

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02009/148150

発行日 平成23年11月4日(2011.11.4)

(43) 国際公開日 平成21年12月10日(2009.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 B O 2 4
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 Z N A L	4 B O 6 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
CO 7 K 16/10 (2006.01)	CO 7 K 16/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

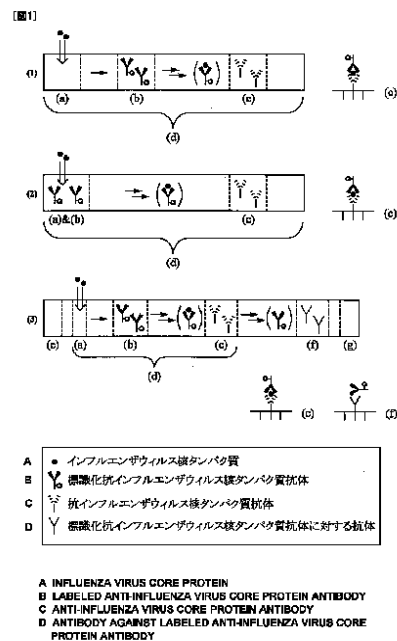
出願番号 特願2010-515934 (P2010-515934)	(71) 出願人 305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福 3 1 9 0
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/060328	
(22) 国際出願日 平成21年6月5日(2009.6.5)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-149300 (P2008-149300)	(71) 出願人 505234030 エスシーワールド株式会社 富山県富山市高田 5 2 9 番地
(32) 優先日 平成20年6月6日(2008.6.6)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2009-50066 (P2009-50066)	(71) 出願人 000162478 協和メデックス株式会社 東京都中央区晴海一丁目8番10号
(32) 優先日 平成21年3月4日(2009.3.4)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
	(74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志
	(74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫
	(74) 代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウィルス検出用デバイス

(57) 【要約】

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が支持体上に不動化された検出領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備することを特徴とする、検体中のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス；ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が担体に固定化されてなる固相を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が支持体上に不動化された検出領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備することを特徴とする、検体中のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス。

**【請求項 2】**

抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 1）が支持体上に不動化された検出領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備し、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 2）に標識が結合した標識化抗体が検体供給領域より供給され、抗体 1 と抗体 2 の少なくとも 1 つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする検体中のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス。

10

**【請求項 3】**

抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 1）が支持体上に不動化された検出領域、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 2）に標識が結合した標識化抗体が移動可能なように支持体上に保持されている標識試薬領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備し、抗体 1 と抗体 2 の少なくとも 1 つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、検体中のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス。

**【請求項 4】**

さらに、展開液供給領域、余剰液吸収領域及び検体供給確認領域からなる群より選ばれる領域を少なくとも 1 つを具備する、請求項 2 又は 3 記載のデバイス。

20

**【請求項 5】**

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のデバイス。

**【請求項 6】**

ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、A 型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、B 型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である、請求項 5 記載のデバイス。

**【請求項 7】**

ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：8 ~ 13 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：22 ~ 27 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む請求項 6 記載のデバイス。

30

**【請求項 8】**

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のデバイス。

**【請求項 9】**

ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、B 型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A 型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である請求項 8 記載のデバイス。

40

**【請求項 10】**

ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：14 で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：28 で表されるアミノ酸配列を含む請求項 9 記載のデバイス。

**【請求項 11】**

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が担体に固定化されてなる固相を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

**【請求項 12】**

50

抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体１）が担体に固定化されてなる固相と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体２）を含有する試薬とを含有し、抗体１と抗体２の少なくとも１つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

【請求項１３】

抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体１）が担体に固定化されてなる固相と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体２）に標識が結合した標識化抗体を含有する試薬とを含有し、抗体１と抗体２の少なくとも１つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

10

【請求項１４】

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が担体に固定化されてなる固相と、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物に標識が結合した標識化抗原類似物を含有する試薬とを含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

【請求項１５】

インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物が担体に固定化されてなる固相と、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体を含有する試薬とを含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

20

【請求項１６】

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗Ａ型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である、請求項１１～１５のいずれかに記載のキット。

【請求項１７】

ヒト抗Ａ型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、Ａ型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、Ｂ型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗Ａ型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である、請求項１６記載のキット。

【請求項１８】

ヒト抗Ａ型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：８～１３のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：２２～２７のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む請求項１７記載のキット。

30

【請求項１９】

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗Ｂ型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である、請求項１１～１５のいずれかに記載のキット。

【請求項２０】

ヒト抗Ｂ型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、Ｂ型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、Ａ型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗Ｂ型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である請求項１９記載のキット。

40

【請求項２１】

ヒト抗Ｂ型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：１４で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：２８で表されるアミノ酸配列を含む請求項２０記載のキット。

【請求項２２】

（１）検体と、担体上に固定化されているヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とを反応させる工程；及び、

（２）工程（１）で生じた物理的变化を測定する工程

を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

【請求項２３】

50

(1) 検体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 (抗体1) とを反応させて、担体上に抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)において、担体上に形成した該複合体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 (抗体2) とを反応させる工程；及び、

(3) 工程(2)で生じた物理的变化を測定する工程

を含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

【請求項24】

物理的变化が、濁度変化又は質量変化である請求項22又は23記載の方法。

10

【請求項25】

(1) 検体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 (抗体1) とを反応させて、担体上に抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)において、担体上に形成した該複合体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 (抗体2) に標識が結合した標識化抗体 (標識化抗体2) とを反応させて、担体上に抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体を形成させる工程；

(3) 工程(2)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

(4) 工程(3)後の担体上の抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体の中の標識を測定する工程

を含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

20

【請求項26】

(1) 検体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 (抗体2) に標識が結合した標識化抗体 (標識化抗体2) とを反応させて、標識化抗体2 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)において形成した複合体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 (抗体1) とを反応させて、担体上に抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体を形成させる工程；

(3) 工程(2)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

(4) 工程(3)後の担体上の抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体の中の標識を測定する工程

を含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

30

【請求項27】

(1) 検体と、担体上に固定化されているヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とを、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物に標識が結合した標識化抗原類似物の共存下に反応させて、担体上に、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体、及び、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - 標識化抗原類似物の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

(3) 工程(2)後の担体上の複合体中の標識を測定する工程

を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

40

【請求項28】

(1) 検体と、担体上に固定化されているインフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物とを、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体の共存下に反応させて、担体上に、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物 - 標識化抗体の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

50

(3) 工程(2)後の担体上の複合体中の標識を測定する工程  
を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

【請求項29】

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である請求項22～28のいずれかに記載の方法。

【請求項30】

ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、A型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、B型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である請求項29記載の方法。

【請求項31】

ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：8～13のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：22～27のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む請求項30記載の方法。

【請求項32】

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である請求項22～28のいずれかに記載の方法。

【請求項33】

ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、B型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である請求項32記載の方法。

【請求項34】

ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：28で表されるアミノ酸配列を含む請求項33記載の方法。

【請求項35】

重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：8～13のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：22～27のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む、A型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、B型インフルエンザウィルスの核タンパク質と反応しないヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体。

【請求項36】

B型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A型インフルエンザウィルスの核タンパク質と反応しないヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体。

【請求項37】

重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：28で表されるアミノ酸配列を含む、B型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A型インフルエンザウィルスの核タンパク質と反応しないヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス、インフルエンザウィルスの検出または定量用キット、インフルエンザウィルスの検出または定量方法、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、並びに、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

抗原抗体反応を用いる免疫学的測定法は、検体中の測定対象物の測定に広汎に使用されており、酵素免疫測定法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）、化学発光酵素免疫測定法、比濁免疫測定法、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いる測定法等、多くの測定法が開発されている。

## 【0003】

近年、簡便さと迅速さという観点から、イムノクロマトグラフィーが注目を集めており、すでに当該手法に基づく多くの製品が流通している。イムノクロマトグラフィーは、その測定原理から、フロースルー型およびラテラルフロー型に分類されるが、近年では、ラテラルフロー型のイムノクロマトグラフィーが主流となっている。ラテラルフロー型のイムノクロマトグラフィーとしては、移動可能なように支持体に担持された、測定対象物に結合する抗体に標識が結合した標識化抗体が移動可能なように支持体に担持されている領域と、測定対象物に結合する抗体が不動化されて存在する領域とを具備するデバイスが報告されている。

10

## 【0004】

インフルエンザは、古くから世界的な流行を周期的に繰り返し、その度に多くの死者を出してきたが、1931年に原因ウイルスが検出され原因解明への道が開かれた。インフルエンザ病原体のウイルスはウイルス内部にある可溶性の核タンパク質（nucleoprotein：以下、NPと略記する）の抗原性によってA型、B型又はC型の3タイプに分類されている。更にウイルス表面に存在する赤血球凝集素（hemagglutinin：HAと略記する）とノイラミニターゼ（neuraminidase：NAと略記する）という2つのエンベロープ（envelope）糖タンパク質の抗原性によって亜型に分類されている。

20

## 【0005】

1972年よりインフルエンザの予防には、エーテル処理後ホルマリンで不活化したワクチンが用いられてきた。近年、予防に用いられるワクチン以外に治療薬として抗インフルエンザ薬が見出され広く用いられるようになった。これらの治療薬としては、インフルエンザB型ウイルスに適応する塩酸アマンタジンや、インフルエンザA型ウイルスとA型に適応するザナビル、リン酸オセルタミビル等である。

## 【0006】

これらの治療薬を選択するにあたっては、検体中のインフルエンザウイルスを検出し、感染がインフルエンザウイルスによるものであって、ウイルスのタイプがA型又はB型であるかを特定することが重要である。また、インフルエンザA型ウイルスは、インフルエンザB型ウイルスに比べ感染力が強く、重篤な症状を引き起こすため、早期の治療には感染ウイルスのタイプ特定が重要である。

30

## 【0007】

従来、インフルエンザウイルスを抗インフルエンザウイルス抗体によって検出することが行われてきた。インフルエンザウイルスに対する抗体としては、HA領域を認識する抗体、NA領域を認識する抗体、マトリックスタンパク（M1等）を認識する抗体、非構造タンパク質（NS1等）を認識する抗体、NPを特異的に認識する抗体などが知られている。また、ヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体として、非特許文献1、非特許文献2に記載の抗体が知られている。

40

## 【0008】

近年、インフルエンザウイルスを簡便かつ迅速に検出するためのイムノクロマトグラフィー用デバイスが開発されており、[特許文献1～14参照]、数多くの製品が市場に流通している[例えば、「エスプラインインフルエンザA&B-N」（富士レピオ社製）；「QuickVueラピッドSPinflu」（DSファーマバイオメディカル社製）；「ボクテムインフルエンザA/B」（大塚製薬・シスメックス社製）；「クリアビューINFLUENZA A/B」（三和化学社製）；「クイックS-インフルA・B「生研」」（デンカ生研社製）；「クイックEX-Flu「生研」」（デンカ生研社製）；「

50

ラピッドテストFLUスティック」(第一化学薬品社製);「キャピリアFlu A; B」(アルフレッサファーマ社製);「クイックチェサーFlu A, B」(ミズホメディー社製)】。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】W02005/007697パンフレット

【特許文献2】W02005/007698パンフレット

【特許文献3】実用新案登録第3088698号公報

【特許文献4】特開2004-279208号公報

【特許文献5】特開2004-279158号公報

【特許文献6】特開2006-189317号公報

【特許文献7】特開2006-194687号公報

【特許文献8】特開2006-194688号公報

【特許文献9】特開2007-93292号公報

【特許文献10】特開2007-33293号公報

【特許文献11】特開2006-153523号公報

【特許文献12】特開2006-67979号公報

【特許文献13】特開2000-55918号公報

【特許文献14】特開2007-33293号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Journal of General Virology Vol.64, p.697-700 (1983)

【非特許文献2】Nature Vol.453, p.667-672 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、これらのデバイスで使用されている抗体はいずれも非ヒト抗体であり、感度が充分でなく、また、変異を繰り返すインフルエンザウィルスに対する特異性が適用十分なものではなかった。そこで、充分な感度が得られ、広汎な特異性のあるインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット、インフルエンザウィルス検出又は定量方法、並びに、インフルエンザウィルス検出又は定量に好適な抗体の開発が求められていた。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本願発明者らは、当該課題を解決すべく鋭意検討した結果、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体がインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス、及び、インフルエンザウィルス検出又は定量用キットに用いられ得る、という知見を見出し、さらに、インフルエンザワクチンを接種したヒトより取り出したリンパ球から、高親和性を有する抗体を取得できる、という知見を見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の〔1〕～〔37〕に関する。

【0013】

〔1〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が支持体上に不動化された検出領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備することを特徴とする、検体中のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス。

〔2〕 抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体(抗体1)が支持体上に不動化された検出領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備し、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体(抗体2)に標識が結合した標識化抗体が検体供給領域より供給され、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする検体中のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス。

10

20

30

40

50

〔 3 〕 抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 1）が支持体上に不動化された検出領域、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 2）に標識が結合した標識化抗体が移動可能なように支持体上に保持されている標識試薬領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備し、抗体 1 と抗体 2 の少なくとも 1 つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、検体中のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス。

〔 4 〕 さらに、展開液供給領域、余剰液吸収領域及び検体供給確認領域からなる群より選ばれる領域を少なくとも 1 つを具備する、〔 2 〕又は〔 3 〕記載のデバイス。

〔 5 〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である、〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかに記載のデバイス。

〔 6 〕 ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、A 型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、B 型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である、〔 5 〕記載のデバイス。

〔 7 〕 ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：8～13 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：22～27 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む〔 6 〕記載のデバイス。

〔 8 〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である、〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかに記載のデバイス。

〔 9 〕 ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、B 型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A 型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である〔 8 〕記載のデバイス。

〔 10 〕 ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：14 で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：28 で表されるアミノ酸配列を含む〔 9 〕記載のデバイス。

〔 11 〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が担体に固定化されてなる固相を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

〔 12 〕 抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 1）が担体に固定化されてなる固相と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 2）を含有する試薬とを含有し、抗体 1 と抗体 2 の少なくとも 1 つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

〔 13 〕 抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 1）が担体に固定化されてなる固相と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体 2）に標識が結合した標識化抗体を含有する試薬とを含有し、抗体 1 と抗体 2 の少なくとも 1 つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

〔 14 〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が担体に固定化されてなる固相と、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物に標識が結合した標識化抗原類似物を含有する試薬とを含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

〔 15 〕 インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物が担体に固定化されてなる固相と、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体を含有する試薬とを含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

〔 16 〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である、〔 11 〕～〔 15 〕のいずれかに記載のキット。

〔 17 〕 ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、A 型インフルエンザ

10

20

30

40

50



ウィルス核タンパク質と特異的に反応し、B型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である、〔16〕記載のキット。

〔18〕 ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：8～13のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：22～27のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む〔17〕記載のキット。

〔19〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である、〔11〕～〔15〕のいずれかに記載のキット。

〔20〕 ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、B型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である〔19〕記載のキット。

〔21〕 ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：28で表されるアミノ酸配列を含む〔20〕記載のキット。

〔22〕 (1) 検体と、担体上に固定化されているヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とを反応させる工程；及び、

(2) 工程(1)で生じた物理的变化を測定する工程

を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

〔23〕 (1) 検体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体(抗体1)とを反応させて、担体上に抗体1-インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)において、担体上に形成した該複合体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体(抗体2)とを反応させる工程；及び、

(3) 工程(2)で生じた物理的变化を測定する工程

を含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

〔24〕 物理的变化が、濁度変化又は質量変化である〔22〕又は〔23〕記載の方法

〔25〕 (1) 検体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体(抗体1)とを反応させて、担体上に抗体1-インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)において、担体上に形成した該複合体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体(抗体2)に標識が結合した標識化抗体(標識化抗体2)とを反応させて、担体上に抗体1-インフルエンザウィルス核タンパク質-標識化抗体2の複合体を形成させる工程；

(3) 工程(2)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

(4) 工程(3)後の担体上の抗体1-インフルエンザウィルス核タンパク質-標識化抗体2の複合体の中の標識を測定する工程

を含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

〔26〕 (1) 検体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体(抗体2)に標識が結合した標識化抗体(標識化抗体2)とを反応させて、標識化抗体2-インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)において形成した複合体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体(抗体1)とを反応させて、担体上に抗体1-インフルエンザウィルス核タンパク質-標識化抗体2の複合体を形成させる工程；

(3) 工程(2)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

10

20

30

40

50

(4) 工程(3)後の担体上の抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体の中の標識を測定する工程

を含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

〔27〕 (1) 検体と、担体上に固定化されているヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とを、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物に標識が結合した標識化抗原類似物の共存下に反応させて、担体上に、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体、及び、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - 標識化抗原類似物の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

(3) 工程(2)後の担体上の複合体中の標識を測定する工程

を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

〔28〕 (1) 検体と、担体上に固定化されているインフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物とを、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体の共存下に反応させて、担体上に、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物 - 標識化抗体の複合体を形成させる工程；

(2) 工程(1)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

(3) 工程(2)後の担体上の複合体中の標識を測定する工程

を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

〔29〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である〔22〕～〔28〕のいずれかに記載の方法。

〔30〕 ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、A型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、B型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である〔29〕記載の方法。

〔31〕 ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：8～13のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：22～27のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む〔30〕記載の方法。

〔32〕 ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である〔22〕～〔28〕のいずれかに記載の方法。

〔33〕 ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が、B型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A型インフルエンザウィルスの核タンパク質とは反応しないヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体である〔32〕記載の方法。

〔34〕 ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：28で表されるアミノ酸配列を含む〔33〕記載の方法。

〔35〕 重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：8～13のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：22～27のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む、A型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、B型インフルエンザウィルスの核タンパク質と反応しないヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体。

〔36〕 B型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A型インフルエンザウィルスの核タンパク質と反応しないヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体。

〔37〕 重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：28で表されるアミノ酸配列を含む、B型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A型インフルエンザウィルスの核タンパク質と反応しないヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、高感度で、広汎な特異性のあるインフルエンザウイルス検出又は定量用デバイス、インフルエンザウイルス検出又は定量用キット、インフルエンザウイルス検出又は定量方法、並びに、インフルエンザウイルス検出又は定量に好適な抗体が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明のデバイスの反応様式を示す図（イムノクロマトグラフィー反応図）である。（a）検体供給領域；（b）標識試薬領域；（c）検出領域；（d）検体移動領域；（e）展開液供給領域；（f）検体供給確認領域；（g）余剰液吸収領域。（1）は、検体供給領域、標識試薬領域、検体移動領域及び検出領域を具備する本発明のデバイスの反応様式を示し、（2）は、（1）の検体供給領域が標識試薬領域を兼ねている本発明のデバイスの反応様式を示し、（3）は、（1）にさらに展開液供給領域、検体供給確認領域及び余剰液吸収領域を具備する本発明のデバイスの反応様式を示す。

10

【図2-a】ヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体を用いる本発明のデバイス（実施例1のデバイス）のイムノクロマトグラムを示す写真である。図2-aは、検出領域で使用される抗体（図中では、固相と表記）と、標識化に使用される抗体（図中では、標識と表記）との種々の組み合わせを用いたデバイスのイムノクロマトグラムを示す写真である。

20

【図2-b】ヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体を用いる本発明のデバイス（実施例1のデバイス）のイムノクロマトグラムを示す写真である。図2-bは、検出領域で使用される抗体（図中では、固相と表記）として23G268を、標識化に使用される抗体（図中では、標識と表記）として23G285を用いたデバイスのイムノクロマトグラムを示す写真である。

【図3】ヒト抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体を用いる本発明のデバイス（実施例1のデバイス）のイムノクロマトグラムを示す写真である。

【図4-a】本発明のヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体の製造において用いる、抗体鎖発現ベクター及び抗体鎖発現ベクターを示す図である。（図4-a）は、抗体重鎖発現用ベクターを示す図である。

30

【図4-b】本発明のヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体の製造において用いる、抗体鎖発現ベクター及び抗体鎖発現ベクターを示す図である。（図4-b）は、抗体軽鎖発現用ベクター-1を示す図である。

【図4-c】本発明のヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体の製造において用いる、抗体鎖発現ベクター及び抗体鎖発現ベクターを示す図である。（図4-c）は、抗体軽鎖発現用ベクター-2を示す図である。

【図5-a】本発明のヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体の、インフルエンザウイルス核タンパク質抗原への競合性阻害実験（特異的結合試験）の結果を示す図である。

40

【図5-b】本発明のヒト抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体の、インフルエンザウイルス核タンパク質抗原への競合性阻害実験（特異的結合試験）の結果を示す図である。

【図6】本発明のヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体の特異性を示す図である。

【図7】本発明のヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体の組み合わせと、感度及び特異性との関係の結果を示す図である。

【図8】本発明のヒト抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体と市販のマウス抗B型インフルエンザウイルス抗体との組み合わせと、感度及び特異性との関係の結果を示す図である。

50

【図 9 - a】市販のマウス抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 M322211 のインフルエンザウィルスとの結合能を示すセンサーグラムである。

【図 9 - b】本発明のヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 23G272 のインフルエンザウィルスとの結合能を示すセンサーグラムである。

