

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4532614号
(P4532614)

(45) 発行日 平成22年8月25日 (2010. 8. 25)

(24) 登録日 平成22年6月18日 (2010. 6. 18)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/04 (2006. 01)	C O 7 K 14/04
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N 33/569 (2006. 01)	G O 1 N 33/569 J
請求項の数 10 (全 21 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願平10-364934	(73) 特許権者	398032751
(22) 出願日	平成10年12月22日 (1998. 12. 22)		シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ
(65) 公開番号	特開平11-243974		ィックス・プロダクツ・ゲーエムベーハー
(43) 公開日	平成11年9月14日 (1999. 9. 14)		ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (
審査請求日	平成17年12月13日 (2005. 12. 13)		番地なし)
(31) 優先権主張番号	19757765:2	(74) 代理人	100127926
(32) 優先日	平成9年12月23日 (1997. 12. 23)		弁理士 結田 純次
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次
		(74) 代理人	100140132
			弁理士 竹林 則幸
		(74) 代理人	100091731
			弁理士 高木 千嘉
		(74) 代理人	100080355
			弁理士 西村 公佑
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 水痘帯状疱疹ウイルス (V Z V) 免疫反応性タンパク質 V P 2 6 およびその診断的使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

V Z V 株の変動により生じる 1 または数個のアミノ酸置換を含む、配列番号 1 に示された V Z V V P 2 6 の A A 1 2 ~ 2 3 5 領域に相当する免疫反応性ペプチド。

【請求項 2】

配列番号 1 に示された V Z V V P 2 6 の A A 1 2 ~ 2 3 5 領域からなる免疫反応性ペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のアミノ酸の配列をコードする核酸。

【請求項 4】

配列番号 2 に示されたヌクレオチド配列に相当する核酸。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の核酸と緊縮条件下にハイブリダイズし、V Z V に対する抗体によって認識されるが、他のヘルペスウイルスに対する抗体には認識されないペプチドをコードする核酸。

【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載の核酸を発現させることによって調製できる免疫反応性ペプチド。

【請求項 7】

請求項 1、2 および 6 のいずれかに記載の免疫反応性ペプチドを使用するサンプル中の

VZVに対する抗体を検出する免疫化学的方法。

【請求項 8】

核酸ハイブリダイゼーションによってVZVを検出するための請求項4または5に記載の核酸の使用。

【請求項 9】

請求項1、2および6のいずれかに記載の免疫反応性ペプチドからなるVZVに対する抗体を検出するための試験キット。

【請求項 10】

請求項4または5に記載の核酸からなるVZVを検出するための試験キット。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）タンパク質VP26のアミノ酸位置12～235の領域と相同性である免疫反応性ペプチド、これらのペプチドをコードする核酸ならびに水痘帯状疱疹ウイルスによる感染の診断のための上記ペプチドまたは核酸の使用に関する。

【0002】

【従来技術】

ウイルス分類国際委員会（ICTV）によれば、VZVはヘルペスウイルス科に属する。75%の例で一次感染は年齢15歳未満で起こり、通常は不顕性の経過をたどる。これに反して、ウイルスと以前に接触したことがなかった成人および自然にまたは治療的に免疫抑制を受けている人での感染は重篤な症状を伴うことがある。胎児の感染の場合も、このウイルスは胎盤を通過することが可能で、この時点では母体の抗体による保護が提供されないため、重篤な症状を招来する。一次感染後、ウイルスは生涯を通じて知覚神経節に保持される。再活性化されると、VZVは知覚神経節内の末梢神経に広がり、帯状疱疹を発症する。

20

【0003】

70のオープンリーディングフレーム（ORF）は、最近知られた糖タンパク質gpI（ORF68）、gpII（ORF31）、gpIII（ORF37）、gpIV（ORF67）、gpV（ORF14）、およびgpVI（ORF60）を含めて完全に解明されている、長さ124,884bpのVZVゲノムの配列から推定できる（Dumas株；A.J. Davison & J.E. Scott, J.Gen. Virol. 67: 1759-1816, 1986）。いずれの場合も、ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列は、単純ヘルペスウイルス（HSV）の糖タンパク質、gE、gB、gH、gI、gCおよびgLと様々な程度ホモロジーを示す。しかしながら、配列のホモロジーがまた機能のホモロジーを意味できるとの示唆は全くない。糖タンパク質gpI、gpII、gpIIIおよびgpVのオープンリーディングフレームは分子生物学的手法によって確認されている。

30

【0004】

免疫原性VZVカプシドタンパク質は数種が同定され、特性が調べられているのみである。D.R. Harper & C.Grose (J.Infect. Dis. 159: 444-451, 1989) は、ヌクレオカプシドに帰属されるp32/p36複合体の免疫反応性を記載している。さらに、A.Vafaiら (Virus Res. 15: 163-174, 1990) は、水痘帯状疱疹ウイルスのヌクレオカプシドタンパク質およびHSVヌクレオカプシドタンパク質の両者を認識するヒトVZV反応性血清の交叉反応性を報告している。いずれの著者もこれらの抗原の診断試験法における使用を可能にするアプローチについては何の提案もしていない。

