

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年4月19日 (19.04.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/043582 A1

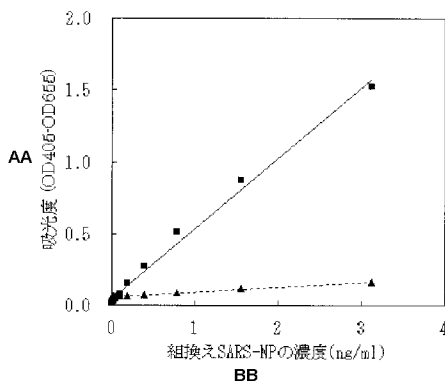
- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01) G01N 33/545 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/320330
- (22) 国際出願日: 2006年10月11日 (11.10.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2005-296542
2005年10月11日 (11.10.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): シスメックス株式会社 (SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤本 幸太郎

- (74) 代理人: 野河 信太郎 (NOGAWA, Shintaro); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満5丁目1-3 南森町パークビル 野河特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINATION OF SARS VIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN, REAGENT KIT FOR THE DETERMINATION, TEST DEVICE, MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED AGAINST SARS VIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN, AND HYBRIDOMA CAPABLE OF PRODUCING THE MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称: SARSウイルスヌcleoカプシドタンパク質を測定するための測定方法、測定用試薬キット、試験具、SARSウイルスヌcleoカプシドタンパク質に対するモノクローナル抗体及び前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ



AA ABSORBANCE (OD405-OD655)
BB CONCENTRATION OF RECOMBINANT SARS-NP (ng/ml)

(57) Abstract: Disclosed is a method for determination of SARS virus nucleocapsid protein (SARS-NP) using a first antibody and a second antibody both capable of binding specifically to SARS-NP, wherein the first or second antibody can recognize an epitope present in a region lying between the 283th nucleotide and the 422th nucleotide to the N-terminus in the amino acid sequence for SARS-NP (region C).

(57) 要約: 本発明は、SARSウイルスヌcleoカプシドタンパク質 (SARS-NP) に特異的に結合する第一抗体及び SARS-NPに特異的に結合する第二抗体を用いてSARS-NPを測定する方法であって、前記第一抗体又は前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から283番目~422番目の領域 (領域C) に存在するエピトープを認識する抗体であるSARS-NPの測定方法を提供する。

WO 2007/043582 A1



SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質を測定するための測定方法、測定用試薬キット、試験具、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質に対するモノクローナル抗体及び前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ

技術分野

[0001] 本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)を測定するための測定方法、測定用試薬キット及び試験具に関する。また、SARS-NPに対するモノクローナル抗体、並びに前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。

背景技術

[0002] 重症急性呼吸器症候群(Severe Acute Respiratory Syndrome:SARS)は、近年発見された感染症であり、SARSはコロナウイルス科に分類される新型のウイルス(SARSウイルス)が起因病原体であることが確認されている。SARS感染の診断法としては、免疫学的測定方法を利用して検体中のSARSウイルスを検出する方法が知られている。このようなものとしては、例えば、非特許文献1や非特許文献2に記載の方法がある。

[0003] 非特許文献1には、SARS-NPに対するポリクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法(ELISA)による測定方法が記載されている。具体的には、ポリクローナル抗体をELISA用のプレートに固定化し、ここに、検体、標識化ポリクローナル抗体を順次添加して複合体を形成させ、これを検出する。

[0004] 非特許文献2には、SARS-NPに対するモノクローナル抗体とSARS-NPに対するポリクローナル抗体を用いたELISAによる測定方法が記載されている。具体的には、3種類のモノクローナル抗体をELISA用のプレートに固定化し、ここに、検体、標識化ポリクローナル抗体を順次添加して複合体を形成させ、これを検出する。

[0005] 非特許文献1や非特許文献2に記載の方法はELISAである。一般的に、ELISAは、免疫学的測定方法の中でも比較的感度の高い測定方法であるといわれている。一方、ウイルス感染の診断では、迅速性・簡便性の高い免疫クロマト法もよく利用される。しかし、免疫クロマト法はELISAに比べて感度が低い測定方法であり、仮に非特許文献1や非特許文献2に記載のポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を免疫クロ

マト法に使用したとしても、十分な感度を得ることができない可能性がある。

- [0006] 非特許文献1: Susanna K. P. Lau, Patrick C. Y. Woo, Beatrice H. L. Wong, Hoi-Wah Tsoi, Gibson K. S. Woo, Rosana W. S. Poon, Kwok-Hung Chan, William I. Wei, J. S. Malik Peiris, and Kwok-Yung Yuen, 「酵素結合免疫アッセイによる重症急性呼吸器症候群(SARS)患者におけるSARSコロナウイルスヌクレオカプシドタンパク質の検出(Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein in SARS Patients by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)」, Journal of Clinical Microbiology, Vol.42, No.7, P.2884-2889.
- [0007] 非特許文献2: Xiao-yan Che, Li-wen Qiu, Yu-xian Pan, Kun Wen, Wei Hao, Li-ya Zhang, Ya-di Wang, Zhi-yong Liao, Xu Hua, Vincent C. C. Cheng, and Kwok-yung Yuen, 「重症急性呼吸器症候群患者からのヌクレオカプシド抗原検出用の高感度特異的モノクローナル抗体ベースの捕捉酵素免疫アッセイ(Sensitive and Specific Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme Immunoassay for Detection of Nucleocapsid Antigen in Sera from Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome)」, Journal of Clinical Microbiology, Vol.42, No.6, P. 2629-2635.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明の目的は、SARS-NPの測定において、免疫学的測定方法の中でも比較的感度の高いELISAのような測定方法だけでなく、免疫学的測定方法の中でも比較的感度の低い免疫クロマト法のような測定方法にも適用することができるような、従来よりも感度の高い測定方法、及び測定に用いる試薬キット、試験具、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供することである。

課題を解決するための手段

- [0009] 上記の課題に鑑み、本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に特異的に結合する第一抗体及びSARS-NPに特異的に結合する第二抗体を用いてSARS-NPを測定する方法であって、前記第一抗体又は前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から283番目～422番目までの領域(領域C)に存在するエピトープを認識する抗体である、SARS-NPの測定方法を提供する。

- [0010] また、本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質 (SARS-NP) に特異的に結合する第一抗体及びSARS-NPに特異的に結合する第二抗体を用いてSARS-NPを測定するための試薬キットであって、前記第一抗体を固定化した固相と、標識物質により標識された前記第二抗体を含有する試薬との組み合わせからなるSARS-NPの測定用試薬キットを提供する。前記第一抗体及び前記第二抗体はSARS-NPに対して特異的に結合する抗体である。また、前記第一抗体又は前記第二抗体は、SARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から283番目～422番目までの領域(領域C)に存在するエピトープを認識する抗体である。
- [0011] また、本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質 (SARS-NP) に特異的に結合する第一抗体及びSARS-NPに特異的に結合する第二抗体を用いてSARSウイルスを測定するための免疫クロマト法用の試験具であって、
前記第一抗体が固相に固定化されており、前記第二抗体が標識物質により標識されており、
前記免疫クロマト法用の試験具が、測定用試料が添加される試料添加部及び前記試料添加部に添加された測定用試料が展開される試料展開部を備え、前記試料展開部が第一抗体を固定化した判定部を有し、前記試料添加部に添加された測定用試料が少なくとも前記判定部に向かって展開され、
前記第一抗体又は前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から283番目～422番目までの領域(領域C)に存在するエピトープを認識する抗体である免疫クロマト法用の試験具を提供する。
- [0012] また、本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質 (SARS-NP) に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10678のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を提供する。
- [0013] また、本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質 (SARS-NP) に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10679のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を提供する。
- [0014] また、本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質 (SARS-NP) に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10680のハイブリドーマにより産生されるモノ

クローナル抗体を提供する。

[0015] また、本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10686のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を提供する。

[0016] また、本発明は、SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10687のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体を提供する。

[0017] また、本発明は、受領番号FERM ABP-10678により寄託されたハイブリドーマを提供する。

[0018] また、本発明は、受領番号FERM ABP-10679により寄託されたハイブリドーマを提供する。

[0019] また、本発明は、受領番号FERM ABP-10680により寄託されたハイブリドーマを提供する。

[0020] また、本発明は、受領番号FERM ABP-10686により寄託されたハイブリドーマを提供する。

[0021] また、本発明は、受領番号FERM ABP-10687により寄託されたハイブリドーマを提供する。

発明の効果

[0022] 本発明の測定方法は、従来よりも高い感度でSARS-NPを測定することができる。これより、簡便且つ高感度にSARSウイルスを検出することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫クロマト法において用いる試験具の一実施形態を模式的に示したものである。

[図2]本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫クロマト法において用いる試験具の一実施形態を模式的に示したものである。

[図3]SARS-NPのアミノ酸配列及び該配列を3つに分けた場合の各領域(領域A、領域B、領域C)を模式的に示した図である。

[図4]実施例3の結果を示した図である。

[図5]実施例4の結果を示した図である。

[図6]実施例5の結果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0024] 本発明は、免疫学的手法によりSARS-NPを測定する。具体的には、SARS-NP、SARS-NPに特異的に結合する第一抗体及びSARS-NPに特異的に結合する第二抗体からなる複合体を形成させてSARS-NPを測定する。本発明者らは、このような測定に使用する抗体の特異性及びその組み合わせに着目して鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。
- [0025] 核タンパク質であるSARS-NPは、比較的突然変異が起こりにくいといわれている。ゆえに、本発明の測定方法では、SARS-NPに対して特異的に結合する抗体を第一抗体及び第二抗体に用いてSARS-NPを測定する。
- [0026] Gen Bank (accession Number; AY274119, protein id; AAP41047.1) において、SARS TOR2株のヌクレオカプシドタンパク質のアミノ酸配列(全長422残基)が示されている。本発明では、このSARS-NPのアミノ酸配列を図3で示すように3の領域に分け、各領域内に存在するエピトープを認識する抗体を複数得た。そして、それら抗体を様々に組み合わせさせてSARS-NPを測定した。これより、第一抗体又は第二抗体にSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から283番目～422番目までの領域(領域C)に存在するエピトープを認識する抗体を用いることで感度の高い測定結果が得られることがわかった。
- [0027] さらに、第一抗体及び第二抗体の好ましい組み合わせとしては、SARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から1番目～141番目の領域(領域A)に存在するエピトープを認識する抗体と領域Cに存在するエピトープを認識する抗体の組み合わせ、又は、SARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から142番目～282番目の領域(領域B)に存在するエピトープを認識する抗体と領域Cに存在するエピトープを認識する抗体の組み合わせが挙げられる。
- [0028] また、第一抗体を固相に固定化する場合、第一抗体として用いるのに好ましい抗体としては、領域Aに存在するエピトープを認識する抗体又は領域Cに存在するエピトープを認識する抗体が挙げられる。さらに、第一抗体を固相に固定化する場合、第