【図 9 - c】本発明の各抗体におけるインフルエンザウィルス結合能を示した図である。

【図 10】本発明の各抗 A 型インフルエンザ核タンパク質抗体における抗原結合能を示した図である。

【図 11 - a】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G268 H鎖（配列番号：1）をコードする DNA を示した図である。下線部はフレームワーク 1、2、3 に相当する DNA 配列を、囲みは CDR 1、2、3 に相当する DNA 配列を示す。

【図 11 - b】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G268 L鎖（配列番号：15）をコードする DNA を示した図である。下線部はフレームワーク 1、2、3 に相当する DNA 配列を、囲みは CDR 1、2、3 に相当する DNA 配列を示す。

【図 11 - c】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G268 H鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：8）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR 1、2、3 を表す。

【図 11 - d】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G268 L鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：22）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR 1、2、3 を表す。

【図 12 - a】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G272 H鎖（配列番号：2）をコードする DNA を示した図である。下線部はフレームワーク 1、2、3 に相当する DNA 配列を、囲みは CDR 1、2、3 に相当する DNA 配列を示す。

【図 12 - b】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G272 L鎖（配列番号：16）をコードする DNA を示した図である。下線部はフレームワーク 1、2、3 に相当する DNA 配列を、囲みは CDR 1、2、3 に相当する DNA 配列を示す。

【図 12 - c】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G272 H鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：9）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR 1、2、3 を表す。

【図 12 - d】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G272 L鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：23）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR 1、2、3 を表す。

【図 13 - a】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G285 H鎖（配列番号：3）をコードする DNA を示した図である。下線部はフレームワーク 1、2、3 に相当する DNA 配列を、囲みは CDR 1、2、3 に相当する DNA 配列を示す。

【図 13 - b】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G285 L鎖（配列番号：17）をコードする DNA を示した図である。下線部はフレームワーク 1、2、3 に相当する DNA 配列を、囲みは CDR 1、2、3 に相当する DNA 配列を示す。

【図 13 - c】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G285 H鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：10）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR 1、2、3 を表す。

【図 13 - d】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G285 L鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：24）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR 1、2、3 を表す。

【図 14 - a】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G312 H鎖（配列番号：4）をコードする DNA を示した図である。下線部はフレームワーク 1、2、3 に相当する DNA 配列を、囲みは CDR 1、2、3 に相当する DNA 配列を示す。

【図 14 - b】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G312 L鎖（配列番号：18）をコードする DNA を示した図である。下線部はフレームワーク 1、2、3 に相当する DNA 配列を、囲みは CDR 1、2、3 に相当する DNA 配列を示す。

【図 14 - c】ヒト抗 A 型インフルエンザウィルスタンパク質抗体 23G312 H鎖に相当する

10

20

30

40

50

アミノ酸配列（配列番号：11）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR1、2、3を表す。

【図14-d】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G312 L鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：25）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR1、2、3を表す。

【図15-a】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G447 H鎖（配列番号：5）をコードするDNAを示した図である。下線部はフレームワーク1、2、3に相当するDNA配列を、囲みはCDR1、2、3に相当するDNA配列を示す。

【図15-b】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G447 L鎖（配列番号：19）をコードするDNAを示した図である。下線部はフレームワーク1、2、3に相当するDNA配列を、囲みはCDR1、2、3に相当するDNA配列を示す。

10

【図15-c】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G447 H鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：12）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR1、2、3を表す。

【図15-d】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G447 L鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：26）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR1、2、3を表す。

【図16-a】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G494 H鎖（配列番号：6）をコードするDNAを示した図である。下線部はフレームワーク1、2、3に相当するDNA配列を、囲みはCDR1、2、3に相当するDNA配列を示す。

20

【図16-b】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G494 L鎖（配列番号：20）をコードするDNAを示した図である。下線部はフレームワーク1、2、3に相当するDNA配列を、囲みはCDR1、2、3に相当するDNA配列を示す。

【図16-c】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G494 H鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：13）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR1、2、3を表す。

【図16-d】ヒト抗A型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G494 L鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：27）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR1、2、3を表す。

【図17-a】ヒト抗B型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G327 H鎖（配列番号：7）をコードするDNAを示した図である。下線部はフレームワーク1、2、3に相当するDNA配列を、囲みはCDR1、2、3に相当するDNA配列を示す。

30

【図17-b】ヒト抗B型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G327 L鎖（配列番号：21）をコードするDNAを示した図である。下線部はフレームワーク1、2、3に相当するDNA配列を、囲みはCDR1、2、3に相当するDNA配列を示す。

【図17-c】ヒト抗B型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G327 H鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：14）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR1、2、3を表す。

【図17-d】ヒト抗B型インフルエンザウィルスタンパク質抗体23G327 L鎖に相当するアミノ酸配列（配列番号：28）を示した図である。下線、二重下線、波線はそれぞれ、CDR1、2、3を表す。

40

【発明を実施するための形態】

【0016】

[インフルエンザウィルス検出又は定量用デバイス]

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイスは、インフルエンザウィルスの検出又は定量に使用され得るデバイスであり、具体的にはイムノクロマトグラフィー等に適したデバイスである。本発明のデバイスは、フロースルー型、ラテラルフロー型のどちらでもよい。

【0017】

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイスの1つの態様は、検出領域、

50

検体供給領域及び検体移動領域を具備し、検出領域中の支持体にヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体が不働化されていることを特徴とするデバイスである。当該デバイスは、水晶発振子マイクロバランス（ＱＣＭ）センサーやカーボンナノチューブ（ＣＮＴ）センサーに適したデバイスである。検体を検体供給領域に供給した後、検体は検体移動領域を展開し、検出領域において、検体中のインフルエンザウイルス核タンパク質と当該抗体との反応が進行し、これに伴い、検出領域における物理的変化が生じる。ここで物理的変化とは、濁度変化、質量変化等が挙げられる。この物理的変化を測定することにより、検体中のインフルエンザウイルス核タンパク質を検出又は定量することができる。インフルエンザウイルス核タンパク質はインフルエンザウイルス中に存在するので、インフルエンザウイルス核タンパク質を検出又は定量することにより、インフルエンザウイルスの検出又は定量することができる。

10

## 【 0 0 1 8 】

本発明のインフルエンザウイルス検出又は定量用デバイスの別の態様は、検出領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備し、検出領域において、当領域を構成する支持体上に抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体（抗体１）が不働化されており、抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体（抗体２）に標識が結合した標識化抗体が検体供給領域より供給され、抗体１と抗体２の少なくとも１つは、ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体であることを特徴とするデバイスである。当該デバイスは、標識試薬領域を具備しないが、標識化抗体は検体と共に検体供給領域から供給される。検体中のインフルエンザウイルス核タンパク質と標識化抗体とが反応して生成するインフルエンザウイルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体は検体移動領域を通じて、検出領域に到達する。検出領域で該複合体は、不働化された抗体１と反応し、検出領域に抗体１ - インフルエンザウイルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体を生成する。生成した該抗体１ - インフルエンザウイルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体中の標識を検出することにより、インフルエンザウイルスを検出又は定量することができる。

20

## 【 0 0 1 9 】

本発明のインフルエンザウイルス検出又は定量用デバイスの別の態様は、検出領域、検体供給領域、検体移動領域及び標識試薬領域を具備し、検出領域において、当領域を構成する支持体上に抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体（抗体１）が不働化されており、抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体（抗体２）に標識が結合した標識化抗体が標識試薬領域に移動可能なように保持されており、抗体１と抗体２の少なくとも１つは、ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体であることを特徴とするデバイスである。当該デバイスにおいて、検体供給領域に供給された検体は、検体移動領域中を展開し、標識試薬領域に到達する。標識試薬領域において、検体中のインフルエンザウイルス核タンパク質は標識化抗体と反応し、インフルエンザウイルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体を生成し、生成した該複合体はさらに検体移動領域を展開し、検出領域に到達する。検出領域において、該複合体は、不働化された抗体１と反応し、検出領域に抗体１ - インフルエンザウイルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体を生成する。生成した該抗体１ - インフルエンザウイルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体中の標識を検出することにより、検体中のインフルエンザウイルスを検出又は定量することができる。尚、本デバイスでは、検体供給領域は標識試薬領域を兼ねていてもよい [ 図 1 ( 1 ) 及び ( 2 ) 参照 ]

30

40

## 【 0 0 2 0 】

また、本発明のインフルエンザウイルス検出又は定量用デバイスは、ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体が支持体上に不働化されている検出領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備し、インフルエンザウイルス核タンパク質抗原に標識が結合した標識化抗原類似物が検体供給領域より供給されるようなデバイスや、ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体が支持体上に不働化されている検出領域、インフルエンザウイルス核タンパク質抗原に標識が結合した標識化抗原類似物が移動可能なように支持体上に保持されている標識試薬領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備するデバイスをも包

50

含する。

【0021】

さらに、本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイスは、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物が支持体上に不動化されている検出領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備し、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体が検体供給領域より供給されるようなデバイスや、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物が支持体上に不動化されている検出領域、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体が移動可能なように支持体上に保持されている標識試薬領域、検体供給領域及び検体移動領域を具備するデバイスをも包含する。

10

【0022】

本発明のデバイスを用いたインフルエンザウィルスの検出又は定量に使用される検体としては、ヒトから採取したインフルエンザウィルスが含まれ得る検体であれば特に制限はなく、例えば鼻腔ぬぐい液（鼻腔スワブ）、鼻腔吸引液、咽頭ぬぐい液（咽頭スワブ）、嗽液等の生体試料等が挙げられる。本発明においては、これらの生体試料をそのまま使用することもできるが、前処理をした生体試料も用いることができる。当該前処理に使用される前処理剤としては、インフルエンザウィルスの核を破壊し、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体との反応を可能とする前処理剤であれば特に制限はないが、例えば界面活性剤等が挙げられる。界面活性剤としては、例えば非イオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、両性界面活性剤等が挙げられるが、非イオン性界面活性剤が好ましい。非イオン性界面活性剤としては、例えばポリオキシエチレン系界面活性剤（例：ノニデットP-40）等が挙げられる。また、前処理剤には、必要に応じて、水性媒体、緩衝剤、防腐剤、塩類、糖類、金属イオン、蛋白等が含まれてよい。水性媒体としては、脱イオン水、蒸留水、膜ろ過水等が挙げられる。緩衝剤としては、例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、バルビツール緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グッド緩衝剤等が挙げられる。グッド緩衝剤としては、例えばTris[トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン]緩衝剤、MES（2-モルホリノエタンスルホン酸）緩衝剤、ピストリス[ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン]緩衝剤、ADA[N-（2-アセトアミド）イミノ二酢酸]緩衝剤、PIPES[ピペラジン-N,N'-ビス（2-エタンスルホン酸）]緩衝剤、ACES{2-[N-（2-アセトアミド）アミノ]エタンスルホン酸}緩衝剤、MOPSO（3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）緩衝剤、BES{2-[N,N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ]エタンスルホン酸}緩衝剤、MOPS（3-モルホリノプロパンスルホン酸）緩衝剤、TES 2-{N-[トリス（ヒドロキシメチル）メチル]アミノ}エタンスルホン酸 緩衝剤、HEPES[N-（2-ヒドロキシエチル）-N'-（2-スルホエチル）ピペラジン]緩衝剤、DIPSO{3-[N,N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸}緩衝剤、TAPSO 2-ヒドロキシ-3-{[N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル]アミノ}プロパンスルホン酸 緩衝剤、POPSO[ピペラジン-N,N'-ビス（2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸）]緩衝剤、HEPPSO[N-（2-ヒドロキシエチル）-N'-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）ピペラジン]緩衝剤、EPPS[N-（2-ヒドロキシエチル）-N'-（3-スルホプロピル）ピペラジン]緩衝剤、トリシン[N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン]緩衝剤、ピシン[N,N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン]緩衝剤、TAPS{3-[N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル]アミノプロパンスルホン酸}緩衝剤、CHES[2-（N-シクロヘキシルアミノ）エタンスルホン酸]緩衝剤、CAPSO[3-（N-シクロヘキシルアミノ）-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸]緩衝剤、CAPS[3-（N-シクロヘキシルアミノ）プロパンスルホン酸]等が挙げられる。

20

30

40

50

## 【0023】

防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質等が挙げられる。塩類としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム等のハロゲン化アルカリ金属塩等が挙げられる。糖類としては、例えばマンニトール、ソルビトール、スクロース等が挙げられる。金属イオンとしては、例えばマグネシウムイオン、マンガンイオン、亜鉛イオン等が挙げられる。蛋白としては、例えばウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、ブロッケー<sup>T M</sup>（大日本製薬社製）、動物血清等が挙げられる。

## 【0024】

本発明のデバイスの一例を図1（1）に基づいて、以下に説明する。

## 【0025】

検体を検体供給領域に添加すると、検体は毛細管現象により支持体上を展開し、標識試薬領域に到達する。この標識試薬領域において、検体中のインフルエンザウィルス核タンパク質は標識試薬領域で抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体2）に標識が結合した標識化抗体2と反応し、インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体（複合体1）が生成する。生成した複合体1は、さらに毛細管現象により支持体上を展開し、検出領域に到達する。検出領域に到達した複合体1は、当該領域において、不動化された抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体1）と反応し、抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体（複合体2）が支持体上に不動化されて生成する。次いで、生成した複合体2の標識を測定することにより、検体中のインフルエンザウィルスを検出又は定量することができる。ここで抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である。抗体1と抗体2の組み合わせとしては、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - 非ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、非ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体の組み合わせが挙げられる。

## 【0026】

検出又は定量の対象となるインフルエンザウィルスとしては、例えばA型インフルエンザウィルス、B型インフルエンザウィルス等が挙げられる。インフルエンザウィルス核タンパク質はインフルエンザウィルスの核に存在するタンパク質、すなわち、インフルエンザウィルスの構成成分の1つであることから、インフルエンザウィルス核タンパク質を測定することにより、検体中のインフルエンザウィルスを検出又は定量することができる。

## 【0027】

A型インフルエンザウィルスを本発明のデバイスを用いて検出又は定量する場合には、抗体1として、抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体A1）を、抗体2として、抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体A2）を用いる。抗体A1と抗体A2のいずれか1つはヒト抗体、すなわち、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である。抗体A1と抗体A2との組み合わせとしては、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体との組み合わせ、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体と非ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体との組み合わせ、非ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体との組み合わせが挙げられる。ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。モノクローナル抗体の場合、抗体A1が認識するA型インフルエンザウィルス核タンパク質中の部位と、抗体A2が認識するA型インフルエンザウィルス核タンパク質の部位とは、同じであっても異なってもよいが、異なっていることが好ましい。A型インフルエンザウィルスを本発明のデバイスを用いて検出又は定量する場合には、標識試薬領域において、移動可能な、A型インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体A2の複合体（複合体A1）が生成し、検出領域において、不動化された、抗体A1 - A

10

20

30

40

50



型インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体 A 2 の複合体 ( 複合体 A 2 ) が生成する。

【 0 0 2 8 】

B 型インフルエンザウィルスを用いる本発明のデバイスを用いて検出又は定量する場合には、抗体 1 として、抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 ( 抗体 B 1 ) を、抗体 2 として、抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 ( 抗体 B 2 ) を用いる。抗体 B 1 と抗体 B 2 のいずれか 1 つはヒト抗体、すなわち、ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体である。抗体 B 1 と抗体 B 2 との組み合わせとしては、ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体との組み合わせ、ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体と非ヒト抗 B 10 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体との組み合わせ、非ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体との組み合わせが挙げられる。ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。モノクローナル抗体の場合、抗体 B 1 が認識する B 型インフルエンザウィルス核タンパク質中の部位と、抗体 B 2 が認識する B 型インフルエンザウィルス核タンパク質の部位とは、同じであっても異なってもよいが、異なっていることが好ましい。B 型インフルエンザウィルスを用いる本発明のデバイスを用いて検出又は定量する場合には、標識試薬領域において、移動可能な、B 型インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体 B 2 の複合体 ( 複合体 B 1 ) が生成し、検出領域において、不動化された、抗体 B 1 - B 20 型インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体 B 2 の複合体 ( 複合体 B 2 ) が生成する。

【 0 0 2 9 】

ヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体としては、例えば後述のヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体等が挙げられる。ヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体としては、例えば後述のヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体等が挙げられる。

【 0 0 3 0 】

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量用デバイスは、さらに展開液供給領域、余剰液吸収領域及び検体供給確認領域からなる群より選ばれる領域を 1 つ以上、具備して 30 いてよい。展開液供給領域に添加された展開液は毛細管現象により支持体を展開し、検体を標識試薬領域へ移動させると共に、標識試薬領域で生成した複合体 1 ( 複合体 A 1 ; 複合体 B 1 ) を検出領域へ移動させる。展開液供給領域は、検体供給領域を兼ねることができる。検出領域において生成された複合体 2 ( 複合体 A 2 ; 複合体 B 2 ) 以外の余剰液は余剰液吸収領域で吸収される。また、支持体上に不動化された抗ヒト I g G 抗体を含有する検体供給確認領域を具備させることにより、検体の添加を確認することができる。

【 0 0 3 1 】

・ 支持体

本発明のデバイスにおける支持体は、検体移動領域で、液体が展開可能な材料であれば特に制限はなく、例えばガラス繊維、セルロース、ナイロン、架橋デキストラン、各種のクロマトグラフィー用紙、ニトロセルロース、金等の金属等が挙げられる。この支持体の大きさに制限はないが、幅 3 mm ~ 1 0 mm 程度、長さ 3 0 mm ~ 1 0 0 mm 程度のストリップ状のものが好ましい。支持体の厚さは 1 0 0 μ m ~ 1 mm のものを用いることができる。また支持体は、その一部又は全体を測定時に検体由来のタンパク質の支持体への非特異吸着防止のために、例えば牛血清アルブミン ( B S A ) 、カゼイン等の動物血清、カゼイン、スクロース等でブロッキングして用いることができる。

【 0 0 3 2 】

・ 検出領域

本発明のデバイスにおける検出領域には、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が不動化されている。検出領域は支持体とは別個に形成されてもよいが、支持体上に形成 40

10

20

30

40

50

されることが好ましい。検出領域に不動化される抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。検出領域に不動化される抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、及び、標識試薬領域で移動可能なように保持されている標識化抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を形成する抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体の少なくとも1つはヒト抗体であり、両抗体ともモノクローナル抗体であることが好ましい。検出領域に不動化される抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体としては、例えば後述のヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、これらのヒト抗体のフラグメント [ F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F ( a b ' ) ] 等が挙げられる。

10

#### 【0033】

検出領域に抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を不動化させる方法としては、例えば抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を直接、支持体に物理吸着させる方法、共有結合等の化学結合によって支持体に固定する方法等が挙げられる。また、不溶性担体粒子に抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を結合させ、これを支持体内に含有させても良い。不溶性担体粒子としては、例えばポリスチレンラテックス粒子、磁性粒子、ガラス繊維等が挙げられる。不溶性担体粒子に抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を結合させる方法としては、例えば前述の物理吸着、化学的結合等が挙げられる。

#### 【0034】

検出領域は、標識試薬領域、検体供給領域、検体移動領域及び展開液供給領域の下流に存在し、余剰液吸収領域の上流に存在する。

20

#### 【0035】

##### ・標識試薬領域

本発明のデバイスにおける標識試薬領域には、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体が移動可能なように保持されている。標識試薬領域は支持体とは別個に形成されてもよいが、支持体上に形成されることが好ましい。標識試薬領域に移動可能なように保持される標識化抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を形成する抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。標識試薬領域に移動可能なように保持される抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体としては、例えば後述のヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、これらのヒト抗体のフラグメント [ F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F ( a b ' ) ] 等が挙げられる。標識試薬領域の構築方法としては、例えば支持体に標識化抗体含有試薬を支持体に点着する方法、標識化抗体含有試薬を含ませた吸水性パッドを支持体上に積層する方法等が挙げられる。吸水性パッドとしては、例えば後述の検体供給領域で使用される吸水性パッド等が挙げられる。

30

#### 【0036】

標識化抗体を形成する標識としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ等の酵素、金コロイド粒子、セレンコロイド粒子等の金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子、発光物質、蛍光物質等が挙げられる。

40

#### 【0037】

標識化抗体の調製方法としては、共有結合により標識と抗体とを結合させる方法、非共有結合により標識と抗体とを結合させる方法等が挙げられる。具体的には、公知の方法、例えばグタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、ピリジル・ジスルフィド法、各種架橋剤を用いる方法等を挙げることができる [「蛋白質核酸酵素」別冊31号、37~45頁(1985)参照]。架橋剤としては、例えばN-スクシンイミジル-4-マレイミド酪酸 (G M B S)、N-スクシンイミジル-6-マレイミドヘキサ酸、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸等を用いることができる。共有結合による方法では、抗体に存在する官能基を用いることができる他、例えばアミノ基、カルボキシル基、水酸基、スルフヒドリル基等の官能基を常法によ

50

り導入したのち、前記方法により標識化抗体を調製することができる。また、非共有結合による方法としては物理吸着法等を挙げることができる。

【0038】

・検体供給領域

本発明のデバイスにおける検体供給領域は、検出領域の上流に位置し、本領域を通じて検体が供給される。検体供給領域は、支持体上に形成されるが、支持体上に、吸水性パッドを積層させて形成してもよい。検体供給領域を形成する支持体及び吸水性パッドには、適宜、塩類、界面活性剤等が含有されてもよい。塩類、界面活性剤としては、例えば前述の塩類、界面活性剤等が挙げられる。吸水性パッドとしては、例えばガラス繊維、セルロース、不織布、ポリビニルアルコール等が挙げられる。