40

【0005】

VZV特異的免疫性レベルのチェックにはラジオイムノアッセイ（RIA）、固相酵素免疫測定法（ELISA）、蛍光抗体膜抗原アッセイ（FAMA）および免疫蛍光試験（IFT）から補体結合（CF）まできわめて多数の様々な血清学的方法がある。これらの方法の大部分は、VZV特異的抗体を検出する。培養ヒト線維芽細胞上での綿密な培養の

50

ちに単離され、特殊な方法によって診断的使用のために調製されたウイルス材料がしばしば抗原として使用される。

【0006】

感染線維芽細胞からのVZV抗原の単離はこの作業に従事する人の感染の危険を伴う。さらに、とくにウイルスは感染細胞から放出されず、したがって特殊な精製方法が要求されるので、この調製は、きわめて高価につき、時間がかかる。抗原を前もって精製することなく免疫化学的試験に使用する場合にはVZV感染細胞を超音波処理によって破壊し、抗原はたとえば、マイクロタイトレーションプレートの被覆用に希釈したのち直接使用される。この方法では、ウイルス特異的抗原に加え、マイクロタイトレーションプレートのウエルに結合するのは主として細胞特異的抗原であることから、とくにある種の疾患たとえば自己免疫疾患に関連する細胞特異的抗原では偽陽性の結果を生じ、その結果、誤診を招くことがある。精製したウイルス糖タンパク質に基づく他の試験方法、たとえば糖タンパク質ELISAは、顕著により精密な多大の損失を生じる精製を要求し、したがって、比較的大規模の免疫化学的診断試験を確立することはほとんど不可能である。糖タンパク質ELISAでは、 α -ヘルペスウイルスの糖タンパク質との間に存在する著しいホモロジーにより、HSV特異的抗体との交叉反応性およびその結果としての偽陽性結果もしばしば観察される。

10

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

上述の問題に対する解決の可能性としては、異種システム内、たとえば大腸菌(E.coli)において大量に調製できる組換えタンパク質の使用がある。このシステムでは人がVZVに感染する可能性はない。それは、特異的なウイルスタンパク質に向けられた識別診断の実施の可能性も提供する。とくに、VZVタンパク質の反応性領域を、他のヘルペスウイルスに対して特異的な抗体との交叉反応性が実際上または完全に排除できる程度まで限定することが可能である。これらの要求に合致するタンパク質は、宿主特異的タンパク質たとえば大腸菌マルトース結合タンパク質(MBP)または融合パートナーとして発現産物の安定性に寄与する6ヒスチジン残基のN-末端局在配列(Hisタグ)のいずれかとともにハイブリッドタンパク質として発現させることができる。これらのハイブリッドタンパク質はついで、単一工程のアフィニティー精製法によって、ほぼ純粋な、したがって夾雑物を含まない形態で、診断用に使用可能な表面、たとえばELISAマイクロタイトレーションプレートの被覆に直接使用することができる。上述の基準に合致するタンパク質は、VZVシステムについてはこれまで記載されていない。

20

30

驚くべきことに、VZV ORF23の部分でVP26*として大腸菌内で安定に発現させることができることが見出された。驚くべきことにさらに、VP26*は免疫反応性であり、診断に有利に使用できることが発見された。

【0008】

【課題を解決するための手段】

したがって、本発明は、VZV VP26のAA12~235領域と相同性であるか、またはVP26のアミノ酸12~235領域を実質的に含有する免疫反応性ペプチドに関する。これに関連して、VZV株の変動により天然に変動したアミノ酸配列を示す免疫反応性ペプチドも明らかに包含されるものである。

40

【0009】

本発明はさらに、本発明による上述の免疫反応性ペプチドをコードする核酸、すなわちDNAまたはRNAに関する。すなわち、とくに表1に示された配列を有する核酸である。しかしながら、これに加えて、上述の核酸と緊縮条件下にハイブリダイズし、VZVに対する抗体によって認識されるが他のヘルペスウイルスに対する抗体には認識されないペプチドをコードする核酸も包含される。

【0010】

本発明はまた、表1に示した配列を有する核酸、または緊縮条件下にハイブリダイズする上述の核酸の1種の発現によって調製できる免疫反応性ペプチドであり、すべてVZVに

50

対する抗体によって認識されるが他のヘルペスウイルスに対する抗体には認識されない免疫反応性ペプチドに関する。

本発明はさらに、VZVに対する抗体の検出を可能にする免疫化学的方法に関する。この方法においては、上記免疫反応性ペプチドの1種または2種以上を、VZV特異的抗体の存在を検討する患者からのサンプルたとえば血液、血漿または血清サンプルと接触させる。ついで、サンプルからの抗体が、使用された免疫反応性ペプチドに結合するか、あるいはこれらのペプチドと他の免疫学的関係、たとえば競合に加わるかを決定するために、当業者に周知の方法が使用される。

【0011】

本発明はまた、核酸ハイブリダイゼーションによるVZVの検出のための本発明の上述の核酸の使用に関する。

このほかに、本発明は、本発明の免疫反応性ペプチドからなりVZVに対する抗体を検出するための試験キット、および本発明の核酸からなりVZVを検出するための試験キットに関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