一抗体及び第二抗体の好ましい組み合わせとしては、第一抗体が領域Aに存在するエピトープを認識する抗体、又は領域Bに存在するエピトープを認識する抗体であり、第二抗体が領域Cに存在するエピトープを認識する抗体である組み合わせが挙げられる。また、別の組み合わせとしては、第一抗体が領域Cに存在するエピトープを認識する抗体であり、第二抗体が領域Aに存在するエピトープを認識する抗体又は領域Bに存在するエピトープを認識する抗体である組み合わせが挙げられる。

[0029] なお、SARS-NPのアミノ酸配列は、Gen Bank (accession Number;AY274119, protein id;AAP41047.1)に開示されているSARS-NPのアミノ酸配列に完全に一致する必要はない。前記Gen Bank (accession Number;AY274119, protein id;AAP41047.1)に開示されているSARS-NPのアミノ酸配列に対して、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたSARS-NPのアミノ酸配列であってもよい。

[0030] 第一抗体及び第二抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもかまわない。なお、特異性の観点から、第一抗体及び第二抗体のうちどちらか一方がモノクローナル抗体であることが好ましく、第一抗体及び第二抗体がモノクローナル抗体であることが最も好ましい。

[0031] 免疫学的測定方法としては、例えば、免疫比濁法 (Turbidometric Immunoassay : TIA)、免疫比ろろ法 (Nephelometric Immunoassay : NIA)、ラテックス免疫凝集法 (Latex Agglutination Immunoassay : LIA)、放射性免疫測定法 (Radio Immunoassay : RIA)、酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay : EIAまたはEnzyme Linked Immunosorbent Assay : ELISA)、蛍光免疫測定法 (Fluorescent Immunoassay : FIA)、化学発光免疫測定法 (Chemiluminescent Immunoassay : CLIA)などが挙げられる。さらに、抗体を固定化した膜状の担体を備えた試験具を用いる免疫クロマト法が挙げられる。なお、ウイルス感染の診断において、迅速性・簡便性の観点から免疫学的測定方法としては免疫クロマト法が好ましい。また、ウイルスを含む検体との接触による感染を防ぐためには、測定を自動化することが好ましい。そして、測定の自動化、感度や汎用性の観点から免疫学的測定方法としてはELISAが好ましい。

[0032] また、測定方法に応じて、抗体を標識物質で標識したり、担体に固定化してもよい。

[0033] 抗体を標識する標識物質は、測定方法に応じて適宜選択される。例えば、測定方

法がRIAであれば、標識物質には¹²⁵I、¹⁴C、³²Pなどの放射性同位元素が挙げられる。EIAやELISAであれば、β-ガラクトシターゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの酵素が挙げられる。FIAであれば、フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体などの蛍光色素が挙げられる。CLIAであれば、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウム誘導体などの化学発光性物質が挙げられる。免疫クロマト法であれば、金コロイド、着色ラテックス粒子、蛍光ラテックス粒子などが挙げられる。

[0034] 抗体を固定化する担体としては、抗体と結合性の高いものであれば特に限定されず、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、ポリスチレン、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリルニトリル、ポリプロピレンなどの合成有機高分子化合物、デキストラン誘導体、アガロースゲル、セルロースなどの多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコーンなどの無機高分子化合物が挙げられる。さらに、これらはアミノ基、アミノアシル基、カルボキシル基、アシル基、水酸基、ニトロ基などの官能基を導入したものであってもよい。また、担体の形状としては、マイクロタイタープレート(ELISAプレート)、ディスクなどの平板状、ビーズなどの粒子状、試験管、チューブなどの管状、繊維状、膜状などが挙げられ、測定方法に応じて適宜選択される。SARS-NP抗体を担体に固定化する方法は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法を用いることができる。

[0035] 測定方法に用いる抗体が含有される試薬は、測定方法に応じて溶液であってもよい。この場合、該試薬は抗体の他に公知の成分を組み合わせることができる。即ち、抗原抗体反応に必要なpHを与える緩衝剤、抗原抗体反応を促進する反応増強剤、非特異反応を抑制する反応安定剤やブロッカー、試薬の保存性を高める防腐剤等を組み合わせても良い。

[0036] 測定方法に用いる測定用試料は、SARSウイルスを含有する可能性がある検体そのもの又は該検体を緩衝液などを用いて処理して得られるものであり、測定反応を阻害しないものであれば特に限定されない。該検体としては、例えば、血液、血清、鼻汁、痰、咽頭拭い液などの体液が挙げられる。

[0037] 以下、本発明の測定方法を適用した免疫クロマト法について説明する。

[0038] 免疫クロマト法の典型的な例としては、被測定物質、担体に固定化された第一抗体、および標識物質で標識された第二抗体とを反応させ、被測定物質と第一抗体と第二抗体とからなる複合体を膜状の担体上に形成させ、前記第二抗体の標識物質を検出することによりこの複合体の存在を検出または定量する方法である。このような免疫クロマト法には、フロースルー式免疫クロマト法とラテラルフロー式免疫クロマト法がある。フロースルー式免疫クロマト法は、被測定物質を含む溶液を、第一抗体を固定化した膜状の担体に対して垂直方向に通過させるものである。一方、ラテラルフロー式免疫クロマト法は、被測定物質を含む溶液を、第一抗体を固定化した膜状の担体に対して水平方向に展開させるものである。

[0039] 図1はラテラルフロー式用試験具の模式図である。図1の(a)は試験具の平面図であり、(b)は試験具の側面図である。図1に示すように、ラテラルフロー式用試験具は、表面に粘着層を有する基材1の上に、試料添加用部材2と標識保持部材3とクロマト用膜担体4と吸収部材5とを備える。標識保持部材3は、試料添加用部材2に接触して配置され、標識物質で標識された第二抗体を保持する。クロマト用膜担体4は、標識保持部材3に接触して配置され、第一抗体を固定化した判定部6を有する。吸収部材5は、クロマト用膜担体4と接触するように配置される。

[0040] 本発明のある実施形態において、図1の試料添加用部材2に測定用試料を滴下すると、毛管現象により測定用試料が試料添加用部材2、標識保持部材3、クロマト用膜担体4、吸収部材5を順次移動する。測定用試料中に被測定物質が混入している場合には、この被測定物質と標識保持部材3中の第二抗体が反応し、複合体を形成する。さらに、これらの複合体が、クロマト用膜担体4の判定部6に固定化された第一抗体により捕捉される。これにより、図1に示したように、判定部6において第二抗体の標識物質のバンドが現れ、被測定物質が目視により検出される。

[0041] また、クロマト用膜担体4は、さらに、滴下された測定用試料が判定部6を通過したことを確認するための対照部を判定部6の下流側に備えてもよい。例えば、この対照部にビオチンを固定化し、ビオチンと結合するアビジンを標識物質で標識して標識保持部材3に保持させた場合、標識保持部材3中のアビジンはクロマト用膜担体4上を測定用試料と共に移動する。アビジンは判定部6の第二抗体には捕捉されず、対照

部のビオチンにより捕捉される。これにより、対照部においてアビジンの標識物質のバンドが現れる。対照部は、判定部6よりも下流に設けられているので、このバンドを確認することにより、試料が判定部6を通過したことが確認できる。なお、この対照部にアビジンを固定化し、ビオチンを標識物質で標識して標識保持部材3に保持させてもよい。さらに、対照部に固定化される物質、および標識保持部材3に保持させる物質は、アビジンとビオチンの組み合わせ以外であってもよい。なお、標識保持部材3に保持させる物質には、被測定物質および判定部に固定化される二次抗体と反応しない物質を用いる。

[0042] また、試験具は、図2で示すように、標識保持部材を有しないものであってもよい。この場合、第二抗体を検体と予め混合して測定用試料を調製し、この測定用試料を試験具の試料添加用部材2に滴下することができる。

[0043] 本発明は、上記試験具を含むSARSウイルス検出のための免疫クロマト法用検出キットに適用することができる。このようなキットは、例えば、検体を処理して測定用試料を調製するための前処理液、試験具、各種抗体等を含む試薬等を含み得る。

[0044] 次に、本発明の測定方法を適用したELISAについて説明する。

[0045] ELISAでは、被測定物質に対する抗体または抗原を固定化したELISAプレート等のマイクロプレートを用いる。例えば、被測定物質が抗原の場合、被測定物質に対する第一抗体を固定化したマイクロプレートを用いる。まず、マイクロプレートに測定用試料を添加し、測定用試料中の被測定物質と前記固定化された第一抗体との複合体を形成させる。続いて、酵素などの標識物質で標識された第二抗体を添加し、マイクロプレート上で、固定化された第一抗体、被測定物質および標識された第二抗体とからなる複合体を形成させる。その後、前記複合体の第二抗体の標識物質を利用して被測定物質の検出や定量を行う。

[0046] 前記第二抗体を標識する標識物質としては、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素が挙げられる。

[0047] よって、本発明は、上記マイクロプレートを含むSARSウイルス検出のためのELISA用検出キットに適用することができる。このようなキットは、例えば、第一抗体を固定化したマイクロプレート、マイクロプレートのウェル内を洗浄するための洗浄液、第二抗

体を標識した酵素に対する基質、各種抗体等を含む試薬を含み得る。上記の洗浄液としては、所定の塩濃度の緩衝液が挙げられる。

- [0048] 以下、モノクローナル抗体の作製方法について説明する。モノクローナル抗体は、ケーラーとミルシュタインの方法 (Koehler & Milstein, Nature 256, 495-497, 1975年) によって産生することができる。すなわち、抗原で免疫した動物の脾臓細胞と骨髄腫細胞とを融合させて、得られた融合細胞 (以降、ハイブリドーマと呼ぶ) から抗原に対して特異的な抗体を生産する細胞を選択し、このハイブリドーマを大量培養あるいは動物の腹腔内で増殖させ、この培養液あるいは腹水から該モノクローナル抗体を分離することにより製造することができる。以下[I]～[V]において、SARS-NPに対するモノクローナル抗体を得るための方法について説明する。
- [0049] [I]抗原; SARS-NPに対するモノクローナル抗体の作成に用いられる抗原は、SARSウイルスを含有する試料から精製して得ることができる。SARSウイルスを含有する試料としては、例えば、SARS患者から採取した血液やSARSウイルスを人工的に培養して得られる培養液などが挙げられる。また、抗原は、遺伝子工学的手法によっても得ることができる。
- [0050] [II]免疫工程; 精製SARS-NP、または遺伝子工学的手法により得た組換えSARS-NPやその部分ペプチドを、リン酸緩衝液などの適当な緩衝液中に溶解または懸濁したものを抗原液として使用する。抗原液は、通常、抗原の濃度が50～500 μ g/ml程度になるように調製すればよい。また、ペプチド抗原など、それだけでは抗原性が低い場合には、アルブミンやキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)など適当なキャリアータンパク質に架橋して用いることができる。
- [0051] 抗原により免疫される動物 (以降、被免疫動物と呼ぶ) としては、マウス、ラット、ハムスター、ウマ、ヤギ、ウサギなどの哺乳類が挙げられる。好ましくはげっ歯類であり、中でも好ましくはマウスである。
- [0052] 免疫は、抗原液を被免疫動物の皮下、皮内、腹腔あるいは静脈などに注射などにより投与することにより行うことができる。このとき、被免疫動物の抗原への応答性を高めるために、抗原液をアジュバントと混合して投与してもよい。アジュバンドとは、それ自身は抗原としての働きを有しないが、抗原と共に投与されることにより被免疫動物