10

【0039】

また、検体供給領域は、前述の標識試薬領域を兼ねていてもよく、この場合には、標識化抗体含有試薬を含ませた吸水性パッドを支持体上に積層することにより、検体を効率的に吸収することができる。吸水性パッドとしては、標識化抗体及びインフルエンザウィルス核タンパク質を吸収し、吸着が少ない材料であれば特に制限は無く、例えば前述のものが挙げられる。

【0040】

・検体移動領域

本発明のデバイスにおける検体移動領域は、支持体全般に渡って存在し、検体、標識化抗体、後述の展開液が移動する領域である。検体供給領域に供給された検体は、検体移動領域を通じて標識化抗体と共に検出領域に運ばれる。また、検体は、後述の展開液供給領域から供給された展開液によっても、検体移動領域を通じて検出領域に運ばれ得る。

20

【0041】

・展開液供給領域

本発明のデバイスにおける展開液供給領域は、支持体の一端に設けられ、展開液が供給される領域である。検体供給領域に検体が供給されたデバイスの展開液供給領域を展開液に浸すことにより、検体は展開液により支持体を移動し、検体移動領域を通じて検出領域に運ばれ得る。この過程で、検体中のインフルエンザウィルス核タンパク質は、標識試薬領域で標識化抗体と反応し、生成した移動可能な、標識化抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体はさらに検出領域に運ばれ、検出領域において、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体を生成する。展開液を用いずとも検体を支持体上で展開させることもできるが、展開液を用いることにより効率的に検体を展開させることができる。展開液は、検体を支持体上で展開させる水性媒体であるが、この水性媒体には必要に応じて、前述の緩衝剤、界面活性剤、防腐剤、塩類、糖類、金属イオン、蛋白等の添加物を含んでいてもよい。

30

【0042】

・検体供給確認領域

本発明のデバイスにおける検体供給確認領域は、余剰液吸収領域の上流に設けられ、検体が確実にデバイスの検体供給領域に添加されたことを確認するための領域である。

【0043】

2つの抗体（抗体1と抗体2）が使用される本発明のデバイスにおいては、検体が検体供給領域に供給されると、検体中のインフルエンザウィルス核タンパク質が標識化抗体（標識化抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体）と反応して形成されるインフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体と共に、未反応の標識化抗体が検体移動領域を展開する。すなわち、検体が確実に供給された場合には、未反応の標識化抗体が検体移動領域を展開する。検体供給確認領域は、この未反応の標識化抗体を捕捉する領域であり、標識化抗体に対する抗体を不動化して固定化し、構築することができる。標識化抗体に反応する抗体としては、例えば抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に対する抗体、標識に対する抗体等が挙げられる。標識化抗体に反応する抗体の不動化方法は、前述の検出領域における抗体の不動化方法等が挙げられる。また、検体中に共通に含まれる物

40

50

質（例えば、酵素等）に対する抗体を不動化して固定化し、検体供給確認領域を構築することもできる（図1の（3）参照）。

【0044】

同様に、1つの抗体が使用される本発明のデバイスにおいては、検体中に共通に含まれる物質（例えば、酵素等）に対する抗体、標識化抗原類似物（標識化インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物）に対する抗体、標識化抗体（標識化ヒト抗体インフルエンザウィルス核タンパク質抗体）に対する抗体を不動化して固定化し、検体供給確認領域を構築することができる。

【0045】

・余剰液吸収領域

本発明のデバイスにおける余剰液吸収領域は、支持体の最下流に設けられ、支持体上を要すれば展開液と共に展開してきた検体及び標識化抗体が検出領域で捕捉されて抗インフルエンザ核タンパク質抗体 - インフルエンザ核タンパク質 - 標識化抗体の複合体を生成し、該複合体を生成した後の余剰液を吸収するための領域である。余剰液吸収領域は、支持体から形成することもできるが、支持体に吸水性物質を付随させて形成することもでき、また、支持体上に吸水性物質を積層させて形成することもできる。吸水性物質としては、例えば吸水性の高い紙、スポンジ等が挙げられる。

【0046】

[ デバイスを用いたインフルエンザウィルスの検出と定量 ]

本発明のデバイスを用いたインフルエンザウィルスの検出と定量は、例えば次のように行うことができる。

【0047】

・態様1

検体供給領域に供給された検体は検出移動領域を展開し、検出領域に到達する。検出領域において、検体中のインフルエンザウィルス核タンパク質は、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体と反応し、インフルエンザウィルス核タンパク質 - ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体の複合体を生成する。この複合体形成に伴う物理的変化を測定することにより、インフルエンザウィルスを検出又は定量することができる。ここでの物理的変化としては、例えば質量変化等が挙げられる。

【0048】

・態様2

検体供給領域に供給された検体及び標識化抗体（標識化抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体）は検出移動領域を展開し、検出領域に到達する。供給時又は展開時に生成したインフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体は、検出領域において、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体と反応し、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体を生成する。検出領域において生成したこの抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体中の標識を測定することにより、インフルエンザウィルスを検出又は定量することができる。

【0049】

・態様3

検体供給領域に供給された検体は標識試薬領域において、標識化抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（標識化抗体2）と反応し、インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体（複合体1）が生成し、次いで、検出領域に検体移動領域を通じて展開してきた複合体1は検出領域において、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体1）と反応し、抗体1 - 抗インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体（複合体2）が検出領域において不動化されて生成し、検出領域内に生成した複合体2の標識を測定することにより、インフルエンザウィルスを検出又は定量することができる。ここで、標識化抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（標識化抗体2）を構成する抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体2）と、抗体1の少なくとも

10

20

30

40

50

1つはヒト抗体である。検出供給領域に供給された検体の展開、標識試薬領域で生成した複合体1の検出領域への展開には、展開液を用いることもできる。

【0050】

・態様4

検体供給領域に供給された検体及び標識化抗原類似物（標識化インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物）は検出移動領域を展開し、検出領域に到達する。検出領域において、検体中のインフルエンザウィルス核タンパク質抗原と標識化抗原類似物とは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に対して競合的に反応し、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質抗原の複合体、及び、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - 標識化抗原類似物の複合体を精製

10

【0051】

・態様5

検体供給領域に供給された検体は、検体移動領域を展開し、標識試薬領域に到達する。標識試薬領域に到達した検体は、標識化抗原類似物（標識化インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物）と共に検体移動領域を更に展開し、検出領域に到達する。検出領域において、検体中のインフルエンザウィルス核タンパク質抗原と標識化抗原類似物とは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に対して競合的に反応し、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質抗原の複合体、及び、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - 標識化抗原類似物の複合体を精製

20

【0052】

・態様6

検体供給領域に供給された検体及び標識化抗体（標識化ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体）は検出移動領域を展開する。供給時又は展開時に生成したインフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体は、未反応の標識化抗体と共に検出領域に到達する。検出領域において、未反応の標識化抗体は、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物と反応し、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物 - 標識化抗体の複合体を生成する。検出領域において生成したこのインフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物 - 標識化抗体の複合体中の標識を測定することにより、インフルエンザウィルスを検出又は定量することができる。

30

【0053】

・態様7

検体供給領域に供給された検体は、検体移動領域を展開し、標識試薬領域に到達する。標識試薬領域において、インフルエンザウィルス核タンパク質は標識化抗体（標識化ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体）と反応し、インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体の複合体を生成する。生成した複合体は、未反応の標識化抗体と共にさらに検体移動領域を展開し、検出領域に到達する。検出領域において、未反応の標識化抗体は、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物と反応し、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物 - 標識化抗体の複合体を生成する。検出領域において生成したこのインフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物 - 標識化抗体の複合体中の標識を測定することにより、インフルエンザウィルスを検出又は定量することができる。

40

【0054】

ここで、検出領域で生成した複合体中の標識は、公知の方法を用いて測定することができる。標識が金コロイド粒子や着色ラテックス粒子の場合には、複合体の生成に起因して支持体上に生成したバンドの吸光度を測定することにより行うことができる。標識が酵素の場合には、酵素の基質を酵素に作用させることにより、標識を測定することができる。用いる酵素及び酵素の基質により、検出法を選択することができる。

50

## 【 0 0 5 5 】

酵素の基質は、展開液中に含有させることもできるが、デバイス中に具備させた基質試薬領域内に移動可能なように担持させることもできる。酵素がペルオキシダーゼの場合、その基質としては、発色基質や発光基質等が挙げられる。発色基質としては、例えばロイコ型色原体と過酸化水素との組み合わせ、2つの化合物の組み合わせからなるカップリング型色原体と過酸化水素との組み合わせ等が挙げられる。ロイコ型色原体としては、例えば2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン(TMB)、ジアミノベンチジン(DAB)、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン ナトリウム塩(DA-64)、10-N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン ナトリウム塩(DA-67)、4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等が挙げられる。2つの化合物の組み合わせからなるカップリング型色原体としては、例えばカップラーとアニリン類又はフェノール類との組み合わせ等が挙げられる。カップラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン(4-AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン等が挙げられる。アニリン類としては、例えばN-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-(3, 5-ジメトキシフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン・ナトリウム塩(DOSE)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン・ナトリウム塩2水和物(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン・ナトリウム塩(HSDA)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4-フルオロ-3, 5-ジメトキシアニリン・ナトリウム塩(F-DAOS)等が挙げられる。フェノール類としては、例えばフェノール、3-ヒドロキシ-2, 4, 6-トリヨウド安息香酸等が挙げられる。発色基質としては、例えばルミノールと過酸化水素との組み合わせ、イソルミノールと過酸化水素との組み合わせ等が挙げられる。

10

20

30

## 【 0 0 5 6 】

酵素がアルカリホスファターゼの場合、その基質としては、発色基質、蛍光基質、発光基質等が挙げられる。基質が発色基質である場合には吸光度を、基質が蛍光基質である場合には蛍光強度を、基質が発光基質である場合には発光強度を測定することにより、検出又は定量が可能となる。発色基質としては例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)、4-ニトロフェニルリン酸等が挙げられる。蛍光基質としては、例えば4-メチルウムベリフェニル-ホスフェート(4MUP)-D-ガラクトシダーゼ用：4-メチルウムベリフェニル-D-ガラクトシド(4MUG)等が挙げられる。発光基質としては、例えば3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン・二ナトリウム塩(AMP PD)、2-クロロ-5-{4-メトキシスピロ[1, 2-ジオキセタン-3, 2'-(

40

50

5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1<sup>3</sup>,7]デカン]-4-イル}フェニルホスフェート・ニナトリウム塩(CDP-Star<sup>TM</sup>)、3-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1<sup>3</sup>,7]デカン]-4-イル}フェニルホスフェート・ニナトリウム塩(CSPD<sup>TM</sup>)、[10-メチル-9(10H)-アクリジニルイデン]フェノキシメチルリン酸・ニナトリウム塩(Lumigen<sup>TM</sup> APS-5)等が挙げられる。

【0057】

酵素が-D-ガラクトシダーゼの場合には、該酵素の基質として、例えば3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3''-D-ガラクトピラノシル)フェニル-1,2-ジオキセタン(AMGPD)等の発光基質が挙げられる。

10

【0058】

また、本発明のデバイスは、その構成要素として、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を含んでいればよく、検出領域における検出方法は特に制限されず、検出方法として、前述の発色法(吸光度法)、蛍光法、発光法のみならず、質量変化を検出する方法も用いることができる。質量変化を検出する方法としては、例えば表面プラズモン共鳴(SPR)法や、圧電振動子を用いる方法(例えば、WO2005/015217パンフレットを参照)等が挙げられる。

【0059】

本発明のデバイスを用いた、検体中のインフルエンザウィルスの定量は次のように行うことができる。まず、検体として、既知濃度のインフルエンザウィルスより調製したインフルエンザウィルス核タンパク質を用いて、該検体を本発明のデバイスの検体供給領域に供給して、検出領域での情報(例えば、吸光度)を測定し、インフルエンザウィルス濃度と情報量との関係を表す検量線を作成する。その後、実際の対象検体を用いて同様の測定を行い、得られた情報量を、先に作成した検量線に照らし合わせることにより、濃度を決定する。

20

【0060】

[インフルエンザウィルス検出又は定量方法]

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量方法は、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を少なくとも1つ以上用いることを特徴とする方法である。後述の、本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量用キットを用いて、インフルエンザウィルスを検出又は定量することができる。

30

【0061】

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量方法は、インフルエンザウィルスを検出又は定量できる方法であれば特に制限はなく、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫放射定量測定法(IRMA)、酵素免疫測定法(ELISA)、均一系酵素免疫測定法、蛍光イムノアッセイ(FIA)、免疫蛍光分析法(IFMA)、蛍光偏光法、化学発光イムノアッセイ(CLIA)、化学発光酵素イムノアッセイ(CLEIA)、比濁免疫測定法、表面プラズモン共鳴法(SPR)等が挙げられる。

【0062】

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量方法としては、例えば以下に示す方法を挙げることができる。

40

【0063】

・方法1

(1)検体と、担体上に固定化されているヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とを反応させる工程；及び、

(2)工程(1)で生じた物理的变化を測定する工程

を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

【0064】

当該方法における物理的变化量の物理的变化としては、例えば濁度変化、質量変化等が挙げられる。当該方法は、抗原抗体反応に伴う反応液の濁度変化を測定する比濁免疫測定

50

法や、抗原抗体反応に伴う質量変化を測定する表面プラズモン共鳴法（SPR）等に適用することができる。

【0065】

・方法2

（1）検体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体1）とを反応させて、担体上に抗体1 - インフルエンザウィルスの複合体を形成させる工程；

（2）工程（1）において、担体上に形成した該複合体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体2）とを反応させる工程；及び、

（3）工程（2）で生じた物理的変化量を測定する工程

を含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量方法。

【0066】

抗体1及び抗体2は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体でもよいが、共にモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0067】

当該方法における物理的変化量の物理的変化としては、例えば濁度変化、質量変化等が挙げられる。当該方法は、抗原抗体反応に伴う反応液の濁度変化を測定する比濁免疫測定法や、抗原抗体反応に伴う質量変化を測定する表面プラズモン共鳴法（SPR）等に適用することができる。また、工程（1）と工程（2）は同時に行ってもよい。

【0068】

・方法3

（1）検体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体1）とを反応させて、担体上に抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体を形成させる工程；

（2）工程（1）において、担体上に形成した該複合体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体2）に標識が結合した標識化抗体（標識化抗体2）とを反応させて、担体上に抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体を形成させる工程；

（3）工程（2）後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；

（4）工程（3）後の担体上の抗体1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体2の複合体の中の標識を測定する工程

を含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量方法。

【0069】

上記方法は、サンドイッチ法の1つの態様である。上記方法における抗体1と抗体2について、それぞれの抗体が認識するインフルエンザウィルス核タンパク質の部位は同じであっても異なってもよいが、異なっていることが好ましい。また、上記方法における抗体1と抗体2はそれぞれ、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよいが、共にモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0070】

上記方法において、工程（4）で生成した複合体中の標識に由来する情報量と、工程（2）で反応系中に存在する未反応の標識化抗体中の標識に由来する情報量との差が顕著である場合には、工程（3）の洗浄工程を省略することができる（ホモジニアス法）。また、工程（1）と工程（2）は同時に行ってもよく、工程（1）と工程（2）の間に洗浄工程を挿入してもよい。

【0071】

上記方法の工程（4）における標識の測定方法としては、例えば前述の方法等が挙げられる。

【0072】

10

20

30

40

50



・方法 4

(1) 検体と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 (抗体 2) に標識が結合した標識化抗体 (標識化抗体 2) とを反応させて、標識化抗体 2 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体を形成させる工程 ;

(2) 工程 (1) において形成した複合体と、担体上に固定化されている抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 (抗体 1) とを反応させて、担体上に抗体 1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体 2 の複合体を形成させる工程 ;

(3) 工程 (2) 後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程 ;

(4) 工程 (3) 後の担体上の抗体 1 - インフルエンザウィルス核タンパク質 - 標識化抗体 2 の複合体の中の標識を測定する工程

を含有し、抗体 1 と抗体 2 の少なくとも 1 つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量方法。

【0073】

上記方法は、サンドイッチ法の別の態様である。上記方法における抗体 1 と抗体 2 について、それぞれの抗体が認識するインフルエンザウィルス核タンパク質の部位は同じであっても異なってもよいが、異なっていることが好ましい。また、上記方法における抗体 1 と抗体 2 はそれぞれ、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよいが、共にモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0074】

上記方法において、工程 (2) で生成した複合体中の標識に由来する情報量と、工程 (2) で反応系中に存在する未反応の標識化抗体中の標識に由来する情報量との差が顕著である場合には、工程 (3) の洗浄工程を省略することができる (ホモジニアス法)。また、工程 (1) と工程 (2) は同時に行ってもよく、工程 (1) と工程 (2) の間に洗浄工程を挿入してもよい。

【0075】

上記方法の工程 (4) における標識の測定方法としては、例えば前述の方法等が挙げられる。

【0076】

・方法 5

(1) 検体と、担体上に固定化されているヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とを、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物に標識が結合した標識化抗原類似物の共存下に反応させて、担体上に、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - インフルエンザウィルス核タンパク質の複合体、及び、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体 - 標識化抗原類似物の複合体を形成させる工程 ;

(2) 工程 (1) 後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程 ;

(3) 工程 (2) 後の担体上の複合体中の標識を測定する工程

を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

【0077】

上記方法は、競合法の 1 つの態様である。上記方法におけるヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【0078】

上記方法の工程 (3) における標識の測定方法としては、例えば前述の方法等が挙げられる。

【0079】

・方法 6

(1) 検体と、担体上に固定化されているインフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物とを、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体の共存下に反応させて、担体上に、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物 - 標識化抗体の複合体を形成させる工程 ;

10

20

30

40

50

(2) 工程(1)後の担体を洗浄し、担体上に結合していない物質を除去する工程；  
(3) 工程(2)後の担体上の複合体中の標識を測定する工程  
を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法。

【0080】

上記方法は、競合法の別の態様である。上記方法におけるヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【0081】

上記方法の工程(3)における標識の測定方法としては、例えば前述の方法等が挙げられる。

【0082】

本発明の方法における反応条件は当業者が適宜設定することができるが、例えば反応温度としては、0 ~ 50 で、好ましくは、4 ~ 40 であり、反応時間としては1分間 ~ 24時間、好ましくは3分間 ~ 12時間である。また、洗浄工程を含む場合の担体の洗浄は、例えばphosphate buffered saline (PBS)を用いて行うことができる。

【0083】

本発明の方法で使用される固相は、担体に、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物が不動化して固定されたものである。担体としては、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物が不動化して固定することができ、水に不溶性であれば特に制限はなく、例えばマイクロタイタープレート等のポリスチレンプレート、ガラス製または合成樹脂製の粒状物(ビーズ)、ガラス製または合成樹脂製の球状物(ボール)、ラテックス、磁性粒子、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、合成樹脂製のチューブ等が挙げられる。担体に、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物を不動化して固定する方法としては、例えば直接的方法、間接的方法等が挙げられる。直接的方法としては、例えば担体上の官能基と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物中の官能基とを共有結合により結合させる方法等が挙げられる。ここで、担体上の官能基と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物中の官能基との組み合わせとしては、例えばアミノ基 - カルボキシル基、カルボキシル基 - アミノ基等が挙げられる。

【0084】

間接的方法としては、例えば担体上の官能基と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物中の官能基とをリンカーを介して間接的に結合させる方法、物質間の相互作用を利用する方法等が挙げられる。ここで、担体上の官能基と、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物中の官能基との組み合わせとしては、例えばアミノ基 - アミノ基、アミノ基 - カルボキシル基、アミノ基 - スルフヒドリル基、カルボキシル基 - アミノ基、カルボキシル基 - カルボキシル基、カルボキシル基 - スルフヒドリル基等が挙げられる。尚、官能基は化学的修飾により導入してもよい。物質間の相互作用を利用する方法としては、例えばアビジン - ビオチンの相互作用を利用する方法、糖 - レクチンの相互作用を利用する方法等が挙げられる。アビジン - ビオチンの相互作用を利用する場合、例えばアビジンを吸着させた担体と、ビオチン化した抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又はビオチン化した標識化抗原類似物とを反応させることにより、担体上に抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物を不動化して固定することができる。

【0085】

また、本発明の方法で使用される固相として、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体又は標識化抗原類似物が不動化して固定された担体をさらに牛血清アルブミン、カゼイン等でブロックして調製された固相も使用することができる。

【0086】

本発明の方法で使用されるヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体としては、例えば後述のヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、ヒト抗B型インフル

10

20

30

40

50

エンザウィルス核タンパク質抗体等が挙げられる。

【0087】

本発明の方法で使用される標識としては、例えば前述の標識等が挙げられる。また、本発明の方法における標識測定方法としては、例えば前述の標識測定方法等が挙げられる。

【0088】

本発明の方法で使用される標識化抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体は、標識と抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体とを、前述の方法に従って調製することができる。