診断的に利用可能な免疫反応性領域の位置を決定するためには、VZVの免疫反応性タンパク質をVZVゲノムライブラリーの免疫スクリーニングにより同定した。このためには、VZVゲノムライブラリーをZap発現系(Stratagene)中にファージライブラリーとして構築した。このライブラリーをついで25VZV反応性ヒト血清からなる血清プールを用いて免疫スクリーニングを実施するために使用した。陽性として評価されたクローンのDNAを環状型に変換し、配列を決定して、VZV配列の相当する領域に帰属させた。この方法の補助によって、ORF23のAA12~235を発現する免疫反応性クローンを単離することが可能であった。このリーディングフレームの発現産物はこれまで、VZVシステム中に報告されていない。しかしながら、それはVZVとORF23がHSV1UL36に相当するHSVとの間のホモロジーの研究から知られている(A.J. Davison & J.E. Scott, J.Gen. Virol. 67: 1759-1816, 1986)。しかしながら、116AAでは相当する単純ヘルペスウイルスの遺伝子産物は、実質的により短く、いずれとも注目すべきホモロジーを示さない。これまで、VZV ORF23の遺伝子産物またはHSV UL36の遺伝子産物のいずれに対する(ヒト血清の)免疫反応性も証明することはできなかった。上述の結果に基づいて、ORF23の遺伝子産物(VP26)は診断試験方法のための可能性ある候補を構成する。結果として、全ORF23およびN-末端で切断した領域も含めて両者をベクターpMAL-c2にサブクローニングした。これにより、構築体pMAL-VP26およびpMAL-VP26*が得られた。これらをオーバーラップ、二方向様式で配列決定した。この配列は公表された配列(A.J. Davison & J.E. Scott, J.Gen. Virol. 67:1759-1816, 1986)と何ら差を示さない。これらの構築体の発現により、切断されたタンパク質は安定に発現させることが可能であるが、完全なタンパク質の場合はそうでないことが示された。pMAL-VP26*産物の免疫反応性は血清プール(上記参照)を使用して陽性であることが見出された。免疫反応性はまた、VZV特異的DNAフラグメントをベクターpMAL-VP26*からベクターpQE30にサブクローニングしてpQE系で発現させたのちにも確認された。したがって、MBP融合部分から生じる偽陽性評価の可能性を排除することができた。

【0013】

ELISA評価においては、IgM診断に対し、計算カットオフ=187(陰性血清の平均値+3×標準偏差)でpMAL-VP26*は感度69%(n=13)および特異性98%(n=41)、または自由に選択されたカットオフ120では感度85%、特異性95%を与えることが見出された。pQE-VP26*を用いた場合には計算カットオフ=173(陰性血清の平均値+3×標準偏差)で感度62%(n=13)、特異性100%(n=41)、また自由に選択されたカットオフ150では感度77%および特異性95%であった。

10

20

30

40

50

【0014】

I g G E L I S A 評価においては、p M A L - V P 2 6 * は I g G 診断に対し、計算カットオフ 2 1 0 (陰性血清の平均値 + 3 × 標準偏差) では、感度は 3 5 % (n = 4 9)、特異性 1 0 0 % (n = 5)、また自由に選択されたカットオフ 1 0 0 では、感度 5 9 %、特異性 8 0 % を与えることが見出された。p Q E - V P 2 6 * を用いた場合には、計算カットオフ 2 1 5 (陰性血清の平均値 + 3 × 標準偏差) で、感度 5 3 %、特異性 1 0 0 %、また自由に選択されたカットオフ 1 3 0 では感度 8 2 %、特異性 8 0 % であった。

【0015】

配列 1 : V P 2 6 (O R F 2 3) (Ellen株) のアミノ酸残基 1 ~ 2 3 5。全部で 2 3 5 A A ; 理論分子量 2 4 . 4 kDa。ボールド体の領域は、総計 2 2 4 A A を有して、理論分子量 2 3 kDa の A A 1 2 ~ 2 3 5 V P 2 6 * 免疫反応性フラグメントに相当する。シャープ (#) 記号は停止コドンを示す。アミノ酸番号は O R F 2 3 について公表された配列 (A. J. Davison & J. E. Scott, J. Gen. Virol. 67: 1759-1816, 1986) のメチオニン (開始コドン) に始まる。

10

Met Thr Gln Pro Ala Ser Ser Arg Val Val Phe Asp Pro Ser Asn Pro
 Thr Thr Phe Ser Val Glu Ala Ile Ala Ala Tyr Thr Pro Val Ala Leu
 Ile Arg Leu Leu Asn Ala Ser Gly Pro Leu Gln Pro Gly His Arg Val
 Asp Ile Ala Asp Ala Arg Ser Ile Tyr Thr Val Gly Ala Ala Ala Ser
 Ala Ala Arg Ala Arg Ala Asn His Asn Ala Asn Thr Ile Arg Arg Thr
 Ala Met Phe Ala Glu Thr Asp Pro Met Thr Trp Leu Arg Pro Thr Val
 Gly Leu Lys Arg Thr Phe Asn Pro Arg Ile Ile Arg Pro Gln Pro Pro
 Asn Pro Ser Met Ser Leu Gly Ile Ser Gly Pro Thr Ile Leu Pro Gln
 Lys Thr Gln Ser Ala Asp Gln Ser Ala Leu Gln Gln Pro Ala Ala Leu
 Ala Phe Ser Gly Ser Ser Pro Gln His Pro Pro Pro Gln Thr Thr Ser
 Ala Ser Val Gly Gln Gln Gln His Val Val Ser Gly Ser Ser Gly Gln
 Gln Pro Gln Gln Gly Ala Gln Ser Ser Thr Val Gln Pro Thr Thr Gly
 Ser Pro Pro Ala Ala Gln Gly Val Pro Gln Ser Thr Pro Pro Pro Thr
 Gln Asn Thr Pro Gln Gly Gly Lys Gly Gln Thr Leu Ser His Thr Gly
 Gln Ser Gly Asn Ala Ser Arg Ser Arg Arg Val #

