

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4595810号  
(P4595810)

(45) 発行日 平成22年12月8日(2010.12.8)

(24) 登録日 平成22年10月1日(2010.10.1)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>C O 7 K</b>	<b>16/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	16/10	Z N A
<b>G O 1 N</b>	<b>33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/543	5 2 1
<b>G O 1 N</b>	<b>33/569</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/569	L
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/08</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/543	5 4 5 A
			C 1 2 P	21/08	

請求項の数 4 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2005-511913 (P2005-511913)	(73) 特許権者	306008724
(86) (22) 出願日	平成16年7月23日(2004.7.23)		富士レビオ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/010475		東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号
(87) 国際公開番号	W02005/007697	(74) 代理人	100088546
(87) 国際公開日	平成17年1月27日(2005.1.27)		弁理士 谷川 英次郎
審査請求日	平成19年5月31日(2007.5.31)	(72) 発明者	安住 純一
(31) 優先権主張番号	特願2003-278527 (P2003-278527)		東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号
(32) 優先日	平成15年7月23日(2003.7.23)		富士レビオ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	山田 崇
(31) 優先権主張番号	特願2003-364316 (P2003-364316)		東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号
(32) 優先日	平成15年10月24日(2003.10.24)		富士レビオ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	本多 智恵
(31) 優先権主張番号	特願2004-109763 (P2004-109763)		東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号
(32) 優先日	平成16年4月2日(2004.4.2)		富士レビオ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体及び該抗体を用いる免疫測定器具

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザA型ウイルスの分子量55~70kDの核タンパク質と抗原抗体反応し、インフルエンザB型ウイルスとは実質的に抗原抗体反応せず、インフルエンザA型ウイルスの核タンパク質のアミノ酸配列59から130のアミノ酸領域のエピトープと反応し、インフルエンザA型ウイルスのH1N1、H2N2、H3N2、H3N8、H4N6、H5N2、H6N2、H7N7、H8N4、H9N2、H10N7、H11N6、H12N5、H13N6、H14N5、H15N8及びH5N1の各亜型ウイルスと抗原抗体反応する、抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項2】

移動可能な標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体を有する標識試薬ゾーン、検体点着ゾーン、展開液供給ゾーン、展開液吸収ゾーン及び抗インフルエンザA型ウイルス抗体をマトリクスに不動化させたインフルエンザA型ウイルス検出ゾーンをマトリクスに設けた器具であって、前記標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体及び検出ゾーンに不動化した抗インフルエンザA型ウイルス抗体の少なくとも一方の抗体が請求項1記載のモノクローナル抗体である免疫測定器具。

【請求項3】

標識試薬ゾーンに更に標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体を含み、且つインフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体を不動化させたインフルエンザA型ウイルス検出ゾーンの近傍に、更にインフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体を不動化させたイン

フルエンザ B 型ウイルス検出ゾーンを有する請求項 2 記載の免疫測定器具。

【請求項 4】

標識物が酵素であり、展開液中及び/又は展開液供給ゾーンの近傍に酵素に対する基質を含有する請求項 2 又は 3 記載の免疫測定器具。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗インフルエンザ A 型ウイルスモノクローナル抗体及び該抗体を用いる免疫測定器具に関する。

【背景技術】

10

【0002】

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、そのたび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; NP)の抗原性によって A 型、B 型又は C 型の 3 種のタイプに分類されている。インフルエンザ A 型は、更にウイルス表面に存在する赤血球凝集素(hemagglutinin; HA)とノイラミニダーゼ(neuraminidase; NA)という 2 つの 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。

【0003】

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 A 型ウイルスに適應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 B 型に適應するザナビル、リン酸オセルタミビル等である。

20

【0004】

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、インフルエンザウイルス B 型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特定が更に重要である。

30

【0005】

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。これまでインフルエンザ A 型ウイルスに対する抗体としては、流行が予想されるウイルスの亜型を判別してワクチン製造に役立てるため、ウイルスの HA や NA を特異的に認識し、ウイルスの亜型を識別するための抗体が知られていた(例えば、(特許文献 1)、(特許文献 2)参照)。また、インフルエンザウイルス A 型各亜型について核タンパク質のアミノ酸配列が決定され、National Library of Medicine; Entrez Nucleotides database 等に報告されている。

【0006】

40

更に、インフルエンザウイルスを検出する装置としては、例えばインフルエンザウイルス抗原を結合しうる固相を用意し、検体中のインフルエンザウイルスを反応させた後、更に第一酵素が結合しているインフルエンザ A 型ウイルス抗体及び第二酵素が結合しているインフルエンザウイルス B 型抗体を前記固相と反応させ、基質を加えて反応を行い、固相上の発色を目視で観察するフロー・スルー型装置が知られていた(特許文献 3)参照)。この装置は、試薬中の抗体にはインフルエンザウイルスの核タンパク質に対する抗体を使用するものの、測定操作が煩雑であり、簡便な測定装置ではなかった。また更に、インフルエンザウイルス核タンパク質に対するモノクローナル抗体を使用した免疫測定器具(以下「イムノクロマト器具」という)が知られている(非特許文献 1)参照)。

【0007】

50

一方、輸液可能な帯状のマトリックスを用いるイムノクロマト器具が開発され、所定の箇所に検体を点着するだけで、特別な検出装置、熟練した測定技術を必要とせず短時間に簡便に検体中の抗原又は抗体の測定ができるようになった。イムノクロマト器具には、その測定対象物質によって、例えば検出ゾーンに複数の梅毒トレポネマ抗原（TP抗原）を結合し、検体中の複数の抗TP抗体を別々の検出ゾーンで検出することのできるイムノクロマト器具が開発されている（（特許文献4）参照）。この器具の検出ゾーンには、異なったTP抗原を結合させた複数のゾーンを有し、1回の測定で異なる抗TP抗体を別々の検出して感染時期を特定し、治療薬の選択等に利用されている。

【0008】

【特許文献1】特開平6-100594号

【特許文献2】特開平7-304799号

【特許文献3】特開2001-124775号

【特許文献4】特開平9-229938号

【非特許文献1】感染症誌 2001; 75; 792-799

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従来の抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体は、核タンパク質に対する抗体がイムノクロマト法などで用いられるものの、インフルエンザA型ウイルスに対する特異性及び反応性が低く、高感度の免疫測定には満足できるものではなかった。また、インフル

エンザ治療薬を選択するためインフルエンザB型ウイルスとは反応しないが、インフル

エンザウイルスのHAとNAが変異した亜型を含む全てのインフルエンザA型ウイルスに反応する抗体が求められていた。

【0010】

また更に、インフルエンザA型ウイルス又はB型ウイルスの判別を特別な診断機器設備や測定装置用いずに、短時間に測定結果が得られ、1回の操作でA型又はB型の判別できる装置が求められていた。

【0011】

従って、本発明の目的は、特異性が高い抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体を提供することである。また、本発明は、インフルエンザA型ウイルスを特異的に検

出することができる免疫測定器具を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、インフルエンザA型ウイルスの核タンパク質を抗原とし、インフルエンザA型ウイルスと特異的に反応する抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体を作出することに成功し、本発明を完成した。また、このインフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体を利用することにより、インフルエンザA型ウイルスをインフルエンザB型ウイルスと識別して検出することが可能な免疫測定器具を提供することに想到した。

【0013】

すなわち、本発明は、インフルエンザA型ウイルスの分子量55~70kDの核タンパク質と抗原抗体反応し、インフルエンザB型ウイルスとは実質的に抗原抗体反応せず、インフルエンザA型ウイルスの核タンパク質のアミノ酸配列59から130のアミノ酸領域のエピトープと反応し、インフルエンザA型ウイルスのH1N1、H2N2、H3N2、H3N8、H4N6、H5N2、H6N2、H7N7、H8N4、H9N2、H10N7、H11N6、H12N5、H13N6、H14N5、H15N8及びH5N1の各亜型ウイルスと抗原抗体反応する、抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を提供する。また、本発明は、移動可能な標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体を有する標識試薬ゾーン、検体点着ゾーン、展開液供給ゾーン、展開液吸収ゾーン及び抗インフルエンザA型ウイルス抗体をマトリックスに不動化させたインフル

エンザA型ウイルス検出ゾーンをマトリックスに設けた器具であって、前記標識抗インフル

10

20

30

40

50

エンザ A 型ウイルス抗体及び検出ゾーンに不動化した抗インフルエンザ A 型ウイルス抗体の少なくとも一方の抗体が上記本発明のモノクローナル抗体である免疫測定器具を提供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、インフルエンザ A 型ウイルスと免疫反応するが、インフルエンザ B 型ウイルスとは反応しない抗インフルエンザ A 型ウイルスモノクローナル抗体が提供された。本発明の抗インフルエンザ A 型ウイルスモノクローナル抗体を用いる免疫測定により、インフルエンザ A 型ウイルスをインフルエンザ B 型ウイルスと識別して検出又は定量することができる。本発明により、さらに、上記本発明の抗インフルエンザ A 型ウイルスモノクローナル抗体を用いた免疫測定器具が提供された。本発明の免疫測定器具を用いることにより、インフルエンザ A 型ウイルスを、簡便に、かつ、インフルエンザ B 型ウイルスと識別して検出することができる。従って、本発明は、インフルエンザの診断及び治療に大いに貢献するものと期待される。

10

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】ウエスタンブロット法によって分画した抗原について、本発明のモノクローナル抗体を反応させた時の結果を示す図である。