における免疫反応を増強することができる物質である。使用可能なアジュバントとしては、フロイト完全アジュバント(FCA)、フロイト不完全アジュバント(FIA)、Ribi(MPL)、Ribi(TDM)、Ribi(MPL+TDM)、百日咳ワクチン(*Bordetella pertussis* vaccine)、ムラミルジペプチド(MDP)、アルミニウムアジュバント(ALUM)、およびこれらの組合せが挙げられる。

なお、被免疫動物に対する抗原液の初回投与においてはFCAを、追加投与においてはFIAやRibiアジュバントを使用する組合せが好ましい。

[0053] 免疫方法について、具体例を示す。例えば、被免疫動物としてマウスを用いる場合、アジュバントを混合した抗原液0.05~1ml(抗原量10~200 μ g)をマウスの腹腔内、皮下、筋肉内または尾の静脈内に注射し、この初回投与から約4~21日毎に1~4回追加投与を行い、さらに、約1~4週間後に最終投与を行う。なお、最終投与に関してはアジュバントを含有しない抗原液を用いることが望ましい。最終投与より約3~5日後に、被免疫動物から脾細胞を得る。ここで得た脾細胞は抗体生産細胞である。

[0054] [III]細胞融合工程;この工程では、被免疫動物から得た脾細胞と骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製する。骨髄腫細胞としては、マウス、ラット、ヒトなどの由来のものが使用され、例えばマウスミエローマP3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/o-Ag14、P3X63-Ag8 \cdot 653などの株化骨髄腫細胞が挙げられる。なお、骨髄腫細胞には免疫グロブリン軽鎖を産生しているものがあり、これを細胞融合に用いると、脾細胞が産生する免疫グロブリン重鎖とこの軽鎖とがランダムに結合することがある。ゆえに、特に免疫グロブリン軽鎖を産生しない骨髄腫細胞、例えばP3X63-Ag8 \cdot 653やSP2/o-Ag14などを用いることが好ましい。脾細胞と骨髄腫細胞とは、同種動物、特に同系統の動物由来であることが好ましい。骨髄腫細胞の保存方法は自体公知の手法に従って行えばよく、例えばウマ、ウサギもしくはウシ胎児血清を添加した一般的な培地で継代培養したものについて凍結により保存される。また細胞融合には対数増殖期の細胞を用いるのが好ましい。

[0055] 脾細胞と骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製する方法は、ポリエチレングリコール(PEG)を用いる方法、センダイウイルスを用いる方法、電気融合装置を用いる方法などが例示される。例えばPEG法の場合、約30~60%のPEG(平均分子量1

,000~6,000)を含む適当な培地または緩衝液中に脾細胞と骨髓腫細胞を1~10:1、好ましくは5~10:1の混合比で懸濁し、温度約25~37°C、pH6~8の条件下で、約30秒~3分間程度反応させればよい。反応終了後、細胞を洗浄しPEG溶液を除いて培地に再懸濁し、マイクロタイタープレート中に播種して培養を続ける。

- [0056] [IV]ハイブリドーマの選択;融合操作後の細胞は選択培地で培養して、ハイブリドーマの選択を行う。選択培地は、親細胞株を死滅させ、ハイブリドーマのみが増殖しえる培地であり、通常、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン(HAT)培地が使用される。ハイブリドーマの選択は、通常、融合操作の1~7日後に、培地の一部、好ましくは約半量を選択培地と交換し、さらに2、3日毎に同様の培地交換を繰り返しながら培養することにより行う。顕微鏡観察によりハイブリドーマのコロニーが生育しているウェルを確認する。
- [0057] 生育しているハイブリドーマが所望の抗体を産生しているかどうかを知るには、培養上清を採取して抗体価アッセイを自体公知の方法により行えばよい。例えば担体に固定化した抗原タンパク質に段階希釈した該上清を加えて反応させ、さらに蛍光物質、酵素、もしくは放射性同位体(RI)などで標識した二次抗体(抗グロブリン抗体、抗IgG抗体、抗IgM抗体など)を反応させれば、該上清中に産生されている抗体を検出することができ、また抗体価を測定することができる。抗原が酵素などの場合は、その酵素と該上清とを反応させた後、適当な基質を反応させて酵素阻害活性の有無により、抗体の検出および抗体価の測定を行うことができる。このように各ウェルの培養上清をスクリーニングし、適切な抗体を産生しているハイブリドーマを得る。
- [0058] さらに限界希釈法、軟寒天法、蛍光励起セルソーターを用いた方法などにより単一クローンを分離する。例えば限界希釈法の場合、ハイブリドーマのコロニーを1細胞/ウェル前後となるように培地で段階希釈して培養することにより目的とする抗体を産生するハイブリドーマクローンを単離することができる。得られた抗体産生ハイブリドーマクローンは、約10%(v/v)ジメチルスルホキシド(DMSO)あるいはグリセリンなどの凍結保護剤の共存下に凍結させて、-70~-196°Cで保存すると、約半年~半永久的に保存可能である。細胞は用時37°C前後の恒温槽中で急速に融解して使用する。凍結保護剤の細胞毒性が残存しないようによく洗浄してから使用するの望ましい。

- 。
- [0059] ハイブリドーマが産生する抗体の免疫グロブリンサブクラスを調べるためには、該ハイブリドーマを一般的な条件で培養し、その培養上清中に分泌された抗体を市販の抗体クラス・サブクラス判定用キットなどを用いて分析することにより知ることができる。
- [0060] [V]モノクローナル抗体の調製;ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得する方法は、モノクローナル抗体の必要量やハイブリドーマの性状などによって適宜選択することができる。例えば、該ハイブリドーマを移植したマウス腹腔内の腹水から取得する方法、細胞培養により培養上清から取得する方法などが挙げられる。マウス腹腔内で増殖可能なハイブリドーマであれば、腹水から数mg/mlの高濃度のモノクローナル抗体を得ることができる。in vivoで増殖できないハイブリドーマは、細胞培養の培養上清からモノクローナル抗体を得る。細胞培養によるモノクローナル抗体の取得は、抗体産生量はin vivoより低い、マウス腹腔内に含まれる免疫グロブリンや他の夾雑物質の混入が少なく、精製が容易であるという利点がある。
- [0061] ハイブリドーマを移植したマウス腹腔内の腹水からモノクローナル抗体を取得する場合、例えば、予めプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)などの免疫抑制作用を有する物質を投与したBALB/cマウスの腹腔内へハイブリドーマ(約 10^6 個以上)を移植し、約1~3週間後に貯留した腹水を採取する。異種ハイブリドーマ(例えばマウスとラット)の場合には、ヌードマウス、放射線処理マウスを使用することが好ましい。
- [0062] 一方、細胞培養上清からモノクローナル抗体を取得する場合、例えば、細胞維持に用いられる静置培養法の他に、高密度培養方法あるいはスピナーフラスコ培養方法などの培養法を用いて当該ハイブリドーマを培養し、モノクローナル抗体を含有する培養上清を得る。培地に添加し得る血清は、他の抗体やアルブミンなどの夾雑物を含み、培養液からのモノクローナル抗体精製が煩雑になることが多いので、培地への添加は少なくすることが望ましい。さらに好ましくは、ハイブリドーマを常法により無血清培地に馴化させ、無血清培地を用いて培養することである。無血清培地で培養することにより、モノクローナル抗体精製が容易になる。
- [0063] 腹水や培養上清からのモノクローナル抗体の精製は、自体公知の方法により行うこ

とができる。例えば、免疫グロブリンの精製法として従来既知の硫酸アンモニウムや硫酸ナトリウムを用いた塩析による分画法、ポリエチレングリコール分画法、エタノール分画法、DEAEイオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法などを応用することで、容易にモノクローナル抗体を精製することができる。さらに、モノクローナル抗体が、マウスIgGである場合には、プロテインA結合担体あるいは抗マウスイムノグロブリン結合担体を用いたアフィニティークロマトグラフィー法により精製することが可能であり、簡便である。

実施例

[0064] 以下、本発明における実施例について説明する。

[0065] 実施例1：SARS-NPに対するモノクローナル抗体の産生

本例のモノクローナル抗体は、次の[I]～[V]の工程を経て産生される。具体的には、[I]遺伝子工学的的手法により組換えSARS-NPを含有する抗原液を調製し、[II]この抗原液でマウスを免疫し、[III]免疫したマウスから得た脾臓細胞と骨髓腫細胞とを融合させ、[IV]得られたハイブリドーマからSARS-NPに対して特異的な抗体を生産する細胞を選択し、[V]このハイブリドーマをマウスの腹腔内で増殖させ、その腹水からモノクローナル抗体を分離した。詳細を以下に示した。

[0066] [I]抗原液の調製

まず、遺伝子解析用ソフトウェア BioEdit version 7.0.0 (BioEdit社)を用いて、SARS TOR2株のヌクレオカプシドタンパク質のcDNA塩基配列 (Gen Bank (accession Number; AY274119, protein id; AAP41047.1) において公開) における大腸菌内で使用頻度の低いコドン、使用頻度の高いコドンに変換した。(以降、この配列をSARS-NP cDNA (E.coli)と呼ぶ。)このSARS-NP cDNA (E.coli) (全長1269bp)のうち、5'末端からの1番目から660番目までに相当するcDNA断片と600番目から1269番目に相当するcDNA断片を合成し、それらを制限酵素で連結して全長1269bpのSARS-NP cDNAを合成した。そして、この合成SARS-NP cDNA 配列を利用して、2種類の組換えSARS-NP (GST融合型、His-tag付加型)を調製した。以下に、詳細を示す。

[0067] (1)塩基配列1～660のcDNA断片を含むベクターの調製

PCR法及びTAクローニング法を利用して、SARS-NP cDNA 配列の1番目から660番

目のcDNA断片を含むベクターを調製した。まず、8種類のプライマー(配列番号3～10)を合成し、このプライマーを用いてPCRを行った(第一PCR)。第一PCRの反応条件は95°C30秒、56.1°C30秒、72°C30秒の16サイクルである。第一PCRの反応液の組成は以下の通りである。

[0068] (第一PCR反応液)

10 μ Mのプライマー(配列番号3)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号4)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号5)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号6)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号7)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号8)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号9)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号10)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
2.5mM dNTP溶液(タカラバイオ株式会社) 1.6 μ L
1.5U/ μ L Ex-Taq(タカラバイオ株式会社) 0.1 μ L
10 \times Ex-Taq緩衝液(タカラバイオ株式会社) 2 μ L
滅菌蒸留水 12.3 μ L