20

30

相当するヌクレオチド配列は表 1 に示す。

【0016】

【表 1】

表 1

1	ATGACACAACCCGCATCGTCTCGTGTAGTCTTTGATCCCAGCAACCCACCACATTTTCG -----+-----+-----+-----+-----+-----+ TACTGTGTTGGGCGTAGCAGAGCACATCAGAACTAGGGTCGTTGGGGTGGTGTAAAAGC MetThrGlnProAlaSerSerArgValValPheAspProSerAsnProThrThrPheSer M T Q P A S S R V V F D P S N P T T F S	60	
61	GTGGAAGCAATTGCGGCTTACACCCCGTTGCTTTAATACGACTTTTAAACGCCAGTGA -----+-----+-----+-----+-----+-----+ CACCTTCGTTAACGCCGAATGTGGGGGCAACGAAATTATGCTGAAAATTTGCGGTCACCT ValGluAlaIleAlaAlaTyrThrProValAlaLeuIleArgLeuLeuAsnAlaSerGly V E A I A A Y T P V A L I R L L N A S G	120	10
121	CCTTTGCAACCTGGTCACCGTGTGGACATCGCTGATGCCAGAAGCATTACACCGTGGGA -----+-----+-----+-----+-----+-----+ GGAAACGTTGGACCAGTGGCACACCTGTAGCGACTACGGTCTTCGTAAATGTGGCACCT ProLeuGlnProGlyHisArgValAspIleAlaAspAlaArgSerIleTyrThrValGly P L Q P G H R V D I A D A R S I Y T V G	180	20
181	GCCGCGGCCAGTGCCGCGCGTGACGCGCTAACCATAATGCAAATACGATACGCCGAACG -----+-----+-----+-----+-----+-----+ CGGCGCCGGTCACGGCGCGCACGTGCGCGATTGGTATTACGTTTATGCTATGCGGCTTGC AlaAlaAlaSerAlaAlaArgAlaArgAlaAsnHisAsnAlaAsnThrIleArgArgThr A A A S A A R A R A N H N A N T I R R T	240	30
241	GCCATGTTTGCCGAGACTGACCCTATGACATGGTTAAGACCAACGGTTGGCTTAAAACGT -----+-----+-----+-----+-----+-----+ CGGTACAAACGGCTCTGACTGGGATACTGTACCAATTCTGGTTGCCAACCGAATTTTGCA AlaMetPheAlaGluThrAspProMetThrTrpLeuArgProThrValGlyLeuLysArg A M F A E T D P M T W L R P T V G L K R	300	40

【0017】

【表2】

10

20

30

40

541 GGAGCACAGTCAAGCACTGTCCAGCCAACAACCGGATCACCGCCCGCGGCCCAAGGCGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CCTCGTGTCTAGTTCGTGACAGGTCGGTTGTTGGCCTAGTGGCGGGCGCCGGGTTCGCGCAC
GlyAlaGlnSerSerThrValGlnProThrThrGlySerProProAlaAlaGlnGlyVal
G A Q S S T V Q P T T G S P P A A Q G V

【表 3】

表 1 つづき

CCACAGTCTACCCCGCCCCCAACCCAAAATACCCCCCAGGGGGGTAAGGGACAGACCTTG
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 GGTGTCAGATGGGGCGGGGGTTGGGTTTTATGGGGGGTCCCCCATTCCTGTCTGGAAC
 ProGlnSerThrProProProThrGlnAsnThrProGlnGlyGlyLysGlyGlnThrLeu
 P Q S T P P P T Q N T P Q G G K G Q T L

10

TCACACACGGGACAATCTGGAAACGCTTCAAGAAGTCGTAGGGTG
 661 -----+-----+-----+-----+-----+----- 705
 AGTGTGTGCCCTGTTAGACCTTTGCGAAGTTCTTCAGCATCCCAC
 SerHisThrGlyGlnSerGlyAsnAlaSerArgSerArgArgVal
 S H T G Q S G N A S R S R R V

【0019】

【実施例】

20

実施例 1 :

ウイルス V Z V 粒子の単離および DNA 抽出

V Z V 感染線維芽細胞からのウイルス粒子の放出には超音波を使用した。ウイルスを直線スクロース勾配 (20~70%w/v) により細胞構成成分から精製した。DNアーゼ I とインキュベートしたのち、ウイルスの DNA をプロテイナーゼ K およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で処理することによってウイルス粒子から放出させた。フェノール/クロロホルムで抽出したのち、ウイルス DNA をエタノールで沈殿させた。

【0020】

実施例 2 :