【0089】

本発明の方法で使用されるインフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物とは、担体上に固定化されたヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に対して、検体中のインフルエンザウィルス核タンパク質と競合的に反応するものであり、例えば抗原であるインフルエンザウィルス核タンパク質そのもののみならず、抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が認識するインフルエンザウィルス核タンパク質中のエピトープを含有する物質等が挙げられる。

10

【0090】

本発明の方法で使用される標識化抗原類似物（標識化インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物）は、前述の標識化抗体の調製方法と同様の方法により調製することができる。

【0091】

20

[インフルエンザウィルス検出又は定量用キット]

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量用キットは、本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量方法に用いられるキットである。

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量用キットとしては、例えば以下に示すキットを挙げることができる。

【0092】

・キット1

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が担体に固定化されてなる固相を含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

30

【0093】

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体はモノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体でもよい。

本キットは比濁免疫測定法、表面プラズモン共鳴（SPR）法等の方法に適したキットである。

【0094】

・キット2

抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体1）が担体に固定化されてなる固相と、

抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体2）を含有する試薬

とを含有し、抗体1と抗体2の少なくとも1つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

40

【0095】

抗体1及び抗体2は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体でもよいが、共にモノクローナル抗体であることが好ましい。

本キットは比濁免疫測定法、表面プラズモン共鳴（SPR）法等の方法に適したキットである。

【0096】

・キット3

抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体1）が担体に固定化されてなる固相と、

50

抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体（抗体２）に標識が結合した標識化抗体を含有する試薬

とを含有し、抗体１と抗体２の少なくとも１つは、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体であることを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

【００９７】

抗体１及び抗体２は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体でもよいが、共にモノクローナル抗体であることが好ましい。

本キットはサンドイッチ法に基づく免疫学的測定法に適したキットである。

【００９８】

・キット４

ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が担体に固定化されてなる固相と、インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物に標識が結合した標識化抗原類似物を含有する試薬

とを含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

【００９９】

本キットは競合法に基づく免疫学的測定法に適したキットである。

【０１００】

・キット５

インフルエンザウィルス核タンパク質抗原類似物が担体に固定化されてなる固相と、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体に標識が結合した標識化抗体を含有する試薬

とを含有することを特徴とする、インフルエンザウィルス検出又は定量用キット。

【０１０１】

本キットは競合法に基づく免疫学的測定法に適したキットである。

【０１０２】

本発明のインフルエンザウィルス検出又は定量用キットにおいて使用される固相としては、例えば前述の固相等が挙げられる。

【０１０３】

本発明のキットで使用されるヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体としては、例えば後述のヒト抗Ａ型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、ヒト抗Ｂ型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体等が挙げられる。

【０１０４】

本発明のキットで使用される標識としては、例えば前述の標識等が挙げられる。また、本発明のキットにおける標識測定方法としては、例えば前述の標識測定方法等が挙げられる。

【０１０５】

本発明のキットにおいては、必要に応じて、前述の水性媒体のみならず、前述の緩衝剤、界面活性剤、防腐剤、塩類、糖類、金属イオン、蛋白等の添加物が含まれていてよい。これらの添加物は、本発明のキットを構成する固相及び試薬とは別個に添加物含有試薬として用いることもできるが、本発明のキットを構成する固相、試薬のいずれか又は両方に含ませて用いることもできる。

【０１０６】

[ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体]

本発明のヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体は、本発明のインフルエンザウィルスの検出又は定量用デバイス、インフルエンザウィルスの検出又は定量用キット、並びに、インフルエンザウィルスの検出又は定量方法に使用され得る抗体であり、ヒト抗Ａ型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体、ヒト抗Ｂ型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体等が挙げられる。また、本発明におけるヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 7 】

本発明のヒト抗 A 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体としては、A 型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、B 型インフルエンザウィルス核タンパク質とは反応しない抗体が好ましい。また、本発明のヒト抗 B 型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体としては、B 型インフルエンザウィルス核タンパク質と特異的に反応し、A 型インフルエンザウィルス核タンパク質とは反応しない抗体が好ましい。

## 【 0 1 0 8 】

・ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の製造方法

上述の通り、本発明のヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体としては、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体が好ましい。ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体製造方法 [ ハイブリドーマ法 ( 例えば、In Vitro Cell Dev Biol. ( 1985 ) 21(10):593-596参照 )、ウィルス感染法 ( 例えば、J. gen. Virol. (1983), 64, 697-700参照 )、ファージディスプレイ法 ( 例えば、W O 2 0 0 1 / 0 6 2 9 0 7 パンフレット参照 )、リンパ球マイクロアレイ法等 ] で製造することができるが、リンパ球マイクロアレイ法が好ましい。

10

## 【 0 1 0 9 】

リンパ球マイクロアレイ法は、国立大学法人富山大学及びエスシーワールド株式会社により共同開発されたモノクローナル抗体製造方法に関する技術 [ 特開 2 0 0 4 - 1 7 3 6 8 1 ; 特開 2 0 0 4 - 1 8 7 6 7 6 ; 特開 2 0 0 5 - 2 6 1 3 3 9 ; 特開 2 0 0 7 - 1 4 2 6 7 ; Anal. Chem. 77(24), p.8050-8056 (2005); Cytometry A 71(11), p.961-967 (2007); Cytometry A 71(12), p.1003-1010 (2007) ] であり、以下の工程を含む。

20

## 【 0 1 1 0 】

- [ 1 ] ヒト血液より B リンパ球を調製する工程 ;
- [ 2 ] 測定対象物に反応する B リンパ球を選択する工程 ;
- [ 3 ] 選択された B リンパ球から、測定対象物と反応する抗体に係る遺伝子を取得する工程 ;
- [ 4 ] 取得した遺伝子を用いて抗体を発現させる工程 ;
- [ 5 ] 目的の性質を有する抗体を選択する工程。

30

## 【 0 1 1 1 】

以下に、ヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体の製造について、上記の各工程を説明する。

## 【 0 1 1 2 】

- [ 1 ] ヒト血液より B リンパ球を調製する工程

ヒト B リンパ球は、ヒト末梢血より調製することができ、特に、インフルエンザウィルス感染歴あるいはインフルエンザワクチン接種歴があり、血清中にインフルエンザウィルス核タンパク質抗体の存在が確認できるヒト末梢血から調製することができる。インフルエンザワクチン接種一定期間後、好ましくは 1 ~ 3 0 日後、より好ましくは 5 ~ 1 0 日後に採血を行い、調製することが望ましい。調製方法の具体例としては、例えば密度勾配遠心、セルソーター、磁気ビーズ等を用いる方法等が挙げられる。

40

## 【 0 1 1 3 】

- [ 2 ] 測定対象物に反応する B リンパ球を選択する工程

1 個の抗原特異的 B リンパ球の選択は、例えば、マイクロウェルアレイチップを用いた方法により行うことができる。マイクロウェルアレイチップを用いた方法では、例えば、1 個の被検体 B リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的 B リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、次いで、抗原に反応した B リンパ球を検出し、検出された抗原特異的 B リンパ球をマイクロウェルから取り出すことにより、1 個の抗原特異的 B リンパ球を得ることができる。以下、この方法を、より具体的に説明する。

50

## 【 0 1 1 4 】

マイクロウェルアレイチップとしては、複数のマイクロウェルを有し、かつ各マイクロウェルが被検体 B リンパ球を 1 個含むことができるものを使用することができる。各マイクロウェルが被検体 B リンパ球を 1 個含むことで、抗原特異的 B リンパ球を細胞レベルで特定することが可能になる。即ち、このマイクロウェルアレイチップを用いると、マイクロウェルに含まれる被検体 B リンパ球が 1 個であることから、抗原に反応する被検体 B リンパ球を 1 個の細胞として特定でき、結果として、抗原特異的 B リンパ球を 1 個の細胞として検出できる。そして、検出された 1 個の抗原特異的 B リンパ球を取り出して、遺伝子をクローニングする。マイクロウェルの形状や寸法には特に制限はないが、マイクロウェルの形状は、例えば、円筒形であることができ、円筒形以外に、直方体、逆円錐形、逆角錐形（逆三角錐形、逆四角錐形、逆五角錐形、逆六角錐形、七角以上の逆多角錐形）等であることもでき、これらの形状の二つ以上を組み合わせた形状であることもできる。例えば、一部が円筒形であり、残りが逆円錐形であることができる。また、逆円錐形、逆角錐形の場合、底面がマイクロウェルの開口となるが、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状である（その場合、マイクロウェルの底部は平坦になる）こともできる。円筒形、直方体は、マイクロウェルの底部は通常、平坦であるが、曲面（凸面や凹面）とすることもできる。マイクロウェルの底部を曲面とすることができるのは、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状の場合も同様である。マイクロウェルには、被検体 B リンパ球は培養液とともに格納されている。培養液としては、例えば、以下のいずれかのものを挙げるができる。

10

20

## 【 0 1 1 5 】

1. 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/mL グルコース, 1 mg/mL BSA, 20 mmol/L HEPES (pH7.4)
2. 10% FCS (牛胎仔血清) 含有 RPMI 1640 培地
3. 1 mg/mL BSA 含有 RPMI 1640 培地
4. 10% FCS (牛胎仔血清) 含有 Dulbecco's MEM 培地
5. 1 mg/mL BSA 含有 Dulbecco's MEM 培地

## 【 0 1 1 6 】

抗原に反応する細胞の検出は、以下のように行うことができる。

例えば、B リンパ球の抗原受容体（免疫グロブリン）に抗原が結合するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに続いて細胞増殖、抗体産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を種々の方法により検知することにより、抗原に反応する細胞を検出することができる。細胞内シグナル伝達を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞内 Ca<sup>2+</sup> イオンの濃度変化を Ca<sup>2+</sup> イオン依存性の蛍光色素を用いることにより行うことができる。細胞内 Ca<sup>2+</sup> イオン濃度変化は、蛍光色素として Fura-2、Fluo-3 あるいは Fluo-4 を使い、検出装置として蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイスキャナーを用いることができる。

30

## 【 0 1 1 7 】

[ 3 ] 選択された B リンパ球から、測定対象物と反応する抗体に係る遺伝子を取得する工程

取り出された抗原特異的 B リンパ球は、細胞溶解剤を用いて溶解した後、PCR を用いて、抗原特異的免疫グロブリン（抗体）遺伝子がクローニングされる。細胞溶解剤としては、公知の物をそのまま使用でき、例えば、以下のものを挙げるができる。

40

## 【 0 1 1 8 】

1x 1st strand buffer [ GIBCO-BRL, SuperScriptII に添付されている ], 0.2 mmol/L dNTP, 0.25% NP-40, 0.1 mg/mL BSA, 10 mmol/L DTT, Random Primer 0.05 μmol/L, 1U/μL RNasin

## 【 0 1 1 9 】

B リンパ球における抗原受容体遺伝子は抗体遺伝子と同一のものであり、タンパク質としては免疫グロブリンと呼ばれる。抗原受容体は B リンパ球の膜表面に存在し（膜型免疫グロブリン）、抗体は普通分泌蛋白（分泌型免疫グロブリン）として産生される。その違

50

いはタンパク質のC末端側にある。膜型免疫グロブリンは細胞膜に埋もれる膜ドメインおよび細胞質側に突き出る部分を持っている。分泌型免疫グロブリンも同じ遺伝子から産生される。しかしながら、オルタナティブ・スプライシング (alternative splicing) によりタンパク質のC末端側が膜型免疫グロブリンと異なり膜ドメインを持たない。その結果、分泌蛋白として産生されるが、この二つの蛋白の抗原結合部位は同一である。従って、Bリンパ球の場合、抗体遺伝子のクローニングと抗原受容体遺伝子のクローニングは同じである。

【0120】

取り出された抗原特異的Bリンパ球を細胞溶解剤で溶解して得られた溶液を用い、逆転写酵素によるcDNAの調製を行う。

10

【0121】

次いで、DNAポリメラーゼによるcDNAの3'末端へのテーリング反応を行いcDNAの3'末端へのアデニン、グアニン、シトシン、チミンいずれかのテーリングを行う。

【0122】

免疫グロブリン遺伝子用のプライマーミックスを用いて2回PCRすることにより、所望の抗原特異的免疫グロブリン遺伝子を増幅することができる。

【0123】

逆転写酵素によるcDNAの調製は、常法 [例えば、Sambrook J, Russell DW in Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001)] により行うことができる。

20

【0124】

本発明では細胞から抽出・精製したRNAを用いて逆転写反応をするのではなく、細胞溶解液を用いて直接RT反応を行うことが好ましい。

【0125】

(PCR法による抗体遺伝子の増幅)

PCR法による抗体遺伝子の増幅では、PCR反応を2回実施することにより抗体遺伝子のV領域遺伝子を増幅することが好ましい。

【0126】

抗体分子はH鎖およびL鎖の組合せによりできており、ヒト抗体遺伝子のH鎖は生殖細胞系列では約200種類のV領域遺伝子断片、約20種類のD断片、6種類のJ断片より構成されており、Bリンパ球に分化するときに遺伝子再構成により各々1種類のV断片、D断片、J断片が組み合わさることにより(V/D/J再構成)ひとつの抗原結合部位を形成する。L鎖も同様である。

30

【0127】

各Bリンパ球は細胞表面に1種類の抗体分子を発現している。抗原特異的Bリンパ球より抗原特異的抗体遺伝子を増幅するためにはそれぞれのV断片の配列に一致したプライマーを用いる必要がある。

【0128】

[4] 取得した遺伝子を用いて抗体を発現させる工程

上述の通り、細胞から遺伝子工学的手法を用いて該抗体の重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)をコードするcDNAを取得し、取得したcDNAを抗体発現用ベクターのプロモーターの下流に挿入した組換えベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られた該抗体発現細胞を適当な培地中で培養するか、動物に投与して該細胞を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離精製することにより調製することができる。このような抗体発現用ベクターは、ヒト抗体の定常領域(C領域)である定常領域重鎖(CH)および定常領域軽鎖(CL)をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築される。

40

【0129】

ヒト抗体のC領域としては、ヒト抗体H鎖ではC<sub>1</sub>やC<sub>4</sub>、ヒト抗体L鎖ではC

50

を用いることができる。抗体のC領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンよりなる染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、抗体C領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

#### 【0130】

該ベクターとしては例えば、pAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem, 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 1527 (1981)]、pSG1 d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)]等があげられる。動物は発現用ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [J. Biochem, 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、および免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)]、エンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)]等があげられる。

10

#### 【0131】

発現用ベクターは、抗体H鎖の遺伝子、L鎖の遺伝子が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一ベクター上に存在するタイプ(タンデム型)のどちらでも用いることができる。

20

#### 【0132】

前記の発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、エレクトロポレーション法 [特開平2-257891号公報, Cytotechnology, 3, 133 (1990)]等があげられる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、抗体を発現させることができる宿主細胞であればいかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(以下、DHFR遺伝子と称す)が欠損したCHO細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4216 (1980)]、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662, 以下YB2/0細胞と称す)等があげられる。

30

#### 【0133】

##### [5] 目的の性質を有する抗体を選択する工程

前工程で得られた抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる(アンチボディズ、第8章)。また、その他に通常の蛋白質に用いられる精製方法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を単独又は組み合わせて使用することができる。精製した組換え抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE) [Nature, 227, 680 (1970)]やウェスタンブロッティング法(アンチボディズ 第12章)等で測定する。

40

#### 【0134】

この培養上清中の抗体のインフルエンザウイルス核タンパク質への結合能を、インフルエンザウイルス核タンパク質をコートした96ウェルプレートを用いたELISA法により測定する。ELISAによる測定は以下のように行うことができる。すなわち、96穴プレートにPBSで希釈したインフルエンザウイルス核タンパク質(10 $\mu$ g/mL)を各ウェルに50 $\mu$ Lずつ分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置して吸着させる。PBSでウェルを洗浄し、非特異的結合を除去する為に3% BSA、0.05% Tween-20含有PBSを各ウェルに400 $\mu$ Lずつ分注し、室温で2時間反応させブロッキングする。ネガティブコントロールのウェルとして、抗原を吸着させず、ブロッキングしたウェルも作成する。その後0.1% Tween-20含有PBS (PBS-T)でウェルを洗浄し、上記293T細胞の培

50



養上清を各ウェルに50 $\mu$ Lずつ分注し、室温で2時間反応させる。ウェルをPBS-Tで洗浄し、1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ(ALP)標識抗ヒト免疫グロブリンを各ウェルに50 $\mu$ Lずつ分注し、室温で2時間反応させる。ウェルをPBS-Tで洗浄し、ALP基質用緩衝液[100mmol/L 塩化ナトリウム、5mmol/L 塩化マグネシウム、100mmol/L トリス緩衝液(pH9.5)]に溶解した1mg/mL p-nitrophenyl phosphate(ALP基質)を各ウェルに50 $\mu$ Lずつ分注し、室温で20分間反応後にマイクロプレートリーダーにて、405nmにおける吸光度を測定する。

【0135】

さらに、本発明のモノクローナル抗体の抗原への結合の特異性をチェックするために、抗体を含む細胞培養上清をウェルに添加する際に、可溶性のインフルエンザウイルス核タンパク質と培養上清とをプレインキュベーションさせた。その混合液をウェルに添加し、ウェルに吸着させたりコンビナント核タンパク質への抗体の結合が可溶性のリコンビナント核タンパク質により競合的に阻害されるかを検討する。

10

【0136】

本発明におけるヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体の具体例としては、重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：8~13のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号：22~27のいずれかで表されるアミノ酸配列を含むヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体が挙げられる。好ましい態様としては、以下の配列番号のアミノ酸配列の組み合わせからなる群より選ばれるアミノ酸配列の組み合わせからなる重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含むヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体が挙げられる。

20

【0137】

・重鎖可変領域のアミノ酸配列及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列がそれぞれ、配列番号：8及び配列番号：22、配列番号：9及び配列番号：23、配列番号：10及び配列番号：24、配列番号：11及び配列番号：25、配列番号：12及び配列番号：26、配列番号：13及び配列番号：27。

【0138】

また本発明におけるヒト抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体の好ましい態様としては、配列番号：14のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号：28のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むヒト抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体が挙げられる。

30

【0139】

尚、前述の通り、本発明において、2つの抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体が用いられる場合、非ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体を、ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体と共に用いることができる。非ヒト動物としては、例えばマウス、ラット、ウサギ等が挙げられる。非ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。非ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体は、例えば前述の公知のモノクローナル抗体製造方法で製造することができる。非ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体としては、例えばマウス抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体、マウス抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体、ラット抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体、ラット抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体、ウサギ抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体、ウサギ抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体等が挙げられる。本発明においては、非ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体として、前述の公知のモノクローナル抗体製造方法で製造されたモノクローナル抗体のみならず、市販品も用いることができる。市販品の具体例としては、マウス抗A型インフルエンザウ

40

50

ルス核タンパク質モノクローナル抗体の市販品であるM322211、M2110169（以上、Fitzgerald社製）、ATCC HB-65等が挙げられ、マウス抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体の市販品であるM2110171（Fitzgerald社製）、41027（Capricorn社製）等が挙げられる。

#### 【0140】

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

#### 【実施例】

10

#### 【0141】

〔実施例1〕 インフルエンザウイルスの検出又は定量用デバイス

・アルカリホスファターゼ標識化抗体の作製

後述の実施例4において取得した2種のヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体[23G285(A型)、23G327(B型)]および2種のマウス抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体[M2110169(A型:Fitzgerald社製)、M2110171(B型:Fitzgerald社製)]をAlkaline Phosphatase Labeling Kit(同仁化学研究所社製)を用いてアルカリホスファターゼ標識化抗体を作製した。

#### 【0142】

・アルカリホスファターゼ標識化抗体を用いたA型インフルエンザウイルスの検出又は定量用デバイス

20

5 cm×0.5 cmに切断したろ紙(ミリポア社製)の一領域にマウス抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体M2110169、M322211(Fitzgerald社製)及びヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体23G268のPBS溶液をそれぞれ点滴し、当該モノクローナル抗体を固定化し、検出領域とした。このろ紙の下方(検体供給領域)より、ノニデットP-40を含有する反応用溶液で希釈したA型インフルエンザウイルス液(H3N2:A/Panama/2007/99)、アルカリホスファターゼ標識化マウス抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体M2110169又はアルカリホスファターゼ標識化ヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体23G285のTris溶液、BCIP/NBT(nitro-blue tetrazolium chloride)溶液(シグマ社製)の順に展開させた。結果を図2-aに示す。特に、ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体を用いる固相抗体(検出領域で不動化される抗体)と標識抗体(標識化に使用される抗体)との組み合わせにおいて、検出領域において、顕著な青いスポットが確認された。このことから、イムノクロマトグラフィーによるA型インフルエンザウイルスの検出に、ヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体が利用可能であると共に、ヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体が高感度のA型インフルエンザウイルスの検出に有用であることが判明した。