[0069] 第一PCRが終了すると、次に、その反応液を用いて第二PCRを行った。第二PCRの反応条件は95°C30秒、58.5°C30秒、72°C30秒の30サイクルである。第二PCRの反応液の組成は以下の通りである。

[0070] (第二PCR反応液)

第一PCR終了後の反応液 1 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号11)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
10 μ Mのプライマー(配列番号12)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
2.5mM dNTP溶液(タカラバイオ株式会社) 1.6 μ L
1.5U/ μ L Ex-Taq(タカラバイオ株式会社) 0.1 μ L
10 \times Ex-Taq緩衝液(タカラバイオ株式会社) 2 μ L
滅菌蒸留水 14.3 μ L

[0071] そして、第二PCR終了後の反応液4 μ Lを用いてTAクローニングを行い、塩基配列1～660のcDNA断片を含むベクターを調製した。TAクローニングには、TOPO TA Cloning kit (invitrogen)を用いた。これにより、塩基配列1～660のcDNA断片を含むベクター-pCR TOPO(1-660)を得た。

[0072] (2) 塩基配列600～1269のcDNA断片を含むベクターの調製

前記(1)と同様の方法で、SARS-NP cDNA 配列の600番目から1269番目のcDNA断片を含むベクターを調製した。8種類のプライマー(配列番号13～20)を合成し、このプライマーを用いてPCRを行った(第一PCR)。第一PCRの反応条件は95°C30秒、55.1°C30秒、72°C30秒の16サイクルである。第一PCRの反応液の組成は、配列番号13～20のプライマーを含む各プライマー溶液を用いており、それ以外の組成は前記(1)と同様である。第一PCRに引き続いて、第二PCR及びTAクローニングも前記(1)と同様の方法で行い、最終的に、塩基配列600～1269のcDNA断片を含むベクター-pCR TOPO(600-1269)を得た。

[0073] (3) 全長SARS-NP cDNAを含むベクターの調製

pCR TOPO(1-660)及びpCR TOPO(600-1269)を用いて、全長1269bpのSARS-NP cDNAを含むベクターを調製した。まず、pCR TOPO(1-660)を制限酵素SmaIとHindIIIで処理して、pCR TOPO(1-660)からベクター部位と塩基配列1～660を含むcDNA断片を調製した。同様にpCR TOPO(600-1269)を制限酵素SmaIとHindIIIで処理して、pCR TOPO(600-1269)から塩基配列600～1269を含むcDNA断片を調製した。そして、ベクター部位と塩基配列1～660を含むcDNA断片、塩基配列600～1269を含むcDNA断片及びDNA Ligation Kit Ver2.1(タカラバイオ株式会社)を用いて全長1269bpのSARS-NP cDNAを含むベクター-pCR TOPO(1-1269)を得た。pCR TOPO(1-1269)に含まれるSARS-NP cDNAの塩基配列を配列番号1に示す。なお、この塩基配列とSARS-NP cDNA (E.coli)の塩基配列を比較したところ、675番目の塩基配列がGからAへ、1107番目の塩基配列がCからAへと置換していたが、それら塩基配列がコードするアミノ酸はTOR2 SARS-NP cDNA (E.coli)と同じであった。配列番号1に記載のSARS-NP cDNAの塩基配列より予想されるアミノ酸配列を配列番号2に示した。

[0074] (4) GST融合型組換えSARS-NPの調製

GST融合型大腸菌組み換えタンパク質発現ベクターpGEX-2TK (Amersham Bioscience)を制限酵素EcoRIとBamHIで処理し、アルカリホスファターゼ処理して4.9kbpのベクター断片を調製した。同様に、全長1269bpのSARS-NP cDNAを含むpCR TOPO (1-1269)を制限酵素EcoRIとBamHIで処理し、全長1269bpのSARS-NP cDNAを含むDNA断片を調製した。そして、4.9kbpのベクター断片、SARS-NP cDNAを含むDNA断片及びDNA Ligation Kit Ver2.1(タカラバイオ株式会社)を用いて、全長1269bpのSARS-NP cDNAを含む大腸菌発現ベクターpGEX-2TK(SARS-NP)を作製した。

[0075] 次に、大腸菌発現ベクターpGEX-2TK(SARS-NP)を含む大腸菌を、LB培地で培養した。培養開始後、対数増殖期に達した大腸菌培養液に最終濃度1mM IPTGを添加し、室温で18時間培養した。培養後、大腸菌体を回収し、PBS(1%TritonX)に懸濁した。超音波破碎機で懸濁液中の大腸菌を破碎した後、沈殿画分を100mM Tris緩衝液(150mMNaCl、pH8.0)で洗浄し、100mM Tris緩衝液(8M尿素、150mM KCl、pH8.0)に溶解した。これを、GST融合型組換えSARS-NP抗原液とした。

[0076] (5)His-tag付加型組換えSARS-NPの調製

ベクターpCDNA3.1(Invitrogen)を制限酵素EcoRIとBamHIで処理し、さらにアルカリホスファターゼ処理して5.0kbpのベクター断片を調製した。同様に、前記(4)で得られた大腸菌発現ベクターpGEX-2TK(SARS-NP)を制限酵素EcoRIとBamHIで処理し、全長1269bpのSARS-NP cDNAを含むDNA断片を調製した。そして、5.0kbpのベクター断片、SARS-NP cDNAを含むDNA断片及びDNA Ligation Kit Ver2.1(タカラバイオ株式会社)を用いて、全長1269bpのSARS-NP cDNAを含むpCDNA3.1(SARS-NP)を作製した。

[0077] 続いて、pCDNA3.1(SARS-NP)を制限酵素BamHIとXhoIで処理し、全長1269bpのSARS-NP cDNAを含むDNA断片を調製した。同様に、大腸菌発現ベクターpQE30(Qiagen)を制限酵素BamHIとXhoIで処理し、3.4kbpのベクター断片を調製した。そして、3.4kbpのベクター断片、SARS-NP cDNAを含むDNA断片及びDNA Ligation Kit Ver2.1(タカラバイオ株式会社)を用いて、全長1269bpのSARS-NP cDNAを含む大腸菌発現ベクターpQE30(SARS-NP)を作製した。

[0078] 次に、大腸菌発現ベクターpQE30(SARS-NP)を含む大腸菌を、100 μ g/mLアンピシ

リンを含有するLB培地で培養した。培養開始後、対数増殖期に達したところで大腸菌培養液に最終濃度1mM IPTGを添加し、3.5時間培養した。培養後、大腸菌を回収し、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(0.5M NaCl、1mM DTT、1mg/mL Pefablock(プロテアーゼインヒビター)、20mM イミダゾール、pH7.4) 30mLに懸濁し、氷上で超音波処理(2分間×7回)し、遠心後に得られた可溶性画分を回収し、His-Trap HPカラム(QIAGEN)を用いてHis-tag付加型組換えSARS-NPを精製した。このHis-tag付加型組換えSARS-NPを含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)をHis-tag付加型組換えSARS-NP抗原液とした。

[0079] [II]免疫工程

被免疫動物としてBalb/cマウス(8週齢メス)を用いた。前記[I](4)にて得られたGST融合型組換えSARS-NP抗原液、及び、前記[I](5)にて得られたHis-tag付加型組換えSARS-NP抗原液を用いて、以下のスケジュールでBalb/cマウスを免疫化した。

[0080] (1)FCAと混合したGST融合型組換えSARS-NP抗原液(GST融合型組換えSARS-NPの最終濃度50 μ g)をマウスの腹腔に投与した。

(2)その2週間後、RIBIと混合したGST融合型組換えSARS-NP抗原液(GST融合型組換えSARS-NPの最終濃度50 μ g)をマウスの腹腔に投与した。

(3)その3週間後、RIBIと混合したGST融合型組換えSARS-NP抗原液(GST融合型組換えSARS-NPの最終濃度50 μ g)をマウスの腹腔に投与した。

(4)その3週間後、RIBIと混合したHis-tag付加型組換えSARS-NP抗原液(His-tag付加型組換えSARS-NPの最終濃度50 μ g)をマウスの腹腔に投与した。

(5)その3週間後、RIBIと混合したHis-tag付加型組換えSARS-NP抗原液(His-tag付加型組換えSARS-NPの最終濃度50 μ g)をマウスの腹腔に投与した。

(6)その3週間後、His-tag付加型組換えSARS-NP抗原液(His-tag付加型組換えSARS-NPの最終濃度50 μ g)を尾静脈に注射した。

[0081] [III]細胞融合工程

ここでは、被免疫動物から得た脾細胞と骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製する。脾細胞は、[II](6)の免疫化処理から3日後のBalb/cマウスから摘出した。骨髓腫細胞は、Balb/cマウス骨髓腫由来培養細胞株(X63細胞株)から得られる

X63細胞を用いた。細胞融合は、約50%のポリエチレングリコール4000 (SIGMA)を含むRPMI-1640培養液中に、前記脾細胞と前記X63細胞の混合比が7.5:1となるように懸濁し、反応させる。この後、HT培地(10%非動化fetal calf serumを加えたRPMI-1640培養液に0.1mM hypoxantinと0.016mM thymidine含有)とクローニングメEDIUM(三光純薬)の比が1:1の培養液に、1mlあたり250万個となるように脾細胞数を懸濁し、96穴マイクロプレート(Corning Inc.)の各ウェルに播種して培養した。

[0082] [IV]ハイブリドーマの選択

融合操作後の細胞は選択培地で培養して、ハイブリドーマの選択を行う。融合操作の翌日、細胞を播いた96穴マイクロプレートの各ウェルにHAT培地を加えて培養した。さらに、細胞融合の4日後、6日後および8日後にHT培地を加えて培養し、ハイブリドーマのコロニーが生育しているウェルを確認した。

[0083] (1) SARS-NPに対する反応性の調査

次に、組換えSARS-NPを固定化したプレートを用いたELISAにより、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のSARS-NPに対する反応性を調べた。ここでは、まず、His-tag付加型組換えSARS-NPをELISAプレート上に固定化する。このプレートにハイブリドーマの培養液の上清を添加して反応させた後、ペルオキシターゼ標識したヤギ抗マウス抗体を添加し、ペルオキシダーゼ基質溶液を加えて発色させ、その吸光度を測定した。これより、His-tag付加型組換えSARS-NPに強い反応性を示すモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ30個(ハイブリドーマNo.1~30)を得た。

[0084] (2) モノクローナル抗体のエピトープの検討

さらに、図3に示したようにSARS-NPのアミノ酸配列を領域A(1-141)、領域B(142-282)、領域C(283-422)の3つの領域に分け、各モノクローナル抗体のエピトープがどの領域に含まれるのかを調べた。

[0085] ここでは、2種類の組換えタンパク質を用いた。各組換えタンパク質の調製は、まず、前記[I](4)で得られた大腸菌発現ベクターpGEX-2TK(SARS-NP)を鋳型として、SARS-NPアミノ酸配列(1~422番目のアミノ酸配列)のうちN末端側から1番目~282番目までのアミノ酸配列領域をコードするcDNA断片、及び、142番目~422番目までのアミノ酸配列領域をコードするcDNA断片をそれぞれ合成する。合成したcDNA断片

を利用して、SARS-NPアミノ酸配列のうち1番目～282番目までのアミノ酸配列領域に相当する組換えタンパク質(SARS-NP N末端タンパク質)、及び、142番目～422番目のアミノ酸配列領域に相当する組換えタンパク質(SARS-NP C末端タンパク質)を得る。以下に組換えタンパク質を得る方法を詳細に示す。

[0086] (1番目～282番目までのアミノ酸配列領域をコードするcDNA断片を含むベクターの調製)

大腸菌発現ベクターpGEX-2TK(SARS-NP)と配列番号11および配列番号21のプライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件は95°C30秒、58.5°C30秒、72°C30秒の30サイクルである。PCRの反応液の組成は以下の通りである。

[0087] 10 μ g/mLの大腸菌発現ベクターpGEX-2TK(SARS-NP) 1 μ L
 10 μ Mのプライマー(配列番号11)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
 10 μ Mのプライマー(配列番号21)を含むプライマー溶液 0.5 μ L
 2.5mM dNTP溶液(タカラバイオ株式会社) 1.6 μ L
 1.5U/ μ L Ex-Taq(タカラバイオ株式会社) 0.1 μ L
 10 \times Ex-Taq緩衝液(タカラバイオ株式会社) 2 μ L
 滅菌蒸留水 14.3 μ L

[0088] そして、PCR終了後の反応液4 μ Lを用いてTAクローニングを行い、全長1269bpのSARS-NP cDNA 配列の1番目から846番目に相当するcDNA断片を含むベクターを調製した。TAクローニングには、TOPO TA Cloning kit (invitrogen)を用いた。これにより、塩基配列1～846に相当するcDNA断片を含むベクターpCR N(1～846)を得た。

[0089] (142番目～422番目までのアミノ酸配列領域をコードするcDNA断片を含むベクターの調製)

大腸菌発現ベクターpGEX-2TK(SARS-NP)と配列番号22および配列番号23のプライマーを用いてPCRを行った。PCRの条件等は、1番目から282番目までのアミノ酸配列領域をコードするcDNA断片を含むベクターの調製した場合と同様である。これにより、SARS-NP cDNA 配列の427番目から1269番目に相当するcDNA断片を含むベクターpCR C(427～1269)を得た。

[0090] (SARS-NP N末端タンパク質の調製)

前記pCR N(1~846)を制限酵素BamHIで処理し、5.0kbpのcDNA断片を調製した。同様に、大腸菌発現ベクターpQE30(Qiagen)を制限酵素BamHIとXhoIで処理し、3.4 kbpのベクター断片を調製した。次に、3.4kbpのベクター断片、前記5.0kbpのcDNA断片及びDNA Ligation Kit Ver2.1(タカラバイオ株式会社)を用いて、塩基配列1~846に相当するcDNA断片を含む大腸菌発現ベクターpQE30 N(1~846)を作製した。

[0091] 次に、大腸菌発現ベクターpQE30 N(1~846)を含む大腸菌に導入し、100 μ g/mL アンピシリンを含有するLB培地で培養した。培養開始後、対数増殖期に達したところで大腸菌培養液に最終濃度1mM IPTGを添加し、3.5時間培養した。培養後、大腸菌を回収し、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(0.5M NaCl、1mM DTT、1mg/mL Pefablock(プロテアーゼインヒビター)、20mM イミダゾール、pH7.4) 30mLに懸濁し、氷上で超音波処理(2分間 \times 7回)し、遠心後に得られた可溶性画分を回収し、His-Trap HPカラム(QIAGEN)を用いて、SARS-NP N末端タンパク質を精製した。

[0092] (SARS-NP C末端タンパク質の調製)

前記pCR C(427~1269)を用いて、前記His-tag付加型組換えSARS-NP N末端タンパク質の調製と同様の方法で、SARS-NP C末端タンパク質を精製した。

[0093] 得られた各タンパク質(SARS-NP N末端タンパク質、SARS-NP C末端タンパク質)をそれぞれELISAプレート上に固定化する。それぞれのプレートに前記ハイブリドーマ(No.1~30)の培養液の上清を添加して反応させた後、ペルオキシターゼ標識したヤギ抗マウス抗体を添加し、ペルオキシターゼ基質溶液を加えて発色させ、その吸光度を測定した。これより、SARS-NP N末端タンパク質にのみ反応性を示すハイブリドーマは図3の領域Aにエピトープが存在するモノクローナル抗体を産生し、SARS-NP C末端タンパク質にのみ反応性を示すハイブリドーマは図3の領域Cにエピトープが存在するモノクローナル抗体を産生し、両タンパク質に反応性を示すハイブリドーマは図3の領域Bにエピトープが存在するモノクローナル抗体を産生することがわかる。

[0094] 以上(1)及び(2)の結果(吸光度)をまとめて表1に示す。

[0095] [表1]

ハイブリドーマ	エピトープが存在する領域	反応性		
		His-tag付加型 組換えSARS-NP	SARS-NP N末端 タンパク質	SARS-NP C末端 タンパク質
No.1	A	3.955	3.955	0.188
No.2		3.267	3.529	0.011
No.3		3.252	3.614	0.036
No.4		3.431	3.460	0.012
No.5		3.308	3.957	0.015
No.6		3.522	3.619	0.015
No.7		2.979	3.667	0.021
No.8		2.663	3.432	0.049
No.9		2.804	3.619	0.011
No.10		3.543	3.737	0.012
No.11		2.687	3.496	0.011
No.12	B	3.554	3.673	1.988
No.13		2.955	3.151	2.444
No.14	C	1.914	0.014	2.817
No.15		2.073	0.030	3.096
No.16		3.628	0.121	3.639
No.17		2.908	0.053	3.512
No.18		3.448	0.051	3.550
No.19		3.318	0.031	3.537
No.20		3.314	0.031	3.541
No.21		3.438	0.048	4.009
No.22		2.849	0.062	3.423
No.23		3.401	0.033	3.415
No.24		2.452	0.042	3.367
No.25		3.330	0.061	3.662
No.26		3.169	0.037	3.573
No.27		3.385	0.061	3.592
No.28		3.045	0.023	3.433
No.29		3.557	0.077	3.511
No.30	2.460	0.032	4.002	

[0096] [V]モノクローナル抗体の調製

上記表1のハイブリドーマのうち、ハイブリドーマNo.1、2、3、12、13、14、15、16及び17が産生する各モノクローナル抗体を精製した。精製は、まず、BALB/cマウスの腹腔内へハイブリドーマを移植し、10日後に貯留した腹水を採取する。採取した腹水から、プロテインAカラムであるHyperD(Perseptive Biosystems)を用いて、モノクローナル抗体を精製した。以上の操作により、9種類のモノクローナル抗体(モノクローナル抗体No.1、2、3、12、13、14、15、16及び17)を得た。

[0097] 実施例2:免疫クロマト法への適用

実施例1において得られた9種類のモノクローナル抗体(モノクローナル抗体No.1、2、3、12、13、14、15、16及び17)を用いて免疫クロマト法を実施した。

[0098] (免疫クロマト法用試験具の作製)

本例では、図2で示したような形態の試験具を用いた。本例の試験具の基材1には接着面を有するバックリングシートを、吸収部材5にはワットマンWF1.5を、クロマト用担体4にはニトロセルロース膜を用いた。なお、クロマト用担体4は、前記9種類のうちいずれかのモノクローナル抗体を固定化した判定部6を有する。なお、本例では、検体から調製された測定用試料に試験具の試料添加部材を浸すことにより、毛細管現象にて試料液を判定部に向かって展開するようになっている。

(抗体感作ラテックス液)

前記9種類のうちいずれかのモノクローナル抗体を青色ポリスチレンラテックス粒子(平均粒径 $0.3\mu\text{m}$)に固定化し、この青色ポリスチレンラテックス粒子を 0.2% (w/v)になるように 10mM リン酸緩衝液(pH8.0)に懸濁し、これを抗体感作ラテックス液として用いた。

(検体の調製)

POCTEM(シスメックス株式会社)の検体用緩衝液を用いて、[I](5)で得たHis-tag付加型組換えSARS-NPを 18.2ng/ml となるように調製し、これをポジティブ検体として用いた。また、His-tag付加型組換えSARS-NPを含まない検体用緩衝液をネガティブ検体として用いた。

(測定方法)

検体 $20\mu\text{l}$ 、POCTEM(シスメックス株式会社)の抽出液 $25\mu\text{l}$ 、抗体感作ラテックス液 $30\mu\text{l}$ を混合して測定用試料を調製した。この測定用試料が入ったチューブに試験具を、試料添加部材2を測定用試料に浸すように入れ、室温で20分間静置後、クロマト用担体4の判定部6に出現する青色のバンドを観察した。

[0099] 測定結果を表2に示した。各バンドは、青色の呈色度合いに応じて、「-」、「W」、「1+」、「2+」及び「3+」の5段階に区別して判定した。表中の「No.」は使用したモノクローナル抗体の番号を示し、A、B、Cは各抗体のエピトープが存在する領域を示す

[0101] なお、「－」、「W」、「1+」、「2+」及び「3+」は、出現したバンドをTRS3000 Membrane Strip Reader(BioDot社)で測定した場合に得られる測定値に基づいて、表3に記載の基準で設定した。表中のROD値とは、バンドの測定値からニトロセルロース膜の濃淡を測定した値をバックグラウンドとして差し引いた値である。ちなみに、青色のバンドを肉眼で確認することができるのは「W」、「1+」、「2+」及び「3+」である。

[0102] [表3]

	ROD値
—	0.000～0.006
W	0.007～0.014
1+	0.015～0.029
2+	0.030～0.079
3+	0.080以上

[0103] 表2より、免疫クロマト法におけるクロマト担体に固定化される抗体と着色ラテックスで標識する抗体の組み合わせについて、好ましくは判定が「1+」となった抗体の組み合わせであり、より好ましくは判定が「2+」となった抗体の組み合わせであり、最も好ましくは判定が「3+」となった抗体の組み合わせである。本例で感度の高い測定結果を示した3つの抗体(モノクローナル抗体No.2、No.12及びNo.14)を産生するハイブリドーマ(ハイブリドーマNo.2、No.12及びNo.14)を、独立行政法人産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター(茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に、2005年2月15日に寄託した。各ハイブリドーマの受領番号は次の通りである。

[0104] ハイブリドーマNo.2の受領番号:FERM ABP-10678

ハイブリドーマNo.12の受領番号:FERM ABP-10679

ハイブリドーマNo.14の受領番号:FERM ABP-10680

[0105] ここで、領域Aにエピトープが存在するモノクローナル抗体をグループAの抗体とし、領域Bにエピトープが存在するモノクローナル抗体をグループBの抗体とし、領域Cにエピトープが存在するモノクローナル抗体をグループCの抗体とする。そして、表2より、クロマト担体に固定化される抗体又は着色ラテックスで標識する抗体として、Cグループの抗体を用いることによって感度の高い測定結果を得られることがわかった。

[0106] クロマト担体に固定化される抗体と着色ラテックスで標識する抗体の組み合わせと

しては、Aグループの抗体とCグループの抗体の組み合わせ、又は、Bグループの抗体とCグループの抗体の組み合わせが比較的感度の高い測定結果を得られることがわかった。

[0107] また、クロマト担体に固定化される抗体としては、Aグループの抗体又はCグループの抗体を用いることによって感度の高い測定結果を得られることがわかった。さらに、クロマト担体に固定化される抗体がAグループの場合は、着色ラテックスで標識する抗体としてCグループの抗体を組み合わせることによって感度の高い測定結果を得られることがわかった。一方、クロマト担体に固定化される抗体がCグループの場合は、着色ラテックスで標識する抗体としてAグループの抗体又はBグループの抗体を組み合わせることによって感度の高い測定結果を得られることがわかった。また、Bグループに属するモノクローナル抗体No.12をクロマト担体に固定化される抗体として使用した場合、着色ラテックスで標識する抗体としてCグループの抗体を組み合わせることによって比較的感度の高い測定結果を得られることがわかった。

[0108] なお、上記の抗体の好ましい組み合わせは、免疫クロマト法に限ったものではなく、その他の免疫学的測定方法においても適応することができる。

[0109] 実施例3:ELISAへの適用

実施例1において得られたモノクローナル抗体No.1及びNo.14を用いてELISA法を実施した。ここで、モノクローナル抗体No.14はELISAプレートに固定化し、モノクローナル抗体No.1はアルカリホスファターゼで標識した。また、10mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて、[I](5)で得たHis-tag付加型組換えSARS-NPを0、0.195、0.39、0.78、1.56、3.12ng/mlとなるように調製し、これらを試料として用いた。

[0110] 測定方法としては、まず、モノクローナル抗体No.12を固定化したELISAプレートに試料100 μ Lを添加し、室温で30分間攪拌した。10mMリン酸緩衝液(pH7.0)でプレートを洗浄した後、実施例1で得られたHis-tag付加型組換えSARS-NP抗原液(20 ng/ml)100 μ Lを加え、室温で30分間攪拌した。リン酸緩衝液でプレートを洗浄した後、5U/mLアルカリホスファターゼ標識モノクローナル抗体No.1を含有する10mMリン酸緩衝液(pH7.0)100 μ Lを添加し、室温で30分間攪拌した。そして、プレートを洗浄後、ペルオキシターゼ基質溶液100 μ Lを加えて発色させ、その吸光度を測定した。

[0111] 比較例として、市販品:SARS-Nucleocapsid ActiveELIZA (IMGENEX社)で用いられている2種の抗体を用いて、同様の方法でELISA法を実施した。

[0112] 結果を図4に示した。図中の縦軸は吸光度(OD405/OD655)、横軸は検体に含まれるHis-tag付加型組換えSARS-NPの濃度(ng/mL)である。また、実線はモノクローナル抗体No.1及びNo.14を用いた場合の結果であり、点線は市販品の抗体を用いた場合の結果である。

[0113] 図4において、モノクローナル抗体No.1及びNo.14を用いた場合、非常に高いシグナル強度を示した。これより、ELISA法において、モノクローナル抗体No.1及びNo.14を用いると非常に高い感度で測定を行うことができることが判った。

[0114] 実施例3で用いた抗体(モノクローナル抗体No.1及びNo.14)並びに試料(His-tag付加型組換えSARS-NPの濃度:0、0.195、0.39、0.78、1.56、3.12ng/ml)を用いて免疫クロマト法を行った。その結果を表4に示した。なお、免疫クロマト法は、実施例2と同様の方法で実施した。なお、ここでは、モノクローナル抗体No.14をクロマト担体に固定化し、モノクローナル抗体No.1を着色ラテックスで標識した。

[0115] [表4]

検体中のSARS-NPの濃度 (ng/mL)	判定
0	-
0.195	W
0.39	1+
0.78	1+
1.56	2+
3.12	2+

[0116] 表4では、検体中のSARS-NPの濃度が0.195(ng/mL)の場合、「W」という判定結果であった。これより、免疫クロマト法において、モノクローナル抗体No.1及びNo.14を用いた場合、検体中のSARS-NPの濃度が少なくとも0.195(ng/mL)以上であればSARS-NPを検出することが可能であることが判った。

[0117] 実施例4:ELISAにおける抗体の組み合わせの検討

実施例1で得られたモノクローナル抗体No.1、3、8、12、14、15、16及び23を用いて

ELISA法を実施した。これらのそれぞれをELISAプレートに固定化し、これらのそれぞれをビオチンで標識して、いずれの組み合わせの場合に高感度でELISA法により検出ができるかを検討した。

- [0118] 上記のモノクローナル抗体をそれぞれ0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.5、0.1%アジ化ナトリウム)で1 μ g/mlになるように希釈した。この抗体液100 μ lをELISAプレートのウェルに加え、4°Cで一晩静置した。プレート洗浄機を用いて、バッファーII(10mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、0.05% Tween20)でプレートを洗浄した。バッファーI(10mMリン酸ナトリウムpH 7.0、2.5 mM EDTA、1% BSA、150mM NaCl) 300 μ lをウェルに加え、4°Cで一晩静置した。このようにして得られた抗体が固定化されたプレートに、バッファーIで希釈した実施例1で得られたHis-tag付加型組換えSARS-NP抗原液(20 ng/ml) 100 μ lを加え、室温で30分間攪拌した。ウェルをバッファーIIで洗浄し、バッファーIで希釈した0.5 μ g/mlの各ビオチン標識モノクローナル抗体を加え、室温で30分間攪拌した。ウェルをバッファーIIで洗浄し、バッファーIで希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(20mU/ml) 100 μ lを加え、室温で30分間攪拌した。ウェルをバッファーIIで洗浄し、ペルオキシダーゼ基質溶液100 μ lを加え、室温で2.5分間攪拌した後、2N硫酸100 μ lを加えた。プレートの吸光度(OD492/OD690)を測定した。測定は、1試料につき2つのウェルで行い、これらの値を平均した。さらに、抗原を含まない上記抗原液(すなわちSARS-NP 0ng/mlの上記抗原液)を用いた測定により得られた値をブランクとして、上記平均値から引いた値を結果として得た。

結果を図5に示す。図中の縦軸は吸光度(OD492/OD690)であり、横軸はプレートに固定化した抗体を示す。

- [0119] 図5より、ELISAにおけるELISAプレートに固定化される抗体とビオチンで標識する抗体の組み合わせについて、好ましくは判定が吸光度(OD492/OD690)が1.000以上となった抗体の組み合わせであり、より好ましくは1.200以上となった抗体の組み合わせであり、最も好ましくは1.450以上となった抗体の組み合わせである。本例で感度の高い測定結果を示した4つの抗体(モノクローナル抗体No.1、No.12、No.14及びNo.15)のうち、モノクローナル抗体No.1及びNo.15を産生するハイブリドーマ(ハイブリドーマNo.1及びNo.15)を、独立行政法人産業技術総合研究所 特許微生物寄託セ

ンター(茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に、2006年9月26日に寄託した。各ハイブリドーマの受領番号は次の通りである。

[0120] ハイブリドーマNo.1の受領番号:FERM ABP-10687

ハイブリドーマNo.15の受領番号:FERM ABP-10686

[0121] ここで、領域Aにエピトープが存在するモノクローナル抗体をグループAの抗体とし、領域Bにエピトープが存在するモノクローナル抗体をグループBの抗体とし、領域Cにエピトープが存在するモノクローナル抗体をグループCの抗体とする。そして、図5より、ELISAプレートに固定化される抗体又はビオチンで標識する抗体として、Cグループの抗体を用いることによって比較的高感度の測定結果を得られることがわかった。

[0122] ELISAプレートに固定化される抗体とビオチンで標識する抗体の組み合わせとしては、Aグループの抗体とCグループの抗体の組み合わせ、又は、Bグループの抗体とCグループの抗体の組み合わせが比較的高感度の高い測定結果を得られることがわかった。

[0123] また、ELISAプレートに固定化される抗体がAグループの場合は、ビオチンで標識する抗体としてCグループの抗体を組み合わせることによって感度の高い測定結果を得られることがわかった。さらに、ELISAプレートに固定化される抗体がBグループの場合は、ビオチンで標識する抗体としてCグループの抗体を組み合わせることによって感度の高い測定結果を得られることがわかった。また、Cグループに属するモノクローナル抗体No.14をELISAプレートに固定化される抗体として使用した場合、ビオチンで標識する抗体としてAグループの抗体を組み合わせることによって比較的高感度の高い測定結果を得られることがわかった。

[0124] 実施例5:様々な濃度の抗原のELISAによる測定

上記の結果から、次の表5に示す組み合わせでモノクローナル抗体を用いて、実施例4と同様にしてELISAを行った。なお、His-tag付加型組換えSARS-NP抗原は、バッファーIで0~3.125 μ g/mlとなるように希釈して用いた。また、ビオチン標識モノクローナル抗体の濃度は1 μ g/mlとし、ペルオキシターゼ基質溶液との反応時間を10分間とした。

測定は、1試料につき4つのウェルで行い、これらの値を平均して結果を得た。
結果を図6に示す。

[0125] [表5]

実施例	プレート固定化抗体	ビオチン標識抗体
5-1	No. 14	No.1
5-2	No.12	No.15
5-3	No.12	No.14

[0126] 図6より、検体中のSARS-NPの濃度に比例して吸光度が増加していることがわかった。ゆえに、本例の抗体を組み合わせたELISA法により、SARSの濃度を測定することが可能であることがわかった。

[0127] この出願は、2005年10月11日に出願された日本国特許出願特願2005-296542号に関し、この特許請求の範囲、明細書、図面及び要約書の全ては本明細書中に参照として組み込まれる。

請求の範囲

- [1] SARSウイルスヌcleoカプシドタンパク質(SARS-NP)に特異的に結合する第一抗体及びSARS-NPに特異的に結合する第二抗体を用いてSARS-NPを測定する方法であって、
前記第一抗体又は前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から283番目～422番目の領域(領域C)に存在するエピトープを認識する抗体であるSARS-NPの測定方法。
- [2] 前記第二抗体が前記領域Cに存在するエピトープを認識する抗体であり、前記第一抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から1番目～141番目の領域(領域A)に存在するエピトープを認識する抗体、又はSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から142番目～282番目の領域(領域B)に存在するエピトープを認識する抗体であり、該第一抗体が固相に固定化されて用いられる請求項1に記載のSARS-NPの測定方法。
- [3] 前記第一抗体が領域Cに存在するエピトープを認識する抗体であり、前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から1番目～141番目の領域(領域A)に存在するエピトープを認識する抗体又はSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から142番目～282番目の領域(領域B)に存在するエピトープを認識する抗体であり、該第一抗体が固相に固定化されて用いられる請求項1に記載のSARS-NPの測定方法。
- [4] 前記第一抗体及び前記第二抗体のうち少なくとも一方がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載のSARS-NPの測定方法。
- [5] 前記第二抗体が標識物質により標識されていることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載のSARS-NPの測定方法。
- [6] 前記測定方法が、免疫比濁法、ラテックス免疫凝集法、放射性免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法または免疫クロマト法である請求項1～5のいずれか一項に記載の測定方法。
- [7] SARSウイルスヌcleoカプシドタンパク質(SARS-NP)に特異的に結合する第一抗体及びSARS-NPに特異的に結合する第二抗体を用いてSARSウイルスヌcleoカプシドタンパク質(SARS-NP)を測定するための試薬キットであって、
前記第一抗体を固定化した固相と、標識物質により標識された前記第二抗体を含有

する試薬との組み合わせからなり、

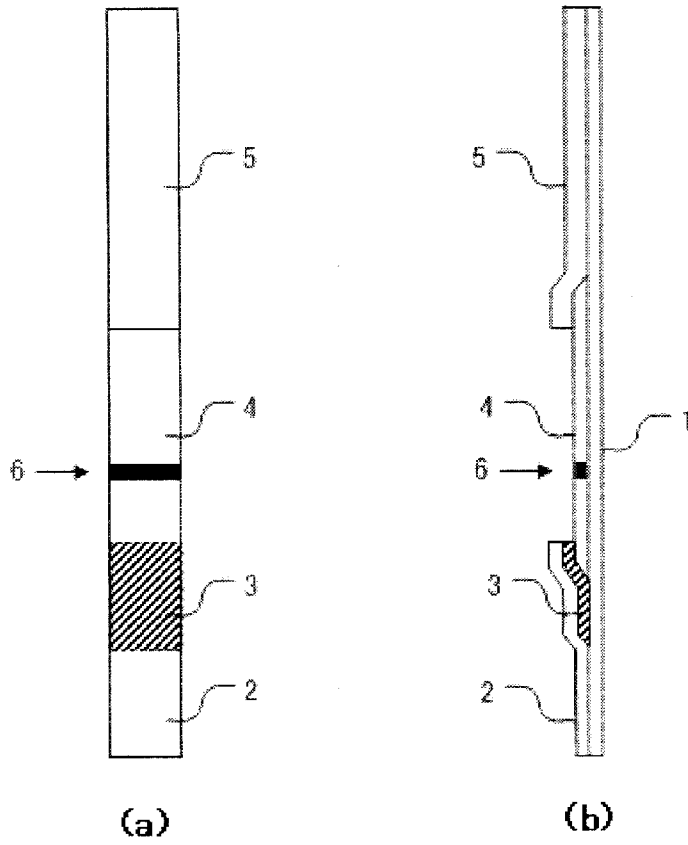
前記第一抗体又は前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から283番目～422番目までの領域(領域C)に存在するエピトープを認識する抗体であるSARS-NPの測定用試薬キット。

- [8] 前記第二抗体が領域Cに存在するエピトープを認識する抗体であり、前記第一抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から1番目～141番目の領域(領域A)に存在するエピトープを認識する抗体、又はSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から142番目～282番目の領域(領域B)に存在するエピトープを認識する抗体である請求項7に記載の測定用試薬キット。
- [9] 前記第一抗体が領域Cに存在するエピトープを認識する抗体であり、前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から1番目～141番目の領域(領域A)に存在するエピトープを認識する抗体又はSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から142番目～282番目の領域(領域B)に存在するエピトープを認識する抗体である請求項7に記載の測定用試薬キット。
- [10] 前記第一抗体及び前記第二抗体のうち少なくとも一方がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項7～9のいずれか一項に記載の測定用試薬キット。
- [11] SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に特異的に結合する第一抗体及びSARS-NPに特異的に結合する第二抗体を用いてSARSウイルスを測定するための免疫クロマト法用の試験具であって、
前記第一抗体が固相に固定化されており、前記第二抗体が標識物質により標識されており、
前記免疫クロマト法用の試験具が、測定用試料が添加される試料添加部及び前記試料添加部に添加された測定用試料が展開される試料展開部を備え、前記試料展開部が第一抗体を固定化した判定部を有し、前記試料添加部に添加された測定用試料が少なくとも前記判定部に向かって展開され、
前記第一抗体又は前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から283番目～422番目までの領域(領域C)に存在するエピトープを認識する抗体である免疫クロマト法用の試験具。

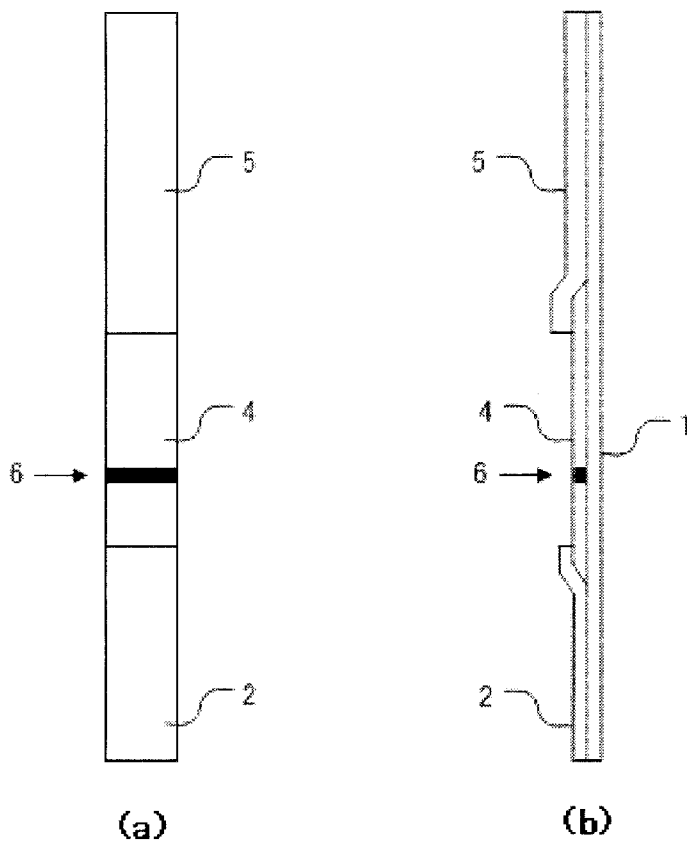
- [12] 前記第二抗体が領域Cに存在するエピトープを認識する抗体であり、前記第一抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から1番目～141番目の領域(領域A)に存在するエピトープを認識する抗体、又はSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から142番目～282番目の領域(領域B)に存在するエピトープを認識する抗体であることを特徴とする請求項11に記載の免疫クロマト法用の試験具。
- [13] 前記第一抗体が領域Cに存在するエピトープを認識する抗体であり、前記第二抗体がSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から1番目～141番目の領域(領域A)に存在するエピトープを認識する抗体又はSARS-NPのアミノ酸配列のN末端側から142番目～282番目の領域(領域B)に存在するエピトープを認識する抗体であることを特徴とする請求項11に記載の免疫クロマト法用の試験具。
- [14] 前記第一抗体及び前記第二抗体のうち少なくとも一方がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項11～13のいずれか一項に記載の免疫クロマト法用の試験具。
- [15] 前記測定用試料が標識物質により標識されている第二抗体を含むことを特徴とする請求項11～14のいずれか一項に記載の免疫クロマト法用の試験具。
- [16] 前記試料展開部が、標識物質により標識されている第二抗体を保持する標識保持部を有し、前記標識保持部が、測定用試料が判定部に向かって展開する展開方向に対して判定部よりも上流側に配置される請求項11～14のいずれか一項に記載の免疫クロマト法用の試験具。
- [17] SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10678のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。
- [18] SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10679のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。
- [19] SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10680のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。
- [20] SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10686のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。
- [21] SARSウイルスヌクレオカプシドタンパク質(SARS-NP)に対して特異的に結合し、受領番号がFERM ABP-10687のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体。

- [22] 受領番号FERM ABP-10678により寄託されたハイブリドーマ。
- [23] 受領番号FERM ABP-10679により寄託されたハイブリドーマ。
- [24] 受領番号FERM ABP-10680により寄託されたハイブリドーマ。
- [25] 受領番号FERM ABP-10686により寄託されたハイブリドーマ。
- [26] 受領番号FERM ABP-10687により寄託されたハイブリドーマ。

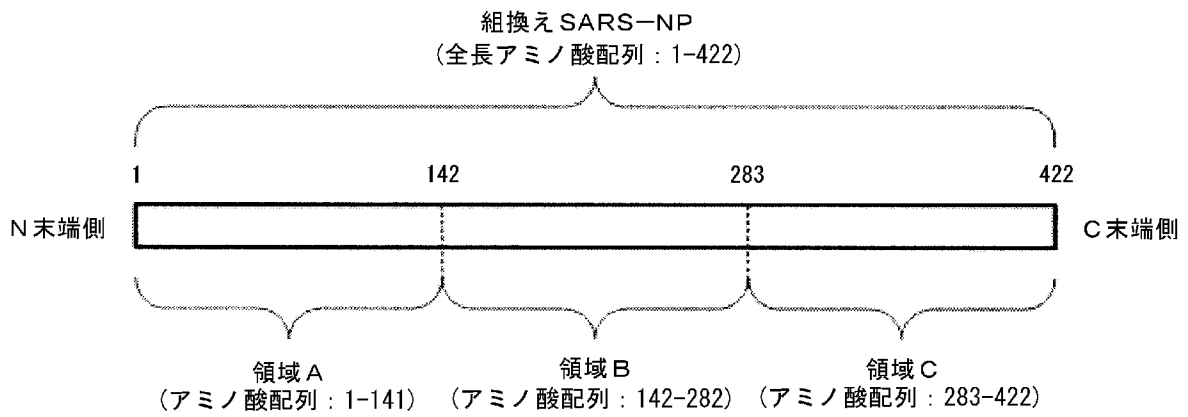
[図1]



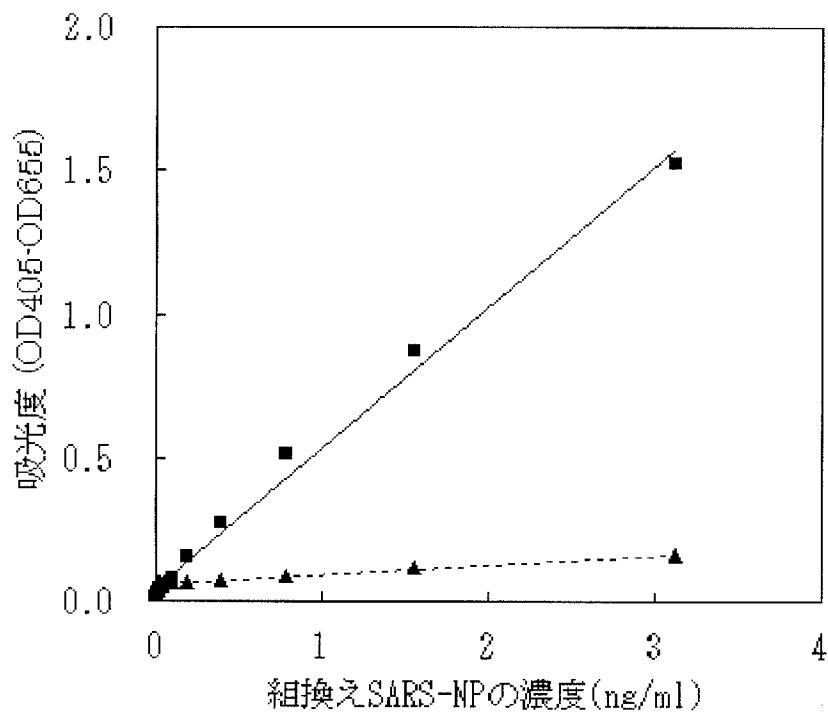
[図2]



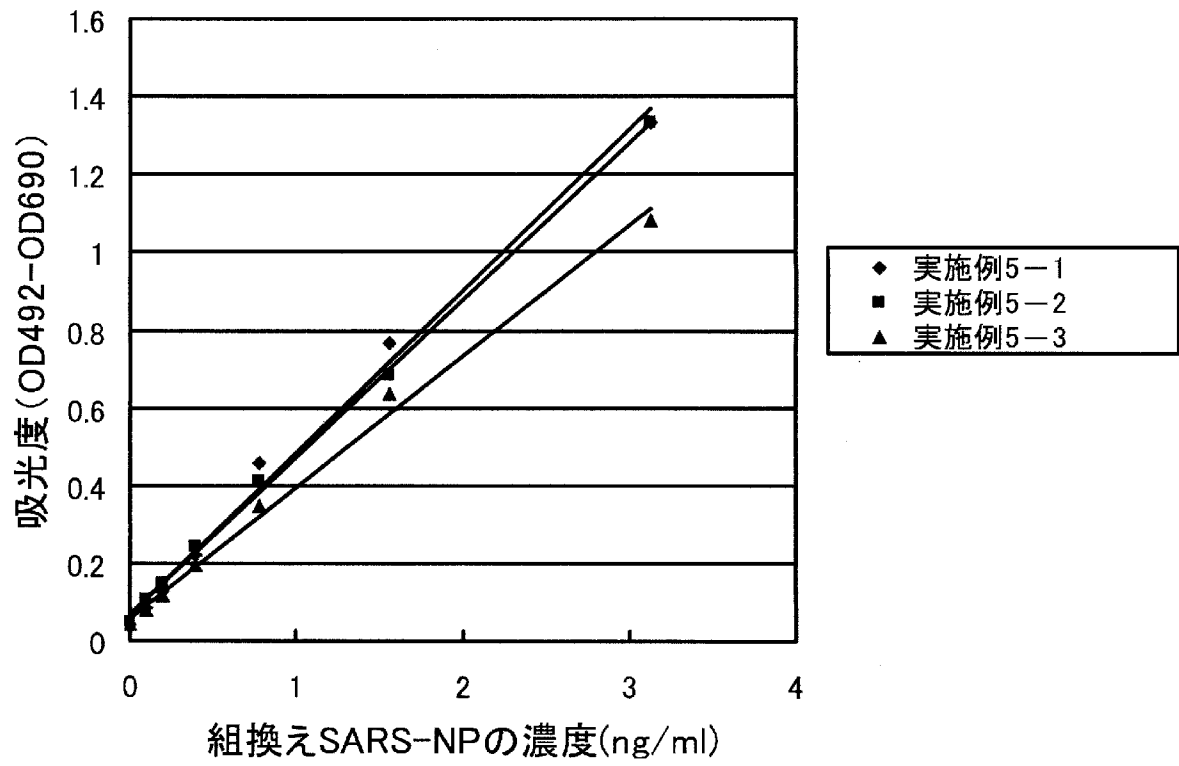
[図3]



[図4]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/320330

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/00(2006.01)i, C07K16/08(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>												
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N15/00, C07K16/08, C12N5/10, C12N15/02, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/545, G01N33/569, G01N33/577</i></p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/Geneseq, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2)</p>												
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2005/042579 A1 (Fujirebio Inc.), 12 May, 2005 (12.05.05), Full text (Family: none)</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>LIANG Y et al. 'Comprehensive antibody epitope mapping of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: insight into the humoral immunity of SARS.' Clin. Chem. (Aug. 2005) vol. 51, pp.1382-1396, full text, particularly, table 2</td> <td>1-26</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	WO 2005/042579 A1 (Fujirebio Inc.), 12 May, 2005 (12.05.05), Full text (Family: none)	1-26	Y	LIANG Y et al. 'Comprehensive antibody epitope mapping of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: insight into the humoral immunity of SARS.' Clin. Chem. (Aug. 2005) vol. 51, pp.1382-1396, full text, particularly, table 2	1-26	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	WO 2005/042579 A1 (Fujirebio Inc.), 12 May, 2005 (12.05.05), Full text (Family: none)	1-26										
Y	LIANG Y et al. 'Comprehensive antibody epitope mapping of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: insight into the humoral immunity of SARS.' Clin. Chem. (Aug. 2005) vol. 51, pp.1382-1396, full text, particularly, table 2	1-26										
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
<p>Date of the actual completion of the international search 04 January, 2007 (04.01.07)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 16 January, 2007 (16.01.07)</p>										
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>										
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/320330

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X/P, Y	SHANG B., et al. 'Characterization and application of monoclonal antibodies against N protein of SARS-coronavirus.' Biochem. Biophys. Res. Commun. (14 Oct. 2005) vol. 336, pp. 110-117	1, 4-7, 10/2, 3, 8, 9, 11-26
A	CHE XY et al. 'Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome.' J. Clin. Microbiol. (2004) vol. 42, pp. 2629-2635	1-10
A	BERRY J.D. et al. 'Development and characterisation of neutralising monoclonal antibody to the SARS-coronavirus.' J. Virol. Methods (2004) vol. 120, pp. 87-96	17-26
A	OHNISHI K. et al. 'Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies.' Jap. J. Infect. Dis. (Apr. 2005) vol. 58, pp. 88-94	1-10, 17-26
A	VAN DEN BRINK E.N. et al. 'Molecular and biological characterization of human monoclonal antibodies binding to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus.' J. Virol. (Feb. 2005) vol. 79, pp. 1635-1644	17-26
A	Teruo KIRIKAE, 'Tokushu SARS Saishin Joho Kensaho no Genjo to Kongo no Tenbo', Antibiotics & Chemotherapy, 25 December, 2003 (25.12.03), Vol. 20, pages 63 to 69	1-26
P, A	Fumihiro TAGUCHI, 'Rinsho Kenkyu to Tenbo SARS SARS Coronavirus', Japanese Journal of Clinical Medicine, 01 December, 2005 (01.12.05), Vol. 63, pages 2113 to 2120	1-26

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C07K16/08(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/00, C07K16/08, C12N5/10, C12N15/02, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/545, G01N33/569, G01N33/577</p>														
<p>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</p>														
<p>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)</p> <p>BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/Geneseq, JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2 0 0 5 / 0 4 2 5 7 9 A 1 (富士レビオ株式会社) 2 0 0 5 . 0 5 . 1 2、全文 (ファミリーなし)</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>LIANG Y et al. 'Comprehensive antibody epitope mapping of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: insight into the humoral immunity of SARS.' Clin. Chem. (Aug. 2005) vol. 51, pp. 1382-1396、全文、特にT a b l e 2</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>P, X/ P, Y</td> <td>SHANG B., et al. 'Characterization and application of monoclonal antibodies against N protein of SARS-coronavirus.' Biochem. Biophys. Res. Commun. (14 Oct. 2005) vol. 336, pp. 110-117</td> <td>1, 4-7, 10/ 2, 3, 8, 9, 11-26</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	Y	WO 2 0 0 5 / 0 4 2 5 7 9 A 1 (富士レビオ株式会社) 2 0 0 5 . 0 5 . 1 2、全文 (ファミリーなし)	1-26	Y	LIANG Y et al. 'Comprehensive antibody epitope mapping of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: insight into the humoral immunity of SARS.' Clin. Chem. (Aug. 2005) vol. 51, pp. 1382-1396、全文、特にT a b l e 2	1-26	P, X/ P, Y	SHANG B., et al. 'Characterization and application of monoclonal antibodies against N protein of SARS-coronavirus.' Biochem. Biophys. Res. Commun. (14 Oct. 2005) vol. 336, pp. 110-117	1, 4-7, 10/ 2, 3, 8, 9, 11-26
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号												
Y	WO 2 0 0 5 / 0 4 2 5 7 9 A 1 (富士レビオ株式会社) 2 0 0 5 . 0 5 . 1 2、全文 (ファミリーなし)	1-26												
Y	LIANG Y et al. 'Comprehensive antibody epitope mapping of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: insight into the humoral immunity of SARS.' Clin. Chem. (Aug. 2005) vol. 51, pp. 1382-1396、全文、特にT a b l e 2	1-26												
P, X/ P, Y	SHANG B., et al. 'Characterization and application of monoclonal antibodies against N protein of SARS-coronavirus.' Biochem. Biophys. Res. Commun. (14 Oct. 2005) vol. 336, pp. 110-117	1, 4-7, 10/ 2, 3, 8, 9, 11-26												
<p><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。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>0 4 . 0 1 . 2 0 0 7</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>1 6 . 0 1 . 2 0 0 7</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>斎藤 真由美</p> <p>電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8</p>	<p>4 B</p> <p>3 7 7 7</p>												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	CHE XY et al. 'Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome.' J. Clin. Microbiol. (2004) vol. 42, pp. 2629-2635	1-10
A	BERRY J.D. et al. 'Development and characterisation of neutralising monoclonal antibody to the SARS-coronavirus.' J. Virol. Methods (2004) vol. 120, pp. 87-96	17-26
A	OHNISHI K. et al. 'Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies.' Jap. J. Infect. Dis. (Apr. 2005) vol. 58, pp. 88-94	1-10, 17-26
A	VAN DEN BRINK E.N. et al. 'Molecular and biological characterization of human monoclonal antibodies binding to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus.' J. Virol. (Feb. 2005) vol. 79, pp. 1635-1644	17-26
A	切替照雄「特集SARS最新情報 検査法の現状と今後の展望」化学療法の領域, 2003. 12. 25, 第20巻, 第63-69頁	1-26
P, A	田口文広「臨床研究と展望 SARS SARSコロナウイルス」日本臨床, 2005. 12. 01, 第63巻, 第2113-2120頁	1-26