ゲノム発現ライブラリーの構築および免疫スクリーニング

30

V Z V ゲノム DNA (実施例 1 参照) を、制限酵素 SauIII A とインキュベートして部分消化し、ZAP 発現ベクター系 (Stratagene) の λ DNA の BamH I 切断部位にクローン化し、 λ ファージ中にパッケージした。大腸菌 (XL1-Blue MRF) の感染後、ファージ力価は 5×10^5 /ml であった。青/白スクリーニングによりこれらのファージの 25% は挿入された DNA フラグメントを繋留しなかったことが確認された。XL1-Blue 細胞をファージで感染させて、LB 上部寒天に移し、LB 寒天プレート上 42℃ で 3 時間インキュベートした。これらをイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドに浸漬したニトロセルロース膜で覆い、LB プレートを 37℃ で 6~10 時間インキュベートした。膜をついで、第一抗体として 25 V Z V 反応性ヒト血清からなる血清プール、および第二抗体としてペルオキシダーゼ結合ウサギ抗-ヒト IgG を用いる免疫染色により、免疫反応性クローンについて分析した。免疫反応性クローンはブランク精製した。挿入された V Z V DNA を包含するファージミドベクター pBK/CMV をコードする領域を ExAssist ヘルパーファージ系 (Stratagene) を用いて切り出し、環化した。V Z V DNA 部分を配列決定によって分析し、データベース検索によって同定した (GCG Blastn プログラム)。

40

【0021】

実施例 3 :

ORF 23 (VP26) のクローニング

ウイルス DNA (実施例 1 参照) またはファージミドベクター pBK/CMV-23 をそれぞれ、ORF 23 (VP26) または、ベクター pBK/CMV-23 に挿入された ORF 23 フラグメント (VP26*) の増幅の鋳型として働く免疫反応性の λ ファージか

50

ら得た。増幅オリゴヌクレオチドとしては以下のプライマーを使用した。

VP 2 6 : VP 2 6 H 5' GAATTCGGATGACACAACCCGCATCGTCTCGTGTA 3'
 VP 2 6 R 5' GCTCTAGATTACACCCTACGACTTCTTGAAGCGTTTCC 3'
 VP 2 6*: VP 2 6*H 5' GGAATTCGGCGCCTGCAGGTCGACACTAGTGGAT 3'
 VP 2 6*R 5' GCTCTAGATTACACCCTACGACTTCTTGAAGCGTTTCC 3'

【0022】

これらのオリゴヌクレオチドは、公表されたVZV配列 (A.J. Davison & J.E. Scott, J. Gen. Virol. 67: 1759-1816, 1986) の相当するセグメントもしくはベクター p B K / C M V (Stratagene) の配列に相補性であるが、それらの5'末端に鋳型DNAにハイブリダイズしなかった制限切断部位配列を含有する。増幅を行ったのちそれぞれサイズ726 bpまたは714 bpの増幅体を制限酵素EcoR I およびXba I により末端で切断し、予めEcoR I およびXba I で線状化した発現ベクター p M A L - c 2 中に結合した。全O R F 2 3 をオーバーラップ、二方向様式によって完全に配列決定した。ベクターはそれぞれ、p M A L - V P 2 6 および p M A L - V P 2 6 * と命名された。さらに、免疫反応性タンパク質をコードする領域 (V P 2 6 *) をベクター p Q E 3 0 にクローニングした。VZVゲノムDNAを鋳型DNAとして用いた。増幅オリゴヌクレオチドとして以下のプライマーを用いた。

VP 2 6*: VP 2 6* 5' CGGATCCGATCCCAGCAACCCACCCAC 3'
 VP 2 6 R 5' GCTCTAGATTACACCCTACGACTTCTTGAAGCGTTTCC 3'

【0023】

これらのオリゴヌクレオチドは、公表されたVZV配列 (A.J. Davison & J.E. Scott, J. Gen. Virol. 67: 1759-1816, 1986) の相当するセグメントに相補性であるが、それらの5'末端に鋳型DNAとハイブリダイズしなかった制限切断部位配列を含有する。増幅の実施後サイズ690 bpの増幅体を制限酵素EcoR I により末端で切断し、予めEcoR I およびSma I で線状化した発現ベクター p Q E 3 0 中に結合した。このベクターは、p Q E - V P 2 6 * と命名された。

【0024】

実施例4:

a) 組換えタンパク質 p M A L - V P 2 6 * および p Q E - V P 2 6 * の調製

組換えタンパク質 p M A L - V P 2 6 * の発現および増幅は、製造業者の説明書に従い (New England Biolabs, 800-21S)、親和性クロマトグラフィーを用いて行った。組換えタンパク質 p Q E - V P 2 6 * の発現および精製は、製造業者の指示書に従い (Clontech, Talon Metal Affinity Resin, PT1320-1)、本来の条件下に金属親和性クロマトグラフィーを用いて行った。

【0025】

b) p M a l - V P 2 6 * または p Q E - V P 2 6 * 固相 I (新規システム) の調製

B型マイクロタイトレーションプレート (Greinerから) を、各ウェルあたり 110 μl の被覆溶液 (50 mM炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.5 中 1 μg/ml の組換え p M A L - V P 2 6 * または 1 μg/ml の組換え p Q E - V P 2 6 *) と 4 °C で 18 時間インキュベートした。マイクロタイトレーションプレートのウェルを、ついで各場合 300 μl の洗浄溶液 (50 mM T r i s / E D T A、pH 7.0 ~ 7.4 + 0.5 % B S A) で 3 回洗浄した。抗-VZV I g G 酵素イムノアッセイにより試験するためには、組換えタンパク質 p Q E - V P 2 6 * を上述の場合と同じ条件下で被覆したが、濃度は 2 μg/ml を使用した。