30

#### 【0143】

さらに、ヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体23G268が不動化され固定化されている検出領域と、ろ紙の下方に検体供給領域を具備するデバイスを用いて、本デバイスの性能を検討した(図2-b)。検体供給領域より、検体として、ノニデットP-40を含有する反応用溶液で希釈したA型インフルエンザウイルス液(H3N2:A/Panama/2007/99)、ノニデットP-40を含有する反応用溶液で希釈したA型インフルエンザウイルス液(H1N1:A/Beijing/262/95)、ノニデットP-40を含有する反応用溶液で希釈したB型インフルエンザウイルス液(B/Victoria/504/00)をそれぞれ供給し、次いで、各デバイスの検体供給領域に、ヒト抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体23G285にアルカリホスファターゼが結合したアルカリホスファターゼ標識化抗体のTris溶液を展開させ、さらに、BCIP/NBT(nitro-blue tetrazolium chloride)溶液を展開液供給領域から展開させた。その結果、図2-bに示すように、A型インフルエンザウイルス液(H3N2:A/Panama/2007/99)及びA型インフルエンザウイルス液(H1N1:A/Be

40

50

ijing/262/95)を用いた場合にのみ、検出領域に青いスポットが検出された。従って、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体23G268及びヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体23G285を用いて、A型インフルエンザウィルスの特異的に検出できることが判明した。

#### 【0144】

・アルカリホスファターゼ標識化抗体を用いたB型インフルエンザウィルスの検出又は定量用デバイス

5 cm×0.5 cmに切断したろ紙(ミリポア社製)の一領域にマウス抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体M2110171(Fitzgerald社製)及び41027(Capricorn社製)のPBS溶液をそれぞれ点滴し、当該モノクローナル抗体を固定化し、検出領域とした。このろ紙の下方(検体供給領域)より、検体として、ノニデットP-40を含有する反应用溶液で希釈したA型インフルエンザウィルス液(H1N1:A/Beijing/262/95)及びノニデットP-40を含有する反应用溶液で希釈したB型インフルエンザウィルス液(B/Victoria/504/00)をそれぞれ供給し、次いで、各デバイスの検体供給領域に、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体23G327にアルカリホスファターゼが結合したアルカリホスファターゼ標識化抗体のT r i s溶液を供給し、さらに、BCIP/NBT(nitro-blue tetrazolium chloride)溶液を展開液供給領域から展開させた。結果を図3に示す。B型インフルエンザウィルス液(B/Victoria/504/00)を用いた場合にのみ、検出領域に青いスポットが検出された。

#### 【0145】

また、検出領域に不動化される抗体として、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体23G327を、標識化抗体として、マウス抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体M2110171(Fitzgerald社製)にアルカリホスファターゼが結合したアルカリホスファターゼ標識化抗体を用いた場合でも、B型インフルエンザウィルス液(B/Victoria/504/00)を用いた場合にのみ、検出領域に青いスポットが検出された。

#### 【0146】

尚、検出領域に不動化される抗体として、マウス抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体41027(Capricorn社製)を、標識化抗体として、マウス抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体M2110171(Fitzgerald社製)にアルカリホスファターゼが結合したアルカリホスファターゼ標識化抗体を用いた場合でも、同様に、B型インフルエンザウィルス液(B/Victoria/504/00)を用いた場合にのみ、検出領域に青いスポットが検出された。

#### 【0147】

このことから、イムノクロマトグラフィーによるB型インフルエンザウィルスの検出に、ヒト抗B型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が利用可能であることが判明した。

#### 【0148】

##### 〔実施例2〕

#### 金コロイド標識化抗体の作製

後述の実施例4において取得した2種のヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体[23G272、23G447]および1種のマウス抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体[M322211(Fitzgerald社製)]を標識抗体として用いて金コロイド標識化抗体を作製した。すなわち、当該抗体のPBS溶液をそれぞれT r i s緩衝液で置換して当該抗体のT r i s溶液を調製し、次いで、40 nm金コロイド(BBInternational社製)と混合し15分間反応させた。反応後、1%BSAを含むT r i s溶液によるブロッキングの後、未結合のモノクローナル抗体を遠心分離により除去し、金コロイド標識化抗体とした。

#### 【0149】

#### インフルエンザA型ウィルス検出

金コロイド標識化抗体を用いたA型インフルエンザウィルスの検出又は定量用デバイス

5 cm×0.5 cmに切断したろ紙（ミリポア社製）の一領域に、固相抗体として抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体〔23G312、23G494、M2110169（Fitzgerald社製）〕を固定化し、検出領域とした。すなわち、当該抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質モノクローナル抗体のPBS溶液をそれぞれ点滴・固定化し、検出領域とした。このろ紙の下方（検体供給領域）より、ノニデットP-40を含有する反応用溶液で希釈したA型インフルエンザウィルス液（H1N1：A/Beijing/262/95）と上記で作製された金コロイド標識化抗体のTris溶液とを等量混合した溶液0.1 mLを展開させた。その結果、いずれの抗体の組み合わせ（固相抗体と標識抗体との組み合わせ）においても検出領域に顕著な赤色のスポットが確認された。スポットが目視で確認できる時間を比較したところ、固相抗体と標識抗体にヒト抗体を用いた組み合わせにおいては、いずれの組み合わせにおいても、固相抗体と標識抗体にマウス抗体を用いた組み合わせに比較して、約2倍速いことが認められた。

10

## 【0150】

更に、検出感度を検討すべく、表1及び表2に示す様な固相抗体と標識抗体との組み合わせを用いて、各種濃度に調製したA型インフルエンザウィルス液（H1N1：A/Beijing/62/95、H3N2：A/Panama/2007/99）と金コロイド標識化抗体を展開し、スポットの着色を目視で観察した。

## 【0151】

## 【表1】

	固相抗体	標識抗体	H1N1 (ng/mL)			
			250	62.5	15.6	3.9
マウス抗体	M2110169	M322211	++	++	+	—
ヒト抗体	23G312	23G272	++	++	+	—
	23G494	23G447	++	++	++	—

20

## 【0152】

## 【表2】

	固相抗体	標識抗体	H3N2 (ng/mL)			
			250	62.5	15.6	3.9
マウス抗体	M2110169	M322211	++	+	—	—
ヒト抗体	23G312	23G272	++	+	—	—
	23G494	23G447	++	++	+	—

30

## 【0153】

その結果、表1及び表2に示す様に、固相抗体、標識抗体共に、市販マウス抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体〔M322211、M2110169（Fitzgerald社製）〕を用いた場合に比較して、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を固相抗体、標識抗体の両方に用いた場合は、H1N1については同程度以上、H3N2については4倍以上の高感度検出が可能であることが示された。

40

## 【0154】

以上のことから、イムノクロマトグラフィーによるA型インフルエンザウィルスの検出に、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が利用可能であり、さらに、マウス抗A型インフルエンザウィルス抗体を用いた場合に比較して、ヒト抗A型インフルエンザウィルス核タンパク質抗体を用いた場合には、A型インフルエンザウィルスを迅速かつ高感度に検出できることが判明した。

## 【0155】

## 〔実施例3〕

アクリジニウム標識化抗体の作製

50

後述の実施例 4 において取得した 7 種のヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体 [ 23G268, 23G272, 23G285, 23G312, 23G447, 23G494 ( 以上、A 型 ) ; 23G327 ( B 型 ) ] および市販マウス抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体それぞれにアクリジニウムエステル ( 同仁化学研究所社製 ) を反応させ、ゲルろ過により未反応のアクリジニウムエステルを除去し、アクリジニウム標識化抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体を得た。

【 0 1 5 6 】

モノクローナル抗体を用いた A 型インフルエンザウイルス検出

96 ウェルマイクロタイタープレート ( ヌンク社製 ) に、PBS で希釈した抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体 ( 10  $\mu$ g/mL ) を各ウェルに 50  $\mu$ L ずつ分注し、4 で一晩静置した。ウェル内の溶液を除去後、1% BSA/PBS 溶液を 100  $\mu$ L ずつ分注し、室温で 2 時間反応させてブロッキングした。0.5% ノニデット P-40、0.5% BSA を含有する PBS で希釈した 3 種のインフルエンザウイルス液 ( H1N1 : A /Beijing/262/95、H3N2 : A /Panama/2007/99、B : B /Victoria/504/00 ) を各ウェルに 50  $\mu$ L 加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween20 を含む PBS で洗浄した後、アクリジニウム標識化抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体を 50  $\mu$ L 加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween20 を含む PBS で洗浄した後、アクリジニウム由来の発光量を測定し、ブランクの発光量との S/N 比を求めた。結果を図 7 に示す。この結果より固相抗体として 23G268 抗体を、標識抗体として 23G285 抗体を用いる組み合わせが最も高感度であることが示された。

【 0 1 5 7 】

さらに、S/N 比 2.1 以上を陽性とし検出感度を求めた。結果を表 3 [ A 型インフルエンザウイルス検出感度 ( ng/mL ) ] に示す。

【 0 1 5 8 】

【 表 3 】

	固相抗体	標識抗体	検出感度 (ng/mL)	
			H1N1	H3N2
マウス抗体	HB-65	M322211	50	50
	M322211	M2110169	12.5	6.25
	M322211	HB-65	12.5	12.5
ヒト抗体	23G268	23G285	6.25	6.25

【 0 1 5 9 】

表 3 から明らかな通り、固相抗体に 23G268 を、標識抗体に 23G285 を用いた場合、固相抗体、標識抗体共に市販マウス抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体 [ M322211、M2110169 ( Fitzgerald 社製 ) ; ATCC HB-65 ] を用いた場合と比較すると、H3N2 については同程度以上、H1N1 については 2 倍以上の高感度検出が可能であることが示された。

【 0 1 6 0 】

モノクローナル抗体を用いた B 型インフルエンザウイルス検出

96 ウェルマイクロタイタープレート ( ヌンク社製 ) に、PBS で希釈したインフルエンザ B 型ウイルス核タンパク質モノクローナル抗体 ( 10  $\mu$ g/mL ) を各ウェルに 50  $\mu$ L ずつ分注し、4 で一晩静置した。ウェル内の溶液を除去後、1% BSA/PBS 溶液を 100  $\mu$ L ずつ分注し、室温で 2 時間反応させてブロッキングした。0.5% ノニデット P-40、0.5% BSA を含有する PBS で希釈した 3 種のインフルエンザウイルス液 ( H1N1 : A /Beijing/262/95、H3N2 : A /Panama/2007/99、B : B /Victoria/504/00 ) を各ウェルに 50  $\mu$ L 加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween20 を含む PBS で洗浄した後、アクリジニウム標識抗 B 型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体を 50  $\mu$ L 加え、室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween20 を含む PBS で洗浄した後、アクリジニウム由来の発光量を測定し、ブランクの発光量との S/N 比を求めた。結果を図 8 に示す。固相抗体として 23G237 を、標識抗体として M

2110171 (Fitzgerald社製) を用いることで最も高感度で検出できることが判明した。

【 0 1 6 1 】

さらに、S/N比2.1以上を陽性とし検出感度を求めた。結果を表4 [ B型インフルエンザウイルス検出感度 (ng/mL) ] に示す。

【 0 1 6 2 】

【表4】

		標識	
		M2110171	23G327
固相	M2110171	125	31.3
	41027	62.5	15.6
	2/3	62.5	62.5
	23G327	31.3	125

10

【 0 1 6 3 】

表4より、市販マウスモノクローナル抗体 [ M2110171 (Fitzgerald社製) ; 41027 (Capricorn社製) ; 2/3 (Hytest社製) ] と本発明のヒト抗体23G327抗体を組み合わせることにより、固相抗体、標識抗体共にM2110171を用いる場合に比較して、2 ~ 8倍の高感度検出が可能となることが示された。

【 0 1 6 4 】

ウイルス株特異性の検討

図7、8に示す様に、モノクローナル抗体を用いたインフルエンザウイルス検出評価において、固相抗体と標識抗体を同一クローンとしても検出可能であることが示された。そこで同一クローンの固相抗体・標識抗体を用いてウイルス株特異性評価を行った。

20

【 0 1 6 5 】

96ウェルマイクロタイタープレート (ヌンク社製) に、PBSで希釈したインフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体 (10 µg/mL) を各ウェルに50 µLずつ分注し、4で一晩静置した。ウェル内の溶液を除去後、1% BSA/PBS溶液を100 µLずつ分注し、室温で2時間反応させてブロッキングした。各種インフルエンザウイルス株 [ NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) より購入 ] を0.5% ノニデットP-40、0.5% BSAを含有するPBSで1 µgHA/mLとなる様に希釈した後、各ウェルに50 µL加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで洗浄した後、固相抗体と同一クローンのアクリジニウム標識化抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体を50 µL加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで洗浄した後、アクリジニウム由来の発光量を測定し、ブランクの発光量とのS/N比が2.1以上を陽性 (○)、2.1未満を陰性 (×) と判定した。インフルエンザA型ウイルス核タンパク質モノクローナル抗体の結果を表5 - 1および表5 - 2に、インフルエンザB型ウイルス核タンパク質モノクローナル抗体の結果を表6 - 1および表6 - 2に示す。

30

【 0 1 6 6 】

40

【表 5 - 1】

		A型NP抗体																		
		ヒト抗体					マウス抗体													
		23G268	23G272	23G285	23G312	23G447	23G494	M322211	M2110169	HB-65										
H1N1	A/Beijing/262/95	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Brazil/11/78	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Chile/1/83	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Johannesburg/82/96	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/New Caledonia/20/99	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/New Caledonia/20/99(IVR-116)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/New Jersey/8/76	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Solomon Islands/3/2006	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Taiwan/1/86	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Texas/36/91	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/USSR/92/77	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Bangkok/1/79	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Beijing/32/92	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/England/427/88	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
A/Leningrad/360/86	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Mississippi/1/85	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Guizhou/54/89	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Johannesburg/33/94	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/New York/55/2004	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/OMS/5389/88	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Philippines/2/82	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Shangdong/9/93	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Shanghai/16/89	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Shanghai/24/90	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Sichuan/2/87	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Sydney/5/97	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Texas/1/77	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Wisconsin/67/2005(NYMCX-161-B)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Wisconsin/67/2005(NYMCX-161)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Hiroshima/52/2005	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Wyoming/03/03	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
H3N2	A/Beijing/262/95	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Brazil/11/78	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Chile/1/83	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Johannesburg/82/96	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/New Caledonia/20/99	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/New Caledonia/20/99(IVR-116)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/New Jersey/8/76	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Solomon Islands/3/2006	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Taiwan/1/86	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Texas/36/91	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/USSR/92/77	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Bangkok/1/79	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/Beijing/32/92	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A/England/427/88	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
A/Leningrad/360/86	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Mississippi/1/85	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Guizhou/54/89	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Johannesburg/33/94	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/New York/55/2004	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/OMS/5389/88	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Philippines/2/82	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Shangdong/9/93	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Shanghai/16/89	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Shanghai/24/90	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Sichuan/2/87	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Sydney/5/97	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Texas/1/77	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Wisconsin/67/2005(NYMCX-161-B)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Wisconsin/67/2005(NYMCX-161)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Hiroshima/52/2005	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
A/Wyoming/03/03	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

10

20

30

40

【表 5 - 2】

H3N8	A/Equine/Kentucky/1/81	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	A/Equine/Miami/63	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	A/Equine/Newmarket/1/93	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	A/Equine/Newmarket/2/93	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
B	A/Vietnam/1194/04	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Malaysia/2506/2004	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Jiangsu/10/2003	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Ann Arbor/1/86	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Beijing/7/87	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Guangdong/120/2000	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Harbin/7/94	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Hong Kong/8/73	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Johannesburg/5/99	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Norway/1/84	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Panama/45/90	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Shandong/7/97	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Singapore/222/79	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
	B/Victoria/2/87	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x	
B/Yamagata/16/88	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x		
B/Yamanashi/166/98	○ ○ ○ ○ ○	x x x x x x x x x x x x x x ○ x		

10

20

30

40

【 0 1 6 8 】

50



(表5-2は表5-1の続きの表である。)

【0169】

【表6-1】

	ウイルス株	B型NP抗体		
		マウス抗体		
		ヒト抗体	M2110171	41027
		23G327		2/3
H1N1	A/Beijing/262/95	X	X	X
	A/Brazil/11/78	X	X	X
	A/Chile/1/83	X	X	X
	A/Johannesburg/82/96	X	X	X
	A/New Caledonia/20/99	X	X	X
	A/New Caledonia/20/99(IVR-116)	X	X	X
	A/New Jersey/8/76	X	X	X
	A/Solomon Islands/3/2006	X	X	X
	A/Taiwan/1/86	X	X	X
	A/Texas/36/91	X	X	X
	A/USSR/92/77	X	X	X
	A/Bangkok/1/79	X	X	X
	A/Beijing/32/92	X	X	X
	A/England/427/88	X	X	X
A/Leningrad/360/86	X	X	X	
A/Mississippi/1/85	X	X	X	
A/Guizhou/54/89	X	X	X	
A/Johannesburg/33/94	X	X	X	
A/New York/55/2004	X	X	X	
A/OMS/5389/88	X	X	X	
A/Philippines/2/82	X	X	X	
A/Shangdong/9/93	X	X	X	
A/Shanghai/16/89	X	X	X	
A/Shanghai/24/90	X	X	X	
A/Sichuan/2/87	X	X	X	
A/Sydney/5/97	X	X	X	
A/Texas/1/77	X	X	X	
A/Wisconsin/67/2005(NYMCX-161-B)	X	X	X	
A/Wisconsin/67/2005(NYMCX-161)	X	X	X	
A/Hiroshima/52/2005	X	X	X	
A/Wyoming/03/03	X	X	X	
H3N2	A/Beijing/262/95	X	X	X
	A/Brazil/11/78	X	X	X
	A/Chile/1/83	X	X	X
	A/Johannesburg/82/96	X	X	X
	A/New Caledonia/20/99	X	X	X
	A/New Caledonia/20/99(IVR-116)	X	X	X
	A/New Jersey/8/76	X	X	X
	A/Solomon Islands/3/2006	X	X	X
	A/Taiwan/1/86	X	X	X
	A/Texas/36/91	X	X	X
	A/USSR/92/77	X	X	X
	A/Bangkok/1/79	X	X	X
	A/Beijing/32/92	X	X	X
	A/England/427/88	X	X	X
A/Leningrad/360/86	X	X	X	
A/Mississippi/1/85	X	X	X	
A/Guizhou/54/89	X	X	X	
A/Johannesburg/33/94	X	X	X	
A/New York/55/2004	X	X	X	
A/OMS/5389/88	X	X	X	
A/Philippines/2/82	X	X	X	
A/Shangdong/9/93	X	X	X	
A/Shanghai/16/89	X	X	X	
A/Shanghai/24/90	X	X	X	
A/Sichuan/2/87	X	X	X	
A/Sydney/5/97	X	X	X	
A/Texas/1/77	X	X	X	
A/Wisconsin/67/2005(NYMCX-161-B)	X	X	X	
A/Wisconsin/67/2005(NYMCX-161)	X	X	X	
A/Hiroshima/52/2005	X	X	X	
A/Wyoming/03/03	X	X	X	

【0170】

10

20

30

【表 6 - 2】

			x x x x x x x x x x o o o o o o o o o o x o o
			x x x x x o o o o o o o o o o o o o o o o o o o
			x x x x x o o o o o o o o o o o o o o o o o o o
			x x x x x o o o o o o o o o o o o o o o o o o o
H3N8	A/Equine/Kentucky/1/81 A/Equine/Miami/63 A/Equine/Newmarket/1/93 A/Equine/Newmarket/2/93		
H5N1	A/Vietnam/1194/04		
B	B/Malaysia/2506/2004		
	B/Jiangsu/10/2003		
	B/Ann Arbor/1/86		
	B/Beijing/7/87		
	B/Guangdong/120/2000		
	B/Harbin/7/94		
	B/Hong Kong/8/73		
	B/Johannesburg/5/99		
	B/Norway/1/84		
	B/Panama/45/90		
B/Shangdong/7/97			
B/Singapore/222/79			
B/Victoria/2/87			
B/Yamagata/16/88			
B/Yamanashi/166/98			

10

20

30

【 0 1 7 1】

( 表 6 - 2 は表 6 - 1 の続きの表である。 )

【 0 1 7 2】

この結果より、本発明のヒト抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体は、ウマ A 型インフルエンザウイルス株である H3N8 型ウイルスの一部とは反応しないものの、それ以外の全てのヒト A 型インフルエンザウイルス株および鳥 A 型インフルエンザウイルス株である H5N1 型ウイルスと反応し、 B 型ウイルス株には反応しないことが判明した。それに対し、市販のマウス A 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体は、 B 型ウイルス株の一部と反応することが判明した。

40

【 0 1 7 3】

また、本発明のヒト抗 B 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体 (23G327) は、全て

50

の A 型インフルエンザウイルス株と反応せず、全ての B 型インフルエンザウイルス株に特異的に反応することが判明した。それに対して、市販のマウス B 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体 2/3 は一部の B 型インフルエンザウイルス株に反応しないことが判明した。

【 0 1 7 4 】

このことから、本発明のヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体は、市販のマウス抗インフルエンザウイルス核タンパク質抗体に比較して、インフルエンザウイルス株に対して高い特異性を示すことが判明した。

