

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4427182号  
(P4427182)

(45) 発行日 平成22年3月3日(2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日(2009.12.18)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/576 (2006.01)

GO 1 N 33/576 Z

GO 1 N 33/531 (2006.01)

GO 1 N 33/531 B

請求項の数 36 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2000-513148 (P2000-513148)  
 (86) (22) 出願日 平成10年9月22日(1998.9.22)  
 (65) 公表番号 特表2001-517799 (P2001-517799A)  
 (43) 公表日 平成13年10月9日(2001.10.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/019694  
 (87) 国際公開番号 WO1999/015901  
 (87) 国際公開日 平成11年4月1日(1999.4.1)  
 審査請求日 平成17年6月22日(2005.6.22)  
 (31) 優先権主張番号 60/059,703  
 (32) 優先日 平成9年9月22日(1997.9.22)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 591076811  
 ノバルティス バクシンズ アンド ダイ  
 アグノスティックス、インコーポレーテッ  
 ド  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 946  
 08, エミリービル, ホートン ストリ  
 ト 4560  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (72) 発明者 チェン, デイビッド ワイ.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945  
 07, アラモ, ダグラス コート 1  
 121

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原を安定化するための緩衝液

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C 型肝炎 (H C V) 抗原、還元剤およびカオトロピック剤を含む、抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 2】

前記還元剤がジチオスレイトール、チオグリセロールおよびメルカプトエタノールからなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 3】

前記還元剤がジチオスレイトール (D T T) である、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 4】

D T T の濃度が約 1 m M から約 2 0 0 m M である、請求項 3 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 5】

D T T の濃度が約 5 m M から約 1 0 0 m M である、請求項 3 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 6】

D T T の濃度が約 1 0 m M である、請求項 3 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 7】

さらに緩衝剤を含む、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 8】

前記緩衝剤がリン酸ナトリウムまたはホウ酸ナトリウムからなる群から選択される、請求項 7 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 9】

前記緩衝剤がリン酸ナトリウムである、請求項 8 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 10】

リン酸ナトリウム (pH 6.5) の濃度が約 15 mM から約 100 mM である、請求項 9 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 11】

さらに界面活性剤を含む、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

10

## 【請求項 12】

前記界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および Tween-20 (登録商標) からなる群より選択される、請求項 11 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 13】

前記界面活性剤が SDS である、請求項 12 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 14】

SDS の濃度が約 0.01 % から約 0.5 % である、請求項 13 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 15】

さらに抗細菌剤を含む、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

20

## 【請求項 16】

前記抗細菌剤がアジ化ナトリウムである、請求項 15 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 17】

前記アジ化ナトリウムの濃度が約 0.01 % から約 0.3 % である、請求項 16 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 18】

さらにキレート剤を含む、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 19】

前記キレート剤がエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) である、請求項 18 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

30

## 【請求項 20】

EDTA の濃度が約 1 mM から約 10 mM である、請求項 19 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 21】

さらに非特異的結合のブロッキング剤を含む、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 22】

前記非特異的結合のブロッキング剤がゼラチンおよびウシ血清アルブミンからなる群から選択される、請求項 21 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

40

## 【請求項 23】

前記非特異的結合のブロッキング剤がゼラチンである、請求項 22 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 24】

ゼラチンの濃度が 0.05 % から約 1.0 % である、請求項 23 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 25】

前記カオトロピック剤がチオシアン酸ナトリウムおよびチオシアン酸アンモニウムからなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

## 【請求項 26】

50

前記カオトロピック剤がチオシアン酸アンモニウムである、請求項 25 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 27】

前記チオシアン酸アンモニウムの濃度が約 10 mM から約 500 mM である、請求項 26 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 28】

さらに緩衝剤、キレート剤、非特異的結合のブロッキング剤、カオトロピック剤、抗細菌剤および界面活性剤を含む、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 29】

前記緩衝剤がリン酸ナトリウムであり、前記キレート剤が EDTA であり、前記非特異的結合のブロッキング剤がゼラチンであり、前記カオトロピック剤がチオシアン酸ナトリウムであり、前記抗細菌剤がアジ化ナトリウムであり、そして前記界面活性剤が SDS である、請求項 28 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

10

【請求項 30】

25 mM リン酸ナトリウム (pH 6.5)、5 mM EDTA、10 mM DTT、0.2% ゼラチン、100 mM チオシアン酸アンモニウム、0.09% アジ化ナトリウムおよび 0.1% SDS を含む、請求項 29 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

【請求項 31】

50 mM リン酸ナトリウム、5 mM EDTA、100 mM チオシアン酸アンモニウム、0.06% SDS、0.25% 魚ゼラチンおよび 10 mM DTT を含む、請求項 29 に記載の抗原希釈剤または緩衝液。

20

【請求項 32】

HCV 抗体の検出のための改良されたイムノアッセイキットであって、この改良は、C 型肝炎 (HCV) 抗原、還元剤およびカオトロピック剤を含む、HCV 抗原のための抗原希釈剤または緩衝液を含む、改良されたイムノアッセイキット。

【請求項 33】

前記還元剤がジチオスレイトール、チオグリセロールおよびメルカプトエタノールからなる群から選択される、請求項 32 に記載の改良されたイムノアッセイキット。

【請求項 34】

前記還元剤がジチオスレイトールである、請求項 32 に記載の改良されたイムノアッセイキット。

30

【請求項 35】

C 型肝炎ウイルス抗原に対して指向された抗体の検出のための改良されたアッセイであって、この改良は、請求項 1 に記載の抗原希釈剤または緩衝液を含む、改良されたアッセイ。

【請求項 36】

少なくとも 1 個の HCV 抗原、ならびに還元剤およびカオトロピック剤を含む抗原希釈剤または緩衝液を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

本願は、出願番号 60/059、703 号に対して米国特許法 119 条に基づく優先権を主張し、これによって、その全体が参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、一般にイムノアッセイの分野に、具体的には、抗 HCV イムノアッセイにおける使用のための、抗原、特に C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗原を安定化する緩衝液に関する。

【0003】

(発明の背景)

一般に、イムノアッセイは、ウイルスに特に関連するエピトープを最初に決定し、次いで

50

、どのエピトープが、開発されるアッセイに好ましいかを決定することによって行われる。特定のエピトープが単離された場合、これらの配列は、決定され、そして、エピトープ調製のための遺伝的物質が生成される。化学的または生物学的手段のいずれかによりタンパク質を生成する方法は、既知であり、例えば、特定のエピトープに対して抗体の存在を検出するために使用されるアッセイである。高度に選択性および感受性のイムノアッセイは、一般に患者に感染している疑いのある病原体の主要な免疫優性エピトープを含む。

#### 【0004】

ウイルス、HCVについて、主要な免疫優性の線状エピトープは、ウイルスポリタンパク質のコア、NS（非構造的）3、NS4およびNS5領域から同定されている。HCVコアタンパク質および推定のマトリックスタンパク質は、HCVに対する抗体を含むヒト血清サンプルに対してアッセイされ、そしてHCVタンパク質内のいくつかの免疫優性な領域が規定されている。Sallbergら、J. Clin. Microbiol.、1992、30：1989-1994（これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。ドメインC、E1、E2/NS1、NS2、NS3、NS4およびNS5を含むHCV-1ポリタンパク質のタンパク質ドメインが同定され、そしてこれらのおおよその境界は、WO93/00365（本明細書中でその全体が参考として援用される）において提供される。さらに、HCVの構造的領域由来の配列を有する個々のポリペプチドは、HCV患者の血清の試験において有用な免疫優性エピトープを得るために設計されている。Kotwalら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1992、89、4486-4489（これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）。10

#### 【0005】

HCV抗体検出のための現在えり抜きのアッセイは、手動アッセイであるOrtho 3.0 ELISAである。ELISAにおける使用のためにカイロン（Chiron）が製造した組換えHCV抗原は、c200（ns-3、c100）、c22およびNS-5である。このc33cおよびc22抗原は、非常に免疫原性である。c33cおよびc22に対する抗体はまた、初期のセロコンバージョンパネルにおいて見出される。HCV抗体の有病率は、58%～95%まで異なり、最も高い検出率はc33cポリペプチドについて得られ、次いでc22ポリペプチドについてである。Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1992、89、10011-10015（これは、本明細書中でその全体を参考として援用される）。しかし、液相においてHCV抗原を安定化30  
する問題に遭遇している。液相におけるHCV抗原の安定性の欠如は、現在のHCV抗体検出アッセイの主要な欠点である。従って、抗HCVイムノアッセイのための抗原緩衝液を開発することは、Ortho 3.0 ELISAと同じ抗原を利用して試みられており、ここでこの緩衝液は、HCV抗原を安定化する。さらに、既存の自動化された機械（例えば、ACS：Centaur）に試薬、緩衝液およびプロトコルを適応させることが試みられている。従って、現在、抗HCVイムノアッセイにおける使用のために液相でHCV抗原の安定性を改良する必要がある。このような改良されたアッセイ試薬および方法は、血液供給物および他の生物学的液体のスクリーニングにおいてHCV抗体のより良い検出を提供する。この緩衝液が、液相で不安定であり得る他の抗原（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）抗原）のために使用され得ることを意図する。40

#### 【0006】

（発明の要旨）

1つの局面において、本発明は、液相における抗原、特にHCV組換え抗原を安定化し得る、還元剤を含む、抗原希釈剤または緩衝液に関する。

#### 【0007】

別の局面において、本発明は、還元剤を含む抗原希釈剤または緩衝液を使用したイムノアッセイに関する。

#### 【0008】

別の局面において、改良されたイムノアッセイキットが提供され、この改良は、還元剤を含む、HCV抗原のための抗原希釈剤または緩衝液の使用を含む。50

## 【0009】

(発明の詳細な説明)

本発明の実施は、他に示されなければ、当該技術分野の範囲内のウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学および組換えDNA技術の従来の方法を使用する。このような技術は、文献で十分に説明される。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、1989); DNA Cloning: A Practical Approach、IおよびII巻(D. Glover編); Methods in Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan編、Academic Press、Inc.); Handbook of Experimental Immunology、I-IV巻(D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、Blackwell Scientific Publications); およびFundamental Virology、第2版、IおよびII巻(B. N. FieldおよびD. M. Knipe編)を参照のこと。

10

## 【0010】

時間に関する試薬安定性は、重要な問題である。緩衝液で希釈され、同じ日に試験されたc33c抗原は、下記のMagic Liteアッセイプロトコルを使用すると機能的であった。しかし、37℃でストレスをかけた場合、この試薬は、初期のセロコンバージョンパネルに対して50%を超える免疫反応性を失う。液相におけるc33cは、ゆっくりと「凝集」し得、または不溶と成り得る。既知の成分(例えば、糖、ゼラチン、グリセロール、架橋試薬および抗酸化剤)は、c33c免疫反応性を安定化するために試用された。還元形態でc33c抗原を保持することは、24時間以上、さらに少なくとも7日までの期間、37℃で初期のc33cセロコンバージョンパネルについて免疫活性を維持し得る(Ortho 3.0 ELISAの性能に匹敵する)ことを発見した。この還元剤は、c33c分子内のシステイン基間のジスルフィド結合を還元し、おそらくc33c免疫反応性および溶解度を改良している。c33cのための抗原希釈剤の出現の前には、液相において従来のライト(Lite)試薬では37℃でこのような長期抗原安定性を示すものはなかった。同様の実験は、以下に示すようにc200および多くのエピトープ融合抗原(MEFA-6)について行われた。従って、本発明は、抗HCVイムノアッセイにおける使用に関して、HCV抗原を安定化するための抗原希釈剤または緩衝液を提供する。本発明の抗原希釈剤または緩衝液は、例えば、ELISAおよびCLIAのようなイムノアッセイにおいて使用され得る。

20

30

## 【0011】

本発明は、液相においてHCV抗原の改良された安定性を提供する抗原希釈剤または緩衝液に関する。本明細書に使用されているように、「抗原希釈剤または緩衝液」とは、抗原が含まれる溶液をいう;それは、緩衝能力を有してもよいし、有さなくてもよい。特に、本発明は、Ortho 3.0 ELISAなどにおける、組換えHCV抗原に関して改良された安定性のための抗原希釈剤または緩衝液に関する。本発明は、例えば、抗原希釈剤または緩衝液に対して、ジチオスレイトール(DTT)のような還元剤を添加することによって達成された。

40

## 【0012】

本発明の好ましい実施態様において、HCV抗原希釈剤または緩衝液は、還元剤を含む。本発明の別の好ましい実施態様において、HCV抗原希釈剤または緩衝液は、リン酸ナトリウム(pH 6.5)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、DTT、ゼラチン、チオシアン酸アンモニウム、アジ化ナトリウムおよびSDSを含む。しかし、これらの個々の試薬は、本質的に同じ機能を果たす同様の試薬によって置換され得る。例えば、DTTは、さらなる還元剤(例えば、チオグリセロール、メルカプトエタノールなど)と置換され得る。リン酸ナトリウムは、ホウ酸ナトリウムおよび他の緩衝液によって置換され得る。ゼラチンは、BSAおよび他の非特異的結合のブロッキング剤で置換され得る。チオシアン酸ナトリウムは、チオシアン酸アンモニウムおよび他のカオトロピック剤と置換され得

50

る。S D S は、多くの界面活性剤（例えば、T w e e n - 2 0、および他の界面活性剤など）によって置換され得る。アジ化ナトリウムは、他の抗細菌剤によって置換され得る。さらに、E D T A は、エチレングリコール - ビス（ - アミノエチルエーテル） - N , N , N ' , N ' - 四酢酸（E G T A）および他のキレート剤によって置換され得る。当業者は、本発明の試薬の代わりとなり得る試薬に精通している。

#### 【 0 0 1 3 】

本発明の好ましい実施態様において、H C V 抗原希釈剤は、約 1 5 m M ~ 約 1 0 0 m M のリン酸ナトリウム（p H 6 . 5）を含む。さらに好ましくは、この希釈剤は、約 2 0 m M ~ 約 7 5 m M のリン酸ナトリウム（p H . 6 . 5）を含む。最も好ましくは、この希釈剤は、2 4 または 2 5 m M のリン酸ナトリウム（p H 6 . 5）を含む。

10

#### 【 0 0 1 4 】

本発明の別の好ましい実施態様において、H C V 抗原希釈剤は、約 1 m M ~ 約 1 0 m M の E D T A を含む。より好ましくは、この希釈剤は、約 3 m M ~ 約 7 m M の E D T A を含む。最も好ましくは、この希釈剤は、5 m M E D T A を含む。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明の別の好ましい実施態様において、H C V 抗原希釈剤は、約 1 m M ~ 約 2 0 0 m M の D T T を含む。より好ましくは、この希釈剤は、約 5 m M ~ 約 1 0 0 m M の D T T を含む。最も好ましくは、この希釈剤は、1 0 m M の D T T を含む。

#### 【 0 0 1 6 】

本発明の別の好ましい実施態様において、H C V 抗原希釈剤は、約 0 . 0 5 % ~ 約 1 % のゼラチンを含む。さらに好ましくは、この希釈剤は、約 0 . 1 % ~ 約 0 . 5 % のゼラチンを含む。最も好ましくは、この希釈剤は、0 . 2 % のゼラチンを含む。

20

#### 【 0 0 1 7 】

本発明の別の好ましい実施態様において、H C V 抗原希釈剤は、約 1 0 m M から約 5 0 0 m M のチオシアン酸アンモニウムを含む。さらに好ましくは、この希釈剤は、約 5 0 m M ~ 約 2 0 0 m M のチオシアン酸アンモニウムを含む。最も好ましくは、この希釈剤は、1 0 0 m M のチオシアン酸アンモニウムを含む。

#### 【 0 0 1 8 】

本発明の別の好ましい実施態様において、H C V 抗原希釈剤は、約 0 . 0 1 % ~ 約 0 . 3 % のアジ化ナトリウムを含む。より好ましくは、この希釈剤は、約 0 . 0 5 % ~ 約 0 . 2 % のアジ化ナトリウムを含む。最も好ましくは、この希釈剤は、0 . 0 9 % のアジ化ナトリウムを含む。

30

#### 【 0 0 1 9 】

本発明の別の好ましい実施態様において、H C V 抗原希釈剤は、約 0 . 0 1 % ~ 約 0 . 5 % の S D S を含む。より好ましくは、この希釈剤は、約 0 . 0 5 % ~ 約 0 . 2 % の S D S を含む。最も好ましくは、この希釈剤は、0 . 1 % の S D S を含む。

#### 【 0 0 2 0 】

本発明の別の好ましい実施態様において、手動アッセイのための H C V 抗原希釈剤は、2 5 m M リン酸ナトリウム（p H 6 . 5）、5 m M E D T A、1 0 m M D T T、0 . 2 % ゼラチン、1 0 0 m M チオシアン酸アンモニウム、0 . 0 9 % アジ化ナトリウムおよび 0 . 1 % S D S を含む。

40

#### 【 0 0 2 1 】

自動化されたアッセイに関しては、c 3 3 c のための好ましい抗原緩衝液は、5 0 m M リン酸塩、5 m M E D T A、1 0 0 m M チオシアン酸アンモニウム、0 . 0 6 % S D S、0 . 2 5 % 魚ゼラチンおよび 1 0 m M D T T を含む。

#### 【 0 0 2 2 】

表 1 は、好ましい H C V 緩衝液を示す。

#### 【 0 0 2 3 】

#### 【 表 1 】

表 1: HCV 抗原のための・HCV 抗原緩衝液

種 類	濃 度	供 給 源	製品番号	ロット番号
リン酸 1 ナトリウム	25 mM	JT Baker	3818-05	A45101
アジ化ナトリウム	0.09%	Fisher Biotech	BP922-500	953331
EDTA	5 mM	Fisher Chemical	S311-100	953493
チオシアン酸ナトリウム	100 mM	Sigma	S-7757	96HO543
Tween-20	0.10%	Sigma	P-1379	56HO876
ゼラチン(魚)	0.20%	Sigma	G-7765	45H1157
DTT	10 mM	Sigma	D-5545	26HO3801

【 0 0 2 4 】

本発明の H C V 抗原希釈剤または緩衝液は、周知の媒体調製技術によって調製され得る。  
本発明の H C V 抗原希釈剤の調製の好ましい実施態様は、表 2 に示される。

【 0 0 2 5 】

【表 2】

表 2 : 希釈剤調整のためのプロセス

プロセス工程	量
1. 95%のバッチ量の P-30 水を加える	
2. リン酸 1 ナトリウムを加える	3.45 g/L
3. アジ化ナトリウムを加える	0.9 g/L
4. EDTA を加える	1.86 g/L
5. チオシアン酸ナトリウムを加える	8.1 g/L
6. 溶液の pH を 6.5 ± 0.1 にし、攪拌する	
7. Tween-20 を加える	1 ml/L
8. ゼラチンを加える	2 ml/L
9. DTT を加える	1.54 g/L
10. 溶解するまで溶液を攪拌する	
11. 1.22 μm Millipak フィルターユニットを通してろ過する。	
12. 暗所にて 4℃で貯蔵する。	

【 0 0 2 6 】

本発明の H C V 抗原希釈剤または緩衝液は、手動および自動化されたアッセイにおいて使用され得る。本発明の抗原希釈剤または緩衝液は、多くの H C V 抗原 (c33c、MEF A-6、c22p、c100p、NS-5 および c200 を含むが、これらに限定されない) で使用され得る。これらの H C V 抗原は、当該分野で慣用的に使用される組換え手順によって調製され得る。

【 0 0 2 7 】

H C V c 3 3 c ( N S 3 ) および c 1 0 0 ( N S 4 ) 領域配列は、免疫優性コアからのエ  
 ピトープを含み、そしてChienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
 、1992、89、10011-10015に記載されるように調製された。c 2 0 0 抗  
 原は、c 3 3 c および c 1 0 0 抗原からなる融合タンパク質である。c 2 2 ( 1 1 9 アミ  
 ノ酸) および NS 5 ( 9 4 2 アミノ酸) 抗原は、c 1 0 0 - 3 ( 3 6 3 アミノ酸) 抗原の  
 生成について以前記載された方法を使用して、ヒトスーパーオキシドディスムターゼ ( S  
 O D ) との C 末端融合物として、酵母 *S. cerevisiae* 内の内部抗原として発現  
 された。Kuoら、Science、1989、244、362-364 (これは、本明  
 細書中でその全体が参考として援用される) ; および Cousenら、Gene、198  
 7、61、265-275 (これは、本明細書中で全体が参考として援用される)。c 3  
 3 c 抗原 ( 3 6 3 アミノ酸) は、5 - 1 - 1 抗原の合成について記載された方法によつて  
 E. coli 中で内部 S O D 融合ポリペプチドとして発現された。Chooら、Scie  
 nce、1989、244、359-362 (これは、本明細書中でその全体が参考とし  
 て援用される)。組換え H C V 抗原は、Chienら、Proc. Natl. Acad.  
 Sci. USA、1989、89、10011-10015に記載されるように精製され  
 た。本発明において、全 H C V 抗原は、S O D 融合タンパク質として調製された。しかし  
 、他の適切な融合タンパク質は、融合パートナーを認識する適切な抗体の利用可能性に依  
 存して作製され得る。

10

#### 【 0 0 2 8 】

M E F A - 6 は、C 型肝炎ポリタンパク質のコア、エンベロープ、NS 3、NS 4 および  
 NS 5 領域からのエピトープを含み、これらは、H C V 株 1、2、および 3 からの等価な  
 抗原決定基を含む。H C V エピトープについてコードする様々な DNA セグメントは、P  
 C R 増幅によって、または合成オリゴヌクレオチドによって構築された。以下の表 3 は、  
 M E F A - 6 カセットにおける各エピトープのアミノ酸セグメント、様々なエピトープの  
 線状配置およびコピー数を記載する。M E F A - 6 カセットは、本明細書中でその全体が  
 参考として援用される 1997 年 5 月 23 日に出願された出願、P C T U S 97/08  
 950 に記載されるように調製された。

20

#### 【 0 0 2 9 】

表 3 に示したように、M E F A - 6 抗原は、以下を含む：コアおよび NS 5 領域からの多  
 コピーの H C V エピトープ；NS 4 5 - 1 - 1 領域からの異なった血清型エピトープ；  
 c 1 0 0 の C 末端領域、E 1 および E 2 領域、ならびに H C V NS 3 ( c 3 3 c ) 領域  
 からの単一コピーの主要な線状エピトープ。M E F A - 6 についての一般的構造式は、h  
 S O D - - E 1 - E 2 - c 3 3 c - 5 - 1 - 1 ( タイプ 1 ) - 5 - 1 - 1 ( タイプ 3 ) -  
 5 - 1 - 1 ( タイプ 2 ) - c 1 0 0 - NS 5 ( 2 コピー ) - コア ( 2 コピー ) である。こ  
 の抗原は、酵母において大変高い発現レベルを有し、高度に均一になるまで精製され、そ  
 して下記のイムノアッセイにおいて高い感度および高い選択性を示す。M E F A - 6 は、  
 1997 年 5 月 20 日に出願された出願第 08/859,524 号 ( その全体が参考とし  
 て本明細書中で援用される ) に記載されるように調製された。

30

#### 【 0 0 3 0 】

#### 【 表 3 】

40



表 3: HCVゲノム内のMEFA-6抗原エピト-7°  
およびそれらの位置

MEFA aa#	5'末端部位	エピト-7°	HCV aa#	株
1-154	<i>NcoI</i>	hSOD		
159-176	<i>EcoRI</i>	E1	303-320	1
179-217	<i>HindIII</i>	E2	405-444	1
218-484	<i>DraIII</i>	c33c	1192-1457	1
487-533	<i>SphI</i>	5-1-1	1689-1735	1
536-582	<i>NruI</i>	5-1-1	1689-1735	3
585-631	<i>ClaI</i>	5-1-1	1689-1735	2
634-673	<i>AvaI</i>	c100	1901-1940	1
676-711	<i>XbaI</i>	NS5	2278-2313	1
714-749	<i>BglIII</i>	NS5	2278-2313	1
750-793	<i>NcoI</i>	core	10-53	1
796-839	<i>SacI</i>	core	10-53	1

#### 【0031】

検出可能なマーカーとしては、発色団、抗体、抗原、酵素、切断産物が検出可能な酵素反応性化合物、ローダミンまたはローダミン誘導体、ビオチン、ストレプトアビジン、蛍光化合物、化学発光化合物、これらのマーカーの誘導体および/または組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。本実施例では、化学発光化合物であるジメチルアクリジニウムエステル (DMAE、Ciba Corning Diagnostics Corp.) が使用された。任意のマーカーでの標識化がMEFA-6または他のエピト-7°の最適な検出および抗原性を得るための条件下で行われる。DMAEが、アッセイにおいて検出マーカーである場合、生じるHCV r-Ag-DMAE結合物は、トレーサーであり、DMAEは、NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と反応させたときに、発光によって検出可能である。

#### 【0032】

ポリペプチド、抗体または合成ペプチド抗原は、DMAEに共有結合した反応性部分とアミノ酸側鎖 (例えば、リジン側鎖またはシステインチオール) との反応によってDMAEで標識された (1995年10月19日に公開された、Ciba Corning Diagnostics CorpのWO 95/27702 (これは、本明細書中でその全体が参考として援用される) を参照のこと。例えば、本明細書中で記載されたHCV抗原は、Ciba Corningから得られたNSP-DMAE-NHS (2', 6'-ジメチル-4'-(N-サクシンイミジルオキシカルボニル)フェニル-10-(3'-スルホプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキシレート) とリジン側鎖のアミノ基との反応によって標識された。アミノ酸側鎖のチオールは、DMAE-ED-MCCまたはNSP-DMAE-PEG-BrAc (Ciba Corning) を使用して標識され得る。標識手順は、一般にWO 95/27702に記載された通りであり、各抗原について最適な検出および抗原性を提供するために必要に応じて条件は変化する。

#### 【0033】

##### 【実施例】

(実施例1: 手動アッセイ)

マジックライトアナライザーシステムII (Magic Lite Analyzer

10

20

30

40

50

System II; MLA II)を手動アッセイのために使用する。体積、濃度、時間および温度のようなパラメーターが手引きのために提供されるが、しかるべく調整され得る。簡潔には、試験サンプルの10  $\mu$ lのアリコートを、対応するチューブに添加した。試験サンプルは、好ましくは、おそらく抗HCV抗体を含む生物学的液体（例えば、血漿または血清）ならびに適切なコントロールである。各チューブに100  $\mu$ lの抗原希釈剤または緩衝液を加え、37 で6分間インキュベートする。各チューブに約60  $\mu$ g / アッセイの最終濃度でラット抗ヒトIgG抗体（PMP / 抗ヒトIgG）と結合体化した常磁性粒子（PMP）を含む100  $\mu$ lの固相緩衝液を加える。しかし、他の抗ヒトIgG抗体が適切である。好ましくは、常磁性粒子は、直径が約10  $\mu$ mより小さい。PMP / 抗ヒトIgG粒子をTris緩衝液（pH8.0）、150mM NaCl、2.75 % BSA、0.1 % カゼイン、0.1 % Tween-20、0.1 % 酵母抽出物、0.25 % E. coli抽出物、0.005 % SOD、0.09 % NaN<sub>3</sub>および1mM EDTAを含む希釈剤で希釈し得る。続いて、DMAEと結合体化した組換えHCV抗原（HCV抗原 / SOD融合タンパク質）（例えば、MEFA-6-DMAE、c33c-DMAEおよびc200-DMAE）を約0.1  $\mu$ g / アッセイ～約1  $\mu$ g / アッセイの濃度で50  $\mu$ lの容量のリガンド試薬（LR）希釈剤中に加える。好ましくは、アッセイ当たり約25  $\times$  10<sup>6</sup>光ユニット当量（相対光ユニット、RLU）が存在するようリガンド試薬量を各サンプルに加える。このおおよその量の光ユニット当量は、単一のリガンドの添加、または多くのリガンドについて好ましい。LR希釈剤は、Tris緩衝液（pH8.0）、150mM NaCl、1.0 % BSA、0.1 % Tween-20、0.09 % NaN<sub>3</sub>および1mM EDTAを含む。完全な混合を保証するために、このチューブを1回当たり5～10秒間づつ6回ボルテックスミキサーで攪拌する。サンプルチューブを18分間、37 でインキュベートする。サンプルチューブを磁石上に3分間（PMP粒子を沈降させるのに十分な時間）置く。このサンプルをPMP粒子を保持するために磁石を使用してデカントする。PMP粒子を1mlのPBSでボルテックスして2回洗浄する。洗浄溶液は、PBS、0.1 % Tween-20、0.09 % NaN<sub>3</sub>および1mM EDTAである。混合、インキュベート、沈降およびデカントを行なう工程は、少なくとも1回繰り返され得る。各チューブに100  $\mu$ lの水を加え、PMP粒子を再懸濁する。次いで、チューブをMLA-II機器に配置し、そして発光を2秒間測定する。

#### 【0034】

（実施例2：自動化アッセイ）

上記の手動抗HCVアッセイをACS:Centaur装置を使用して、自動化使用に適応させた。以下の手順を使用する。簡潔には、ACS:Centaurシステムは、以下の工程を自動的に行う：1) 10  $\mu$ lのサンプルをキュベットに分配する；2) 100  $\mu$ lの補助希釈緩衝液、100  $\mu$ lのLite試薬 / 固相、50  $\mu$ lの抗原試薬2（例えば、MEFA-6）、50  $\mu$ lの抗原試薬1（例えば、c33c）を分配し、そして37 で18分間混合物をインキュベートする；3) 混合物から固相を分離し、非結合試薬を吸引する；4) 洗浄試薬1でキュベットを洗浄する；5) 各300  $\mu$ lの酸性試薬および塩基性試薬を分配し、化学発光反応を開始する；そして6) システム作動指示またはオンラインヘルプシステムに記載されるように、選択されたオプションに従って結果を報告する。固相 / Lite試薬希釈緩衝液は、50mM Tris、0.5M KCl、1mM EDTA、3.75 % BSA、0.003 % 酵母、0.05 g / L E. coli、0.5 % Tween-20、2mg / L アンホテリシン B、24mg / L 硫酸ゲンタマイシン、30  $\mu$ g / 試験固相および45  $\times$  10<sup>6</sup>試験Lite試薬（抗SOD<sup>+</sup>DMAE抗体）を含む。補助の希釈緩衝液は、50mM Tris、0.5M KCl、1mM EDTA、3.75 % BSA、0.003 % 酵母、0.05 g / L E. coli、0.5 % Tween-20、2mg / L アンホテリシン B、24mg / L 硫酸ゲンタマイシン、0.05 g / L 腹水 IgG1および0.1 g / L 腹水 IgG2A（ブロッキング抗体）を含む。洗浄試薬は、PBS / Tween-20を含む。酸性

試薬は、0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  / 0.1N  $\text{HNO}_3$ を含む。塩基性試薬は、界面活性剤とともに0.25N未満のNaOHを含む。

#### 【0035】

(実施例3: c33cを用いた手動アッセイ)

c33c HCV抗原を使用した手動アッセイを、実施例1において上記した方法論を使用してアッセイ当たり100ngのc33cで行った。抗原希釈剤は、25mM リン酸ナトリウム(pH6.5)、100mM チオシアン酸ナトリウム、5mM EDTA、0.1% Tween-20、0.2% 魚ゼラチン、0.09% アジ化ナトリウムおよび10mM DTTを含んでいた。このアッセイを $3 \times 10^6$ RLU / 10 $\mu$ l、30 $\mu$ g / アッセイのPMPで行った。アッセイを種々の時間および種々の温度下で行った。例えば、アッセイを4 で0日目、4 で3日目、37 で1日目、37 で2日目、37 で3日目および37 で6日目に行った。

10

#### 【0036】

10 $\mu$ lのサンプル(例えば、ヒト抗HCV抗体を含む生物学的液体)を各サンプルチューブに加えた。サンプルは以下のものを含んでいた: ランダムな陰性コントロール(r1、r2およびr3)、陽性コントロール(Virotrol)、セロコンバージョンパネル(PHV905-5、PHV907-4およびPHV904-6)、HCV患者サンプル(FF25931)およびセロコンバージョンサンプル(6214-09および6212-04)。結果を表4に示す。感度を光学密度単位のアッセイ検出カットオフによって除したアッセイサンプルの光学密度(s/co)として報告する。すべての既知の陰性サンプルは、カットオフ値より下の相対光単位(RLU)を示したが、既知の陽性サンプルは、カットオフ値よりずっと上のRLUを示した。

20

#### 【0037】

比較の目的で、いくつかのサンプル(表4を参照のこと)からのHCV抗体の検出をまた、Ortho 3.0および市販のストリップイムノブロットアッセイ(RIBA-3.0 Chiron Corporation)によって、どちらのアッセイがHCV抗体検出のための確認試験として臨床的に使用されるかについて行った。RIBA法に従って、組換えHCV抗原をゲル電気泳動で分離し、そして患者の血清と接触させた。分離した抗原との反応性を標識2次抗体を使用してイムノブロットアッセイによって実施する。アッセイの結果をプラス/マイナスのスケールで記録する。Ehelingら、Lancet、1991、337、912-913(これは、本明細書中でその全体が参考として援用される)。Ortho 3.0アッセイを製造者の指示に従って行った。c33c、c22p、c100pおよびNS-5をこれらの試験のためのHCV抗原として使用した。

30

#### 【0038】

簡潔には、RIBA-3.0アッセイを以下のように行った。アッセイ開始の約30分前に、キットを冷蔵(2~8 )から取りだし、そしてキットの成分を室温(15~30 )に至らしめた。必要な数のストリップをシールしたホイルポーチから取り除き、そしてアッセイチューブ立て中でそれぞれのチューブの中に置いた。1mlの検体希釈剤をストリップ全体が液体で覆われるように各チューブに加えた。20 $\mu$ lの適切な検体またはコントロールを、対応するチューブに加えた。チューブにふたをし、反転して混合した。チューブを備えたラックをロッカーに置き、そしてゴムバンドまたはテープで固定した;ラックを室温(15~30 )で4~4.5時間揺り動かした(16~20サイクル/分)。チューブは、ふたをはずし、そして液体を廃棄物容器へと完全に吸引した。1mlの検体希釈剤を各チューブに加えた。チューブはふたをし、ロッカー上のラックに置き、そして室温で30~35分間揺り動かした。次いで、液体を吸引した。1mlの作業洗浄緩衝液を各チューブに加え、次いで、液体およびストリップを30mlの作業洗浄緩衝液を含む洗浄容器に注いだ(洗浄容器当たり最高20ストリップ)。洗浄容器を完全に作業洗浄緩衝液で満たし(総容量、60mL)、次いで、洗浄液をデカントした。ストリップを保持するため、洗浄容器をデカントしながらやさしく転がした。60mlの作業洗浄緩衝

40

50

液を加え、旋回し、次いでストリップを保持しながら洗浄液をデカントした。ストリップ当たり 1 m l の結合物を各洗浄容器に加えた（洗浄容器当たり最低 1 0 m l ）。洗浄容器をロータリシェイカー上で  $110 \pm 5$  r p m、9 ~ 11 分間、室温（15 ~ 30）で回転した。作業基質を使用前 1 時間までに調製した。結合物インキュベーションの終了に際して、結合物をデカントし、ストリップを 6 0 m l の作業洗浄緩衝液を加え、そして旋回することにより洗浄した。洗浄液をデカントし、この工程をさらに 2 回繰り返した。最終洗浄液をデカントした。ストリップ当たり 1 m l の作業基質を各洗浄容器に対して加えた（洗浄容器あたり最低 1 0 m l ）。洗浄容器をロータリシェイカー上で  $110 \pm 5$  r p m、15 ~ 20 分間、室温（15 ~ 30）で回転した。作業基質をデカントし、そしてストリップを 6 0 m l の蒸留水または脱イオン水を加え、旋回することによって洗浄した。洗浄液をデカントし、この工程をさらに 1 回繰り返した。ストラップを保持するため、洗浄容器をデカントしながらやさしく回転した。ピンセットを使用して、ストリップを吸収紙に移し、そして過剰な水をブロットした。ストリップを暗所、室温で少なくとも 30 分間風乾した。ストリップを 3 時間以内に判読した。検体における抗 H C V 反応性を各ストリップのヒト I g G（レベル I およびレベル I I）内部のコントロールバンドの強度と各抗原バンドの強度を比較することによって決定した。抗体の同定を抗原バンドの特定の位置によって規定した。抗原 / ペプチドバンドの強度を以下のように内部 I g G コントロールの強度に関して記録した：なし（-）、レベル I I g G コントロールバンドの強度より小さい（- / +）、レベル I I g G コントロールバンドの強度と等しい（1 +）、レベル I I g G コントロールバンドの強度より大きく、そしてレベル I I I g G コントロールバンドの強度より小さい（2 +）、レベル I I I g G コントロールバンドの強度と同等（3 +）、およびレベル I I I g G コントロールバンドの強度より大きい（4 +）。

#### 【0039】

（実施例 4：c 2 0 0 を用いた手動アッセイ）

c 2 0 0 H C V 抗原を使用した手動アッセイを、様々な量の還元剤を用いて実施例 1 に記載されたように行った。安定化緩衝液は、還元剤の量を除いて実施例 3 と同じであった。このアッセイを  $3 \times 10^6$  R L U / 1 0  $\mu$  l、3 0  $\mu$  g / アッセイ P M P で行った。アッセイを種々の時間で、そして種々の量の還元剤下で行った。例えば、アッセイを 2 0 m M D T T を使用して 3 7 で 1 日後（バイアル 1）行い、D T T なしで 3 7 で 1 日後（バイアル I I）、そして 2 0 m M D T T を試験前に加えた場合、3 7 で 1 日後（バイアル I I I）行った。バイアル I I および I I I をまた、3 日後に試験した。

#### 【0040】

1 0  $\mu$  l のサンプル（例えば、ヒト抗 H C V 抗体を含む生物学的液体）を各サンプルチューブに加えた。サンプルは、以下を含んでいた：様々な希釈でのランダムな陰性コントロール（r 1、r 2、r 3、r 4 および r 5）、セロコンバージョンパネル（P H V 9 0 4 - 6 および P H V 9 0 6 - 1）および H C V 患者サンプル（F F 2 5 9 3 1）。結果を表 5 に示す。s / n は、平均陰性値で除した感度である。

#### 【0041】

（実施例 5：M E F A - 6 および c 3 3 c を使用した手動アッセイ）

M E F A - 6 および c 3 3 c H C V 抗原を使用した手動アッセイを、実施例 1 において上記された方法論を使用して、アッセイ当たり 1 0 0 n g の M E F A - 6 および 8 5 n g の c 3 3 c で行った。M E F A - 6 のための安定化緩衝液は、5 0 m M ホウ酸ナトリウム（p H 9 . 5）、5 m M E D T A、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0、0 . 5 % B S A、および 1 % チオグリセロールを含んでいた。この p H 9 . 5 で M E F A - 6 は安定なので、還元剤は必要ない。c 3 3 c のための緩衝液は、2 5 m M リン酸ナトリウム（p H 6 . 5）、5 m M E D T A、0 . 1 % T w e e n - 2 0、0 . 2 % 魚ゼラチン、1 0 0 m M チオシアン酸ナトリウムおよび 1 0 m M D T T を含んでいた。アッセイを  $4.5 \times 10^6$  R L U / 1 0  $\mu$  l の抗 S O D<sup>+</sup> D M A E、3 0  $\mu$  g / アッセイ P M P で行った。アッセイを種々の時間で、そして種々の温度下で行った。例えば、アッセイを 4 で 7

10

20

30

40

50

日目に、そして37 で7日目に行った。

【0042】

10  $\mu$ lのサンプル(例えば、ヒト抗HCV抗体を含む生物学的液体)を各サンプルチューブに加えた。サンプルは、ランダムな陰性コントロール(r1、r2、r3およびr4)、陽性コントロール(Virotrol)、セロコンバージョンパネル(PHV905-5、PHV909-1、PHV909-2およびPHV909-3)、セロコンバージョンサンプル(6212-02および6214-09)およびセロコンバージョンコントロールパネル(SC-0030A、SC-0030B、SC-0030C、SC-0030D、SC-0040A、SC-0040B、SC-0040C、SC-0040DおよびSC-0040E)を含んでいた。結果を表6に示す。感度を、光学密度単位のアッセイ検出カットオフによって除したアッセイサンプルの光学密度(s/co)として報告した。すべての既知の陰性サンプルは、カットオフ値より下の相対光単位(RLU)を示したが、既知の陽性サンプルは、カットオフ値よりずっと上のRLUを示した。

10

【0043】

比較の目的で、いくつかのサンプルからのHCV抗体の検出(表6を参照のこと)をまた、実施例3で記載されているように、Ortho 3.0およびRIBA・3.0によって行った。

【0044】

(実施例6:MEFA-6を用いた手動アッセイ)

MEFA-6 HCV抗原を使用した手動アッセイを、実施例1で上記された方法論を使用してアッセイ当たり100ngのMEFA-6を用いて行った。MEFA-6の緩衝液は、50mM ホウ酸ナトリウム(pH9.5)、5mM EDTA、0.05% Tween-20、0.5% BSAおよび1% チオグリセロールを含んでいた。アッセイを $4.5 \times 10^6$ RLU/10  $\mu$ lの抗SOD<sup>+</sup>DMAE、30  $\mu$ g/アッセイ PMPで行った。アッセイを4 で7日目に行った。

20

【0045】

10  $\mu$ lのサンプル(例えば、ヒト抗HCV抗体を含む生物学的液体)を各サンプルチューブに加えた。サンプルは、ランダムな陰性コントロール(r1、r2およびr3)、陽性コントロール(Virotrol)およびセロコンバージョンコントロールパネル(SC-0030A、SC-0030B、SC-0030CおよびSC-0030D)を含んでいた。結果を表7に示す。感度を光学密度単位のアッセイ検出カットオフによって除したアッセイサンプルの光学密度(s/co)として報告した。すべての既知の陰性サンプルは、カットオフ値より下の相対光単位(RLU)を示したが、既知の陽性サンプルは、カットオフ値よりずっと上のRLUを示した。

30

【0046】

比較の目的で、いくつかのサンプルからのHCV抗体の検出(表7を参照のこと)をまた、上記のようにOrtho 3.0およびRIBA・3.0によって行った。前述の実施例は、本発明を例示することを意味し、そしていかなる方法でも本発明を制限するとは解釈されない。当業者は、本発明の精神および範囲内である改変を認識する。本明細書中で引用されたすべての参考文献は、ここでその全体が参考として援用される。

40

【0047】

【表4】

表 4: c33c.Pyセ1

サンプル	0日目 4°C	3日目 4°C	1日目 37°C	2日目 37°C	3日目 37°C	6日目 37°C
r1	1925	1247	1001	1509	1971	2202
r2	1740	1679	1632	1448	1401	1863
r3	1602	1432	1463	1401	1725	1940
Viretrol	61708	64156	65604	60060	56595	59044
6214-09	14322	16555	10888	16555	14784	15246
6212-04	40856	43351	41842	40725	36421	39008
PHV905-5	10734	15030	14969	13721	15785	13999
PHV907-4	2341	1756	1940	2017	2110	2002
PHV904-6	53299	49496	54208	54285	47135	45676
FF25931 1:8	567120	608993	530006	572603	568974	581504
平均陰性	1756	1453	1365	1453	1699	2002
カットオフ	5267	4358	4096	4358	5097	6005

	s/co	s/co	s/co	s/co	RIBA	c22p	c100p	NS-5	ORTHO
Viretrol	11.72	14.72	16.02	13.78	11.10	9.83	9.83	NS-5	3.0
6214-09	2.72	3.80	2.66	3.80	2.90	2.54	2.54	-	s/co
6212-04	7.76	9.95	10.22	9.23	7.15	6.50	6.50	-	0.9
PHV905-5	2.04	3.45	3.65	3.15	3.1	2.33	2.33	-	1.4
PHV907-4	0.44	0.40	0.47	0.46	0.41	0.33	0.33	-	0.9
PHV904-6	10.12	11.36	13.23	12.46	9.25	7.61	7.61	-	0.1
									>5.0

【 0 0 4 8 】

【 表 5 】

10

20

30

40

表 5: c200 アッセイ

	バイアル I 37°C 1日目 コントロール c200 20mM DTT	バイアル II 37°C 1日目 試験 c200 w/o DTT	バイアル III 37°C 1日目 試験 c200 20mM DTT を加えた	バイアル III 37°C 1日目 試験 c200 40mM DTT を加えた	バイアル III 37°C 3日目 試験 c200 40mM DTT を加えた	バイアル III 37°C 3日目 試験 c200 w/o DTT
サンプリング						
ランダム r1	1463	1448	1078	1109	1217	801
ランダム r2	1217	1324	1247	1879	1309	1016
ランダム r3	1155	1247	1340	1217	1063	1124
ランダム r4	1170	1217	2402	1340	1386	1140
ランダム r5	1155	1232	1217	1494		
ゼロコン バリエーション PHV904-6	29106	10102	8763	13182	14060	2141
ゼロコン バリエーション PHV906-1	27828	15231	16016	21468	30523	25656
FF25931 1:4	643551	574944	435543	318025	322307	277616
FF25931 1:256	26657	19774	16339	16524	22484	21699
FF25931 1:1024	9948	7854	8516	8408	12859	17048
平均陰性	1232	1294	1457	1408	1244	1020
	s/n	s/n	s/n	s/n	s/n	s/n
ゼロコン バリエーション PHV904-6	23.6	7.8	6.0	9.4	11.3	2.1
ゼロコン バリエーション PHV906-1	22.6	11.8	11.0	15.2	24.5	25.1
FF25931 1:4	522.4	444.5	299.0	225.9	259.1	272.1
FF25931 1:256	21.6	15.3	11.2	11.7	18.1	21.3
FF25931 1:1024	8.1	6.1	5.8	6.0	10.3	16.7

【 0 0 4 9 】

【 表 6 】

10

20

30

表 6: MEFA-6 + c33cアッセイ

サンプル	4°C	7日目	37°C	7日目	Ortho 3.0	RIBA	3.0	c22p	NS-5	遺伝子型
	s	s/co	s	s/co	s/co	c100p	c33c	-	-	1a
NABI SC-0030A	6607	0.39	5960	0.43	0.005	-	-	-	-	-
NABI SC-0030B	14522	0.86	8778	0.64	0.015	3+	+/-	+/-	-	-
NABI SC-0030C	86748	5.12	46785	3.40	1.837	4+	1+	2+	-	-
NABI SC-0030D	472749	27.92	489304	35.54	4.900	4+	4+	4+	3+	-
NABI SC-0040A	9379	0.55	7454	0.54	0.003	-	-	-	-	2b
NABI SC-0040B	12720	0.75	7546	0.55	0.056	-	-	-	-	-
NABI SC-0040C	65927	3.89	29799	2.16	1.215	+/-	2+	-	-	-
NABI SC-0040D	106845	6.31	43613	3.17	1.534	+/-	2+	-	-	-
NABI SC-0040E	175067	10.34	78124	5.67	3.247	1+	3+	1+	-	-
ランダム r1	5236		4697							
ランダム r2	5652		4112							
ランダム r3	5991		5375							
ランダム r4	5698		4173							
					Ortho 3.0	RIBA	3.0			

10

20

30



(表6の続き)

サンプル	4°C	7日目	37°C	7日目	Ortho 3.0	RIBA	3.0		
	s	s/co	s	s/co	s/co	c100p	c33c	c22p	NS-5
コントロールVirotest I	117548	6.94	74721	5.43	s/co	c100p	c33c	c22p	NS-5
BCP 6212-04	68807	4.06	31616	2.30	1.4	-	1+	-	-
BCP 6214-09	81543	4.82	24270	1.76	0.9	+/-	2+	-	-
BBi PHV905-5	25040	1.48	16755	1.22	0.9	-	1+	-	-
BBi PHV909-1	6699	0.40	5313	0.39	0.0	-	-	-	-
BBi PHV909-2	30661	1.81	15646	1.14	1.3	-	-	1+	+/-
BBi PHV909-3	32432	1.92	16570	1.20	1.4	-	-	2+	+/-
平均陰性	5644		4589						
カットオフ	16933		13768						

遺伝子型

【 0 0 5 0 】

【 表 7 】

10

20

30

サンプリング	4°C	7日目
	s	s/co
ランダム r1	8624	
ランダム r2	8609	
ランダム r3	7192	
コントロール Virotrol I	129406	5.00
NABI SC-0030A	8516	0.33
NABI SC-0030B	26827	1.04
NABI SC-0030C	179980	6.96
NABI SC-0030D	508831	19.67
平均陰性	8624	
カットオフ	25872	

---

フロントページの続き

- (72)発明者 アルカンジェル, フィリップ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94704, バークレー, リージェント ストリート 2  
541, アpartment 103
- (72)発明者 ティレル, スティーブン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02038, フランクリン, プロスペクト ストリート  
287
- (72)発明者 ジーグラ, ワンダ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02032, メドウェイ, ウィントーブ ストリート  
5エイ

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 国際公開第96/041164(WO, A1)  
特開平04-036185(JP, A)  
特開昭62-231169(JP, A)  
特開平09-127114(JP, A)  
特開平06-074956(JP, A)  
特開平06-303980(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-98