【0026】

c) 抗-VZV I g M 抗体を検出するための酵素イムノアッセイ

抗-VZV I g M 抗体を検出するための酵素イムノアッセイは以下のように実施した。血清は最初 P O D サンプル緩衝液 (Behring Diagnostics, OWBE 945) 中 1 : 84 に希釈し

10

20

30

40

50

、ついで1：2の比率で、RF吸着剤(Behring Diagnostics, OUCG 945)と室温において15分間予めインキュベートした。各場合とも上述のように予め希釈した血清100μlを実施例4bに記載したようにして調製したマイクロタイトレーションプレートのウェル中37℃において1時間インキュベートした。プレートをPOD洗浄溶液(Behring Diagnostics, OSEW 965)で3回洗浄したのち、微生物接合緩衝液(Behring Diagnostics, OUWW 935)中pQE-VP26*の場合には1：25、pMAL-VP26*の場合には1：50の比率で希釈した抗-ヒトIgM/POD接合体(Behring Diagnostics, バッチ4241313)100μlをピペットで加えた。1時間(+37℃)でインキュベーションしたのち、さらに3回洗浄工程を行った。結合したVZV抗体分子の数に直接相関関係を有する結合ペルオキシダーゼ活性を、H₂O₂/テトラメチルベンジジン(Behring Diagnostics, OUVG 945)を加えて測定した。室温に30分間置いたのち基質の変換を0.5M硫酸(Behring Diagnostics, OSFA 965)を加えて停止させ、吸光を450nmで測定した。

10

【0027】

抗-VZV-陽性および抗-VZV-陰性血清をEnzygnost抗-VZV/IgM標準システム(Behring Diagnostics, OWLW 155)および新規酵素イムノアッセイの両方で検討した。検討結果(吸光単位)を表2に示す。

ELISA評価においては、pMAL-VP26*はIgM診断に対し、計算カットオフ=187(陰性血清の平均値+3×標準偏差)で、感度69%(n=13)および特異性98%(n=41)、また自由に選択されたカットオフ120では感度85%および特異性95%を与えることが見出された。pQE-VP26*を用いた場合には計算カットオフ=173(陰性血清の平均値+3×標準偏差)で、感度は62%(n=13)、特異性は100%(n=41)、また自由に選択されたカットオフ150では感度77%、特異性95%であった。

20

【0028】

実施例5：

a) 抗-VZV IgG抗体を検出するための酵素イムノアッセイ

抗-VZV IgG抗体を酵素イムノアッセイで検出するためには、PODサンプル緩衝液(Behring Diagnostics, OWBE 945)中に予め1：100に希釈した血清100μlを、各々の場合実施例4bに記載したようにして調製したマイクロタイタープレート中にピペットで添加し、37℃において1時間インキュベートした。プレートをPOD洗浄溶液(Behring Diagnostics, OSEW 965)により3回洗浄したのち、微生物接合緩衝液(Behring Diagnostics, OUWW 935)中1：50に希釈した抗-ヒトIgG/POD接合体(Behring Diagnostics, バッチ243713)100μlをピペットで加えた。1時間(+37℃)インキュベーション後に、さらに3回洗浄工程を行った。結合したVZV抗体分子の数に直接相関関係を有する結合ペルオキシダーゼ活性を、H₂O₂/テトラメチルベンジジン(Behring Diagnostics, OUVG 945)の添加により測定した。室温に30分間置いたのち、基質の変換を0.5M硫酸(Behring Diagnostics, OSFA 965)を加えて停止させ、吸光を450nmで測定した。

30

抗-VZV-陽性および抗-VZV-陰性血清はEnzygnost抗-VZV/IgG標準システム(Behring Diagnostics, OWLT 155)および新規な酵素イムノアッセイの両方で検討した。検討結果(吸光単位)は表3に示す。

40

【0029】

ELISA評価においては、pMAL-VP26*はIgG診断に対し、計算カットオフ210(陰性血清の平均値+3×標準偏差)で、感度35%(n=49)、特異性100%(n=5)、また自由に選択されたカットオフ100では感度59%、特異性80%を与えることが見出された。pQE-VP26*を用いた場合には計算カットオフ215(陰性血清の平均値+3×標準偏差)で感度53%、特異性100%、また自由に選択されたカットオフ130では感度82%、特異性80%であった。

【0030】

【表4】

50

表 2

番号	状態	ELISA IgM 標準 接合 1 : 50 血清 1 : 42	ELISA IgM pMAL-VP26* 1 μ g/ml 接合 1 : 50 血清 1 : 168	ELISA IgM pQE-VP26* 1 μ g/ml 接合 1 : 25 血清 1 : 168	
1	—	11	86	62	
2	—	22	38	100	10
3	—	16	31	72	
4	—	57	23	88	
5	+	133	399	88	
6	—	0	161	118	
7	—	10	28	77	
8	—	47	45	60	
9	—	7	16	63	20
10	+	132	173	160	
11	—	71	117	70	
12	—	0	32	75	
13	—	17	75	66	
14	—	11	16	57	
15	—	23	27	73	
16	—	11	27	59	
17	+	979	1720	532	30
18	—	9	18	44	
19	—	34	30	71	
20	+	293	630	215	
21	+	126	139	259	
22	—	61	277	169	
23	+	292	808	154	
24	+	581	98	115	40
25	+	321	821	304	
26	+	509	519	375	
27	+	298	>2500	694	

