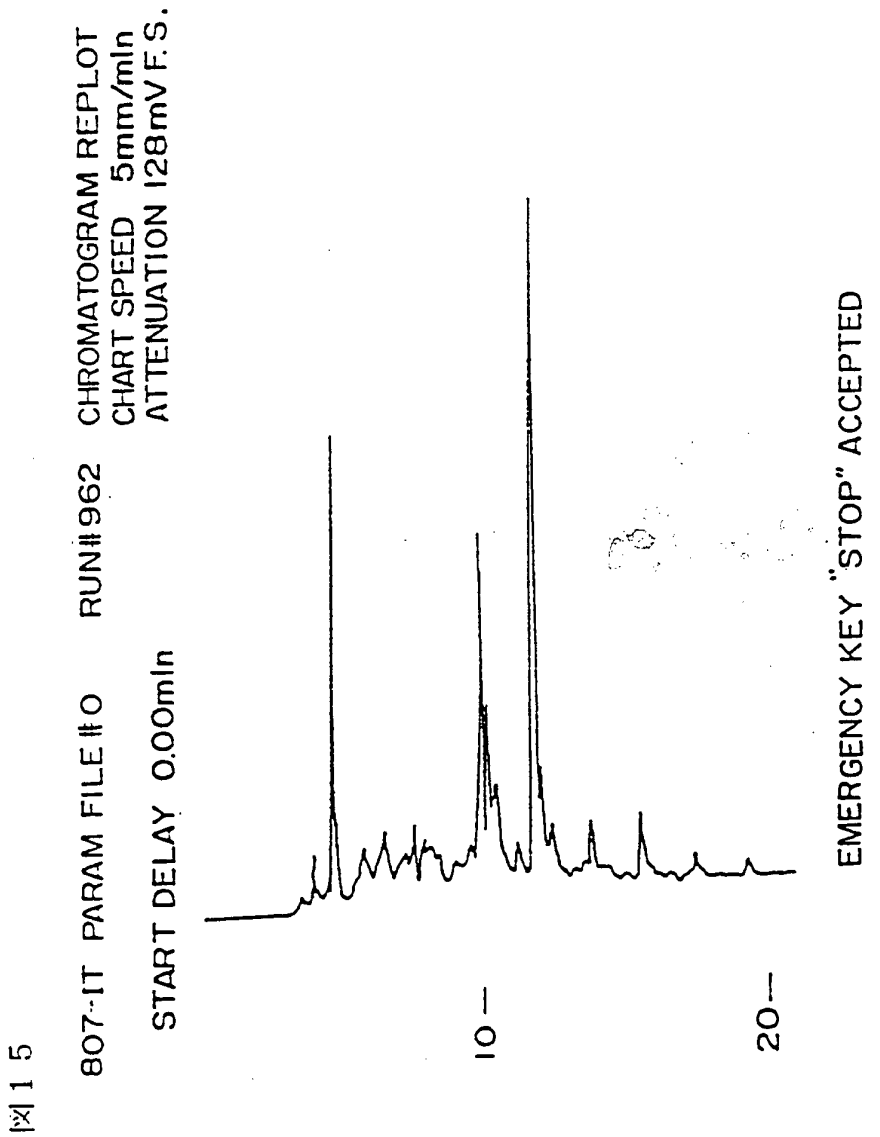

807-IT PARAM FILE #0 RUN#962 CHROMATOGRAM REPLOT
START DELAY 0.00min CHART SPEED 5mm/min
ATTENUATION 128mV F.S.
10
20
EMERGENCY KEY "STOP" ACCEPTED

図15

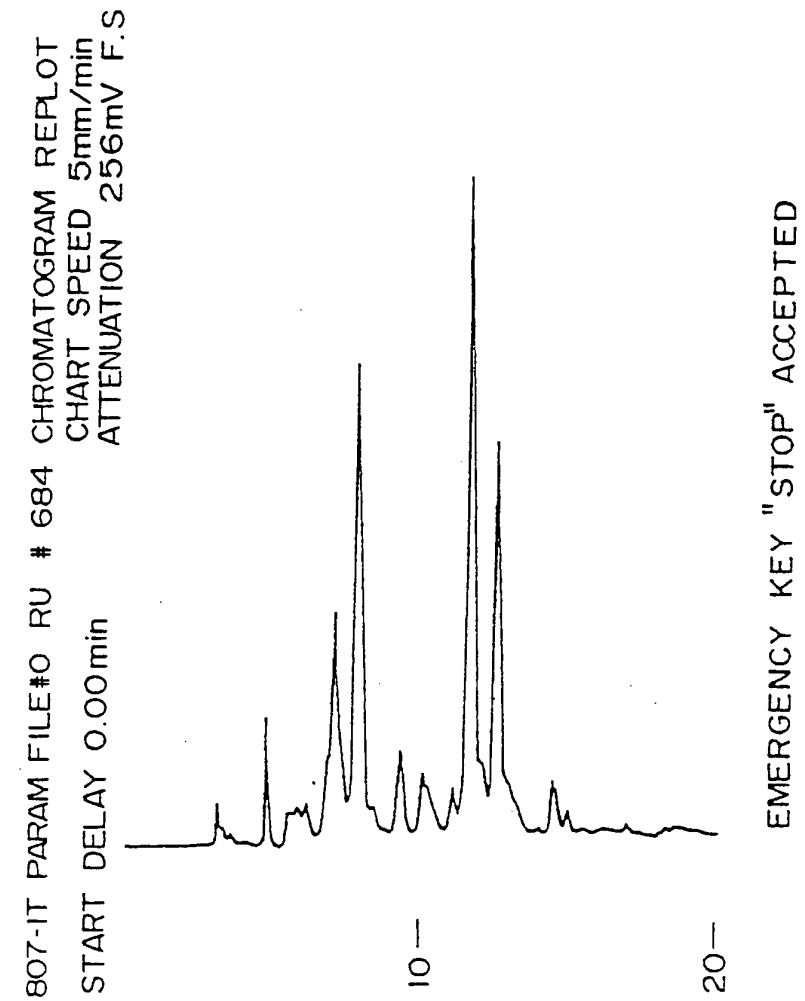

807-IT PARAM FILE#0 RU # 684 CHROMATOGRAM REPLOT
START DELAY 0.00min
CHART SPEED 5mm/min
ATTENUATION 256mV F.S
10
20
EMERGENCY KEY "STOP" ACCEPTED

図16

図17

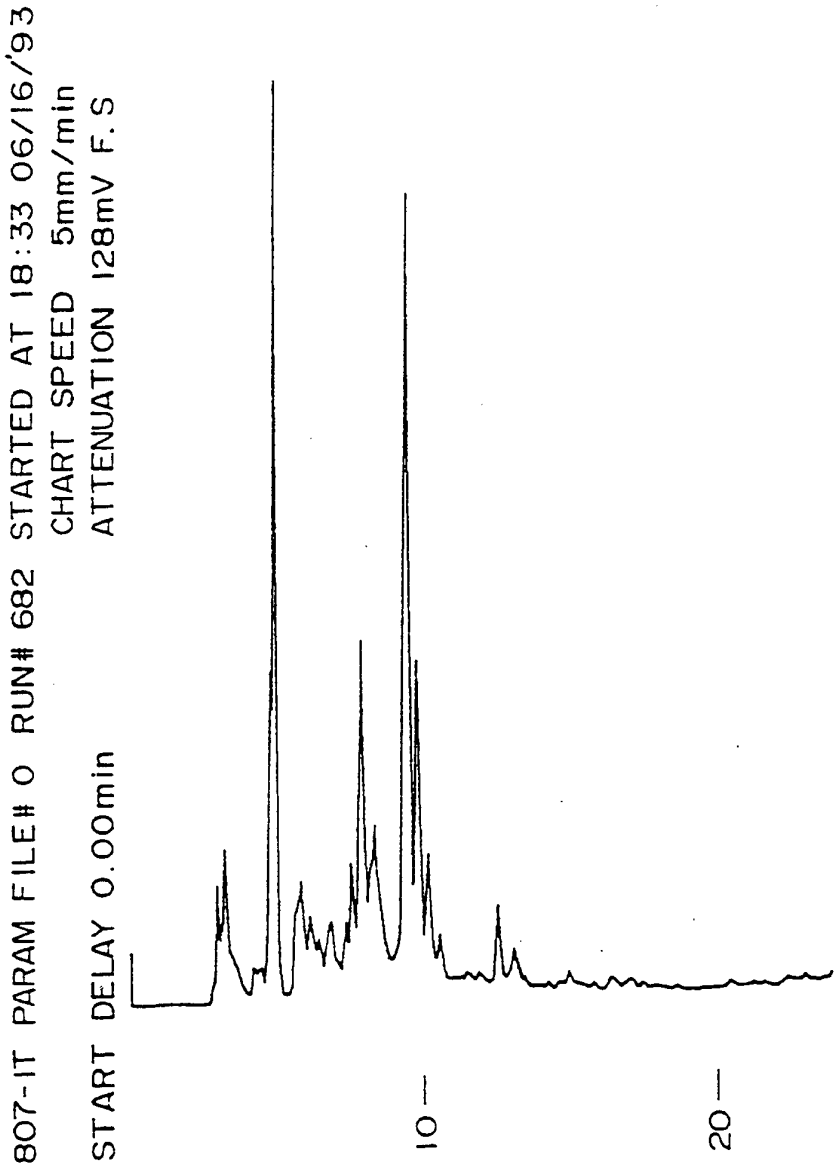
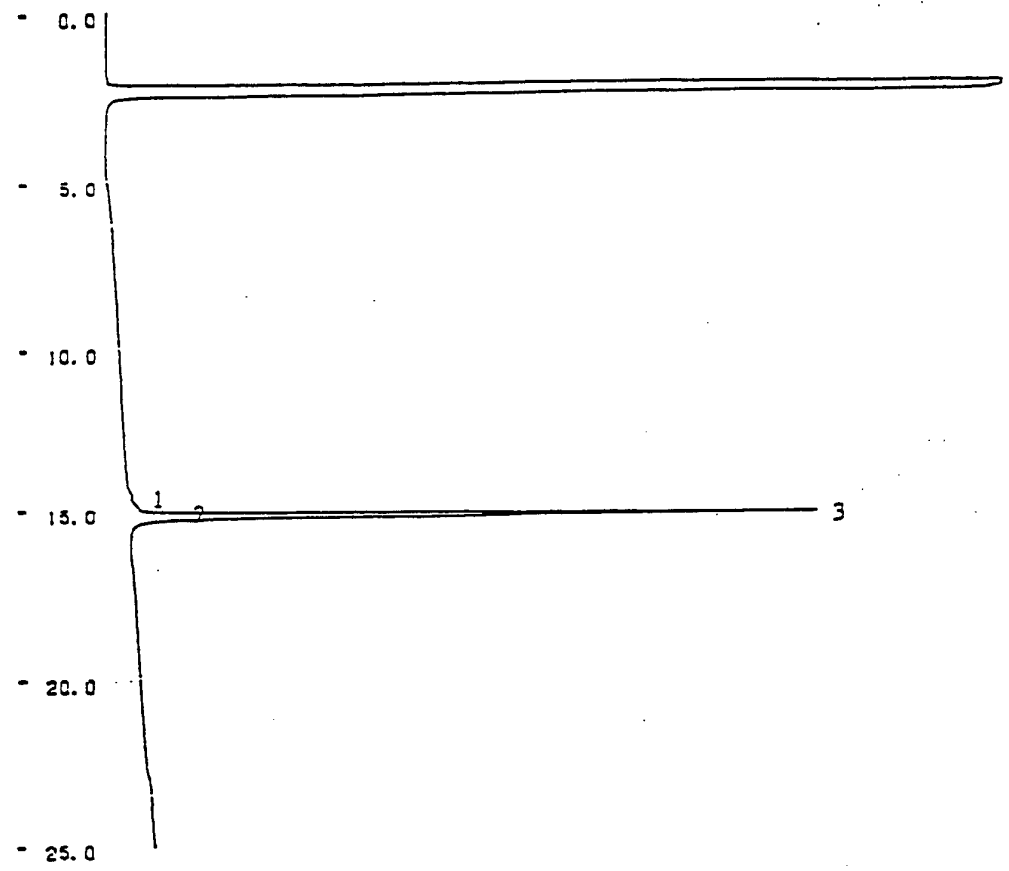

807-IT PARAM FILE# 0 RUN# 682 STARTED AT 18:33 06/16/'93
CHART SPEED 5mm/min
ATTENUATION 128mV F.S
START DELAY 0.00min
10
20

図18

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=8 ﾌｧｲﾙ=1:SPPS1.C02 94/02/16 10:45:24

分析ファイル : 1:分析表

Sample : AB-629 Lot 229-402151
Column : YMC Pak ODS-AM (4.6mmI.D.x 150mm) Lot.04151:6478
Eluant : 20 -70% CH3CN/0.1% TFA (25min)
Temp. : 50 ℃ Flow rate : 1.0 ml/min.
Detector : 220 nm(0.64 AUFS)
Load : 10 ul (conc. 0.53 mg/ 530μl 2M AcOH)



** 定量計算結果 **

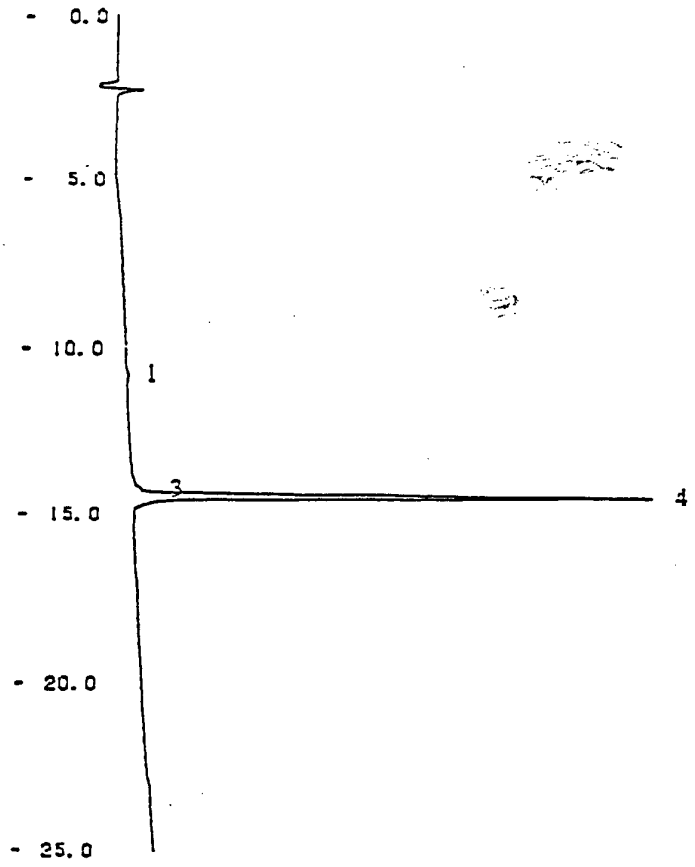
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	14.588	12783	1138			0.78	
	2	15.042	44299	4365	V		2.72	
	3	15.233	1572014	197144	V		96.5	
	TOTAL		1629096	202646			100	

図19

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=7 ﾌｧｲﾙ=1:SPPS1.C03 94/02/24 11:34:36

分析ファイル : 1:分析表

Sample : D-343. Lot 719-40 2233
Column : YMC Pak CDS-AM (4.6mmI.D.x 150mm) Lot.041516478
Eluant : 20 -70% CH3CN/0.1% TFA (25min)
Temp. : 50 ℃ Flow rate : 1.0 ml/min.
Detector : 220 nm(0.64 AUFS)
Load : 10 ul (conc. 0.58 mg/ 580μl 0.1% TFA)



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	10.803	3728	522			0.29	
	3	14.317	32780	3261	V		2.56	
	4	14.505	1241699	148761	V		97.14	
	TOTAL		1278207	152544			100	

図20

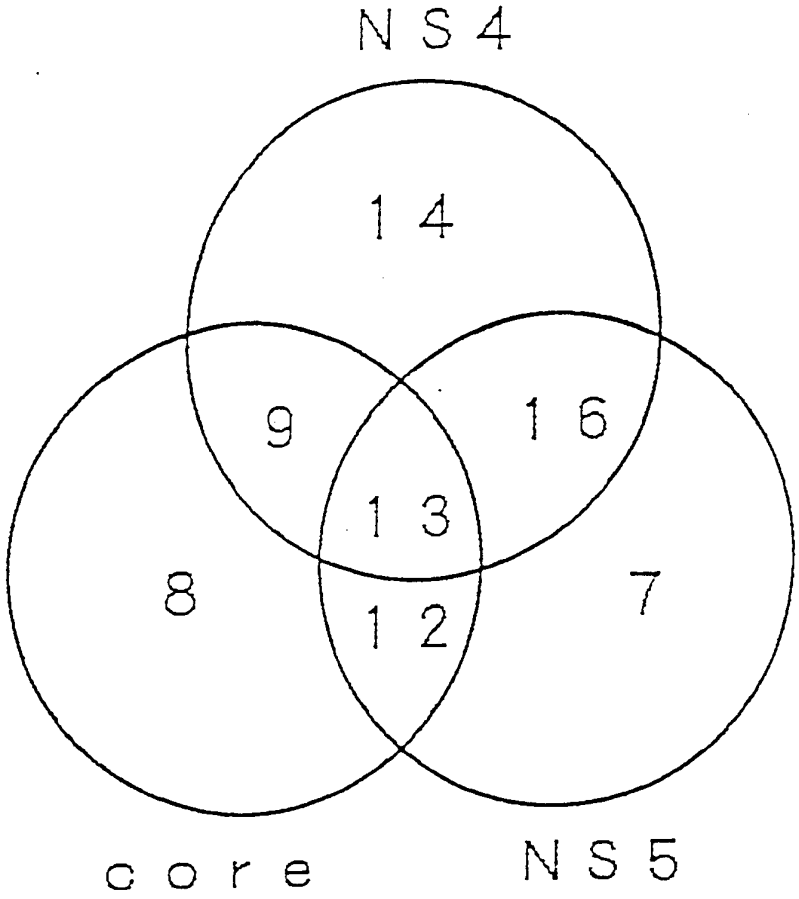


図21

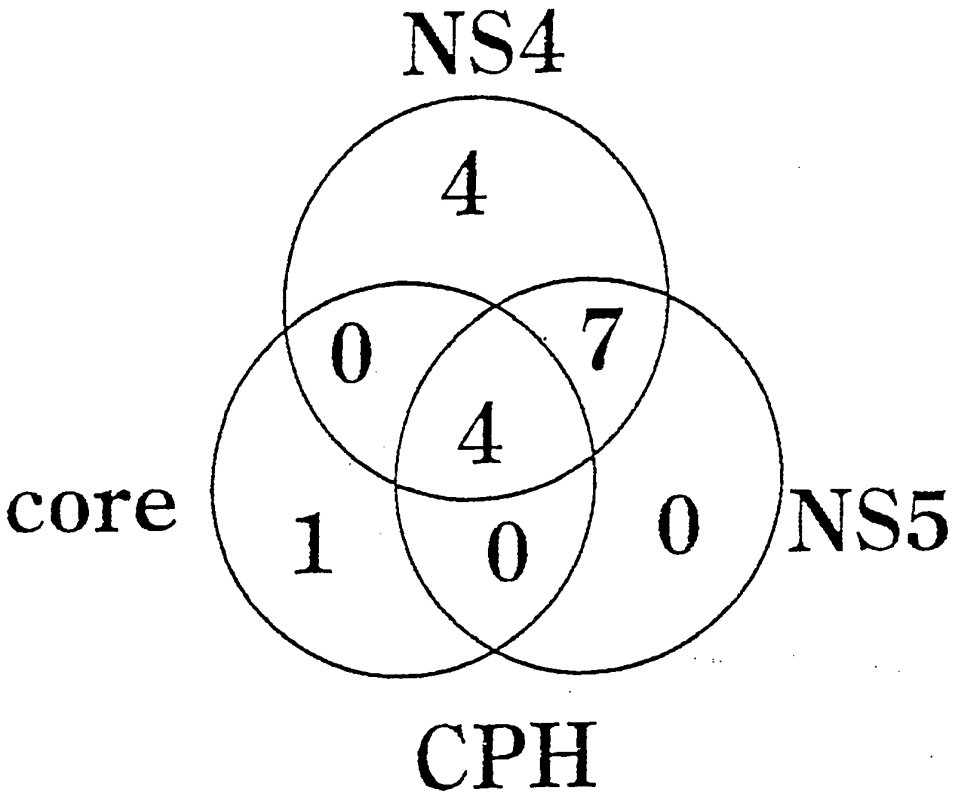


図22

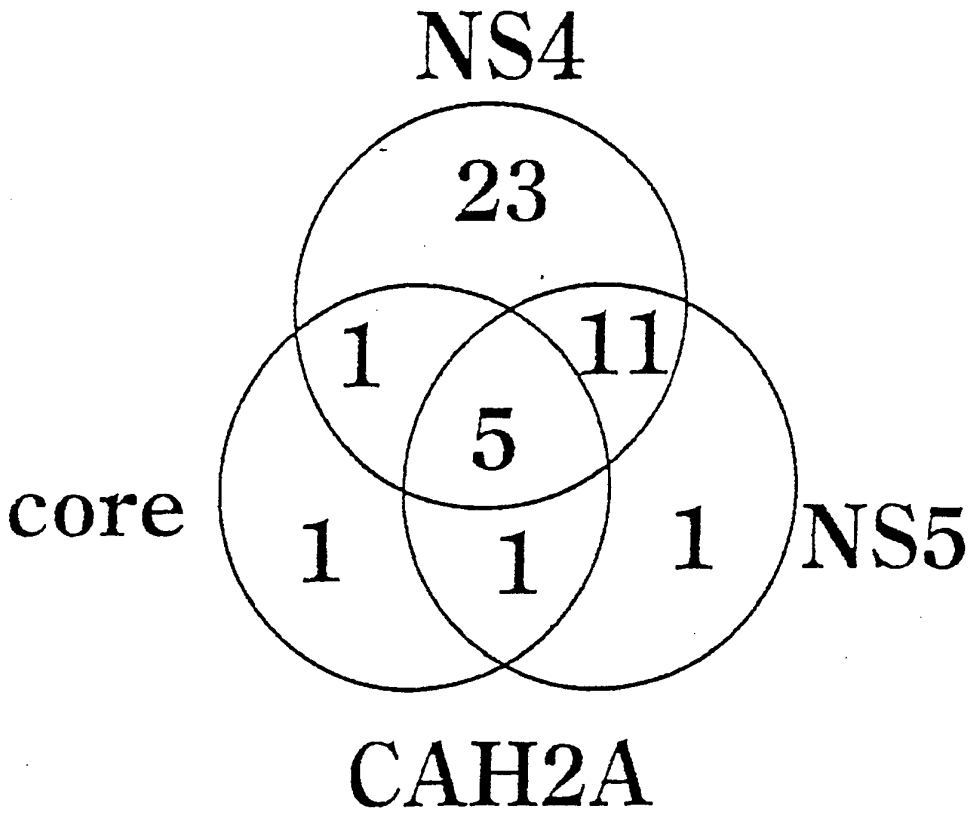


図23

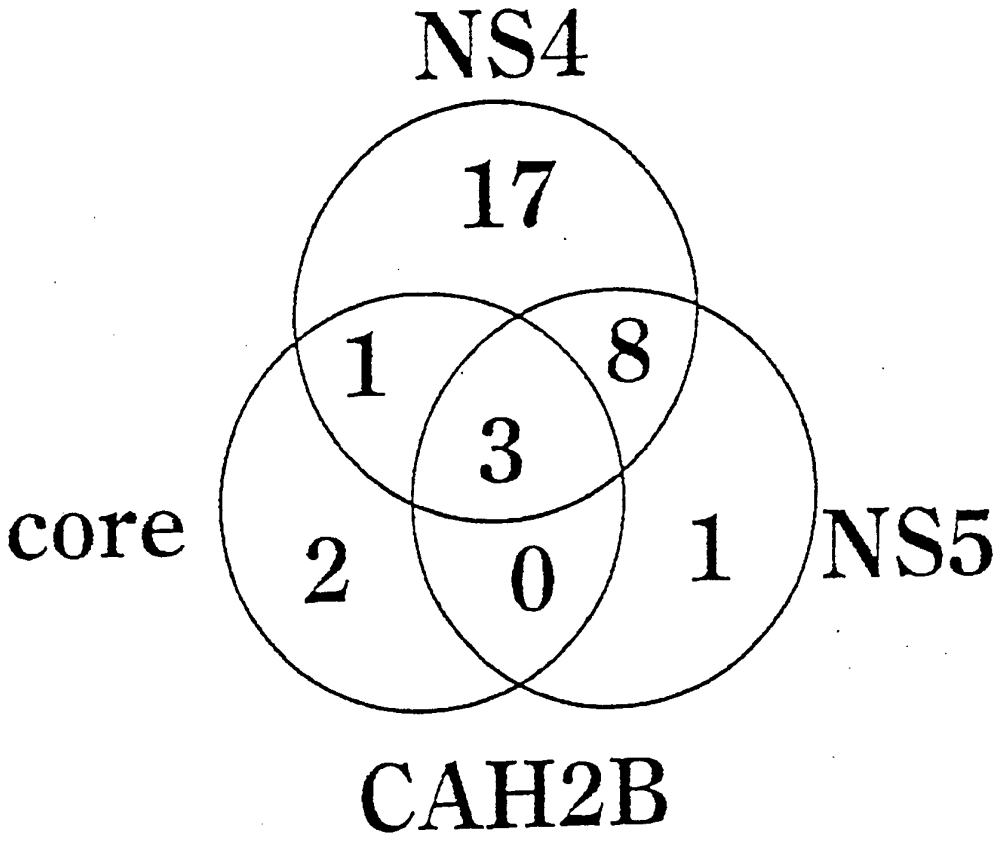


図２４　（表１）

[ckk-n5]

L	S	G	R	P	A	I	V	P	D	R	E	L	L	Y	Q	E	F	D	E
Leu	Ser	Gly	Arg	Pro	Ala	Ile	Val	Pro	Asp	Arg	Glu	Leu	Leu	Thr	Gln	Glu	Phe	Asp	Gln

[ckk-n51]

L	S	G	R	P	A	I	V	P	D
Leu	Ser	Gly	Arg	Pro	Ala	Ile	Val	Pro	Asp

[ckk-n52]

R	E	L	L	Y	Q	E	F	D	E
Arg	Glu	Leu	Leu	Thr	Gln	Glu	Phe	Asp	Gln

[ckk-n53]

A	I	V	P	D	R	E	L	L	Y
Ala	Ile	Val	Pro	Asp	Arg	Glu	Leu	Leu	Thr

[ckk-n54]

R	P	A	I	V	P	D	R	E	L	L	Y	Q	E
Arg	Pro	Ala	Ile	Val	Pro	Asp	Arg	Glu	Leu	Leu	Thr	Gln	Glu

[ckk-n55]

P	A	I	V	P	D	R	E	L	L	Y	Q
Pro	Ala	Ile	Val	Pro	Asp	Arg	Glu	Leu	Leu	Thr	Gln

図25　（表2）

[ckk-n6]

V	N	Q	R	A	V	V	A	P	D	K	E	V	L	Y	E	A	F	D	E
Val	Asn	Gln	Arg	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Asp	Lys	Glu	Val	Leu	Thr	GlU	Ala	Phe	Asp	Gln

[ckk-n61]

V	N	Q	R	A	V	V	A	P	D
Val	Asn	Gln	Arg	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Asp

[ckk-n62]

K	E	V	L	Y	E	A	F	D	E
Lys	Glu	Val	Leu	Thr	GlU	Ala	Phe	Asp	Gln

[ckk-n63]

V	V	A	P	D	K	E	V	L	Y
Val	Val	Ala	Pro	Asp	Lys	Glu	Val	Leu	Thr

[ckk-n64]

R	A	V	V	A	P	D	K	E	V	L	Y	E	A
Arg	Ala	Val	Val	Ala	Pro	Asp	Lys	Glu	Val	Leu	Thr	GlU	Ala

[ckkn65]

A	V	V	A	P	D	K	E	V	L	Y	E
Ala	Val	Val	Ala	Pro	Asp	Lys	Glu	Val	Leu	Thr	GlU

図２６　（表３）

NS5

[ckk-n3]

C	T	T	H	H	V	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L	L	W	R
Cys	Thr	Thr	HIs	His	Val	Ser	Pro	Asp	Ala	Asp	Leu	Ile	Gln	Ala	Asn	Leu	Leu	Trp	Arg

[ckk-n31]

C	T	T	H	H	V	S	P	D	A
Cys	Thr	Thr	HIs	His	Val	Ser	Pro	Asp	Ala

[ckk-n32]

D	L	I	E	A	N	L	L	W	R
Asp	Leu	Ile	Gln	Ala	Asn	Leu	Leu	Trp	Arg

[ckk-n33]

V	S	P	D	A	D	L	I	E	A
Val	Ser	Pro	Asp	Ala	Asp	Leu	Ile	Gln	Ala

[ckk-n34]

H	H	V	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N	L
HIs	His	Val	Ser	Pro	Asp	Ala	Asp	Leu	Ile	Gln	Ala	Asn	Leu

[ckk-n35]

H	V	S	P	D	A	D	L	I	E	A	N
His	Val	Ser	Pro	Asp	Ala	Asp	Leu	Ile	Gln	Ala	Asn

図２７　（表４）

[ckk-n4]

C	T	T	H	G	K	A	Y	D	V	D	M	V	D	A	N	L	F	M	G
Cys	Thr	Thr	His	Gly	Lys	Ala	Thr	Asp	Val	Asp	Met	Val	Asp	Ala	Asn	Leu	Phe	Met	Gly

[ckk-n41]

C	T	T	H	G	K	A	Y	D	V
Cys	Thr	Thr	His	Gly	Lys	Ala	Thr	Asp	Val

[ckk-n42]

D	M	V	D	A	N	L	F	M	G
Asp	Met	Val	Asp	Ala	Asn	Leu	Phe	Met	Gly

[ckk-n43]

K	A	Y	D	V	D	M	V	D	A
Lys	Ala	Thr	Asp	Val	Asp	Met	Val	Asp	Ala

[ckk-n44]

H	G	K	A	Y	D	V	D	M	V	D	A	N	L
His	Gly	Lys	Ala	Thr	Asp	Val	Asp	Met	Val	Asp	Ala	Asn	Leu

[ckk-n45]

G	K	A	Y	D	V	D	M	V	D	A	N
Gly	Lys	Ala	Thr	Asp	Val	Asp	Met	Val	Asp	Ala	Asn

図28　（表5）

NS4

[ckk-n1]

Q	E	F	D	E	M	E	E	C	A	S	H	L	P	Y	I	E	Q	G	M
Gln	Glu	Phe	Asp	Gln	Met	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Gly	Met

[ckk-n11]

Q	E	F	D	E	M	E	E	C	A
Gln	Glu	Phe	Asp	Gln	Met	Glu	Glu	Cys	Ala

[ckk-n12]

S	H	L	P	Y	I	E	Q	G	M
Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu	Gln	Gly	Met

[ckk-n13]

M	E	E	C	A	S	H	L	P	Y
Met	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	His	Leu	Pro	Tyr

[ckk-n14]

D	E	M	E	E	C	A	S	H	L	P	Y	I	E
Asp	Gln	Met	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Ile	Glu

[ckk-n15]

E	M	E	E	C	A	S	H	L	P	Y	I
Gln	Met	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	His	Leu	Pro	Tyr	Ile

図２９　（表６）

[ckk-n2]

E	A	F	D	E	M	E	E	C	A	S	R	A	A	L	I	E	E	G	Q
GlU	Ala	Phe	Asp	Gln	Met	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Ala	Ala	Tyr	Ile	Glu	Glu	Gly	Gln

[ckk-n21]

E	A	F	D	E	M	E	E	C	A
GlU	Ala	Phe	Asp	Gln	Met	Glu	Glu	Cys	Ala

[ckk-n22]

S	R	A	A	L	I	E	E	G	Q
Ser	Arg	Ala	Ala	Tyr	Ile	Glu	Glu	Gly	Gln

[ckk-n23]

M	E	E	C	A	S	R	A	A	L
Met	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Ala	Ala	Tyr

[ckk-n24]

D	E	M	E	E	C	A	S	R	A	A	L	I	E
Asp	Gln	Met	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Ala	Ala	Tyr	Ile	Glu

[ckk-n25]

E	M	E	E	C	A	S	R	A	A	L	I
Gln	Met	Glu	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Ala	Ala	Tyr	Ile

図30 （表7）

No.	ckk-n5	ckk-n6	PCR判定	NS4L2判定	
1	1.382	4.000	4	2	
2	1.715	4.000	3	2	
3	0.724	4.000	4	2	
4	0.577	4.000	3	2	
5	1.887	4.000	3	2	
6	1.888	3.501	2	2	*
7	0.852	3.469	4	2	
8	0.387	3.155	4	2	
9	0.373	2.423	3	2	
10	0.925	2.230	4	2	
11	0.767	2.104	3	2	
12	0.377	0.957	4	2	
13	0.288	0.776	4	2	
14	4.000	2.448	1	1	
15	4.000	2.298	2	1	
16	2.877	1.279	3	1	*
17	3.814	0.983	2	1	
18	4.000	0.813	2	1	
19	1.926	0.728	4	1	*
20	1.942	0.689	5	1	
21	1.958	0.483	2	1	
22	3.288	0.475	2	1	
23	3.700	0.462	2	1	
24	4.000	0.456	2	1	
25	4.000	0.430	2	1	
26	1.703	0.428	2	1	
27	0.986	0.416	2	1	
28	1.846	0.414	4	1	*
29	4.000	0.402	2	1	
30	3.990	0.396	2	1	
31	4.000	0.365	2	1	
32	2.217	0.350	2	1	
33	1.423	0.346	2	1	
34	4.000	0.340	2	1	
35	3.721	0.337	2	1	
36	3.235	0.333	2	1	
37	3.935	0.327	2	1	
38	4.000	0.326	2	1	
39	0.771	0.322	2	1	
40	1.757	0.317	2	1	
41	4.000	0.306	2	1	
42	4.000	0.266	2	1	
43	4.000	0.198	2	1	
44	2.825	0.169	2	1	
45	4.000	0.161	2	1	

図31 （表8）

No.	ckk-n3	ckk-n4	PCR判定	NS5判定
1	0.364	4.000	3	2
2	0.651	3.901	3	2
3	0.626	3.534	4	2
4	0.434	2.191	3	2
5	0.384	1.598	5	2
6	0.529	1.536	3	2
7	0.497	0.970	3	2
8	0.333	0.617	3	2
9	0.355	0.605	3	2
10	1.232	0.756	2	1
11	2.173	0.709	5	1
12	0.747	0.494	2	1
13	0.868	0.376	2	1
14	4.000	0.358	2	1
15	3.491	0.347	2	1
16	4.000	0.346	2	1
17	0.658	0.340	2	1
18	1.375	0.326	2	1
19	0.506	0.325	2	1
20	0.533	0.320	2	1
21	0.502	0.316	3	1
22	0.590	0.303	2	1
23	1.958	0.299	2	1
24	0.470	0.295	2	1
25	4.000	0.295	2	1
26	0.463	0.289	2	1
27	0.465	0.288	2	1
28	0.500	0.283	2	1
29	2.338	0.279	2	1
30	3.607	0.275	2	1
31	4.000	0.261	2	1
32	0.471	0.258	3	1
33	0.598	0.258	2	1
34	1.039	0.256	2	1
35	4.000	0.254	2	1
36	1.279	0.249	2	1
37	0.416	0.248	4	1
38	0.408	0.248	4	1
39	1.003	0.247	2	1
40	2.935	0.244	2	1
41	4.000	0.241	2	1
42	1.274	0.239	2	1
43	1.930	0.236	2	1
44	1.671	0.227	1	1
45	4.000	0.219	2	1
46	4.000	0.218	2	1
47	3.963	0.215	2	1
48	4.000	0.202	2	1

図32 （表9）

No.	ckk-n1	ckk-n2	PCR判定	NS4L3判定
1	0.413	0.797	4	2
2	0.247	0.683	3	2
3	1.091	0.205	1	1
4	0.643	0.208	2	1
5	2.577	0.219	1	1
6	2.453	0.341	2	1
7	0.506	0.257	2	1
8	0.711	0.218	2	1
9	0.514	0.270	2	1
10	0.488	0.254	2	1
11	2.388	0.235	2	1
12	1.318	0.199	2	1
13	0.543	0.265	2	1
14	0.664	0.216	2	1
15	0.776	0.225	5	1
16	4.000	0.189	2	1
17	0.750	0.209	2	1
18	4.000	0.274	2	1
19	3.526	0.291	2	1
20	2.997	0.222	2	1
21	3.514	0.334	2	1
22	1.310	0.248	2	1
23	0.329	0.215	2	1
24	0.469	0.229	4	1
25	1.959	0.359	2	1
26	4.000	0.276	2	1
27	0.610	0.286	2	1
28	4.000	0.239	2	1

図33 (表10)

No.	ckk-c1	ckk-c2	PCR 判定	core 判定
1	2.196	4.000	3	2
2	1.644	3.657	3	2
3	0.535	3.505	4	2
4	0.786	3.374	4	2
5	0.456	3.085	3	2
6	0.421	2.916	3	2
7	0.567	2.679	4	2
8	0.801	2.292	4	2
9	0.963	1.768	4	2
10	1.034	1.739	4	2
11	0.511	1.518	4	2
12	0.694	1.503	4	2
13	0.958	1.496	3	2
14	0.874	1.411	2	2
15	0.447	1.089	3	2
16	0.567	1.024	3	2
17	0.643	0.994	3	2
18	0.386	0.866	3	2
19	0.409	0.775	4	2
20	0.379	0.573	5	2
21	3.825	1.626	2	1
22	4.000	1.373	2	1
23	4.000	1.187	2	1
24	4.000	1.174	5	1
25	4.000	1.167	2	1
26	1.562	0.954	2	1
27	1.818	0.813	2	1
28	2.191	0.708	2	1
29	1.860	0.702	2	1
30	3.669	0.684	2	1
31	4.000	0.626	2	1
32	4.000	0.608	2	1
33	1.758	0.546	2	1
34	1.777	0.543	2	1
35	4.000	0.516	2	1
36	2.591	0.448	2	1
37	3.735	0.440	2	1
38	0.677	0.439	2	1
39	1.249	0.435	5	1
40	0.891	0.389	2	1
41	1.657	0.362	5	1
42	0.456	0.295	2	1

図34 （表11）

HCV 症例	N	NS4(40) 判定数	NS4(20) 判定数
CAH	83	69	52
CPH	17	15	13

図35 （表12）

	HCV TYPE					
CH2A	N=48	SUBTYPE			IFN	
TYPE		2	3	4	N	P	C
1		26/31	4/31	1/31	19/31	3/31	9/31
2		4/12	8/12	0/12	2/12	4/12	6/12
1+2		0	0	0			
−		3/5	1/5	1/5	3/5	0/5	2/5

	HCV TYPE					
CH2B	N=36	SUBTYPE			IFN	
TYPE		2	3	4	N	P	C
1		24/24	0/24	0/24	19/24	4/24	1/24
2		0/7	7/7	0/7	1/7	1/7	5/7
1+2		0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
−		3/4	1/4	0/4	2/4	1/4	1/4

	HCV TYPE					
CPH	N=17	SUBTYPE			IFN	
TYPE		2	3	4	N	P	C
1		11/11	0/11	0/11	6/11	0/11	5/11
2		1/4	3/4	0/4	1/4	0/4	3/4
1+2		1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1
−		0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1

図３６　（表１３）

抗原領域別判定数

	NS4	NS5	core	N
CH2A	40	18	8	48
CH2B	29	12	6	36
CPH	15	11	5	17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/01823

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^6 C07K7/00, G01N33/576

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)

Int. Cl^6 C07K7/00, G01N33/576

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 practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, A, 93-18054 (N. V. INNOGENETICS S.A.), September 16, 1993 (16. 09. 93)	1-18
Y	WO, A, 93-10239 (COMMON SERVICES AGENCY), May 27, 1993 (27. 05. 93)	1-18
Y	WO, A, 93-00365 (CHIRON CORPORATION), January 7, 1993 (07. 01. 93)	1-18
Y	JP, A, 5-176773 (Immuno Japan K.K.), July 20, 1993 (20. 07. 93), (Family: none)	1-18
Y	J. C in Microbiol., Vol. 31. No. 6, June 30, 1993 (30. 06. 93) P. BIMMONDS, No. 1493-1503 P	1-18
Y	WO, A, 92-19743 (CHIRON CORPORATION), November 12, 1992 (12. 11. 92) & EP, A1, 554624 & CA, A, 2086162	1-18

☐ 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 document 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	Date of mailing of the international search report
January 10, 1995 (10. 01. 95)	January 31, 1995 (31. 01. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 94/01823

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cℓ[6] C07K7/00, G01N33/576

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[6] C07K7/00, G01N33/576

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

国際調査で使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）

CAS ONLINE

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	関連する請求の範囲の番号
Y	WO, A, 93-18054 (N. V. INNOGENETICS S. A.) 16. 9月. 1993 (16. 09. 93)	1-18
Y	WO, A, 93-10239 (COMMON SERVICES AGENCY) 27. 5月. 1993 (27. 05. 93)	1-18
Y	WO, A, 93-00365 (CHIRON CORPORATION) 7. 1月. 1993 (07. 01. 93)	1-18

☑ 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。

* 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」先行文献ではあるが、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
10. 01. 95

国際調査報告の発送日
31.01.95

名称及びあて先
日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）
今村 玲英子 印
4H 9279

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

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	関連する請求の範囲の番号
Y	JP, A, 5-176773（株式会社　イムノジャパン），20. 7月. 1993（20. 07. 93）（ファミリーなし）	1-18
Y	J. Clin. Microbiol., Vol. 31, No. 6, 30. 6月. 1993（30. 06. 93）, P. BIMMONDS,　第1493-1503頁	1-18
Y	WO, A, 92-19743（CHIRON CORPORATION），12. 11月. 1992（12. 11. 92）&EP, A1, 554624&CA, A, 2086162	1-18