【 0 1 7 5 】

・ヒト抗インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体の性能評価  
センサーチップの作製

センサーチップ CM5 を Biacore 2000 にセットし、Running Buffer として HBS-EP (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を 10  $\mu$ L/分の流速で流した。活性化液 (0.4 mol/L の EDC と 0.1 mol/L の NHS の等量混合溶液：各 GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を 7 分間流して接触させた。続けて、Sodium Acetate Buffer, pH5.0 で 10  $\mu$ g/mL に調製したヤギ抗ヒト IgG もしくはヤギ抗マウス IgG (Thermo Scientific 社製) を 7 分間流して CM5 表面に固定化した。続いて、活性化されている残りのカルボン酸をマスクするために、エタノールアミン (1 mol/L, pH8.5) を 7 分間流した。続いて、グリシン - 塩酸バッファー (0.2 mol/L, pH2.2) を 1 分間流して洗浄した。本操作をフローセル 2 において行い、フローセル 1 に対しては同様に EDC、NHS で活性化を行い、IgG の接触を行わずにエタノールアミンのみでマスクした。

【 0 1 7 6 】

モノクローナル抗体を用いたインフルエンザウイルス検出

10  $\mu$ g/mL に調製した抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナル抗体を上記で作製したセンサーチップに流速 5  $\mu$ L/分で 10 分間流すことにより、抗体をセンサーチップ上に捕捉させた。この時、フローセル 2 において得られた信号 (RU) からフローセル 1 において得られた信号 (RU) を差し引いた値を抗体結合量として算出した。その後、HBS-EP にて 10  $\mu$ g/mL に調製した 3 種のインフルエンザウイルス (H1N1 : A/Beijing/262/95、H3N2 : A/Panama/2007/99、B : B/Victoria/504/00) 溶液を流速 5  $\mu$ L/分で 5 分間反応させ、さらに HBS-EP (0.01 mol/L HEPES, 0.15 mol/L NaCl, 3 mmol/L EDTA, 0.005 % surfactant P20) バッファーを流速 5  $\mu$ L/分で 5 分間流した。この時、フローセル 2 において得られた信号 (RU) からフローセル 1 において得られた信号 (RU) を差し引いた値から先述の抗体結合量を差し引いた値を抗原結合量として算出した。反応後、グリシン - 塩酸バッファー (0.2 mol/L, pH1.7) を 1 分間流してセンサーチップを再生させた。市販マウス抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体 (M322211) と 3 種のインフルエンザウイルス (H1N1 : A/Beijing/262/95、H3N2 : A/Panama/2007/99、B : B/Victoria/504/00) 溶液との相互作用を表すセンサーグラムを図 9 - a に、本発明で得られたヒト抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体 (23G272) と 3 種のインフルエンザウイルス (H1N1 : A/Beijing/262/95、H3N2 : A/Panama/2007/99、B : B/Victoria/504/00) 溶液との相互作用を表すセンサーグラムを図 9 - b に示す。本発明のヒト抗体である 23G272 においては、抗原解離反応が認められず、当該抗体が親和性の強い抗体であることが明らかとなった。

【 0 1 7 7 】

また、図 9 - c に示されている他の全てのヒト抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体 (23G268、23G285、23G312、23G447、23G494) についても、23G272 と同様に抗原解離反応が認められず、親和性の強い抗体であることが明らかとなった。この時、フローセル 2 において得られた信号 (RU) からフローセル 1 において得られた信号 (RU) を差し引いた値を算出し、先に算出した抗体結合量との比を抗原結合量とした。結果を図 9 - c に示す。この結果より、23G268 抗体、23G272 抗体、23G285 抗体、23G312 抗体、23G447 抗体及び 23G494 抗体は市販マウス抗 A 型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体と同等以上

10

20

30

40

50

の反応性であることが示された。23G272抗体においては市販マウス抗A型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体より2倍以上の反応性を示しており、結合反応速度が非常に速い性質を持つことが示された。ヒト抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体(23G327)は、市販マウス抗B型インフルエンザウイルス核タンパク質抗体の1つ(2/3)の約0.8倍の反応性であり、抗体2/3に比較して若干、反応性が劣っていた。しかしながら、抗体2/3は表6-2に示す通り、一部のB型インフルエンザウイルス株と反応せず、B型インフルエンザウイルス株との反応において、広範性を有さなかった。B型インフルエンザウイルス株との反応において広範性を有する3種の抗体(23G327、M2110171、41027)間で比較した場合、23G327がM2110171の約1.2倍、41027の約2倍と最も反応性の高い抗体であった。このことから、B型インフルエンザウイルス株との反応性、及び、B型インフルエンザウイルス株との反応における広範性の観点から総合的に判断すると、本発明の抗体である23G327が最も優れていることが示された。

10

## 【0178】

更に上記センサーチップ作成方法と同様の方法で、フローセル2に23G272を、フローセル3にM2110169を、フローセル4にHB-65をそれぞれ、固定化した。固定化量は、それぞれ23G272は1519 RU、M2110169は1773 RU、HB-65は1734 RUであった。作製したチップに10 µg/mLに調整したA/Beijing/262/95を流速5 µL/分で2分間反応させた。結果を図10に示す。23G272はHB-65と比較して10倍程度の抗原結合量を持つことが認められた。また、M2110169はグリシン-塩酸バッファーにより失活し、ウイルスとの反応を示さなかった。

20

## 【0179】

## 〔実施例4〕

## 〔インフルエンザウイルス核タンパク質の調製〕

インフルエンザウイルス核タンパク質遺伝子は公開されている配列情報(A/Puerto Rico/8/34、B/Ann Arbor/1/86)を基に合成し、pSUPEXベクターへ組み込んだ。このベクターを用いて大腸菌(NY49株)を形質転換させ、該形質転換体にインフルエンザウイルス核タンパク質を発現させた。得られたインフルエンザウイルス核タンパク質は、インフルエンザウイルス核タンパク質に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

## 【0180】

## 〔Bリンパ球の調製〕

市販のインフルエンザHAワクチンをヒトボランティアに免疫し、免疫後9日目或いは1ヶ月後に末梢血よりリンパ球を調製した。すなわち、末梢血からヒトリンパ球をリンホセパールI液(免疫生物研究所社製)を用いて遠心分離し、さらにAutoMACS(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いてリンパ球画分から非Bリンパ球分画細胞を除去しBリンパ球画分を分離精製した。

30

## 【0181】

## 〔Bリンパ球への蛍光色素の負荷〕

調製した $2 \times 10^6$ 個Bリンパ球を1 µmol/L Fluo 4-AM(カルシウム依存性蛍光色素、Invitrogen社)/BSA含有RPMIバッファー(loading buffer)[RPMI1640, 3 mg/mL BSA, 25 mmol/L HEPES(pH7.4)]に懸濁し、ゆっくり震盪しながら室温で40~60分インキュベーションした。Fluo 4-AMは細胞膜透過性であるが、一旦細胞内に取り込まれてエステルアゼでAM基がはずされると、Fluo 4-AMは細胞質に留まる。細胞をLoading Bufferで洗浄し、細胞内に導入されなかった余分なFluo 4-AMを除いた後、RPMI1640/10% FCS溶液に懸濁した。なお、以下の全ての実験においてはPhenol Redを含まないRPMI1640を用いた。Fluo 4-AMはカルシウムが結合すると蛍光強度が増加する蛍光色素であり、Bリンパ球の抗原による活性化の検出に用いる。

40

## 【0182】

## 〔マイクロウェルアレイチップ〕

マイクロウェルアレイチップはシリコンを用いて作製されており(富山県工業技術センター製造)、直径10 µm、深さ14 µmのマイクロウェルが25 µmのピッチ(ウェルの中心間

50

の距離)で縦横に配列されている。マイクロウェルは30 x 30 (900ウェル)でひとつのクラスターを形成しており、それが縦に10クラスター、横5クラスター並んでいるものを用いた。

#### 【0183】

[マイクロウェルアレイチップへのリンパ球の播種]

マイクロウェルアレイチップをハクス緩衝液(HBSS)に浸し、減圧脱泡することでウェル中の空気を除くことにより、マイクロウェルへ溶液を満たした。0.2% LIPIDURE-BL-B03(日油株式会社製)でマイクロウェルチップ表面を10~15分間ブロッキング処理した後、余分なバッファーを除き、そこへ上記細胞懸濁液を添加し、10分間静置した。チップ上のマイクロウェルに入らなかった細胞をHBSSで洗い流した。リンパ球の直径は約8 $\mu$ mであり、使用するマイクロウェルの直径が10 $\mu$ mであるために一つのマイクロウェルにはリンパ球が1個入る。カバーガラスを上記シール上に置き、チップとカバーガラスの間にHBSSを満たした。

10

#### 【0184】

[マイクロウェルアレイチップを用いたリコンビナント核タンパク質特異的Bリンパ球の検出]

Bリンパ球を播種したマイクロウェルアレイチップをマイクロチップCCDイメージャー(Micro Chip VIEW 1100; ナノシステムソリューションズ社製)に載せ、抗原刺激前のFluo 4の蛍光強度の経時変化を10秒間隔で100秒測定した。測定を一旦停止して、チップをスキャナーから引き出し、チップとカバーガラスの間のHBSSを除き、そこへHBSSに溶解させたリコンビナント核タンパク質(10~100 $\mu$ g/mL)を加えた。直ちにマイクロウェルアレイチップをマイクロチップCCDイメージャーの測定部へ戻し、抗原添加後の細胞内のFluo 4の蛍光強度の経時変化を10秒間隔でスキャンし、データを保存した。個々の細胞内カルシウム濃度の経時変化が、抗原が特異抗体発現細胞に結合した時に観察される細胞内カルシウム濃度経時変化の典型的パターンとどの程度相関しているかについて、ソフトウェアを用いて解析し、抗原特異的な細胞内カルシウム応答を示す細胞を特定した。

20

#### 【0185】

[Bリンパ球のマイクロウェルからの回収]

検出したリコンビナント核タンパク質に反応し細胞内カルシウムが上昇したBリンパ球は蛍光顕微鏡下でマイクロマニピュレータを用いて回収した。すなわち、まず、カバーガラスとチップの間のHBSSを取り除き、カバーガラスとチップの間に空気を入れることでカバーガラスを取り外した。チップが乾燥しないようにチップにRPMI1640/10% FCS溶液を加え、蛍光顕微鏡下で細胞のFluo 4の蛍光を観察しながら、マイクロマニピュレータで目的の細胞を回収した。

30

#### 【0186】

[Bリンパ球からの抗体遺伝子cDNAの合成]

回収したBリンパ球を予め2.5 $\mu$ Lの逆転写反応溶液[1x 1<sup>st</sup> strand buffer (Invitrogen, SuperScript IIIに添付されている), 0.25 pmol each GSP RTプライマー(Cg-RT, C1-RT及びCk-RT), 0.1 mmol/L each dNTP, 10 mmol/L DTT, 1 mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA), 0.25% NP-40, 1.6 U RNaseOUT(Invitrogen), 0.2x Ampdirect Plus(株式会社島津製作所), 16 U SuperScript III(Invitrogen)]の入ったPCR用チューブに移す。25 $^{\circ}$ C, 10分; 30 $^{\circ}$ C, 5秒; 35 $^{\circ}$ C, 5秒; 40 $^{\circ}$ C, 5秒; 45 $^{\circ}$ C, 5秒; 50 $^{\circ}$ C, 5秒; 55 $^{\circ}$ C, 1時間反応させmRNAよりcDNAを合成した。

40

#### 【0187】

[cDNA-3'末端のGテーリング反応]

合成したcDNA溶液2.5 $\mu$ Lに、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase(TdT)酵素を7.5 U添加し、10 mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mmol/L dGTP存在下、37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。

#### 【0188】

[抗体遺伝子の1回目の増幅]

50

Gテーリング反応が終了したcDNA溶液10 $\mu$ Lに、ヘラクレスII fusion DNAポリメラーゼ酵素を0.25 $\mu$ L添加し、1x ヘラクレスII fusion DNAポリメラーゼ・バッファー、0.25 mmol/L each dNTP、25 pmol Oligo(dC) adaptor、8% DMSO存在下、98 $^{\circ}$ C、2分間；(98 $^{\circ}$ C、20秒；60 $^{\circ}$ C、20秒；72 $^{\circ}$ C、30秒) x 23サイクル；72 $^{\circ}$ C、3分間反応させる。このPCRの反応により抗体遺伝子のOligo(dC) adaptor配列から定常部領域までのDNAが増幅される。

## 【0189】

[抗体遺伝子の2回目の増幅]

続いて2回目のPCR反応を行い、取得した細胞のH鎖及びL鎖のV領域のcDNAを別個のチューブを用いて増幅した。具体的には、1回目に得られたPCR反応溶液3.3 $\mu$ Lを鋳型に、ヘラクレスII fusion DNAポリメラーゼ酵素を0.05 $\mu$ L添加し、1x ヘラクレスII fusion DNAポリメラーゼ・バッファー、0.25 mmol/L each dNTP、2.5 pmol AP1プライマー、2.5 pmol Cg-1stプライマー或いはCl-1st & Ck-1stプライマー、8% DMSO存在下、98 $^{\circ}$ C、2分間；(98 $^{\circ}$ C、20秒；55 $^{\circ}$ C、20秒；72 $^{\circ}$ C、30秒) x 30サイクル；72 $^{\circ}$ C、3分間反応させる。

## 【0190】

[抗体遺伝子の3回目の増幅]

2回のPCRではcDNAが十分増幅されないため、3回目の増幅を行った。2回目に得られたPCR反応溶液0.02 $\mu$ Lを鋳型に、TaKaRa LA Taqポリメラーゼ酵素を0.05 $\mu$ L添加し、1x GCバッファー、0.2 mmol/L each dNTP、3 pmol AP2プライマー、3 pmol Cg-nestプライマー或いはCl-nest & Ck-nestプライマー存在下、94 $^{\circ}$ C、3分間；(94 $^{\circ}$ C、20秒；55 $^{\circ}$ C、20秒；72 $^{\circ}$ C、90秒) x 30サイクル；72 $^{\circ}$ C、3分間反応させる。3回目のPCRにより、抗体遺伝子の可変部領域から定常部領域までのcDNA配列が増幅される。使用したプライマーの配列を表7(単一細胞5'-RACEに用いたプライマー)に示す。

## 【0191】

## 【表7】

配列名	配列番号	塩基配列
Oligo(dC) adaptor	配列番号: 29	ACAGCAGGTCAGTCAAGCAGTAGCAGCAGTTCGATAA GCGGCCGCCATGGACCCCCCCCCCCC(AGT)(ACGT)
AP1	配列番号: 30	ACAGCAGGTCAGTCAAGCAGTA
AP2	配列番号: 31	AGCAGTAGCAGCAGTTCGATAA
Cg-RT	配列番号: 32	AGGTGTGCACGCCGCTGGTC
Cg-1st	配列番号: 33	CGCCTGAGTTCACGACACC
Cg-nest	配列番号: 34	TCGGGGAAGTAGTCCTTGAC
Cl-RT	配列番号: 35	ACAC(CT)AGTGTGGCCTTGTT
Cl-1st	配列番号: 36	GCTTG(AG)AGCTCCTCAGAGG
Cl-nest	配列番号: 37	GGG(CT)GGGAACAGAGTGACC
Ck-RT	配列番号: 38	GTTATTCAGCAGGCACACAA
Ck-1st	配列番号: 39	GAGGCAGTTCAGATTTCAA
Ck-nest	配列番号: 40	GGGAAGATGAAGACAGATGGT

## 【0192】

尚、上記表7の塩基配列中、括弧( )書きは、括弧内の塩基のいずれか1つが選択されることを意味する。

## 【0193】

[増幅した抗体遺伝子の塩基配列の決定]

PCR産物を、アガロースゲルを用いて解析、精製し、pGEM-T Easy vector (Promega) に挿入し、抗体遺伝子の塩基配列を決定し、タンパクに翻訳されることを確認した。H鎖のV

領域のcDNAの塩基配列を配列番号：1～7に、アミノ酸配列を配列番号：8～14に示す。さらに、L鎖のV領域のcDNAの塩基配列を配列番号：15～21に、アミノ酸配列を配列番号：22～28に示す。

【0194】

[抗体タンパクの産生、抗原結合能の解析]

RT-PCR法にて増幅した抗体のH鎖およびL鎖の可変領域遺伝子を抗体タンパク発現用ベクター(図4-a、4-b、4-c)に組込んだ。すなわち、増幅した抗体のH鎖可変領域の遺伝子断片はpMXv6-hlg ベクターのV<sub>H</sub>の部分に、L鎖可変領域の遺伝子断片はpMXv6-hlg のV<sub>L</sub> 又はpMXv6-hlg ベクターのV<sub>L</sub>の部分に制限酵素を用いて挿入した。作製したH鎖およびL鎖の発現ベクターから抗体タンパクを発現させるために、両方の発現ベクターを同時にヒト胎児腎由来細胞293T細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入はLipofectamine 2000 (Invitrogen社)を用いて常法に従い行った。5～7日後に細胞上清を回収した。この培養上清中の抗体のリコンビナント核タンパク質への結合能を、リコンビナント核タンパク質をコートした96ウェルプレートを用いたELISA法により測定した。ELISAによる測定は以下のように行った。すなわち、96穴プレートにPBSで希釈したリコンビナント核タンパク質(10 µg/mL)を各ウェルに50 µLずつ分注し、4℃で一晩静置し吸着させた。非特異的結合を除去する為に3%BSA添加PBSを各ウェルに150 µLずつ分注し、室温で1時間反応させブロッキングした。ネガティブコントロールのウェルとして、抗原を吸着させず、ブロッキングしたウェルも作成した。その後、上記293T細胞の培養上清を各ウェルに50 µLずつ分注し、室温で2時間反応させた。ウェルをTBS-Tで洗浄し、1/2,000倍希釈したhorseradish peroxidase (HRP)標識抗ヒト免疫グロブリンを各ウェルに50 µLずつ分注し、室温で1.5時間反応させた。ウェルをTBS-Tで洗浄し、クエン酸-リン酸緩衝液(12 mmol/Lクエン酸、26 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH5.0)に溶解した0.4 mg/mL o-phenylenediamine (OPD; HRP基質)を各ウェルに50 µLずつ分注し、室温で15分反応後にマイクロプレートリーダーにて、492 nmにおける吸光度を測定した。

10

20

【0195】

さらに、本発明のモノクローナル抗体の抗原への結合の特異性をチェックするために、抗体を含む細胞培養上清をウェルに添加する際に、可溶性のリコンビナント核タンパク質と培養上清とをプレインキュベーションさせた。その混合液をウェルに添加し、ウェルに吸着させたリコンビナント核タンパク質への抗体の結合が可溶性のリコンビナント核タンパク質により競合的に阻害されるかを検討した。結果を図5-aおよび5-bに示す。

30

【0196】

図5-aおよび5-bに示されるように、作製した23G268抗体、23G272抗体、23G285抗体、23G312抗体、23G447抗体及び23G494抗体は、リコンビナントA型インフルエンザウィルス核タンパク質に特異的に結合し、リコンビナントB型インフルエンザウィルス核タンパク質には結合しなかった。さらに、結合の特異性を検討するために上記6種類の抗体と可溶性のリコンビナントA型インフルエンザウィルス核タンパク質を混合したものをリコンビナントA型インフルエンザウィルス核タンパク質が結合しているウェルに加え同様にELISAを行った。その結果、ウェルに結合したリコンビナントA型インフルエンザウィルス核タンパク質への抗体の結合が、可溶性リコンビナントA型インフルエンザウィルス核タンパク質により用量依存的、競合的に阻害されることが観察された。この結果より、23G268抗体、23G272抗体、23G285抗体、23G312抗体、23G447抗体及び23G494抗体は、リコンビナントA型核タンパク質に特異的に結合することが示された。

40

【0197】

一方、作製した23G327抗体はリコンビナントB型インフルエンザウィルス核タンパク質に特異的に結合し、リコンビナントA型インフルエンザウィルス核タンパク質には結合しなかった。さらに、結合の特異性を検討するために23G327抗体と可溶性のリコンビナントB型インフルエンザウィルス核タンパク質を混合したものをリコンビナントB型インフルエンザウィルス核タンパク質が固定されているウェルに加え同様にELISAを行った。その結果、ウェルに固定されたリコンビナントB型インフルエンザウィルス核タンパク質への

50

23G327抗体の結合が、可溶性リコンビナントB型インフルエンザウィルス核タンパク質により用量依存的、競合的に阻害されることが観察された。この結果より23G327抗体がリコンビナントB型インフルエンザウィルス核タンパク質に特異的に結合することが示された。

【0198】

直接ELISAによるウィルス特異性の検討

96ウェルマイクロタイタープレート（ヌンク社製）に、PBSで希釈した種々のインフルエンザウィルス核タンパク質抗原(10 μg/mL)を各ウェルに50 μLずつ分注し、4℃で一晩静置した。ウェル内の溶液を除去後、1% BSA/PBS溶液を100 μLずつ分注し、室温で2時間反応させてブロッキングした。

【0199】

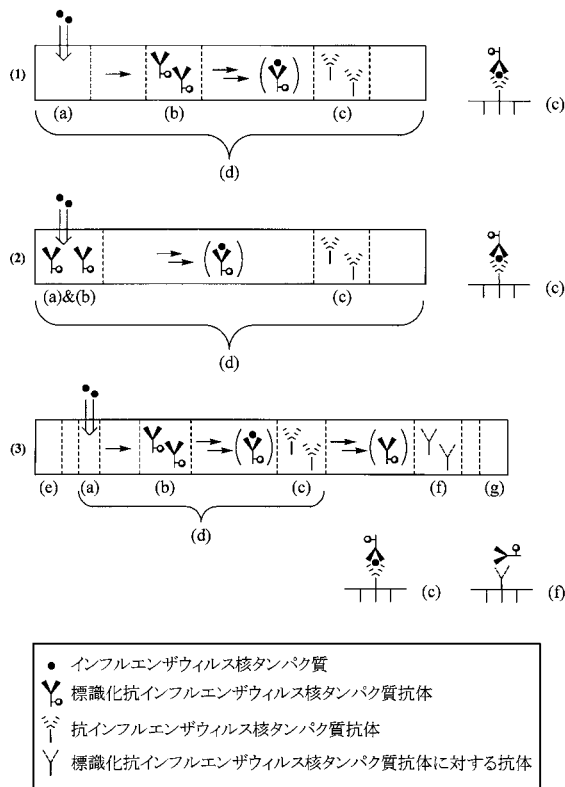
ウェル内の溶液を除去後、上記で得られた培養上清あるいはヒトIgG1を0.1% BSA/PBS溶液で希釈し、各ウェルに50 μLずつ加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで洗浄した後、HRP標識ウサギ抗ヒトIgG抗体を加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween20を含むPBSで洗浄した後、TMB発色溶液を50 μL加え、室温で30分間反応させた。最後に反応停止液(1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)を50 μL加え、マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定した。結果を図6に示す。この結果より、23G268抗体、23G272抗体、23G285抗体、23G312抗体、23G447抗体及び23G494抗体は、A型インフルエンザウィルスに特異的に結合することが示され、23G327抗体は、B型インフルエンザウィルスに特異的に反応することが示された。

【産業上の利用可能性】

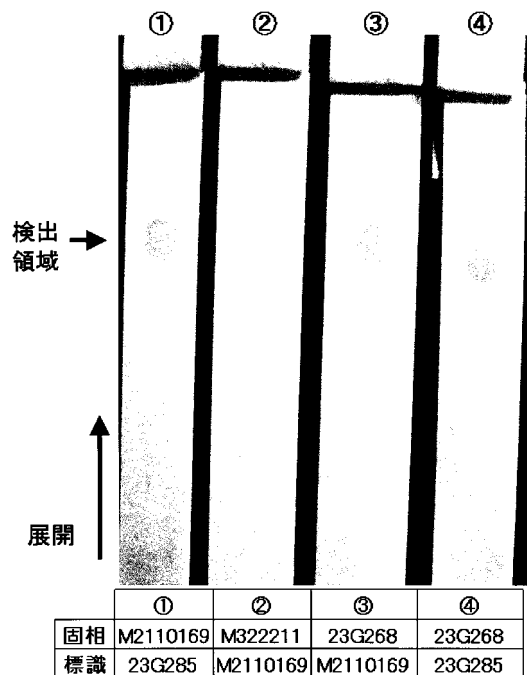
【0200】

本発明により、インフルエンザウィルス感染診断用のデバイス及びキット、並びに、これらに用いられるヒト抗インフルエンザウィルス核タンパク質抗体が提供される。

【図1】

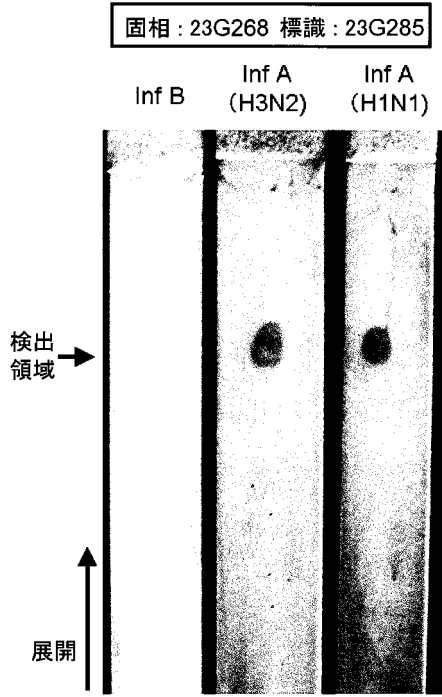


【図2 - a】

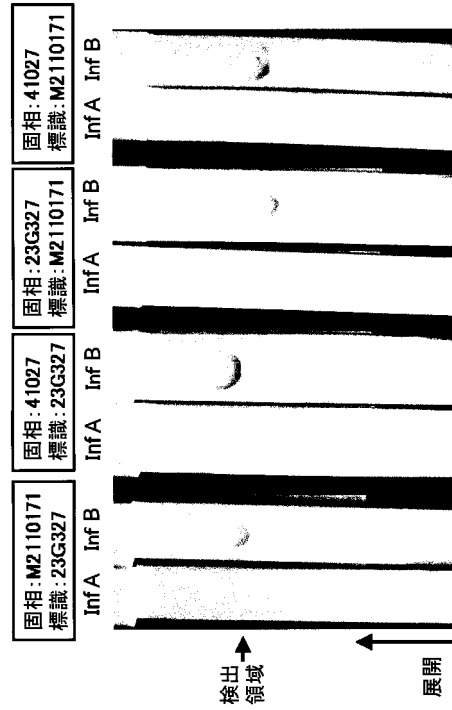




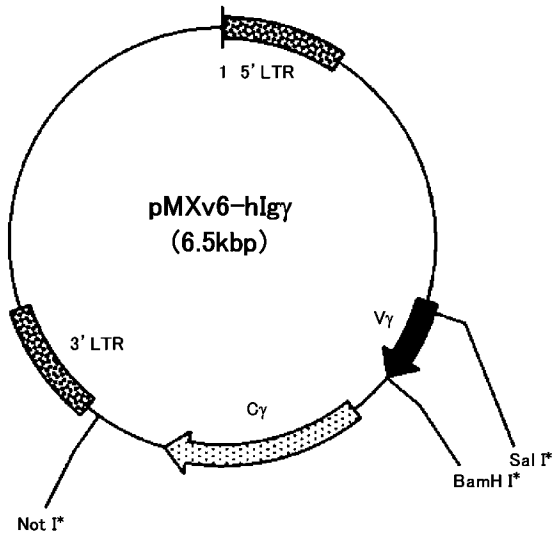
【 図 2 - b 】



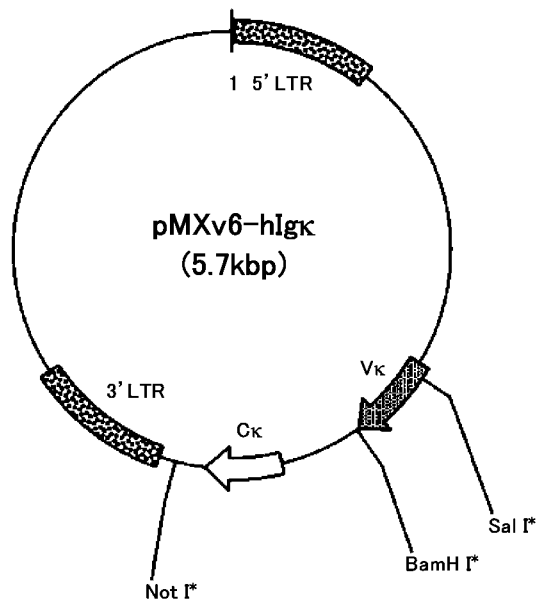
【 図 3 】



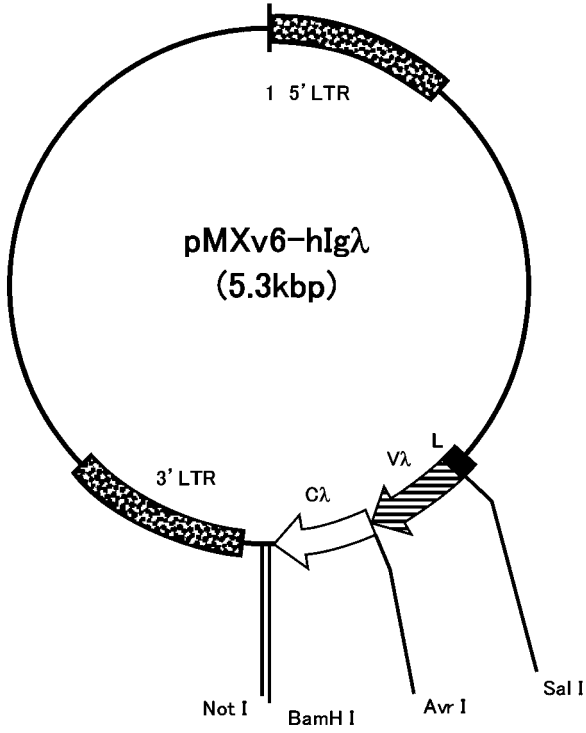
【 図 4 - a 】



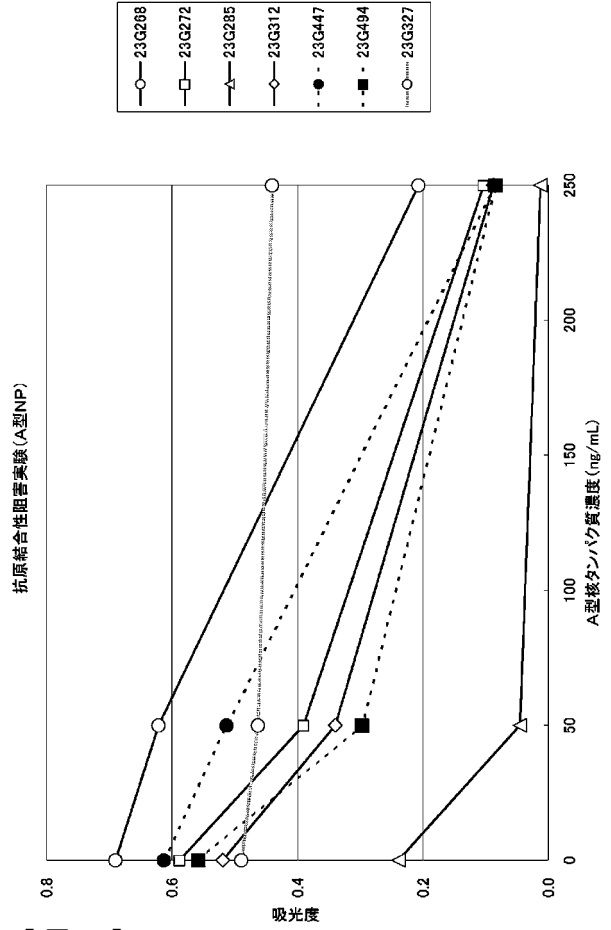
【 図 4 - b 】



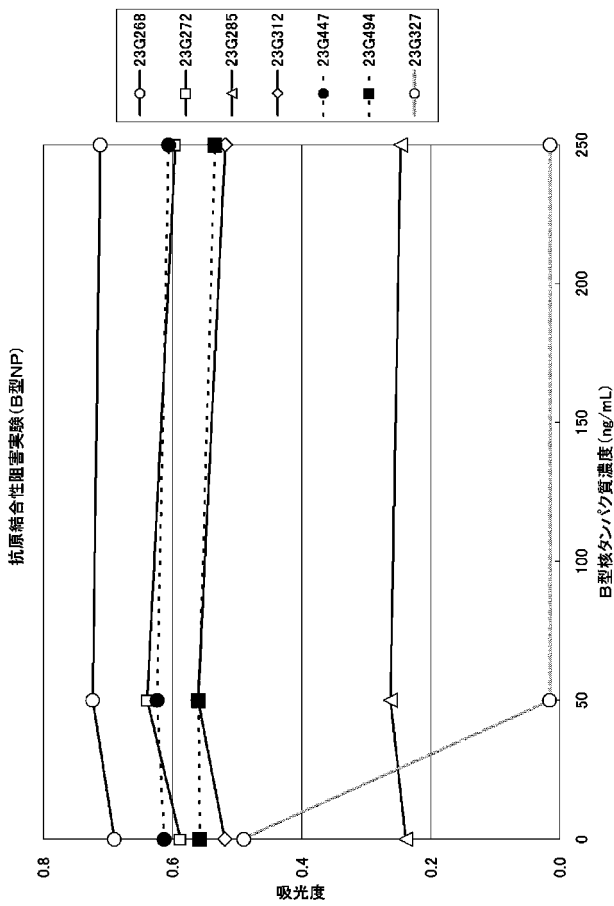
【 図 4 - c 】



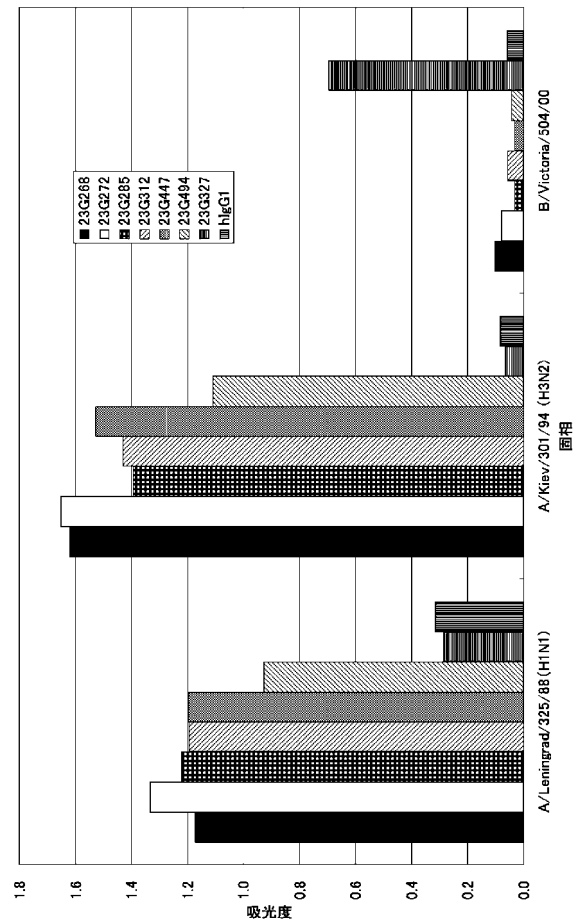
【 図 5 - a 】



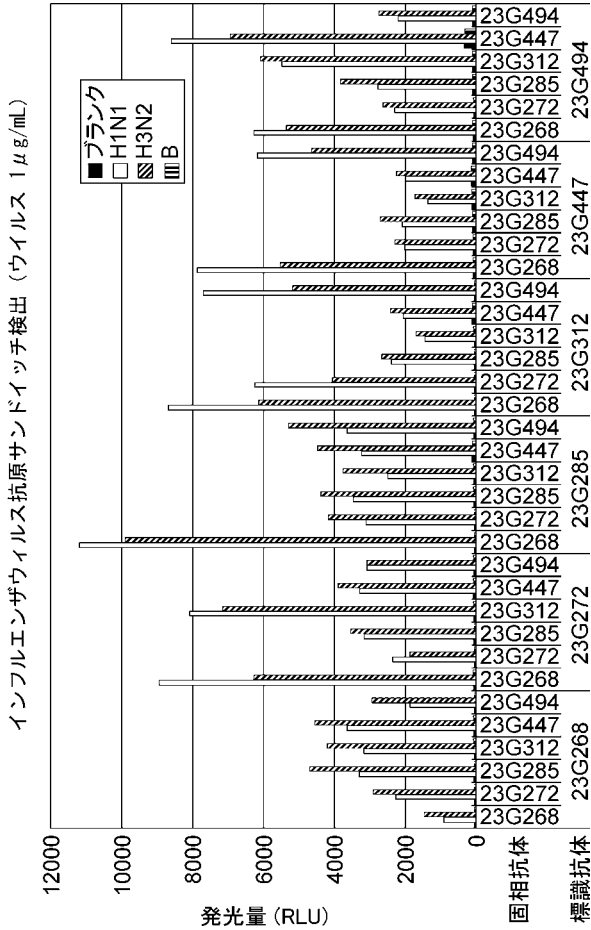
【 図 5 - b 】



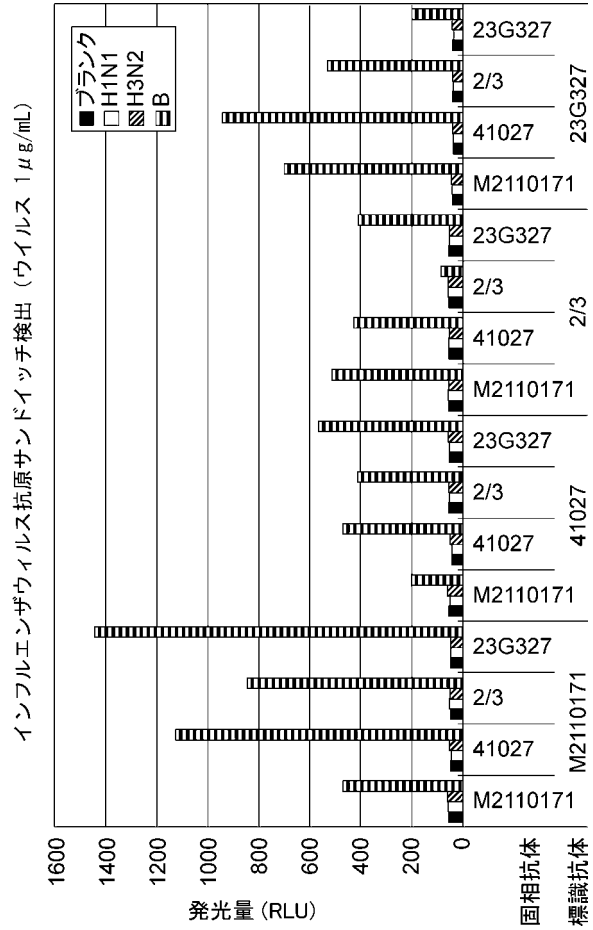
【 図 6 】



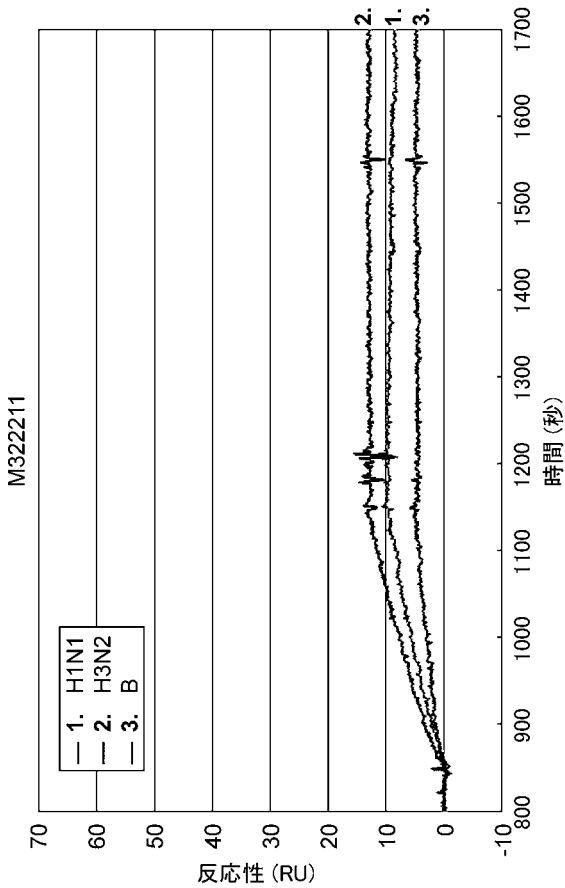
【 図 7 】



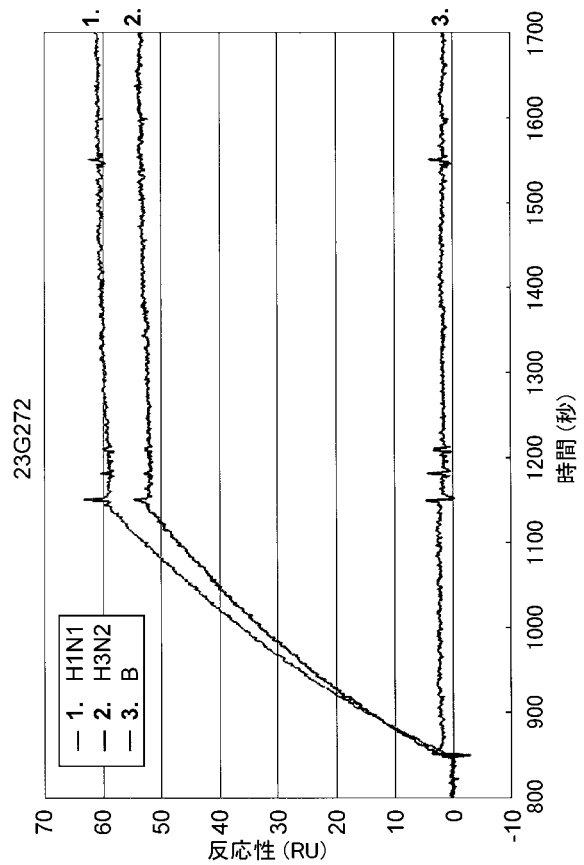
【 図 8 】



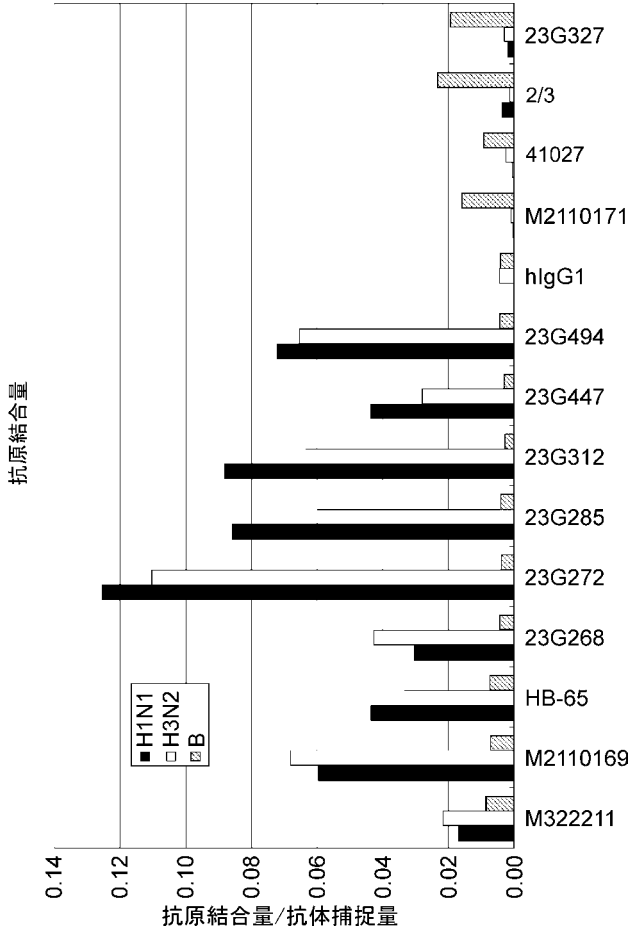
【 図 9 - a 】



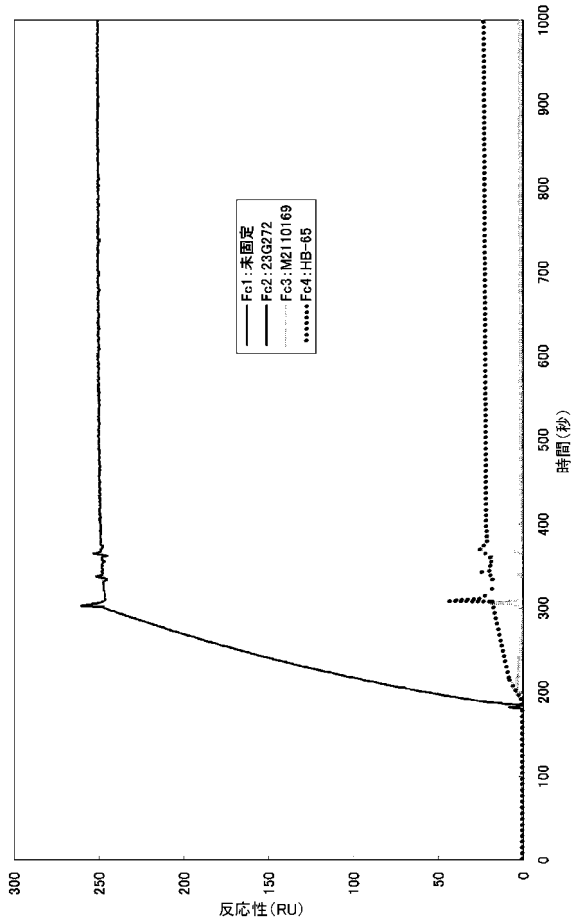
【 図 9 - b 】



【 図 9 - c 】



【 図 10 】



【 図 11 - a 】

配列番号：1 (A型H鎖)  
**23G268 H-chain**  
 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GTG GTG AAG AAG CCT GGG GAC  
 TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG CCA TCT GGA TAC ACG TTC ACC ACC  
 TAC TGG ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CCC GAA  
 TGG ATG GGA ATA CTC AAT CCC ACA GGT GCC ACC GTT ATG TAC GCA  
 AAG AAG TTC CAG GGT CGG GTC ATC ATG ACC AGG GAC ACG TCC ACG ACG  
 ACA GTC TTT TTG CAA CTG AAC GGC CTG GAA TCT GAG GAC ACC GCC ATA  
 TAT TAC TGT CCG AGA GAT CTG GGG CCT GCA AGG GTG GAT TTT GAC  
 TGG TTG TCC ACC TTT GTC TCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC  
 GTC TCC TCA G

【 図 11 - d 】

配列番号：22 (A型L鎖)：23G268 対応のアミノ酸配列  
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQGITRHLNHWYQQKSGKAPKLLIYDASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGADFTLTISVQPEDFATYYCQSYSNPPTFGPGTKVDIKR

【 図 11 - b 】

配列番号：15 (A型L鎖)  
**23G268 L-chain**  
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCG TCC CTG TCT GCA TCT GTG GGA  
 GAC AGA GTC ATC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT ACC AGA  
 CAG TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA TCA GGC AAA GCC CCC AAA CTC  
 CTG ATC TAC CAT GCG TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCC AGG  
 TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG GCA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT  
 GTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAT  
 AGT AAC CCT CCG ACT TTC GGC CCC GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA  
 CGT GAG

【 図 12 - a 】

配列番号：2 (A型H鎖)  
**23G272 H-chain**  
 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC  
 TCG GTG AAG GTA TCC TGC AAG GCT ACC GGA GAC ACC TTC AGC AGC  
 TAT TCT ATC AGC TGG GTG CGA CAG GCT CCT GGA CAA GGG CTT GAG  
 TGG ATG GGA AGG GTC ACC CCT TCC TTT GGA ATA TCA CTC TAC GCA  
 CAG AAA TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC GCG GAC AGA TCC TCG AGC  
 ACA GCC TAT ATG GAG CTG AAC AAC CTG ACA TCT GAT GAC ACC GCC GTG  
 TAT TAC TGT CCG GCT GGG GGT CTT GTA GTG GTG GTG GCG AAC CAG  
 TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G

【 図 11 - c 】

配列番号：8 (A型H鎖)：23G268 対応のアミノ酸配列  
 QVQLVQSGAVVKKPGDSVSKVSKASGYTFYYMHVVRQAPGQPEWMI VNPFGGTVM  
 YAKKFGQRVIMTRDSTTTVFLQLNGLESEDAIYYCARDLGPARDVDFDLSTFVSWGQ  
 GTLVTVSS

【 図 12 - b 】

配列番号：16 (A型L鎖)  
**23G272 L-chain**  
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GCA TCT GTG GGA  
 GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCG AGT CAG GAC ATT ACC AGT  
 TCC TTA GGC TGG TAT CAG CAG AGA GCA GGG GAA GCC CCG AAG CTC  
 CTG CTC TTT CTT GCA TCC AGA TTG GAA AGT GGG GTC CCG TCC AGG  
 TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAA TAT ACT CTC ACC ATC AGC AAC  
 CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CTA CAC TAT TTT  
 GGT TCC CGT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAG ATC  
 AAA CGT G

【 図 1 2 - c 】

配列番号：9 (A型H鎖)：23G272 対応のアミノ酸配列  
 QVQLVQSGAEVKKFGSSVKVCKATGDTFSSYSISWVRQAPGQGLEWMGRVTPSFGISL  
 YAKRFQGRVITITADRSSSTAYMELNNLTSDDTAVVYCAAGGLVYVVANHWGQGLTVTVS  
 S

【 図 1 2 - d 】

配列番号：23 (A型L鎖)：23G272 対応のアミノ酸配列  
 EIVLTQSPATLSASVGDVRVITICRASQDITSSLGWYQQRAGEAPKLLLFASRLSEGV  
 SRFSGSGSGTEYTLTISNLPEDFATYYCLHYFGRFRTFGQGTKEIKR

【 図 1 3 - a 】

配列番号：3 (A型H鎖)  
**23G285 H-chain**  
 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG  
 TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGA  
 TAT GGG ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG  
 TGG GTG GCA GTG ATA TTA TAT GAG GGA ATT AAT AAA GAC TAT GCA  
 GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC TCC AAG AAC  
 ACA CTG TAT TTG CAA ATG AAT AGT CTG AGA GCC CAG GAC ACG GCT CTG  
 TAT TAC TGT GCG AGA GAT CGT GAG CTG CGA CTT GAC TAC TGG GGC  
 CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

【 図 1 3 - b 】

配列番号：17 (A型L鎖)  
**23G285 L-chain**  
 CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCG CCC TCA GTG TCT GGG GCC CCA GGG CAG  
 AGG GTC ACC TTC TCC TGC ACT GGG AGC AGC TCC AAC ATC GGG GCA  
 GGT TAT GAT GTA AAC TGG TAC CAG CAG CTT CCA GGA ACA GCC CCC  
 AAA GTC CTC ATC TAT GGC AAC ACC AAT CGG CCC TCA GGG GTC CCT  
 GAT CGA TTC TCT GCC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC ATC  
 ACT GGG CTC CAG GCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGC CAG TCC  
 TAT GAC AGT AGC CTG AGG GGT TAT GTC TTC GGA ACA GGG ACC AAG  
 GTC AGC GTC CTA

【 図 1 3 - c 】

配列番号：10 (A型H鎖)：23G285 対応のアミノ酸配列  
 QVQLVQSGGGVQVQGRSLRLSCAAAGFTFSRYCMHWVRQAPGKLEWVAVILYEGINKD  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDRELRLDYWGQGLTVTVSS

【 図 1 3 - d 】

配列番号：24 (A型L鎖)：23G285 対応のアミノ酸配列  
 QSVLTQPPSVSGAPQVRVTFSCGSSSNIAGYDVNWNWYQQLPGTAPKVLIIYQNTNRP  
 SVPDRFSASKSGTSASLAITGLQAEDEADYCYQSYDSSLRGYYVFGTGTQVSVL

【 図 1 4 - a 】

配列番号：4 (A型H鎖)  
**23G312 H-chain**  
 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG  
 TCC CTG AGA CTC TCT TGT ATA GCC TCT GGA TTC AGT TTT GAT GAT  
 TAT GCG ATG CAC TGG GTC CGG CAA ATT CCA GGG AAG GGC CTG GAG  
 TGG GTC TCA GGT ATT AGT TGG AAC AGT GGT GCC AGA GGC TAT GCG  
 GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTT ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAA AAT  
 TCC CTG TAT CTA CAA ATG AAC AGT CTC AGA GTT GGG GAC ACG GCC TTC  
 TAT TAC TGT GCC AGA GAC ATG GGG GCC GGG CCA AAT GAT TAT GAT  
 ACC AGT GGC AAT TAC CCC CTT CAC CTC TAT GGC ATG GAC GTC TGG  
 GGC CAT GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GG

【 図 1 4 - d 】

配列番号：25 (A型L鎖)：23G312 対応のアミノ酸配列  
 EIVLTQSPATLSVSPGDRATLSCRASQSVSDKLAWYQKPGQAPRLLIYGAYTRATGTP  
 ARFSGSGSGTEFTLSITGLQAEDEADFAIYYCHQYNNWPLTFGGGKTVDIK

【 図 1 4 - b 】

配列番号：18 (A型L鎖)  
**23G312 L-chain**  
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT GTG TCT CCA GGG  
 GAT AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC GAC  
 AAG TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC  
 CTC ATC TAT GGT GCA TAC ACC AGG GCC ACA GGT ACC CCA GCC AGG  
 TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAG TTC ACT CTC AGC ATC ACA GGT  
 CTG CAG GCT GAA GAT TTT GCA ATT TAT TAC TGT CAC CAA TAC AAT  
 AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAY ATC AAA  
 CCT G

【 図 1 5 - a 】

配列番号：5 (A型H鎖)  
**23G447 H-chain**  
 CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCA CAG  
 ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC AAT  
 CCT GAT CAC TAC TGG AAC TGG ATC CGA CAG CCC CCA GGG AAG GGC  
 CTT GAG TGG ATT GGG TAC ATC TAT TAC ACT GGG CGC ACC TGG TAC  
 AGC CCG TCC CTC AAG AGT CGC GTT TCC TTA TCA GTA GAC ACG TCC AAG  
 AGC CAG TTC TCC TTG AAC GTG GAC TCT GTG ATT GCC GCA GAC ACG GCC  
 GTA TAT TAC TGC GCC AGA AGT CAC GTG TGG TTC GGG GAG TTA TAC  
 TGG GGC CAG GGA GCC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GG

【 図 1 4 - c 】

配列番号：11 (A型H鎖)：23G312 対応のアミノ酸配列  
 QVQLVQSGGGLVQVQGRSLRLSCLASGFSFDYAMHWVRQIPGKLEWVSGISWNSGAR  
 GYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRVGDTAFYYCARDMGAGPNDDYDTSNYPPLHLY  
 GMDVWGHGTTVTVSS

【 図 1 5 - b 】

配列番号：19 (A型L鎖)  
**23G447 L-chain**  
 CAG TCT GTG CTG ACG CAG CCG CCC TCA GTG TCT GCG GCC CCA GGA CAG  
 AAG GTC ACC ATC TCC TGC TCT GGA CGC AGC TCC AAC GTT GGG GAT  
 AAT TAT CTG TCC TGG TAC CAG CAG TTC CCA GGA ACA GCC CCC AAA  
 CTC CTT ATC TAT CAC AAT ACT AAG CGC CCC TCA GGG ATT CCT GAC  
 CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACG TCA GCC ACC CTG GGC ATC ACC  
 GGA CTC CAG ACT GGA GAC GAG GCC GCT TAT TAC TGC GCA ACA TGG  
 GAT AGC GTT CTG AGT GCT GGG GTT TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG  
 ACC GTC CTA

【 図 1 5 - c 】

配列番号：12 (A型H鎖)：23G447 対応のアミノ酸配列

QVQLQESGPGLVKPSQTL~~SL~~TCSVSGGSI~~SNPDHY~~WNWIRQPPGKLEWIGYIYYTGR~~T~~  
WYSPSLKSRVSLVSDT~~SKS~~QFSLNVDSVIAADTAVYYCARSHVWFEGELYWGQALVTVS  
S

【 図 1 5 - d 】

配列番号：26 (A型L鎖)：23G447 対応のアミノ酸配列

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTIISCSGRSSNVGDNYVSWYQQFPGTAPKLLIYDNTKRP~~SGI~~  
PDRFSGSKSGTSATLGITLQIGDEAAYCATWDSVLSAGVFGGGTKLTVL

【 図 1 6 - a 】

配列番号：6 (A型H鎖)

**23G494 H-chain**

CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC AAG CCT GGA GGG  
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC AGC TTC AGT GAC  
TAT TAT ATG ACG TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG  
TGG GTT TCA TCC ATC AAT AGT GGC AGC ACT GTC ACA AAC GAC GCA  
GAC TCT GTG CAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAG AAC TCA GTG  
TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA ACC GAG GAC ACG GCC GTC TAT TAC  
TGT GCG AGA GAT TTT GGT ATC AAA GCG GGT ACT TCG GAC TAC TGG  
GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCC G

【 図 1 6 - b 】

配列番号：20 (A型L鎖)

**23G494 L-chain**

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA  
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG ACC ATT AGC AAC  
TTT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA AAA GCC CCT AAA CTC  
CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGA TTG CAA AGT TGG GTC CCA TCA AGG  
TTC ACT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC GCT CTC ACC ATT AGC AGT  
CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAG CAG ACT TTC  
AGT CCC CGA ATC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAG GTG GAA ATG AAA  
CGT

【 図 1 6 - c 】

配列番号：13 (A型H鎖)：23G494 対応のアミノ酸配列

QVQLVQSGGGLVKGKPSLRSLRSCAGS~~GF~~SFSDY~~MT~~WIRQAPGKLEWVSS~~INS~~GS~~TV~~IN  
YADSVQGRFTISRDKNSVYIQMNSLRTE~~D~~TAVYYCARD~~FG~~IKAGTSDYWGQGLVTVSS

【 図 1 6 - d 】

配列番号：27 (A型L鎖)：23G494 対応のアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGD~~RV~~TIITCRAS~~QT~~ISN~~FL~~NWYQKPKGKAPKLLIYAASRLQSWVP  
SRFTGSGSGTD~~F~~LTISLQPEDFATYYC~~QT~~IFSPRIT~~FG~~PGTKVEMKR

【 図 1 7 - a 】

配列番号：7 (B型H鎖)

**23G327 H-chain**

CAG CTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AGG CCT GGG GCC  
TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC AAC CTC ATC GAC  
TTC TAT GTG AAC TGG GTG CGA CAG GTC CCT GGA CAA GGA CTT GAG  
TGG ATG GGG TAC ATC AAC CCT GAC AGT GGT GGC GCA CAC TAT GAA  
GGG AAA TTT CAG GGC AGG GTC ATC ATG ACC AGG GAC ACG TCC ATC AAC  
ACA GCC TAT ATG GAA TTG CCC AGC CTG ACA TCT GAC GAC ACG GCC GTC  
TAT TTC TGT GCG AGA GGG GCT AGT AGT GGC TTG TTG ACC TAC TAT  
TAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC GAA GGG ACC ACG GTT ATC GTC TCC  
TCA GGT GAG TGT CCC AAG CAG CTT

【 図 1 7 - b 】

配列番号：21 (B型L鎖)

**23G327 L-chain**

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT ATA GGA  
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCG AGT CCG GGC ATT AAC AGT  
TAT TTA GCC TGG TAT CAG CAC AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC  
CTG ATC TAT GCT GCC TCC ACT TTG CAG TCC GGG GTC CCA TCT CGG  
TTC AGT GGC AGT GGT TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC  
CTG CAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAG AAG TAT AAT  
AGT GCC CCG TGG ACG TTC GGC CCA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA  
CG

【 図 1 7 - c 】

配列番号：14 (B型H鎖)：23G327 対応のアミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASG~~YN~~LIDFYVNWVRQVPGGLEW~~MG~~YINPDSGGAH  
YEGK~~FQ~~GRVIMTRDTSINTAYMELPSLTSDDTAVYFCARGASSGLLTYYYGLD~~VW~~WGE~~GT~~  
TIVVSS

【 図 1 7 - d 】

配列番号：28 (B型L鎖)：23G327 対応のアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASIG~~DR~~VTIITCRAS~~PG~~INSY~~LA~~WYQHKPKGKAPKLLIYAAS~~T~~LQSGV~~P~~  
SRFSGSGSGTD~~F~~LTISLQPEDVATYYC~~QK~~YNSA~~PW~~T~~FG~~PGTKVEIK

【配列表】

2009148150000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/060328
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/543(2006.01)i, C07K16/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/543, C07K16/10, G01N33/53, G01N33/569, C12N15/09, C12P21/08  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/007698 A1 (Fujirebio Inc.), 27 January, 2005 (27.01.05), Full text; Fig. 2 & KR 10-2006-0054333 A & CN 1826355 A	1-37
Y	JP 2003-530543 A (Biosite, Inc.), 14 October, 2003 (14.10.03), Abstract; Claims; Par. Nos. [0004], [0110] to [0118] & US 2003/0165993 A1 & GB 2374415 A & EP 1237926 A & WO 2001/040306 A1 & AU 2063001 A & CA 2392729 A	1-37
A	WO 2007/055226 A1 (University of Toyama), 18 May, 2007 (18.05.07), Full text; all drawings (Family: none)	1-37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 18 June, 2009 (18.06.09)		Date of mailing of the international search report 30 June, 2009 (30.06.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.



国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/060328									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, C07K16/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n											
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. G01N33/543, C07K16/10, G01N33/53, G01N33/569, C12N15/09, C12P21/08											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
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)											
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 請求項の番号									
Y	WO 2005/007698 A1 (富士レビオ株式会社) 2005.01.27, 全文、第2図 & KR 10-2006-0054333 A & CN 1826355 A	1-37									
Y	JP 2003-530543 A (バイオサイト インコーポレイテッド) 2003.10.14, 要約、特許請求の範囲、段落【0004】、【0110】-【0118】 & US 2003/0165993 A1 & GB 2374415 A & EP 1237926 A & WO 2001/040306 A1 & AU 2063001 A & CA 2392729 A	1-37									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 18.06.2009		国際調査報告の発送日 30.06.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 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) 赤坂 祐樹	2J 3316								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 0 3 2 8
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 請求項の番号
A	WO 2007/055226 A1 (国立大学法人富山大学) 2007.05.18, 全文、全図 (ファミリーなし)	1 - 3 7

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

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

(出願人による申告)平成20年度文部科学省知的クラスター創成事業(第I期)「ほくりく健康創造クラスター」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

- (74)代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845  
 弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 村口 篤  
 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内
- (72)発明者 岸 裕幸  
 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内
- (72)発明者 小澤 龍彦  
 富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷キャンパス内
- (72)発明者 池本 守  
 富山県富山市高田529番地 エスシーワールド株式会社内
- (72)発明者 小野 仁  
 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内
- (72)発明者 守田 和樹  
 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内
- (72)発明者 鶴澤 耕治  
 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA14 BA51 GA05 GA11 GA18 GA27 HA03  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA13 DA15  
4H045 AA11 AA30 BA10 BA60 CA01 DA76 EA50 EA53 FA72 FA74  
GA26

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。