【0031】

【表5】

表 2 つづき

番号	状態	ELISA IgM 標準 接合 1 : 50 血清 1 : 42	ELISA IgM pMAL-VP26* 1 μ g/ml 接合 1 : 50 血清 1 : 168	ELISA IgM pQE-VP26* 1 μ g/ml 接合 1 : 25 血清 1 : 168	
28	—	29	36	29	
29	—	16	19	104	10
30	—	8	13	44	
31	—	3	23	47	
32	—	50	23	101	
33	—	9	32	117	
34	+	250	187	204	
35	+	291	1079	470	
36	—	26	52	44	20
37	+	139	66	123	
38	—	38	87	49	
39	—	26	25	40	
40	—	49	13	63	
41	—	5	20	34	
42	—	27	43	80	
43	—	51	49	161	
44	—	8	38	100	30
45	—	21	38	133	
46	—	10	33	82	
47	—	29	18	35	
48	—	30	66	97	
49	—	21	35	97	
50	—	56	64	82	
51	—	5	40	56	40
52	—	97	55	37	
53	—	2	19	35	
54	—	31	21	39	

【 0 0 3 2 】

【表 6】

表 3

番号	状態	ELISA IgG 標準 接合 1 : 50 血清 1 : 231	ELISA IgG pMAL-VP26* 1 μ g/ml 接合 1 : 50 血清 1 : 100	ELISA IgG pQE-VP26* 2 μ g/ml 接合 1 : 50 血清 1 : 100	
1	+	1014	176	137	
2	+	302	87	356	10
3	+	642	97	314	
4	+	612	87	0	
5	+	1383	181	215	
6	+	930	132	118	
7	+	653	39	145	
8	+	915	47	469	
9	+	570	23	220	20
10	+	1770	131	253	
11	+	990	104	76	
12	+	698	227	335	
13	+	141	62	501	
14	+	338	39	44	
15	+	556	113	246	
16	+	791	45	423	
17	+	2982	264	258	30
18	+	1205	192	295	
19	+	694	80	100	
20	+	1143	270	340	
21	+	1405	377	256	
22	+	539	42	72	
23	+	2449	533	530	
24	+	1923	1117	620	40
25	+	1420	95	54	
26	一次+	1194	277	66	

【0033】

【表7】

表3つづき

番号	状態	ELISA IgG 標準 接合1:50 血清1:231	ELISA IgG pMAL-VP26* 1 μ g/ml 接合1:50 血清1:100	ELISA IgG pQE-VP26* 2 μ g/ml 接合1:50 血清1:100	
27	带状疱疹+	2087	341	204	
28	+	549	89	172	10
29	—	34	87	120	
30	—	76	55	128	
31	—	0	38	101	
32	—	41	94	116	
33	—	8	147	177	
34	+	1315	860	340	
35	+	1629	282	187	
36	+	469	218	287	20
37	+	693	181	346	
38	+	1449	296	169	
39	+	1139	85	193	
40	+	1509	64	118	
41	+	457	110	159	
42	+	343	304	545	
43	+	1455	511	244	30
44	+	1030	174	245	
45	+	528	50	184	
46	+	510	161	353	
47	+	300	94	290	
48	+	490	91	157	
49	+	888	348	277	
50	+	1301	83	195	
51	+	704	247	139	40
52	+	2523	2325	757	
53	+	447	99	153	
54	+	848	149	167	

【0034】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：235

配列の型：アミノ酸

鎖の数：

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

ハイボセティカル：Y e s

10

起源：

生物名：水痘帯状疱疹ウイルス

株名：E l l e n

直接の起源：

クローン名：V P 2 6

ゲノム内での位置

染色体上の位置：O R F 2 3

20

配列：

Met Thr Gln Pro Ala Ser Ser Arg Val Val Phe Asp Pro Ser Asn Pro

1 5 10 15

Thr Thr Phe Ser Val Glu Ala Ile Ala Ala Tyr Thr Pro Val Ala Leu

20 25 30

Ile Arg Leu Leu Asn Ala Ser Gly Pro Leu Gln Pro Gly His Arg Val

35 40 45

Asp Ile Ala Asp Ala Arg Ser Ile Tyr Thr Val Gly Ala Ala Ala Ser

50 55 60

Ala Ala Arg Ala Arg Ala Asn His Asn Ala Asn Thr Ile Arg Arg Thr

65 70 75 80

Ala Met Phe Ala Glu Thr Asp Pro Met Thr Trp Leu Arg Pro Thr Val

85 90 95

Gly Leu Lys Arg Thr Phe Asn Pro Arg Ile Ile Arg Pro Gln Pro Pro

100 105 110

30

40

Asn Pro Ser Met Ser Leu Gly Ile Ser Gly Pro Thr Ile Leu Pro Gln
 115 120 125
 Lys Thr Gln Ser Ala Asp Gln Ser Ala Leu Gln Gln Pro Ala Ala Leu
 130 135 140
 Ala Phe Ser Gly Ser Ser Pro Gln His Pro Pro Pro Gln Thr Thr Ser
 145 150 155 160
 Ala Ser Val Gly Gln Gln Gln His Val Val Ser Gly Ser Ser Gly Gln
 165 170 175
 Gln Pro Gln Gln Gly Ala Gln Ser Ser Thr Val Gln Pro Thr Thr Gly
 180 185 190
 Ser Pro Pro Ala Ala Gln Gly Val Pro Gln Ser Thr Pro Pro Pro Thr
 195 200 205
 Gln Asn Thr Pro Gln Gly Gly Lys Gly Gln Thr Leu Ser His Thr Gly
 210 215 220
 Gln Ser Gly Asn Ala Ser Arg Ser Arg Arg Val
 225 230 235