【図2】実施例4で用いた発現用プラスミド(pW6A)の制限酵素地図を示す図である。

20

【図3】インフルエンザ H1N1 の A 断片をさらに細分化した断片 A1 から A7 のアミノ酸を示す図である。

【図4】FVA2-11 との反応性を確認する CBB 染色パターンとウエスタンブロットを示す図である。

【図5】インフルエンザ A 型ウイルス亜型の核タンパク質アミノ酸配列(80~140)を示す図である。

【図6】本発明の測定器具態様の一例を模式的に示す断面図である。

【図7】本発明の測定器具をカセットにセットしたときの一例を示す平面図である。

【図8】図7の A-A' の断面図である。

【発明を実施するための最良の形態】

30

【0016】

上記の通り、インフルエンザ A 型ウイルスの分子量 55 ~ 70 kD の核タンパク質と抗原抗体反応するものである。インフルエンザ A 型ウイルスの分子量 55 ~ 70 kD の核タンパク質と抗原抗体反応することは、インフルエンザ A 型ウイルスを試料とし、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を組み込んだウエスタンブロット法により確認することができる。ウエスタンブロット(下記実施例参照)を行なうと、本発明のモノクローナル抗体は、分子量 55 ~ 70 kD の核タンパク質を認識する。

【0017】

上記のとおり、本発明のモノクローナル抗体は、インフルエンザ B 型ウイルスとは実質的に抗原抗体反応しない。ここで、「実質的に抗原抗体反応しない」とは、検出可能なレベルで抗原抗体反応しないか又は抗原抗体反応を起こしても、その反応の程度が、インフルエンザ A 型ウイルスとの抗原抗体反応よりも明らかに弱く、インフルエンザ A 型ウイルスと抗原抗体反応していないことが当業者にとって明瞭な程度にしか反応しないことを意味する。また、ここで、「インフルエンザ B 型ウイルスとは実質的に抗原抗体反応しない」とは、インフルエンザ B 型ウイルスの核タンパク質をはじめ、該ウイルスの各構成要素のタンパク質と実質的に抗原抗体反応しないという意味である。好ましい形態では、本発明のモノクローナル抗体は、インフルエンザ C 型ウイルスとも実質的に反応しない。

40

【0018】

本発明のモノクローナル抗体は、インフルエンザ A 型ウイルスの核タンパク質のアミノ

50

酸配列の59番目のアミノ酸残基(以下、「59aa」のように記載)から130aaのアミノ酸領域内のエピトープと反応する。インフルエンザA型ウイルスの核タンパク質のアミノ酸配列は既に公知であり、例えば、GenBank Accession No. ITY238021等に記載されている。インフルエンザA型ウイルスの種々の亜型の核タンパク質の59aa~140aaのアミノ酸配列を図5に示す。また、好ましい形態では、本発明のモノクローナル抗体は、各亜型のインフルエンザA型ウイルスの核タンパク質と抗原抗体反応することから、図5に示すアミノ酸配列中、共通する配列を有し、親水性構造を有する例えば90aa~95aa、111aa~115aa若しくは120aa~123aa等の領域又はこれらの各領域を含み、かつ、共通する配列を有する領域をエピトープとするものである。

【0019】

本発明のモノクローナル抗体は、インフルエンザA型ウイルスの各亜型の核タンパク質と抗原抗体反応する。すなわち、インフルエンザA型ウイルスは、そのウイルス粒子表面に、ヘマグルチニン(H)とノイラミニダーゼ(N)を有するが、これらのH及びNの構造の相違により種々の亜型に分類されている。本発明のモノクローナル抗体は、次の亜型の核タンパク質と抗原抗体反応するものである。H1N1、H2N2、H3N2、H3N8、H4N6、H5N2、H6N2、H7N7、H8N4、H9N2、H10N7、H11N6、H12N5、H13N6、H14N5、H15N8、H5N1。

【0020】

また、好ましい形態では、本発明のモノクローナル抗体は、インフルエンザと症状が少なくとも部分的に類似している他の感染症の病原体とも実質的に抗原抗体反応しない。例えば、アデノウイルス(1~7型)、コクサッキーウイルス(A16, B1~B6型)、単純ヘルペスウイルス1型、エコーウイルス(3型、4型、7型、22型、30型)、エンテロウイルス(71型)、ムンプスウイルス、ポリオウイルス(1~3型)、RSウイルス(サブグループA、サブグループB)、パラインフルエンザウイルス(1~3型)、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、霊菌、表皮ブドウ球菌、変形菌、黄色ブドウ球菌、コリネバクテリア、ジフテリア、カンジダ・アルビカンス、化膿連鎖球菌、ストレプトコッカスsp.(グループB, C, G, F)、肺炎連鎖球菌、ヘモフィルス属インフルエンザ、リステリア・モノサイトゲネス、肺炎マイコプラズマ、クラミジア・トラコマチス、クラミジア・ニューモニエと実質的に抗原抗体反応しない。

【0021】

また、周知のとおり、抗体をパペイン分解やペプシンで分解することにより、FabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのような、対応抗原との結合性を有する抗体断片(本明細書において「抗原結合性断片」という)が得られることが知られているが、本発明のモノクローナル抗体の抗原結合性断片も本発明のモノクローナル抗体と同様に用いることができ、本発明の範囲内に入る。

【0022】

本発明のモノクローナル抗体は、インフルエンザA型ウイルスの核タンパク質を免疫原い、常法であるハイブリドーマ法により作製することができる。免疫原として用いられるインフルエンザA型の核タンパク質としては、核タンパク質が多量に存在しその免疫原作用を発揮できれば、培養ウイルス液、インフルエンザHAワクチン、HI用HA抗原、リコンビナント抗原のいずれもが使用可能である。抗原に含まれる免疫原性の高いHAやNAの作用を抑えるために、超遠心による核タンパク質精製(例えばJ. Biochem.; 102:1241-1249, 1987参照)やプロテアーゼ処理(例えばJ. Immunol. Methods; 180:107-116, 1995参照)をした抗原を使用することもできる。

【0023】

上記モノクローナル抗体は、上記インフルエンザA型ウイルスの核タンパク質を含む抗原を免疫原として用いて動物を免疫し、そのインフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体産生細胞と腫瘍細胞とを細胞融合することによって得られるハイブリドーマにより産生させることができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 4 】

上記ハイブリドーマは、以下の方法で得ることができる。即ち、上述のようにして得た前記抗原のインフルエンザ A 型ウイルス核タンパク質をフロイントの完全アジュバンドとともに、数回に分けて、マウス等の動物に、2～3週間おきに、腹腔内又は静脈投与することによって免疫する。次いで、脾臓等に由来する抗体産生細胞と、骨髄腫ラインからの細胞（ミエローマ細胞）等の試験管内で増殖可能な腫瘍細胞とを融合させる。

## 【 0 0 2 5 】

上記融合方法としては、ケーラーとミルシュタインの常法（ネーチャー（Nature）、256巻、495頁、1975年）に従ってポリエチレングリコールによって行うことができ、又はセンダイウイルス等によって行うことができる。

10

## 【 0 0 2 6 】

上記融合した細胞からインフルエンザ A 型ウイルス核タンパク質を認識する抗体を産生するハイブリドーマを選択する方法としては、例えば以下のようにして行うことができる。即ち、上記融合した細胞から、限界希釈法によって、HAT培地及び/又はHT培地中で、生存している細胞をハイブリドーマとして選択することができる。次いで、上記ハイブリドーマの培養培地を、高純度に精製したインフルエンザ A 型ウイルス核タンパク質を固定化したアッセイプレート上で反応させた後、抗マウス免疫グロブリン（Ig）等と更に反応させるEIA法等によって、インフルエンザ A 型ウイルス核タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

## 【 0 0 2 7 】

下記実施例において、本発明の好ましいモノクローナル抗体が複数得られ、そのうちの3種をそれぞれ、ハイブリドーマFVA2-3、ハイブリドーマFVA2-6及びハイブリドーマFVA2-11と命名した。これらのハイブリドーマは、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1、中央第6）に、ハイブリドーマFVA2-3は、識別表示FVA2-3、受託番号FERM BP-10066（受託日；2003年7月18日、2004年7月14日に国内寄託FERM P-19437から国際寄託に移管）として、ハイブリドーマFVA2-6は、識別表示FVA2-6、受託番号FERM BP-10067（受託日；2003年7月18日、2004年7月14日に国内寄託FERM P-19438から国際寄託に移管）として、及び、ハイブリドーマFVA2-11は、識別表示FVA2-11、受託番号FERM BP-10068（受託日；2003年7月18日、2004年7月14日に国内寄託FERM P-19439から国際寄託に移管）としてそれぞれブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

20

30

## 【 0 0 2 8 】

上記各ハイブリドーマは、通常、細胞培養に用いられる培地において培養し、培養上清からモノクローナル抗体を回収することができる。また、ハイブリドーマが由来する動物に投与することによって、腹水を貯留させ、この腹水から回収することもできる。

## 【 0 0 2 9 】

上記モノクローナル抗体の回収方法としては、通常行われている精製方法を用いることができ、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAによるアフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。

40

## 【 0 0 3 0 】

上記方法に従い製造されたモノクローナル抗体はインフルエンザ A 型ウイルスの核タンパク質との反応し、インフルエンザ A 型ウイルスの各種亜型と反応することが確認された。現在保存されて入手可能なヒト、ウマ、カモ、七面鳥、アザラシ、ニワトリ、カモメ、マガモ等のインフルエンザ A 型ウイルス保存株38種（以下の表3を参照）とは反応し、本発明のモノクローナル抗体で検出可能であった。一方、交差反応性が考えられる微生物として、例えばアデノウイルス（1～7型）、コクサッキーウイルス（A16、B1～B6型）、単純ヘルペスウイルス1型、エコーウイルス（3型、4型、7型、22型、30型）、エンテロウイルス（71型）、ムンプスウイルス、ポリオウイルス（1～3型）、

50

R S ウイルス (サブグループ A、サブグループ B)、パラインフルエンザウイルス (1~3 型)、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、霊菌、表皮ブドウ球菌、変形菌、黄色ブドウ球菌、コリネバクテリア、ジフテリア、カンジダ・アルピカンス、化膿連鎖球菌、ストレプトコッカス sp. (グループ B, C, G, F)、肺炎連鎖球菌、ヘモフィルス属インフルエンザ、リステリア・モノサイトゲネス、肺炎マイコプラズマ、クラミジア・トラコマチス、クラミジア・ニューモニエ等との反応性を確認したが、反応は認められなかった。

#### 【0031】

本発明のモノクローナル抗体は、インフルエンザ A 型ウイルスの検出又は定量的のための免疫測定に用いることができる。免疫測定方法自体は、周知であり、周知のいずれの免疫測定方法をも採用することができる。すなわち、測定形式で分類すれば、サンドイッチ法、競合法、凝集法、ウェスタンブロット法などがあり、用いる標識で分類すれば蛍光法、酵素法、放射法、ビオチン法等があるが、これらのいずれをも用いることができる。さらに、免疫組織染色によって診断することもできる。免疫測定方法に標識抗体を用いる場合、抗体の標識方法自体は周知であり、周知のいずれの方法をも採用することができる。また、周知のとおり、抗体をパパイン分解やペプシンで分解することにより、Fab フラグメントや F(ab')<sub>2</sub> フラグメントのような、対応抗原との結合性を有する抗体断片 (本明細書において「抗原結合性断片」という) が得られることが知られているが、本発明の抗体の抗原結合性断片も本発明の抗体と同様に用いることができる。

#### 【0032】

なお、これらの免疫測定法自体は周知であり、本明細書で説明する必要はないが、簡単に記載すると、例えば、サンドイッチ法では、本発明の抗体又はその抗原結合性断片を第 1 抗体として固相に不動化し、検体と反応させ、洗浄後、本発明の酵素と抗原抗体反応する第 2 抗体を反応させ、洗浄後、固相に結合した第 2 抗体を測定する。第 2 抗体を酵素、蛍光物質、放射性物質、ビオチン等で標識しておくことにより固相に結合した第 2 抗体を測定することができる。濃度既知の複数の標準試料中について上記方法により測定し、測定された標識量と標準試料中の本発明の酵素の関係に基づき検量線を作成し、未知濃度の被検試料についての測定結果をこの検量線に当てはめることにより、被検試料中の本発明の酵素を定量することができる。なお、第 1 抗体と第 2 抗体を上記の説明と入れ替えてもよい。また、凝集法では、ラテックス等の粒子に本発明の抗体又はその抗原結合性断片を不動化し、検体と反応させて吸光度を測定する。濃度既知の複数の標準試料中について上記方法により測定し、測定された標識量と標準試料中の本発明の酵素の関係に基づき検量線を作成し、未知濃度の被検試料についての測定結果をこの検量線に当てはめることにより、被検試料中の本発明の酵素を定量することができる。

#### 【0033】

本発明はまた、上記本発明のモノクローナル抗体を利用し、インフルエンザ A 型ウイルスを、簡便に、かつ、インフルエンザ B 型ウイルスと識別して検出することができる、免疫測定器具をも提供する。

#### 【0034】

本発明の免疫測定器具は、移動可能な標識抗インフルエンザ A 型ウイルス抗体を有する標識試薬ゾーン、検体点着ゾーン、展開液供給ゾーン、展開液吸収ゾーン及び抗インフルエンザ A 型ウイルス抗体をマトリクスに不動化させたインフルエンザ A 型ウイルス検出ゾーンをマトリクスに設けた器具であって、前記標識抗インフルエンザ A 型ウイルス抗体及び検出ゾーンに不動化した抗インフルエンザ A 型ウイルス抗体の少なくとも一方の抗体が上記本発明のモノクローナル抗体である免疫測定器具である。検体点着ゾーンに点着された検体は、標識試薬ゾーンに含有される標識抗体と抗原抗体反応し、標識された抗原抗体複合物が形成される。該抗原抗体複合物は、展開液供給ゾーンから供給された展開液により流され、インフルエンザ A 型ウイルス検出ゾーンに至る。ここで、マトリクスに不動化された抗インフルエンザ A 型ウイルス抗体と、前記標識抗原抗体複合物が抗原抗体反応し、前記標識抗原抗体複合物がマトリクスに不動化される。インフルエンザ A 型ウイルス検出ゾーンに標識抗原抗体複合物が不動化されたか否かは、標識の有無により判定される。

なお、インフルエンザA型ウイルス検出ゾーンを通過した展開液は、展開液吸収ゾーンに吸収される。なお、検体点着ゾーンと標識試薬ゾーンは同一であってもよい(この場合、検体は、標識試薬ゾーンに点着される)。本発明の免疫測定器具では、標識抗体又はインフルエンザA型ウイルス検出ゾーンに不動化された抗体の少なくともいずれか一方が、本発明のモノクローナル抗体である。また、一方の抗体はポリクローナル抗体であってもよい。なお、インフルエンザA型ウイルスの核タンパク質は、通常、複数の分子が会合しないしは付着しているため、標識抗体又はインフルエンザA型ウイルス検出ゾーンに不動化された抗体の両者が同一のモノクローナル抗体であってもインフルエンザA型ウイルスを検出することができる。

#### 【0035】

以下、本発明の免疫測定器具の各構成要件について分説する。

#### 【0036】

##### マトリクス

本発明の免疫測定器具における帯状のマトリクスは、毛細管作用によって液体を輸液可能な吸収性の材料で構成される。この吸収性材料としては、例えばセルロース、ニトロセルロース等のセルロース又はその誘導体、ガラス繊維等を単独又は混合して製造したる紙、膜、多孔性材料である。このマトリクスの大きさに制限はないが、幅3mm~10mm程度、長さ30mm~100mm程度のストリップ状のものが取り扱いが容易で好ましい。マトリクスの厚さは100 $\mu$ m~1mmのものを用いることができる。またマトリクスは、その一部又は全体を測定時に検体由来のタンパク質のマトリクスへの非特異反

#### 【0037】

##### 検出ゾーン

検出ゾーンには、前記マトリクス上に抗インフルエンザA型ウイルス抗体を不動化したインフルエンザA型ウイルス検出部を設けることができる。この検出部に不動化する抗インフルエンザA型ウイルス抗体は、後述する標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体とともに、少なくとも一方が本発明の抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体であり、両方の抗体が抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体であることが好ましい。検出部の前記インフルエンザA型ウイルス抗体は、マトリクス上にあり、マトリクスを展開する液体の輸液方向(マトリクスの長手方向)に直交する方向にライン状に設けることが感度よく測定するためには好ましい。抗インフルエンザA型ウイルスポリクローナル抗体としては、市販され容易に入手可能なポリクローナル抗体から適宜選択して用いることができる。

#### 【0038】

この検出ゾーンの抗インフルエンザA型ウイルス抗体は、前記した抗体であり、モノクローナル抗体を単独又は混合して用いることもできる。抗インフルエンザA型ウイルス抗体は、IgG抗体、IgM抗体、更にこれらの抗体の抗原結合性フラグメントであるFab、F(ab')<sub>2</sub>等であってもよい。

#### 【0039】

検出部に不動化される抗インフルエンザA型ウイルス抗体は、直接マトリクスの検出ゾーンに物理吸着させてもよいが、共有結合などの化学結合によって固定することによって設けることもできる。また、抗インフルエンザA型ウイルス抗体を水不溶性の担体に結合させ、これをマトリクス内に含有させてもよい。この不溶性の担体としては、ゼラチン、アラビアゴム及びヘキサメタリン酸ナトリウムからなる混合物を不溶化して得られる粒子(特公昭63-29223)、ポリスチレンラテックス粒子、ガラス繊維等を挙げることができる。不溶性の担体と抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体と結合させるには、前記化学結合又は物理吸着により結合させることができる。

#### 【0040】

検出ゾーンには、抗インフルエンザA型ウイルス抗体によるインフルエンザA型ウイル

10

20

30

40

50



ス検出部のほか、抗インフルエンザB型ウイルス抗体によるインフルエンザB型ウイルス検出部を設けることができる。このインフルエンザB型ウイルス検出部は、前記インフルエンザA型ウイルス検出部の近傍であれば、展開液の輸液方向で前記インフルエンザA型ウイルス検出部上流側又は下流側のいづれであってもよい。インフルエンザB型ウイルス検出ゾーン不動化させる抗インフルエンザB型ウイルス抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であってもよく、前記抗インフルエンザA型ウイルス抗体と同様に化学結合又は物理吸着によって、マトリクスに不動化することができる。

#### 【0041】

前記した如くマトリクス上の検出ゾーンには、少なくとも抗インフルエンザA型ウイルス抗体によるインフルエンザA型ウイルスの検出部を設け、更にインフルエンザB型ウイルスの検出部を設けることが、インフルエンザA型ウイルス及びインフルエンザB型ウイルスを同時に測定する上で好ましい。これらの検出部は、マトリクスの輸液方向において、酵素標識試薬ゾーン、検体点着ゾーン及び展開液供給ゾーンの下流側であって、添加液吸収ゾーンの上流側である。検出部は、マトリクスに巾0.5mmから5mm程度のライン状に近接して複数のラインを設けることができる。巾5mm程度のマトリクスであれば、前記抗体及び抗原を通常それぞれ0.1μgから10μg程度点着し、乾燥させることにより検出部を作成することができる。

10

#### 【0042】

##### 標識試薬ゾーン

標識試薬ゾーンは、マトリクス上に設けられたゾーンに標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体を移動可能に点着して設けることができる。このゾーンは展開液供給ゾーンからの展開液の輸液方向で前記検出ゾーンの上流側に設けることができる。このゾーンは、マトリクスに酵素標識試薬を点着する方法、酵素標識試薬を含む吸水性のパッドをマトリクス上に積層する方法、又はパッドと密着するマトリクス部分の一部又は全部にパッドとともに酵素標識試薬を含有させることにより構成される。吸水性のパッドとしては、後述する検体点着ゾーンのパッドを用いることができる。

20

#### 【0043】

標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体の抗体としては、前記検出ゾーンに設けられる抗体とともに、少なくとも一方が抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体であり、両方の抗体が抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体であることが好ましい。標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体の抗体としては、前記検出ゾーンの抗体と同様にそのフラグメントを用いることもできる。

30

#### 【0044】

前記標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体は、前記抗体と標識物とを結合させて製造することができる。標識物としては、酵素、金属コロイド粒子、着色ラテックス粒子、発光物質、蛍光物質などを挙げることができる。酵素としては酵素免疫測定法(EIA)に用いられる各種酵素であり、その酵素としては例えばアルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、D-ガラクトシダーゼ等を挙げることができる。また、金属コロイド粒子としては、例えば金コロイド粒子、セレンコロイド粒子などを用いることができる。

#### 【0045】

また、標識物と抗インフルエンザA型ウイルス抗体との結合方法は、公知の共有結合又は非共有結合を作る方法を利用して製造することができる。結合の方法には、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(例えば「蛋白質核酸酵素」別冊31号、37~45頁(1985)参照)。架橋剤を用いる結合方法では、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(GMBS)、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、例えばチオール基、アミノ基、カルボキシル基、水酸基等の官能基を常法により導入したのち、前記結合法により標識抗インフルエンザA型ウイルス

40

50

抗体を製造することができる。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。

#### 【0046】

前記の通りインフルエンザA型ウイルスを検出する他、同時にインフルエンザB型ウイルスを検出する場合には、標識試薬ゾーンに標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体を添加して器具を作製する。標識試薬ゾーンに含有される標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体及び標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体は、マトリクス又は吸水性パッドのどちらか一方に含有させる方法、若しくはマトリクスと吸水性のパッドの両方に標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体及び標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体を含有させることができる。インフルエンザA型ウイルス及びインフルエンザB型ウイルスの同時測定を行う場合には、標識試薬を多く用いるため、マトリクスとパッドの両方に酵素標識試薬を単独又は混合して含有させることが高感度測定を行う上で有利である。標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体及び標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体量は、通常検査対象物の予測される量に応じて適宜変更することができるが、通常乾燥重量で $0.01\mu\text{g} \sim 5\mu\text{g}$ 程度である。標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体及び標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体は、酵素標識ゾーンに含有させる場合に試薬の安定化剤、溶解調節剤等とともに塗布することができる。

10

#### 【0047】

##### 検体点着ゾーン

検体点着ゾーンは、展開液供給ゾーンの展開液の輸液方向の下流側で検出ゾーンのの上流側のマトリクスに特に試薬等を含まずに設けることができる。さらに検体点着ゾーンは、  
1) 展開液ゾーンの展開液輸液方向の下流側で酵素標識試薬ゾーンの上流側の所定箇所、  
2) 標識試薬ゾーンの下流側で検出ゾーンのの上流側の所定箇所、  
3) 標識試薬ゾーン上の所定箇所等に設けることができる。また、前記酵素標識試薬ゾーンに検体点着ゾーンを設けた装置では、前記した如く酵素標識を含有する吸水性パッドを付設することが効率よく分析を行う上で好ましい。このパッドを付加する装置では、多量の検体液を点着することができるため、検体中の微量成分を検出感度よく測定を行うことができる。この吸水性のパッドとしては、標識試薬や検体中のインフルエンザウイルスを吸着することの少ない材料から選択され、例えばポリビニルアルコール(PVA)、不織布、セルロース等の多孔質の合成又は天然の高分子化合物からなる材料を単独又は組み合わせて構成することができる。このパッドの大きさ、厚さ、密度等は限定されないが、通常縦と横が $3\text{mm} \sim 10\text{mm}$ 程度で厚さが $0.5\text{mm} \sim 4\text{mm}$ 程度のパッドを用いることが効率よく測定を行うためには好ましい。

20

30

#### 【0048】

##### 展開液供給ゾーン

展開液供給ゾーンは、マトリクスの長手方向の一端に設けられ展開液が供給されるゾーンである。測定を開始するには、このゾーンを少なくとも展開液吸収ゾーンに達する量の展開液の入った容器に浸し行うことができる。さらに展開液の供給には展開液ゾーンに展開液の入った液槽を付加し、この液槽のカバーを破り展開液とマトリクスを接触させることにより測定を開始することもできる。展開液には、界面活性剤、緩衝剤、安定化剤、抗菌剤等を適宜含有することができる。また、標識物として酵素も用いる場合には、後述する基質試薬ゾーンとともに展開液に基質を添加することもできる。緩衝剤を含む緩衝液としては、例えば酢酸緩衝液、ほう酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、ジエタノールアミン緩衝液等を挙げることができる。また展開液供給ゾーンには展開液のマトリクスへの供給を安定して連続的に実施するため展開液パッドを付設することができる。展開液パッドとしては、例えばセルロース又はセルロース誘導体等のろ紙用いることができる。

40

#### 【0049】

##### 展開液吸収ゾーン

展開液吸収ゾーンは、マトリクスの一端に設けられた前記展開液ゾーンに対して他端に設置される。このゾーンはマトリクスに供給される展開液を吸収し分析を円滑に行うため

50

に設けられる。展開液吸収ゾーンはマトリクスを長く形成してこのゾーンを確保することもできる。また、マトリクスに吸水性材料を付設し展開を促進することもできる。この吸水性材料には、天然高分子化合物、合成高分子化合物等からなる保水性の高い紙、スポンジ等を用いることができる。展開液吸収ゾーンは、展開液を全て吸収する容積をもったパッド状の吸収性材料があるが、吸収性材料をマトリクスの上又は下に積層することにより、小型化した免疫測定器具を製造することができる。

#### 【0050】

##### 基質試薬ゾーン

更に、標識試薬ゾーンの標識物として酵素を用いる場合には、前記した通り展開液に基質を含有させるか、基質試薬ゾーンをマトリクスの前記展開液供給ゾーン近傍に設けることができる。基質試薬ゾーンは、展開液供給ゾーンに付設した前記展開液パッドに含有させ設けることが基質量を多くして高感度測定を行う上で好ましい。

10

#### 【0051】

基質としては標識試薬の酵素に対応して以下に示す各種発色基質、蛍光基質、発光基質等を用いることができる。

#### 【0052】

(a) 発色基質パーオキシダーゼ用：過酸化水素と組合せた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)アルカリホスファターゼ用：5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)

20

(b) 蛍光基質アルカリホスファターゼ用：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)

(c) 発光基質アルカリホスファターゼ用：3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-ホスフォリルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン・2ナトリウム塩(AMPPD) - D-ガラクトシダーゼ用：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)パーオキシダーゼ用：過酸化水素と組み合わせたルミノール、イソルミノール

#### 【0053】

前記基質を基質ゾーンとして設ける場合には、通常前記基質を水溶液に溶解して展開液パッドにライン状に塗布した後、乾燥させることにより形成することができ、所望により基質のシグナル増強剤、安定化剤、溶解調節剤等を添加することもできる。基質ゾーンは、マトリクスの端部に付設した展開液パッド内であれば、特に限定されない。展開液及び展開液パッドに添加する基質量は、測定条件により決定することができるが、1個の器具当たり通常5~500µg程度を用いることができる。

30

#### 【0054】

##### 各ゾーンの配置

本発明の免疫測定器具の好ましい1例を図6ないし図8に模式的に示す。図6中、参照番号2がマトリクス、4が標識試薬ゾーン、8が検体点着ゾーン、3が展開液供給ゾーン、5が展開液吸収ゾーン、6aがインフルエンザA型ウイルス検出ゾーン、7が基質試薬ゾーン、9が検体である。この例では、検体点着ゾーン8と標識試薬ゾーン4が同一である。なお、参照番号6bはインフルエンザB型ウイルス検出ゾーン、10は展開液確認ゾーン、11は展開液槽である(下記実施例6参照)。

40

#### 【0055】

##### 測定器具の使用方法

本発明の測定器具により各種検体試料中のインフルエンザA型ウイルスの測定を行うことができる。測定は、まず検体を本発明の測定器具の検体点着ゾーンに供給した後、展開液を展開液パッドに供給し、マトリクスに展開して行う。なお、検体の希釈液として、試料希釈液として、界面活性剤を含む緩衝液を用いることができる。展開液は毛細管作用に

50

よりマトリクスを移動し、展開液吸収ゾーンに達し、検出ゾーンに結合されなかった検体中の成分、酵素標識試薬等が吸収され展開が完了する。所定時間（通常10分から20分）経過後、検出ゾーンを観察し、検体液中のインフルエンザA型ウイルスにより検出部に固定化された標識物を測定することにより、インフルエンザA型ウイルスの測定を行うことができる。この検出は標識物又は標識物と用いる酵素とによりそれぞれ対応する目視又は比色計、蛍光光度計、フォトンカウンター、感光フィルム等の測定装置を用いて実施することができる。測定では、例えば検出ゾーンの発色を目視で測定する方法が簡便である。また、この方法ではインフルエンザA型ウイルスの濃度に対応した色票（カラーチャート）を用いることにより半定量的な分析が可能となる。更に、比色計等により検出ゾーンの発色を数値化して、定量を行うこともできる。

10

#### 【0056】

図6ないし図8に示す、本発明の免疫測定器具の好ましい1例を例としてさらに測定原理を説明する。検体9を検体点着ゾーン8に点着すると共に、展開液槽11中の展開液を展開液供給ゾーン3に供給する。展開液は、毛管現象によりマトリクス2中を横向きの白抜き矢印の方向へ移動していく。基質試薬ゾーン7に含有された基質が展開液に溶解され、展開液と共に移動していく。一方、検体9は、標識試薬ゾーン4中の標識抗体と反応し、標識抗原抗体複合物が形成される。ここに展開液が到着すると、標識抗原抗体複合物は展開液中の基質と反応しながらマトリクス2中を移動し、インフルエンザA型ウイルス検出ゾーン6aに到達すると、インフルエンザA型ウイルス検出ゾーン6aに不働化されている抗インフルエンザA型ウイルス抗体と反応して、インフルエンザA型ウイルス検出ゾーン6aに不働化される。検体中にインフルエンザA型ウイルスが含まれている場合には、標識酵素と基質との反応により、発色が起こる。一方、検体中にインフルエンザA型ウイルスが含まれていない場合には、標識抗体は抗原抗体反応することができず、標識がインフルエンザA型ウイルス検出ゾーン6aに不働化されないため発色が起こらない。従って、インフルエンザA型ウイルス検出ゾーン6aが発色するか否かで検体中にインフルエンザA型ウイルスが含まれるか否かを知ることができる。展開液確認ゾーン10には、展開液中の試薬と反応して発色する酵素が不働化されており、展開液確認ゾーン10が発色すれば、そこまで展開液が到達していることがわかる。あるいは、展開液確認ゾーン10には、標識酵素に対する抗体が不働化されており、展開液確認ゾーン10に到達した標識試薬が該抗体にトラップされ、さらに展開液が到達すると、トラップされた標識と展開液中の基質が反応して発色するようにしてもよい（下記実施例では抗アルカリフォスファターゼ抗体を不働化）。また、標識試薬ゾーン4中に、標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体を含めておき、一方、抗インフルエンザB型ウイルス抗体を不働化した抗インフルエンザB型ウイルス検出ゾーン6bを設けておけば、インフルエンザB型ウイルスの検出も同時に行うことができ、インフルエンザウイルスがA型かB型かを単一の測定操作で調べることができる。

20

30

#### 【0057】

また、前記マトリクスはプラスチック、金属、紙等の支持部材上に積層し固定して用いることもできる。前記マトリクスは、プラスチック等のケースに固定し、展開液を含む液槽を展開液供給ゾーンに付設し前記各ゾーン部分に穴の開いたケースでカバーをすることにより取扱の容易な器具を構成することができる。本発明の免疫測定器具に用いられる検体としては、ヒト、動物等から採取したインフルエンザが含まれると考えられる検体であり、各種体液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）等の体液抽出液を挙げることができる。

40

#### 【0058】

以下参考例、実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、発明を本実施例に限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0059】

実施例1 抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体の作製

50

免疫原にはインフルエンザ核タンパク質抗原を含有するインフルエンザHAワクチン(化血研製:A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)(IVR-116)株、A/パナマ/2007/99(H3N2)NIB-41)株)を使用した。免疫原に等量のフロインド完全アジュバント(ヤترون社製)を加え完全に混合した後、Balb/cマウスに2週間間隔で計4回免疫した。細胞融合の3日前にマウス腹腔内に免疫原を注射し、PEGを用いてマウス脾細胞とミエロマ細胞(P3U1)とを融合した。培養液にはHAT選択培地を使用し、約2週間後に培養上清を採取しスクリーニングに供した。1次スクリーニングには、インフルエンザ核タンパク質抗原を含有するインフルエンザHAワクチン、インフルエンザA型リコンビナント核タンパク質抗原(A/ニューカレドニア/20/99由来(r-NP/H1N1)、A/北九州/159/93由来(r-NP/H3N2);DDBJ/GeneBankデータベース)を固相化したEnzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA法)を使用した。すなわち、インフルエンザHAワクチンは0.1M炭酸緩衝液pH9.6でx300倍に、同じくA型リコンビナント核タンパク質抗原は1µg/mlの濃度に希釈し、マイクロプレートモジュール(Nunc社製)の各ウエルに100µlずつ加え、4- overnightインキュベートし固相化した。次に、0.1%のTween20(商品名)を含むPBS(PBS-Tween)で各ウエルを洗浄後、PBSで希釈した1%のウシ血清アルブミン(BSA)300µlを加え4- overnightブロッキングを行った。ブロッキング液を除いた後、培養上清を100µl加え37- 1時間反応させた。PBS-Tweenで十分に洗浄した後、0.2%BSA、0.2%エマルゲン985、1%ショ糖、1%KClを含む0.05Mリン酸緩衝液pH7.5(反应用液)で2000倍希釈した酵素標識抗マウスIgG抗体(DAKO社製)を各ウエルに100µlずつ加え37- 1時間反応させた。反応後PBS-Tweenで十分に洗浄し、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)を各ウエルに100µlずつ加え、室温で30分間反応後、反応停止液を各ウエルに100µlずつ加え主波長415nm副波長490nmで発色レベルを測定した。

【0060】

陽性と判定された培養上清については、インフルエンザB型リコンビナント核タンパク質(B/山梨/166/98(r-NP/B)DDBJ/GeneBankデータベース)を抗原としたELISAで2次スクリーニングを行い、最終的にインフルエンザA型ウイルス核タンパク質抗原に反応し、インフルエンザB型核タンパク質抗原とは反応しない抗体を産生するハイブリドーマ3株(ハイブリドーマFVA2-3、ハイブリドーマFVA2-6及びハイブリドーマFVA2-11)を得た。これらのハイブリドーマは、前述の通り特許微生物寄託センターに寄託されている。該ハイブリドーマ3株から得られたモノクローナル抗体のサブクラスは全てIgG1であった。表1にハイブリドーマの反応性の結果を示す。

【0061】

【表1】

表1 モノクローナル抗体の反応性

モノクローナル抗体	抗原			
	r-NP/H1N1	r-NP/H3N2	Vaccine	r-NP/B
FVA2-3	+++	+++	2.206	0.018
FVA2-6	+++	+++	2.183	0.017
FVA2-11	+++	+++	2.223	0.018

+++ , range over

【0062】

実施例2 モノクローナル抗体のウェスタンブロッティング法における反応性

リコンビナント抗原、インフルエンザHAワクチン（核タンパク質抗原含有）、ウイルス液を用いてウエスタンブロッティング法により反応性を確認した。各試料を、0.001 M EDTA、1% SDS、5% 2ME（2-メルカプトエタノール）、10% グリセロール、0.005% BPB（Bromophenol Blue）を含む0.01 M Tris-HCl（pH 8.0）に溶解し、100 に加熱処理した後、電気泳動に供した。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）は、e-パジェル10%ゲル濃度（アトー社製）を使用し常法に従った。泳動後PVD膜（アトー社製）に転写し、ブロックエース（大日本製薬製）にて4 ー晩ブロッキングを行った。ブロッキング液を除きPBS-Tweenで洗浄後、10 µg/mlの濃度に調整したモノクローナル抗体を加え室温45分反応させた。PBS-Tweenで十分に洗浄した後、反应用液で4000倍に希釈した酵素標識抗マウスIgG抗体（Cappel社製）を室温45分させた。PBS-Tweenで十分に洗浄後、ECLウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムバイオサイエンス社製）を用いてX線フィルム（コダック社製）に1~15分間露光しシグナルを検出した。

10

## 【0063】

モノクローナル抗体FVA2-3、FVA2-6、FVA2-11では全ての抗原に対して、55~70 kD付近を中心にバンドが認められた。この結果を図1に示す。

## 【0064】

## 実施例3 モノクローナル抗体を用いたELISAでの抗原測定

3種の精製モノクローナル抗体を0.1 Mリン酸緩衝液pH 7.5で2 µg/mlの濃度でマイクロプレートモジュール（Nunc社製）の各ウエルに100 µlずつ加え、4 ー晩インキュベートし固相化した。次に、0.1%のTween 20（商品名）を含むPBS（PBS-Tween）で各ウエルを洗浄後、PBSで希釈した1%のウシ血清アルブミン（BSA）300 µlを加え4 ー晩ブロッキングを行った。反应用液で希釈したインフルエンザA型ウイルス液を各ウエルに100 µl加え37 ー1時間反応させた。PBS-Tweenで十分に洗浄した後、反应用液で調整した3種のアルカリフォスファターゼ標識モノクローナル抗体を各ウエルに100 µlずつ加え37 ー1時間反応させた。反応後PBS-Tweenで十分に洗浄し、4-ニトロフェニルフォスフェイト（4-NPP）を各ウエルに100 µlずつ加え、室温で30分間反応後、反応停止液を各ウエルに100 µlずつ加え、主波長415 nm副波長490 nmで発色レベルを測定した。陽性はbuffer blankの発色レベルの2.1倍以上とし、陽性となる最終希釈倍率で反応性の強さを表した。

20

30

取得した3種のモノクローナル抗体での組み合わせ全9通りにおいて、市販抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体よりも2~8倍高い反応性を示した。この結果を表2に示す。

## 【0065】

【表2】

表2 抗原測定ELISA

モノクローナル抗体		抗原			
酵素標識抗体固相抗体		A/シドニー /5/97	A/北京 /352/89	A/ニューカドニア /20/99	A/パナマ /2007/99
FVA2-3	FVA2-3	x640	x80	x320	x640
	FVA2-6	x640	x160	x320	x640
	FVA2-11	x640	x160	x320	x640
FVA2-6	FVA2-3	x640	x80	x320	x640
	FVA2-6	x640	x160	x320	x640
	FVA2-11	x640	x80	x320	x640
FVA2-11	FVA2-3	x640	x80	x320	x640
	FVA2-6	x640	x160	x320	x640
	FVA2-11	x640	x160	x320	x640
市販抗体*	市販抗体*	x320	x40	x80	x80

\* 市販モノクローナル抗体

## 【0066】

実施例4 抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体の反応部位の測定 4 -  
1 プラスミドの作製 20

モノクローナル抗体FVA2-11の認識部位を決定するために、498アミノ酸からなるインフルエンザH1N1株(ニューカドニア/20/99)を、PCR法にて、1~159アミノ酸(A断片)、162~327アミノ酸(B断片)および327~498アミノ酸(C断片)の3断片を増幅した。プライマーにはあらかじめ、EcoRI、BamHI部位を付加していた。増幅断片をQIAGEN社のPCR Purification Kitで精製し、図2のに示す発現用プラスミドpWG6AのNdeI-EcoRI部位にGSTを組み込みんだ発現用プラスミドpWG6AのEcoRI-BamHI部位に挿入し、プラスミドpWGInf.H1N1-A, pWGInf.H1N1-BおよびpWGInf.H1N1-Cを作製した。これらを用い大腸菌BL21(DE3)(Brookhaven National Laboratoryより入手)を形質転換させ

30  
BL21(DE3)pWGInf.H1N1-A, BL21(DE3)pWGInf.H1N1-Bおよび

BL21(DE3)pWGInf.H1N1-Cを得た。

## 【0067】

4-2 組換え蛋白質(GST+H1N1-A, GST+H1N1-BおよびGST+H1N1-C)の発現

4-1で作製した形質転換体を、50μg/mlのアンピシリンを含むLB培地2ml中37℃で培養した。予備培養にて600nmでODを0.6~0.8にした後0.4mM IPTGを添加し発現誘導を行い、更に3時間培養した。1.5ml量の菌体培養液を5000rpmで2分間遠心分離して菌体を集め、100μlの緩衝液(10mMトリス-塩酸、pH8.0、0.1M塩化ナトリウム、1mMEDTA)に懸濁し、15分間の超音波破碎により完全に菌体を破碎した。これを菌体試料とする。

## 【0068】

菌体試料8μlに3倍濃度のSDSポリアクリルアミド緩衝液(0.15Mトリス-塩酸、pH6.8、6%SDS、24%グリセロール、6mMEDTA、2%2-メルカプトエタノール、0.03%プロモフェノールブルー)4μlを加え十分攪拌した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ニトロセルロースフィルターにウエスタンブロットを行って転写を行い、1%BSAによりブロッキング後、リン酸緩衝液(10mMリン酸、pH7.4、0.15M塩化ナトリウム)で1000倍に希釈したモノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体FVA2-11を反応させた。更に、ペルオキシダーゼ酵素標識された抗マウスイムノグロブリンウサギポリクローナル抗体(ダコ社製)を反応させ、洗浄後10mlの基質発色液(0.01%過酸化水素水、0.6mg/ml4-クロロ-1-ナフトール)を添加し発色させた。その結果、モノクローナル抗体FVA2-11はGST+H1N1-Aのみと反応することが判明した。

#### 【0069】

##### 4-3 プラスミドの作製

次にインフルエンザH1N1のA断片をさらに細分化した断片A1(1~90アミノ酸)、A2(85~159アミノ酸)、A3(44~130アミノ酸)、A4(59~103アミノ酸)、A5(44~103アミノ酸)、A6(59~130アミノ酸)およびA7(1~130アミノ酸)(図3)をPCR法で増幅した。増幅断片をQIAGEN社のPCR Purification Kitで精製し、前記発現用プラスミドpWG6AのEcoRI-BamHI部位に挿入し、プラスミドpWGInf.H1N1-A1, pWGInf.H1N1-A2, pWGInf.H1N1-A3, pWGInf.H1N1-A4, pWGInf.H1N1-A5, pWGInf.H1N1-A6を作製した。A7断片は図2に示すpWG6AのEcoRI-BamHI部位に挿入しプラスミドpWInf.H1N1-A7を作製した。これらを用い大腸菌BL21(DE3)(Brookhaven National Laboratoryより入手)を形質転換させ、アンピシリン耐性の形質転換体大腸菌

BL21(DE3)pWGInf.H1N1-A1, BL21(DE3)pWGInf.H1N1-A2,  
BL21(DE3)pWGInf.H1N1-A3,  
BL21(DE3)pWGInf.H1N1-A4, BL21(DE3)pWGInf.H1N1-A5,  
BL21(DE3)pWGInf.H1N1-A6およびBL21(DE3)pWInf.H1N1-A7を得た。

#### 【0070】

4-4組換え蛋白質(GST+H1N1-A1, GST+H1N1-A2, GST+H1N1-A3, GST+H1N1-A4, GST+H1N1-A5, GST+H1N1-A6およびH1N1-A7)の発現

4-3で作製した形質転換体を、50μg/mlのアンピシリンを含むLB培地2ml中37℃で培養した。予備培養にて600nmでODを0.6~0.8にした後0.4mM IPTGを添加し発現誘導を行い、更に3時間培養した。1.5ml量の菌体培養液を5000rpmで2分間遠心分離して菌体を集め、100μlの緩衝液(10mMトリス-塩酸、pH8.0、0.1M塩化ナトリウム、1mMEDTA)に懸濁し、15分間の超音波破砕により完全に菌体を破砕した。これを菌体試料とする。

#### 【0071】

菌体試料8μlに3倍濃度のSDSポリアクリルアミド緩衝液(0.15Mトリス-塩酸、pH6.8、6%SDS、24%グリセロール、6mMEDTA、2%2-メルカプトエタノール、0.03%プロモフェノールブルー、分子量マーカー(117.6, 113.9, 81.2, 60.7, 47.4, 36.1, 25.3, 19.0, 14.7, 6.1KD))4μlを加え十分攪拌した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ニトロセルロースフィルターにウエスタンブロットを行って転写を行い、1%BSAによりブロッキング後、リン酸緩衝液(10mMリン酸、pH7.4、0.15M塩化ナトリウム)で1000倍に希釈したモノクローナル抗体FVA2-11を反応させた。更に、ペルオキシダーゼ酵素標識された抗マウスイムノグロブリンウサギポリクローナル抗体(ダコ社製)を反応させ、洗浄後10mlの基質発色液(0.01%過酸化水素水、0.6mg/ml4-クロロ-1-ナフトール)を添加し発色させた。各断片を図3に示す。泳動後のCBB染色パターンとウエスタンブロットの結果を図4に示す。以上の結果から抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体(FVA2-11)の認識



部位は、インフルエンザH1N1のアミノ酸59～130領域であることがわかる。また、更に図5に示すインフルエンザA型亜型の核タンパク質アミノ酸配列から、アミノ酸番号59～130番目の反応部位で共通する配列を有し、親水性構造を有する例えば90～95番目、111～115番目又は120～123番目等のアミノ酸配列がエピトープであることが予想される。

#### 【0072】

参考例1 アルカリホスファターゼ標識抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体の作製

抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体(FVA2-11)をペプシン処理してFc領域を切断しF(ab')<sub>2</sub>を得、次に2ME(2-メルカプトエタノール、ナカライテスク社製)を用いて、ジスルフィド結合を切断し、フリーのチオール基を露出させたF(ab')<sub>2</sub>を得た。次に、マレイミド基を導入した、アルカリホスファターゼとF(ab')<sub>2</sub>をカップリングし、ゲル濾過で精製アルカリホスファターゼ標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体を得た。

10

#### 【0073】

参考例2 抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体の作製)

免疫原にはインフルエンザ核タンパク質抗原を含有するインフルエンザHAワクチン(B/山梨/166/98株)あるいはインフルエンザA型リコンビナント核タンパク質抗原(A/ニューカレドニア/20/99由来(r-NP/H1N1)、A/北九州/159/93由来(r-NP/H3N2))を使用した。

20

#### 【0074】

免疫原に等量のフロインド完全アジュバント(ヤトロソ社製)を加え完全に混合した後、Balb/cマウスに2週間間隔で計4回免疫した。細胞融合の3日前にマウス腹腔内に免疫原を注射し、PEGを用いてマウス脾細胞とミエローマ細胞(P3U1)とを融合した。培養液にはHAT選択培地を使用し、約2週間後に培養上清を採取しスクリーニングに供した。1次スクリーニングには、インフルエンザHAワクチン、インフルエンザB型リコンビナント核タンパク質(r-NP/B)を固相化したEnzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA法)を使用した。すなわち、インフルエンザHAワクチンは0.1M炭酸緩衝液pH9.6でx300倍に、同じくB型リコンビナント核タンパク質抗原は1μg/mlの濃度に希釈し、マイクロプレートモジュール(Nunc社製)の各ウエルに100μlずつ加え、4晩インキュベートし固相化した。次に、0.1%のTween20(商品名)を含むPBS(PBS-Tween)で各ウエルを洗浄後、PBSで希釈した1%のBSA300μlを加え4晩ブロッキングを行った。ブロッキング液を除いた後、培養上清を100μl加え37℃1時間反応させた。PBS-Tweenで十分に洗浄した後、0.2%BSA、0.2%エマルゲン985、1%ショ糖、1%KClを含む0.05Mリン酸緩衝液pH7.5(反応用液)で2000倍希釈した酵素標識抗マウスIgG抗体(DAKO社製)を各ウエルに100μlずつ加え37℃1時間反応させた。反応後PBS-Tweenで十分に洗浄し、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)を各ウエルに100μlずつ加え、室温で30分間反応後、反応停止液を各ウエルに100μlずつ加え主波長415nm副波長490nmで発色レベルを測定した。

30

40

#### 【0075】

陽性と判定された培養上清については、インフルエンザA型リコンビナント核タンパク質抗原(A/ニューカレドニア/20/99由来(r-NP/H1N1)、A/北九州/159/93由来(r-NP/H3N2))を抗原としたELISAで2次スクリーニングを行い、最終的にインフルエンザB型核タンパク質抗原に反応し、インフルエンザA型核タンパク質抗原とは反応しない抗体を産生するハイブリドーマ3株(FrB1-03, FrB1-07, FVB2-16)を得た。上記各ハイブリドーマは産業技術総合研究所特許生物寄託センターにブダペスト条約に基づき、ハイブリドーマFrB1-03、寄託番号FERM BP-10070、ハイブリドーマFrB1-07、寄託番号FERM

50

BP-10071、ハイブリドーマFVB2-16、寄託番号FERM BP-10069として寄託されている。該ハイブリドーマ3株から得られたモノクローナル抗体のサブクラスは全てIgG1であった。

【0076】

(モノクローナル抗体のウェスタンブロッティング法における反応性)

リコンビナント抗原、インフルエンザHAワクチン(核タンパク質抗原含有)を用いてウェスタンブロッティング法により反応性を確認した。SDS-PAGEは、e-パジェル10%ゲル濃度(アトー社製)を使用し常法に従った。泳動後PVDf膜(アトー社製)に転写し、ブロックエース(大日本製薬社製)にて4-晩ブロッキングを行った。ブロッキング液を除きPBS-Tweenで洗浄後、10 $\mu$ g/mlの濃度に調整したモノクローナル抗体を加え室温45分反応させた。PBS-Tweenで十分に洗浄した後、反应用液で4000倍に希釈した酵素標識抗マウスIgG抗体(Cappel社製)を室温45分させた。PBS-Tweenで十分に洗浄後、ECLウェスタンブロッティング検出システム(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いてX線フィルム(コダック社製)に1分間露光しシグナルを検出した。

10

【0077】

モノクローナル抗体FrB1-03、FrB1-07では、60~75kD付近に強いバンドが認められた。

【0078】

参考例3 アルカリホスファターゼ標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体の作製

20

前記参考例2で製造した抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体(FrB1-03)を用い、前記実施例参考例1と同じ処理を繰り返すことにより、アルカリホスファターゼ標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体を得た。

【0079】

実施例5 インフルエンザA型ウイルス及びインフルエンザB型ウイルス同時免疫測定器具

図6に示すように、巾5mm、長さ50mmのニトロセルロース膜(ミリポア社製)のマトリクス2の展開液吸収ゾーン5側の末端から16mmと13.5mmの位置に実施例2で製造した抗インフルエンザA型ウイルス抗体(FVA2-11)と参考例2で製造した抗インフルエンザB型ウイルス抗体(FrB1-3)を含む水溶液0.7 $\mu$ lをニトロセルロース膜にそれぞれ点着し乾燥させ、検出ゾーン6a及び6bを作成した。更にマトリクス2の展開液吸収ゾーン5側の末端から11mmの位置に抗アルカリホスファターゼ抗体(ダコ社製)を点着し乾燥させ、展開液確認部10を作成した。次いで、マトリクスに参考例1で製造したアルカリホスファターゼ標識抗インフルエンザA型ウイルス抗体(5 $\mu$ g/ml)と参考例3で製造したアルカリホスファターゼ標識抗インフルエンザB型ウイルス抗体(5 $\mu$ g/ml)との混合水溶液5 $\mu$ lを点着し乾燥させ、酵素標識試薬パッド4からなる標識試薬ゾーンを作成した。

30

【0080】

展開液パッド3は、巾5mm、長さ20mmのろ紙(ミリポア社製)上に、基質として5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)100 $\mu$ gを巾6.1mmのライン状に点着して乾燥させて作成した。前記マトリクス2、展開液パッド3、酵素標識試薬パッド4及び展開液吸収パッド5(巾10mm、長さ20mm、厚さ1mmのろ紙(ミリポア社製))を、展開液槽11を有するプラスチックケースに固定して、図7及び8に示すインフルエンザA型ウイルス及びB型ウイルス同時免疫測定器具1を製造した。

40

【0081】

参考例4 インフルエンザA型ウイルス及びB型ウイルス同時免疫測定器具(従来法器具)

実施例3で製造した作成したインフルエンザA型ウイルス及びB型ウイルス同時免疫測定器具1の検出ゾーン6a及び6b、アルカリホスファターゼ標識抗インフルエンザウイルス抗体について、それぞれ購入した抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体

50

及び抗インフルエンザ B 型ウイルスモノクローナル抗体を用いて作成し、インフルエンザ A 型ウイルス及び B 型ウイルス同時免疫測定器具（エスプラインインフルエンザ A & B（富士レビオ社製）；従来測定器具）を作成した。

【 0 0 8 2 】

実施例 6 インフルエンザ A 型ウイルス及びインフルエンザ B 型ウイルスの測定

前記実施例 5 で製造したインフルエンザ A 型ウイルス及びインフルエンザ B 型ウイルス同時測定器具 1（本発明測定器具）の検体点着ゾーン 8 に表 3 に記載されたインフルエンザ A 型ウイルスの垂型試料（試料希釈液として、界面活性剤を含むトリス緩衝液（pH 8.0）を使用）各 30  $\mu$ l を点着した後、変形部材に設けた押し込み部 12 を下方に加圧して変形させて、変形部材に付設された突起部 13 によって展開液パッド 3 を展開液槽 11 に挿入して展開液を展開液パッド 3 に供給して測定を開始した。測定開始 15 分後、対象試薬ゾーン 10 の発色によって展開液の展開を確認した後、検出ゾーン 6 a 及び 6 b の発色を目視で測定した。その結果を表 3 に示す。

10

【 0 0 8 3 】

また、対照として、参考例 4 で作成した従来測定器具によって表 3 に記載の前記試料 30  $\mu$ l について同様にウイルスの検出を行った。その測定結果を表 3 に示す。

【 0 0 8 4 】

【表 3】

表3 インフルエンザA型ウイルス亜型株の測定結果

株名	亜型	従来測定器具		本発明測定器具	
		発色 6a	発色 6b	発色 6a	発色 6b
A/Puerto Rico/8/34	H1 N1	+	-	+	-
A/Singapore/1/57	H2 N2	+	-	+	-
A/Aichi/2/68	H3 N2	+	-	+	-
A/equine/Miami/1/63	H3 N8	+	-	+	-
A/equine/Tokyo/2/71	H3 N8	+	-	+	-
A/equine/Kentucky/1/81	H3 N8	-	-	+	-
A/equine/Suffolk/89	H3 N8	+	-	+	-
A/equine/Alaska/1/91	H3 N8	+	-	+	-
A/equine/Kentucky/1/91	H3 N8	-	-	+	-
A/equine/Rome/5/91	H3 N8	-	-	+	-
A/equine/Taby/91	H3 N8	-	-	+	-
A/equine/Lambourn/22778/92	H3 N8	-	-	+	-
A/equine/Hong Kong/92	H3 N8	-	-	+	-
A/equine/Avesta/1/93	H3 N8	-	-	+	-
A/equine/La Plata/1/93	H3 N8	+	-	+	-
A/equine/Kentucky/1/94	H3 N8	-	-	+	-
A/equine/La Plata/1/95	H3 N8	+	-	+	-
A/equine/La Plata/1/96	H3 N8	+	-	+	-
A/duck/Czech/56	H4 N6	-	-	+	-
A/duck/Pennsylvania/10128/83	H5 N2	+	-	+	-
A/turkey/Massachusetts/3740/65	H6 N2	+	-	+	-
A/seal/Massachusetts/1/80	H7 N7	+	-	+	-
A/equine/Prague/1/56	H7 N7	-	-	+	-
A/equine/Newmarket/1/77	H7 N7	-	-	+	-
A/turkey/Ontario/67	H8 N4	-	-	+	-
A/turkey/Wisconsin/66	H9 N2	-	-	+	-
A/chicken/Germany/N/49	H10 N7	-	-	+	-
A/duck/England/56	H11 N6	-	-	+	-
A/duck/Alberta/60/76	H12 N5	-	-	+	-
A/gull/Maryland/704/77	H13 N6	-	-	+	-
A/mallard/Astrakhan/263/82	H14 N5	+	-	+	-
A/duck/Australia/341/83	H15 N8	+	-	+	-
A/Hokkaido/11/02	H1 N1	+	-	+	-
A/Hokkaido/1/03*	H3 N2	+	-	+	-
A/swine/Miyagi/5/03	H1 N2	+	-	+	-
A/HongKong/483/97	H5 N1	-	-	+	-
A/HongKong/156/97	H5 N1	-	-	+	-
A/HongKong/reverse genetics-911	H5 N1	+	-	+	-
測定対照		-	-	-	-

\*: 鶏卵未馴化のためMDCK培養上清によるアッセイ結果

【0085】

結果から従来測定器具では検出できなかったインフルエンザA型ウイルスの亜型検体について、本発明測定器具では全て検出可能であった。

【0086】

実施例7

前記実施例5で製造したインフルエンザA型ウイルス及びインフルエンザB型ウイルス同時測定器具1(本発明測定器具)を用い、実施例6と同様にして、アデノウイルス(1~7型)、コクサッキーウイルス(A16, B1~B6型)、単純ヘルペスウイルス1型、エコーウイルス(3型、4型、7型、22型、30型)、エンテロウイルス(71型)

10

20

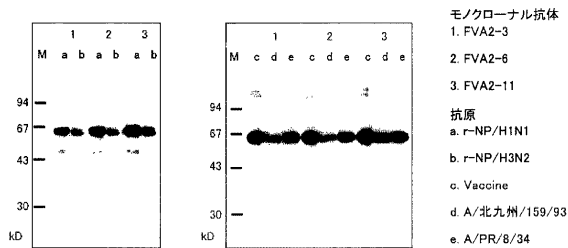
30

40

50

、ムンプスウイルス、ポリオウイルス（1～3型）、RSウイルス（サブグループA、サブグループB）、パラインフルエンザウイルス（1～3型）、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、霊菌、表皮ブドウ球菌、変形菌、黄色ブドウ球菌、コリネバクテリア、ジフテリア、カンジダ・アルビカンス、化膿連鎖球菌、ストレプトコッカス sp.（グループB, C, G, F）、肺炎連鎖球菌、ヘモフィルス属インフルエンザ、リステリア・モノサイトゲネス、肺炎マイコプラズマ、クラミジア・トラコマチス、クラミジア・ニューモニエとの交差反応性を調べた。その結果、これらのいずれのウイルス又は菌とも反応しなかった。

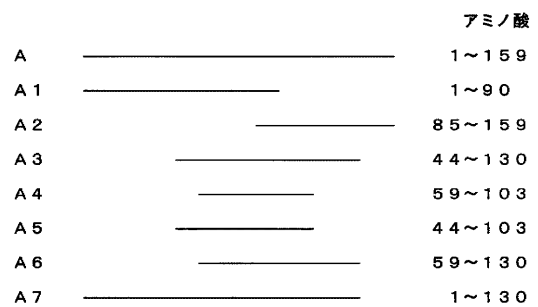
【図1】



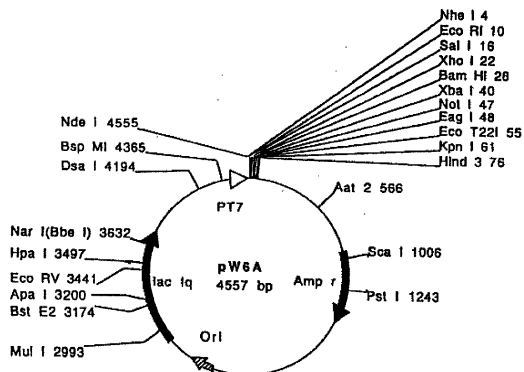
ウェスタンブロットングでの反応性

【図3】

Influenza H1N1 の Deletion 作製



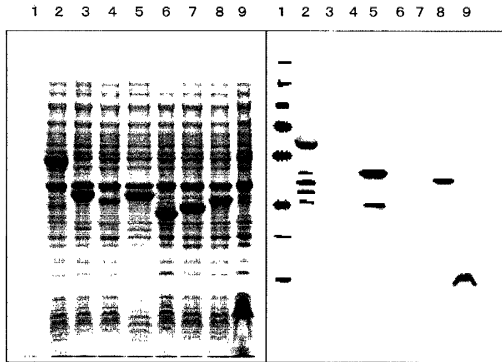
【図2】



【 図 4 】

FVA2-11 の反応性

(CBB染色パターン) (ウエスタンブロット)



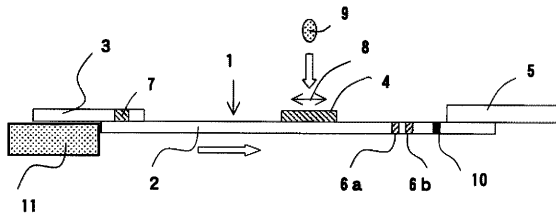
- Lane  
 1.MW marker  
 2.GST+A  
 3.GST+A1  
 4.GST+A2  
 5.GST+A3  
 6.GST+A4  
 7.GST+A5  
 8.GST+A6  
 9.A7

【 図 5 】

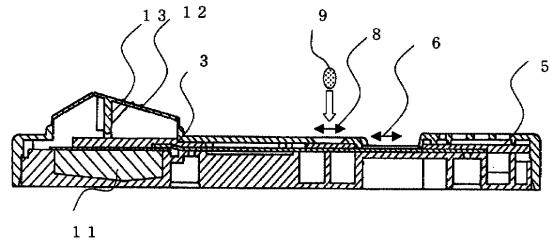
インフルエンザA型ウイルス核タンパク質アミノ酸配列 (59~140)

亜型名	アミノ酸配列			
	60	70		
H10N7	NSITIERMVLSAFDERRNKYL			
H11N6	NSITIERMVLSAFDERRNKYL			
H13N6	NSITIERMVLSAFDERRNKYL			
H14N5	NSITIERMVLSAFDERRNKYL			
H1N1	NSLTIERMVLSAFDERRNKYL			
H2N2	NSLTIERMVLSAFDERRNKYL			
H4N6	NSITIERMLLSAFDERRNKYL			
H7N7	NSITIERMVLSAFDERRNKYL			
	80	90	100	
H10N7	EEHPSAGKDP	KKTGGP	IYRRRDGKWMREL T	
H11N6	EEHPSAGKDP	KKTGGP	IYRRRDGKQVREL I	
H13N6	EEHPSTGRDP	KKTGGP	IYRRRDGKQVREL I	
H14N5	EEHPSAGKDP	KKTGGP	IYRRRDGKWMREL I	
H1N1	EEHPSAGKDP	KKTGGP	IYRRVNGKWMREL I	
H2N2	EEHPSAGKDP	KKTGGP	IYKRVNGKWMREL V	
H4N6	EEHPSAGKDP	KKTGGP	IYRRRDGKQVREL I	
H7N7	EEHPSAGKDP	KKTGGP	IYRRRDGKWMREL I	
	110	120	130	140
H10N7	LYDKEE	IRRIWRG	ANNGEDATAGLTHLMIWH	
H11N6	LYDKEE	IRRIWRG	ANNGEDATAGLTHLMIWH	
H13N6	LYDKEE	IRRIWRG	ANNGEDATAGLTHLMIWH	
H14N5	LYDKEE	IRRIWRG	ANNGEDATAGLTHLMIWH	
H1N1	LYDKEE	IRRIWRG	ANNGDATAGLTHMMIWH	
H2N2	LYDKEE	IRRIWRG	ANNGDATAGLTHMMIWH	
H4N6	LYDKEE	IRRIWRG	ANNGEDATAGLTHLMIWH	
H7N7	LYDKEE	IRRIWRG	ANNGEDATAGLTHLMIWH	

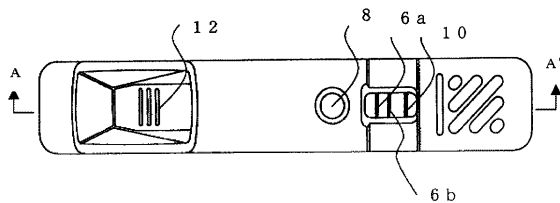
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 7 】



【配列表】

0004595810000001.app

---

フロントページの続き

微生物の受託番号 FERM BP-10066

微生物の受託番号 FERM BP-10067

微生物の受託番号 FERM BP-10068

(72)発明者 藤井 信之

東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 特開平09-229938(JP,A)  
特開平10-300750(JP,A)  
特開平11-153600(JP,A)  
特開2000-329767(JP,A)  
特開平05-149951(JP,A)  
特開平07-304799(JP,A)  
特開平06-100594(JP,A)  
特開2001-124775(JP,A)  
J.Clin.Microbiol.,1986,23(2),p.240-5  
J.Virol.Methods.,1996,60(1),p.65-71  
Virus Res.,1992,22(3),p.281-93

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

PubMed

WPI

JSTPlus(JDreamII)

BIOSIS(DIALOG)