10

20

配列番号：2

配列の長さ：705

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

30

配列の種類：DNA (ゲノム)

ハイボセティカル：Yes

起源：

生物名：水痘帯状疱疹ウイルス

株名：Ellen

ゲノム内での位置

染色体上の位置：ORF23

40

配列：

ATGACACAAC CCGCATCGTC TCGTGTAGTC TTTGATCCCA GCAACCCAC CACATTTTCG 60
GTGGAAGCAA TTGCGGCTTA CACCCCGTT GCTTTAATAC GACTTTTAAA CGCCAGTGGA 120
CCTTTGCAAC CTGGTCACCG TGTGGACATC GCTGATGCCA GAAGCATTTA CACCGTGGGA 180
GCCGCGGCCA GTGCCGCGCG TGCACGCGCT AACCATAATG CAAATACGAT ACGCCGAACG 240
GCCATGTTTG CCGAGACTGA CCCTATGACA TGGTTAAGAC CAACGGTTGG CTTAAAACGT 300
ACGTTTAACC CGCGTATTAT ACGACCACAA CCCCCAAATC CATCCATGAG TTTGGGAATC 360
TCGGGGCCTA CTATATTGCC GCAAAAAACA CAGAGCGCCG ATCAGTCTGC TTTACAACAG 420
CCCGCCGCGT TGGCGTTTTT GGGATCATCC CCGCAACACC CCCCACCTCA AACGACGTCG 480
GCATCCGTTG GACAACAGCA ACACGTGGTG TCGGGTCTT CTGGACAACA ACCGCAACAG 540
GGAGCACAGT CAAGCACTGT CCAGCCAACA ACCGGATCAC CGCCCGCGGC CCAAGGCGTG 600
CCACAGTCTA CCGCGCCCCC AACCCTAAAT ACCCCCAGG GGGGTAAGGG ACAGACCTTG 660
TCACACACGG GACAATCTGG AAACGCTTCA AGAAGTCGTA GGGTG 705

10

配列番号：3

配列の長さ：37

20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル：No

起源：

生物名：水痘帯状疱疹ウイルス

30

株名：Ellen

ゲノム内での位置

染色体上の位置：ORF 23

配列：

GGAATTCGG ATGACACAAC CCGCATCGTC TCGTGTA

37

配列番号：4

配列の長さ：38

40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル：No

起源：

生物名：水痘帯状疱疹ウイルス

株名：E11en

10

ゲノム内での位置

染色体上の位置：ORF 2 3

配列：

GCTCTAGATT ACACCCTACG ACTTCTTGAA GCGTTTCC

38

配列番号：5

配列の長さ：3 4

配列の型：核酸

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル：No

起源：

生物名：水痘帯状疱疹ウイルス

株名：E11en

30

ゲノム内での位置

染色体上の位置：ORF 2 3

配列：

GGAATTCCGC GCCTGCAGGT CGACACTAGT GGAT

34

配列番号：6

配列の長さ：3 8

配列の型：核酸

40

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル：No

起源：

生物名：水痘帯状疱疹ウイルス

株名：E11en

ゲノム内での位置

10

染色体上の位置：ORF 2 3

配列：

GCTCTAGATT ACACCCTACG ACTTCTTGAA GCGTTTCC

38

配列番号：7

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル：No

起源：

生物名：水痘帯状疱疹ウイルス

株名：E11en

ゲノム内での位置

30

染色体上の位置：ORF 2 3

配列：

CGGATCCGAT CCCAGCAACC CCACCAC

27

配列番号：8

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

40

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

ハイボセティカル：No

起源：

生物名：水痘帯状疱疹ウイルス

株名：E11en

ゲノム内での位置

染色体上の位置：ORF 23

10

配列：

GCTCTAGATT ACACCCTACG ACTTCTTGAA GCGTTTCC

38

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 R 1/92 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 R 1:92

- (72)発明者 マルクス・アイクマン
 ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 マルブルク, シュテュムペルシュタール 1 0 アー
- (72)発明者 ドロテア・ギクルホルン
 ドイツ連邦共和国 3 5 0 7 5 グラーデンバハ, クリプシュタインシュトラッセ 4
- (72)発明者 クラウス・ラートザク
 ドイツ連邦共和国 3 5 0 3 7 マルブルク, ウーファースシュトラッセ 1 4
- (72)発明者 ハンスペーター・ハウザー
 ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 エルンハウゼン, フォイアードルンヴェーク 6
- (72)発明者 ベルンハルト・ギーゼンドルフ
 ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 ミヒエルバハ, エーヴィゲスター 2 4

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 Journal of General Virology, 1992, Vol.73, p.2709-2713
 Journal of General Virology, 1986, Vol.67, p.1759-1816

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
 C12N 15/00-15/90
 C07K 14/00-14/825
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq