

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5525688号  
(P5525688)

(45) 発行日 平成26年6月18日(2014.6.18)

(24) 登録日 平成26年4月18日(2014.4.18)

(51) Int. Cl.

F 1

<b>GO 1 N 33/569</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/569	Z N A L
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 2 1
<b>CO 7 K 16/10</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 1 5 A
<b>C 1 2 N 15/02</b>	<b>(2006.01)</b>	CO 7 K 16/10	

請求項の数 11 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-531039 (P2007-531039)  
 (86) (22) 出願日 平成18年8月18日(2006.8.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/316243  
 (87) 国際公開番号 W02007/021002  
 (87) 国際公開日 平成19年2月22日(2007.2.22)  
 審査請求日 平成21年8月7日(2009.8.7)  
 (31) 優先権主張番号 特願2005-238997 (P2005-238997)  
 (32) 優先日 平成17年8月19日(2005.8.19)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

前置審査

(73) 特許権者 593025712  
 株式会社ビーエル  
 静岡県沼津市神田町6番26号  
 (74) 代理人 100091502  
 弁理士 井出 正威  
 (72) 発明者 喜田 宏  
 北海道札幌市豊平区月寒西3条5丁目1-1  
 (72) 発明者 迫田 義博  
 北海道札幌市西区八軒3条西3丁目605-14  
 (72) 発明者 難波 靖治  
 静岡県沼津市神田町6番26号 株式会社  
 ビーエル内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルスH5亜型の免疫検出法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する抗体を用いる免疫測定法からなるインフルエンザウイルスH5亜型の検出法であって、前記抗体が、配列番号1に示されるヘマグルチニン蛋白のアミノ酸配列の168番目のアミノ酸を含むエピトープを認識するモノクローナル抗体である検出法。

【請求項2】

インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する第一の抗体と第二の抗体とを用いたサンドイッチ式免疫測定法からなるインフルエンザウイルスH5亜型の検出法であって、前記第一の抗体および前記第二の抗体の少なくとも何れか一方が、配列番号1に示されるヘマグルチニン蛋白のアミノ酸配列の168番目のアミノ酸を含むエピトープを認識するモノクローナル抗体である検出法。

【請求項3】

前記第一の抗体および第二の抗体の何れか一方を担体に固定しておく請求項2に記載の検出法。

【請求項4】

インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する第一の抗体を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する第二の抗体と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれるイン

10

20

フルエンザウイルスH5亜型と前記第二の抗体とを備えた複合体を前記捕捉部位に捕捉させるイムノクロマトグラフィ測定法であって、前記第一の抗体および前記第二の抗体の少なくとも何れか一方が、配列番号1に示されるヘマグルチニン蛋白のアミノ酸配列の168番目のアミノ酸を含むエピトープを認識するモノクローナル抗体である測定法。

【請求項5】

前記第二の抗体は金属コロイドまたはラテックスで標識されている請求項4に記載の測定法。

【請求項6】

前記膜担体がニトロセルロース膜である請求項4または5に記載の測定法。

【請求項7】

インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する第一の抗体と第二の抗体と膜担体とを少なくとも備え、前記第一の抗体は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の抗体は適当な標識物質で標識され、かつ、前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されてなるインフルエンザウイルスH5亜型検出用イムノクロマト法テストストリップであって、前記第一の抗体および前記第二の抗体の少なくとも何れか一方が、配列番号1に示されるヘマグルチニン蛋白のアミノ酸配列の168番目のアミノ酸を含むエピトープを認識するモノクローナル抗体であるイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項8】

前記第二の抗体は金属コロイドまたはラテックスで標識されている請求項7に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項9】

前記膜担体がニトロセルロース膜である請求項7または8に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項10】

配列番号1に示されるヘマグルチニン蛋白のアミノ酸配列の168番目のアミノ酸を含むエピトープを認識するモノクローナル抗体。

【請求項11】

インフルエンザウイルスH5亜型以外のインフルエンザウイルスとは反応しないものである請求項10に記載の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、インフルエンザウイルスH5亜型のエンベローブ表面上の分子であるヘマグルチニン(HA)蛋白に対する抗体を用いたインフルエンザウイルスH5亜型の免疫検出法、詳しくは、サンドイッチ式免疫測定法、特に、イムノクロマトグラフィ測定法およびイムノクロマト法テストストリップに関するものであり、高病原性鳥インフルエンザウイルスなどのインフルエンザウイルスH5亜型の感染を迅速かつ簡便に診断するために有用な検出法に関する。

【背景技術】

【0002】

高病原性鳥インフルエンザは、鶏などに高致死性の病原性を示すインフルエンザウイルスによる感染症で、家きんベストとも呼ばれ、わが国では家畜伝染病予防法の法定伝染病に指定されており、世界獣医事務局(OIE)ではリストA疾病として掲げられている。

【0003】

今までに高病原性鳥インフルエンザを引き起こしたインフルエンザウイルスはインフルエンザA型ウイルスのH5亜型及びH7亜型のみである。これらの亜型が総て強毒性であるわけではないが、わが国では、強毒性及び弱毒性であるかにかかわらずこれらの亜型に家畜が感染した場合、すべて屠殺処分することとされている。

【0004】

10

20

30

40

50

H5N1亜型による高病原性鳥インフルエンザは、1997年に香港で流行し、さらに、2003年から2004年にはアジアの数カ国で大流行し、人への感染及び死亡例も報告された。

したがって、高病原性鳥インフルエンザの感染を迅速に発見することは、大規模なインフルエンザ感染拡大を防ぐ上で重要な課題である。

【0005】

高病原性鳥インフルエンザ診断は、現状では、ウイルス感染が疑われる病鳥から気管スワブまたはクロアカスワブ(総排泄腔スワブ)を採取し、これを発育鶏卵に接種して培養した後、ウイルスを分離する方法により行われている。しかし、この方法は、結果が得られるまでに数日を要し、迅速に結果が求められない点で不利である。また、近年開発された遺伝子検査(PCR法、LAMP法)を用いることにより、結果を得るまでにかかる時間は大幅に短縮されるが、かかる遺伝子検査には特別な機器及び技術を要するため、養鶏現場等で検査を行うことは出来ない。

10

【0006】

【特許文献1】特表2004-509648号公報

【特許文献2】特開平11-108932号公報

【特許文献3】特開2001-215228号公報

【非特許文献1】Hinshaw VSら、「Specific antibody responses and generation of antigenic variants in chickens immunized against a virulent avian influenza virus」, Avian Dis. 1990, 34(1): 80-6

20

【非特許文献2】Kaverin NVら、「Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation escape mutants」, J. Gen. Virol. 2002, 83(pt10): 2497-505

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで、本発明は、インフルエンザウイルスH5亜型のエンベロープ表面上の分子であるヘマグルチニン(HA)蛋白に対する抗体を用いたインフルエンザウイルスH5亜型の免疫検出法、とりわけ、サンドイッチ式免疫測定法、特に、イムノクロマトグラフィー測定法およびイムノクロマト法テストストリップを提供することにより、迅速かつ簡便に鳥インフルエンザ診断を行えるようにすることを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は、インフルエンザウイルスH5亜型を免疫原としてマウスを免疫して該ウイルスのヘマグルチニン(HA)蛋白に対する抗体を取得することに成功し、当該抗体を免疫測定法、特にサンドイッチ式免疫測定法、とりわけイムノクロマトグラフィー測定法で使用するにより、インフルエンザウイルスH5亜型を特異的に検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明の一面によれば、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する抗体を用いる免疫測定法からなるインフルエンザウイルスH5亜型の検出法が提供される。

40

この検出法における免疫測定法としては、特に限定されるものではないが、サンドイッチ式免疫測定法、とりわけELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)法、イムノクロマトグラフィー測定法などが好ましい。

【0010】

したがって、本発明の他の局面によれば、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する第一の抗体と第二の抗体とを用いたサンドイッチ式免疫測定法からなることを特徴とするインフルエンザウイルスH5亜型の検出法が提供される。

また、本発明の好ましい実施形態によれば、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグ

50

ルチニン蛋白に対する第一の抗体を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する第二の抗体と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれるインフルエンザウイルスH5亜型と前記第二の抗体とを備えた複合体を前記捕捉部位に捕捉させることを特徴とするイムノクロマトグラフィ測定法が提供される。

【0011】

また、本発明の好ましい実施形態によれば、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する第一の抗体と第二の抗体と膜担体とを少なくとも備え、前記第一の抗体は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の抗体は適当な標識物質で標識され、かつ、前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されてなるインフルエンザウイルスH5亜型検出用イムノクロマト法テストストリップが提供される。

10

【0012】

本発明で使用するインフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、反応特異性の観点から、モノクローナル抗体とすることが好ましい。イムノクロマトグラフィ測定法などのサンドイッチ式免疫測定法の場合も、そこで使用する第一の抗体及び第二の抗体は、それぞれ、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、反応特異性の観点から、一般に、少なくとも一方の抗体をモノクローナル抗体とすることが好ましく、両方の抗体をモノクローナル抗体とすることが特に好ましい。

20

【0013】

本発明で使用する抗体は、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する抗体であり、したがって、インフルエンザウイルスH5亜型と特異的に反応し、インフルエンザウイルスH5亜型以外のインフルエンザウイルスとは反応しないものである。インフルエンザウイルスH5N1型(A/Hong Kong/156/97(H5N1))のヘマグルチニン蛋白の全アミノ酸配列は、配列番号1に示されるとおり公知である(Science 279(5349), 393-396(1998))。本発明で使用する好ましい抗体は、配列番号1に示されるヘマグルチニン蛋白のアミノ酸配列の168番目のアミノ酸を含むエピトープを認識する抗体、特にモノクローナル抗体である。このエピトープは、上記アミノ酸配列の168番目のアミノ酸残基を含むその前後の数個のアミノ酸残基から構成されるものと考えられ、通常、当該168番目のアミノ酸残基を中心とする6~10個のアミノ酸残基から構成されると考えられる。

30

【0014】

かくして、本発明の他の局面によれば、配列番号1に示されるヘマグルチニン蛋白のアミノ酸配列の168番目のアミノ酸を含むエピトープを認識するモノクローナル抗体(以下、「第一のモノクローナル抗体」ともいう)が提供される。しかしながら、当該第一のモノクローナル抗体は、蛍光抗体法によれば、インフルエンザウイルスH5弱毒株に対して全般的に反応するが、A/tn/S.Africa/61、A/swan/Shima/449/83(24a5b)、A/HongKong/156/97、A/HongKong/483/97、A/duck/Yokohama/aq-10/2003及びA/chicken/Yamaguchi/7/04からなる群より選ばれた強毒株の少なくとも1つには反応しないか又は弱毒株に対するよりも反応性が弱い。

40

【0015】

かくして、本発明のさらに他の局面によれば、インフルエンザウイルスH5亜型であるA/tn/S.Africa/61、A/swan/Shima/449/83(24a5b)、A/HongKong/156/97、A/HongKong/483/97、A/duck/Yokohama/aq-10/2003及びA/chicken/Yamaguchi/7/04の全てに対して反応するモノクローナル抗体(以下、「第二のモノクローナル抗体」ともいう)が提供される。第二のモノクローナル抗体は、蛍光抗体法によれば、上記強毒株の全てに対して強く反応する点で、第一のモノクローナル抗体と明確に区別されるものであり、第一のモノクローナル抗体と異なるエピトープを認識するものと考えられる。第二のモノクローナル抗体は

50

、広範囲の強毒株及び弱毒株に対して反応するので、インフルエンザウイルスH5亜型を広く検出するのに好適であり、とりわけ、強毒株の検出用に好適である。

【0016】

なお、第一のモノクローナル抗体及び第二のモノクローナル抗体の何れも、インフルエンザウイルスH5亜型以外のインフルエンザウイルスとは反応しないものであり、したがって、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対して特異的に反応する抗体である。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、免疫測定法による検出法において、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する抗体を用いることとしたので、当該抗体のインフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対する特異的反応性を利用して、インフルエンザウイルスH5亜型を選択的に検出することができ、鳥、ヒト等のインフルエンザウイルスH5亜型による感染症の診断に広く適用できる。

10

【0018】

また、本発明のイムノクロマトグラフィ測定法およびイムノクロマト法テストストリップによれば、特殊な機器及び熟練した技術を必要とすることなく、養鶏現場等において簡便かつ迅速に鳥インフルエンザウイルスの検出及び該ウイルスによる感染を診断することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0019】

本発明において、抗体の製造および該抗体を使用する検出法および測定法における各ステップは、それぞれ、それ自体、公知の免疫学的手法に準拠して行なわれる。

本発明において、ポリクローナル抗体は、例えば、配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードするDNA配列のうち、該アミノ酸配列の168番目のアミノ酸残基を含む部分に対応するDNA断片をクローニングし、当該クローン化遺伝子を大腸菌などの宿主で遺伝子工学的に発現させて発現蛋白を抽出および精製し、この精製蛋白を抗原として常法に従って動物を免疫し、その抗血清から取得することができる。また、前記第二のモノクローナル抗体が認識するインフルエンザウイルス強毒株ヘマグルチニン蛋白のエピトープに対応するアミノ酸配列をコードするDNA配列を取得し、上記と同様に免疫抗原として使用してもよい。

30

【0020】

本発明において、モノクローナル抗体は、例えば、上記と同様に得られた精製蛋白を抗原としてマウスのような動物を免疫したのち、この免疫された動物の脾臓細胞とミエローム細胞とを細胞融合して得られた融合細胞をHAT含有培地でセレクトした後に増殖せしめ、増殖せしめた株を前記のようにして得られた精製蛋白を使用して、たとえば、酵素標識免疫法などにより選別することで、取得することができる。

別法として、上記モノクローナル抗体は、例えば、H5亜型のインフルエンザウイルス自体を抗原としてマウスのような動物を免疫したのち、この免疫された動物の脾臓細胞とミエローム細胞とを細胞融合して得られた融合細胞をHAT含有培地でセレクトした後に増殖せしめ、増殖せしめた株から、H5亜型のインフルエンザウイルスとは反応するが、H5亜型以外のインフルエンザウイルスの総てとは反応しない株を選別することで、取得することができる。

40

【0021】

被験試料中のインフルエンザウイルスH5亜型を検出するための本発明のイムノクロマトグラフィ測定法は、公知のイムノクロマト法テストストリップの構成に準拠して容易に実施できる。

一般に、かかるイムノクロマト法テストストリップは、抗原の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の抗体と、前記抗原の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の抗体と、膜担体とを少なくとも備え、前記第一の抗体は前記膜担体の

50

所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の抗体は前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されて構成される。第一の抗体および第二の抗体は、上述のように、それぞれポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であっても良いが、少なくとも何れか一方がモノクローナル抗体であることが好ましい。通常は、第一の抗体及び第二の抗体は「ヘテロ」の組み合わせで用いられ、すなわち、抗原上の位置および構造の何れもが異なる各抗原決定基をそれぞれ認識する第一の抗体及び第二の抗体が組み合わせて用いられる。しかしながら、第一の抗原決定基と第二の抗原決定基は抗原上の位置が異なっていれば構造的に同一であってもよく、その場合、第一の抗体および第二の抗体は上記「ホモ」の組み合わせのモノクローナル抗体であってもよく、すなわち、第一の抗体および第二の抗体の両方に同一のモノクローナル抗体が使用できる。

10

#### 【0022】

イムノクロマト法テストストリップの具体例としては、例えば、図1に示されるテストストリップが挙げられる。図1において、数字1は粘着シート、2は含浸部材、3は膜担体、31は捕捉部位、4は吸収用部材、5は試料添加用部材を示している。

図示の例では、膜担体3は、幅5mm、長さ36mmの細長い帯状のニトロセルロース製メンブレンフィルターで作成されている。

該膜担体3には、そのクロマト展開開始点側の末端から7.5mmの位置に、第一の抗体が固定され、検体の捕捉部位31が形成される。

図示の例では、膜担体3は、ニトロセルロース製メンブレンフィルターを用いているが、被験試料に含まれる検体をクロマト展開可能で、かつ、上記捕捉部位31を形成する抗体を固定可能なものであれば、いかなるものであってもよく、他のセルロース類膜、ナイロン膜、ガラス繊維膜なども使用できる。

20

#### 【0023】

含浸部材2は、前記第一の抗体が結合する第一の抗原決定基と異なる部位に位置する第二の抗原決定基にて前記抗原と抗体抗原反応する第二の抗体を含浸せしめた部材からなる。当該第二の抗体は、適当な標識物質で予め標識される。

図示の例では、含浸部材2として、5mm×15mmの帯状のガラス繊維不織布を用いているが、これに限定されるものではなく、例えば、セルロース類布（濾紙、ニトロセルロース膜等）、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック布類なども使用できる。

30

#### 【0024】

第二の抗体の標識物質としては、使用可能なものであればいかなる物質であってもよく、呈色標識物質、酵素標識物質、放射線標識物質などが挙げられる。

このうち、捕捉部位31での色の変化を肉眼で観察することにより迅速かつ簡便に判定できる点から、呈色標識物質を用いることが好ましい。

呈色標識物質としては、金コロイド、白金コロイド等の金属コロイドの他、赤色および青色などのそれぞれの顔料で着色されたポリスチレンラテックスなどの合成ラテックスや、天然ゴムラテックスなどのラテックスが挙げられ、このうち、金コロイドなどの金属コロイドが特に好ましい。

40

当該含浸部材2は、標識された第二の抗体の懸濁液を前記ガラス繊維不織布等の部材に含浸せしめ、これを乾燥させることなどによって作製できる。

#### 【0025】

図1に示されるように、膜担体3を粘着シート1の中程に貼着し、該膜担体3のクロマト展開の開始点側（すなわち図1の左側、以下「上流側」と記す、また、その逆の側、すなわち図1の右側を、以下「下流側」と記す）の末端の上に、含浸部材2の下流側末端を重ね合わせて接続するとともに、この含浸部材2の上流側部分を粘着シート1に貼着して本発明のイムノクロマト法テストストリップを作成できる。

さらに、必要に応じて、含浸部材2の上面に試料添加用部材5の下流側部分を載置するとともに、該試料添加用部材5の上流側部分を粘着シート1に貼着してもよく、また、膜

50

担体3の下流側部分の上面に吸収用部材4の上流側部分を載置するとともに、該吸収用部材4の下流側部分を粘着シート1に貼着せしめることもできる。

【0026】

試料添加用部材5としては、例えば、多孔質ポリエチレンおよび多孔質ポリプロピレンなどのような多孔質合成樹脂のシートまたはフィルム、ならびに、濾紙および綿布などのようなセルロース製の紙または織布もしくは不織布を用いることができる。

吸収用部材4は、液体をすみやかに吸収、保持できる材質のものであればよく、綿布、濾紙、およびポリエチレン、ポリプロピレン等からなる多孔質プラスチック不織布等を挙げることができるが、特に濾紙が最適である。

【0027】

さらに、市販品の場合、図1のイムノクロマト法テストストリップは、試料添加用部材5と捕捉部位31の上方にそれぞれ被験試料注入部と判定部が開口された適当なプラスチック製ケース内に収容されて提供される。

【0028】

かくして、生体試料などからなる被験試料を必要に応じて適当な展開溶媒と混合してクロマト展開可能な混合液を得た後、当該混合液を図1に示されるイムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上に注入すると、該混合液は、該試料添加用部材5を通過して含浸部材2において、標識された第二の抗体と混合する。

その際、該混合液中に検体が存在すれば、抗原抗体反応により検体と第二の抗体との複合体が形成される。

この複合体は、膜担体3中をクロマト展開されて捕捉部位31に到達し、そこに固定された第一の抗体と抗原抗体反応して捕捉される。

このとき、標識物質として金コロイドなどの呈色標識物質が使用されていれば、当該呈色標識物質の集積により捕捉部位31が発色するので、直ちに、検体を定性的または定量的に測定することができる。

【0029】

被験試料としては、特に制限はないが、例えば、クロアカスワブ、気管スワブ、糞便、鼻腔吸引液、鼻腔ぬぐい液および咽頭ぬぐい液、血液（全血でも、血清でも、血漿でもよい）、唾液、尿、臓器乳剤等が挙げられる。被験試料は、展開溶媒などの適当な希釈液で希釈して膜担体に注入してもよい。

なお、全血を被験試料として用いるときで、特に標識抗体の標識物質として金コロイドなどの呈色標識物質が用いられる場合、前記試料添加用部材に血球捕捉膜部材を配置しておくことが好ましい。血球捕捉膜部材は、前記含浸部材と前記試料添加用部材との間に積層することが好ましい。これにより、赤血球が膜担体に展開されるのが阻止されるので、膜担体の捕捉部位における呈色標識の集積の確認が容易になる。血球捕捉膜部材としては、カルボキシメチルセルロース膜が用いられ、具体的には、アドバンテック東洋株式会社から販売されているイオン交換濾紙CM（商品名）や、ワットマンジャパン株式会社から販売されているイオン交換セルロースペーパーなどを用いることができる。

【実施例】

【0030】

下記の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【0031】

実施例1（抗インフルエンザウイルスH5亜型モノクローナル抗体の作出）

インフルエンザウイルスH5亜型であるA/duck/Pennsylvania/10128/84(H5N2)株を11日齢の孵化鶏卵の羊膜腔に接種し、培養した。数日後に羊水を採取しウイルスを得た。

得られたウイルスを抗原として、当該ウイルスに対するモノクローナル抗体を作出した。モノクローナル抗体の作出は常法に従っておこなった。

すなわち、100 $\mu$ gのウイルス抗原と等量のAdjuvant Complete Freund (Difco)を混合して、マウス（BALB/c、5週齢、日本SLC）に3回免疫し、その脾臓細胞を細胞融合に用いた

10

20

30

40

50

。細胞融合には、マウスの骨髄腫細胞であるSp2/0-Ag14細胞（Shulmanら、1978）を用いた。

【 0 0 3 2 】

得られた融合細胞をHAT含有培地でセレクトした後に増殖せしめ、増殖せしめた融合細胞から、インフルエンザウイルスH5亜型の上記株と反応するモノクローナル抗体産生細胞を最終的に15クローン得た。

作出した15クローンのモノクローナル抗体と各種インフルエンザウイルスH5亜型との反応性を蛍光抗体法により確認し、結果を表1に示した。なお、蛍光抗体法は下記手順に従った。

【 0 0 3 3 】

蛍光抗体法

イヌ腎臓由来株化細胞（Madin-Darby canine kidney cell：MDCK細胞）を用いて蛍光抗体法を行った。MDCK細胞の培養にはイーグル最小必須培地（日水製薬）に56で30分間加熱非動化した10% Bovine calf serum（Roche）、0.3mg/ml L-グルタミン、100単位/mL ペニシリンGカリウム、100 µg/ml 硫酸ストレプトマイシンを加えた後、炭酸水素ナトリウムでpHを調整した培地を用いた。

蛍光抗体法はOffice International Des Epizooties（2000）の方法に従った。Lab-Tek II Chamber Slide System（Nunc）に単層を形成させたMDCK細胞に $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mlでウイルスを接種し、35で8時間培養後、培養上清を除去し、感染細胞をPBSで1回洗浄した。細胞を20分間100%冷アセトン（和光純薬）に浸し固定した後、乾燥させた。モノクローナル抗体を含むマウス腹水、もしくは培養上清を抗体希釈液（1% BSA及び0.05% Tween20を含むPBS）で800倍に希釈し、これを1次抗体液として添加し、室温で1時間反応させた。PBSで1回洗浄後、抗体希釈液で1000倍に希釈したFluorescence-conjugated Goat IgG Fraction to Mouse IgG（ICN Biomedicals）を2次抗体液として添加し、室温で1時間反応させた。PBSで1回洗浄後、細胞を封入剤（Glycerol for fluorescence microscopy（Merck）と0.5M 炭酸重炭酸バッファー（pH9.5）を比率3:1で混合したもの）で封入した後、蛍光顕微鏡（Axiovert 200, ZEISS）を用い、FITC Filter（Chroma）で観察した。判定は目視により核および細胞質に緑色の特異的な細胞内蛍光を確認することで陽性（+）と判定した。

【 0 0 3 4 】

10

20

【表 1】  
モノクローナル抗体とインフルエンザウイルスH5亜型各株との反応性

ウイルス	25	40	48	64	A25	B168	ク	口	ー	ン	抗	体	A310	B29	B59
					A25	B168	D31	145	B220	3	A27	B9	A310	B29	B59
A/duck/Mi/54/76 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/HongKong/342/78 (H5N2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/HongKong/698/79 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/Pennsylvania/10128/84 (H5N2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/swan/Hokkaido/4/96 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/swan/Hokkaido/51/96 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/swan/Hokkaido/67/96 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/Hokkaido/69/00 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/Hokkaido/447/00 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/Mongolia/54/01 (H5N2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/Mongolia/500/01 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/Mongolia/596/01 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/duck/Hokkaido/84/02 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/tn/S.Africa/61 (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
A/swan/Shima/449/83 (24a5b) (H5N3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/HongKong/156/97 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A/HongKong/483/97 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
A/duck/Yokohama/aq-10/2003 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

【 0 0 3 5 】

表 1 において、A/duck/Mi/54/76 (H5N3)、A/duck/HongKong/342/78 (H5N2)、A/duck/HongKong/698/79 (H5N3)、A/duck/Pennsylvania/10128/84 (H5N2)、A/swan/Hokkaido/4/96 (H5N3)、A/swan/Hokkaido/51/96 (H5N3)、A/swan/Hokkaido/67/96 (H5N3)、A/duck/Hokkaido/69/00 (H5N3)、A/duck/Hokkaido/447/00 (H5N3)、A/duck/Mongolia/54/01 (H5N2)、

10

20

30

40

50

A/duck/Mongolia/500/01 (H5N3)、A/duck/Mongolia/596/01 (H5N3)及びA/duck/Hokkaido/84/02 (H5N3)の13種はインフルエンザウイルスH5弱毒株であり、A/tn/S.Africa/61 (H5N3)、A/swan/Shima/449/83 (24a5b) (H5N3)、A/HongKong/156/97 (H5N1)、A/HongKong/483/97 (H5N1)、A/duck/Yokohama/aq-10/2003 (H5N1)及びA/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1)の6種はインフルエンザウイルスH5強毒株である。

なお、表1において、A/duck/Mongolia/500/01(H5N3)及びA/duck/Mongolia/596/01(H5N3)は、それぞれ、A/duck/Mongolia/3/01(H5N3)及びA/duck/Mongolia/10/01(H5N3)と同等であることが知られている。

【0036】

表1から、クローンNo.25, 40, 48, 64, A25, B168及びD31は、上記蛍光抗体法において、表1に示される13種の弱毒株及び6種の強毒株の全てに対して反応するものであることがわかる。これに対し、クローンNo.145, B220, 3, A27, B9, A310 B29及びB59は、上記蛍光抗体法において、表1に示される13種の弱毒株の全てに対して反応するが、6種の強毒株の少なくとも一つに対しては反応しないか又は弱毒株よりも反応性が低いことがわかる。

【0037】

表1に示した15クローンより12種のクローンNo.3, A27, B29, 25, 40, 48, A25, 64, D31, B9, A310及びB168を選定し(なお、3種のクローンNo.3, A27及びB29については、以下、それぞれ、クローン3/3, A27/1及びB29/1と表記する)、これら12種のクローンのアイソタイプ及びA/duck/Pennsylvania/10128/84(H5N2)株を固相化抗原に用いたELISA法における力価を調べ、その結果を表2に示した。なお、表2中、Mabはクローンの種類を示し、Isotypeはモノクローナル抗体のイムノグロブリンアイソタイプを示し、ELISA titerはA/duck/Pennsylvania/10128/84(H5N2)株に対するELISA法による力価を示す。作出したモノクローナル抗体のアイソタイプは、Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma)を用いてELISAで同定した。

【0038】

【表2】

## インフルエンザウイルスH5亜型反応性モノクローナル抗体

Mab	Isotype	ELISA titer
		A/duck/pennsylvania/10128/84
3/3	IgG <sub>3</sub>	102,400
A27/1	IgG <sub>1</sub>	102,400
B29/1	IgG <sub>2b</sub>	1,638,400
25	IgG <sub>1</sub>	409,600
40	IgG <sub>1</sub>	409,600
48	IgG <sub>1</sub>	102,400
A25	IgG <sub>1</sub>	1,638,400
64	IgG <sub>1</sub>	104,857,600
D31	IgG <sub>1</sub>	409,600
B9	IgG <sub>1</sub>	6,400
B168	IgG <sub>1</sub>	409,600
A310	IgG <sub>1</sub>	104,857,600

【0039】

また、上記の選定した12種のクローンについて、インフルエンザウイルスH5亜型以外のインフルエンザウイルスとの反応性をELISA法により確認し、結果を表3に示した。なお、表3の結果は12種のクローンに共通である。

【0040】

【表3】

様々な亜型ウイルスとの反応性

動物由来標準株	
A/duck/Totteri/723/80(H1N1)	—
A/duck/Hokkaido/17/01(H2N2)	—
A/duck/Mongolia/4/03(H3N8)	—
A/duck/Czech/56(H4N6)	—
A/duck/Pennsylvania/10128/83(H5N2)	+++
A/turkey/Massachusetts/3740/65(H6N2)	—
A/seal/Massachusetts/1/80(H7N7)	—
A/turkey/Ontario/67(H8N4)	—
A/turkey/Wisconsin/66(H9N2)	—
A/chicken/Germany/N/49(H10N7)	—
A/duck/England/56(H11N6)	—
A/duck/Alberta/60/76(H12N5)	—
A/gull/Maryland/704/77(H13N6)	—
A/mallard/Astrakhan/263/82(H14N5)	—
A/duck/Australia/341/83(H15N8)	—

10

【0041】

表3から明らかのように、上記12種のクローンはインフルエンザウイルスH5亜型以外のインフルエンザウイルスとは反応せず、したがって、インフルエンザウイルスH5亜型と特異的に反応するものであることがわかった。

20

また、上記クローンのうち、クローン3/3、A27/1及びB29/1から得られたモノクローナル抗体とA/duck/Pennsylvania/10128/84(H5N2)株とを混合して11日齢の孵化鶏卵の羊膜腔に接種し、培養し、数日後に羊水を採取しウイルスを得た。得られたウイルスは、上記モノクローナル抗体の選択圧がかかっているため、上記モノクローナル抗体が結合する部位に変異を生じている可能性が高い。

そこで、得られたウイルスのヘマグルチニン遺伝子をシーケンスし、そのアミノ酸配列を配列番号1の配列と比較したところ、前者のアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列の168番目のアミノ酸残基が変異していることがわかった。

したがって、上記3種のクローン3/3、A27/1及びB29/1は、インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に特異的に結合するものであり、さらには、配列番号1の168番目のアミノ酸残基を含むエピトープを認識するものであることが示された。

30

【0042】

実施例2（抗インフルエンザウイルスH5亜型抗体を用いたイムノクロマトキットの作製）

（1）抗インフルエンザウイルスH5亜型抗体（抗H5抗体）の調製

実施例1で得られた12種のクローンのそれぞれを、マウス腹腔に接種し、抗H5抗体を含んだ腹水を得た。さらに、常法によりプロテインG吸着体を用いたIgG精製を行い、抗H5抗体とした。

【0043】

（2）金コロイド溶液の調製

40

加熱によって沸騰させた超純水99mlに、1%（v/w）塩化金酸水溶液1mlを加え、さらに、その1分後に1%（v/w）クエン酸ナトリウム水溶液1.5mlを加えて加熱し5分間沸騰させた後、室温に放置して冷却した。次いで、この溶液に200mM炭酸カリウム水溶液を加えてpH9.0に調製し、これに超純水を加えて全量を100mlとして金コロイド溶液を得た。

【0044】

（3）金コロイド標識抗H5抗体溶液の調製

上記（1）で得られた12種のクローン由来の抗H5抗体を下記の手順でそれぞれ金コロイド標識した。

抗H5抗体の蛋白換算重量1μg（以下、抗体の蛋白換算重量を示すとき、単に、その精製蛋白質の重量分析による重量数値で示す）と上記（2）の金コロイド溶液1mlとを混合し

50

、室温で2分間静置してこの抗体のこごとくを金コロイド粒子表面に結合させた後、金コロイド溶液における最終濃度が1%となるように10%ウシ血清アルブミン（以下、「BSA」と記す）水溶液を加え、この金コロイド粒子の残余の表面をこごとくこのBSAでブロックして、金コロイド標識抗H5抗体（以下、「金コロイド標識抗体」と記す）溶液を調製した。この溶液を遠心分離（5600×G、30分間）して金コロイド標識抗体を沈殿せしめ、上清液を除いて金コロイド標識抗体を得た。この金コロイド標識抗体を10%サッカロース・1%BSA・0.5%トリトン（Triton）-X100を含有する50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4）に懸濁して金コロイド標識抗体溶液を得た。

#### 【0045】

（4）抗インフルエンザウイルスH5亜型測定用イムノクロマト法テストストリップの作成 10  
図1に示されるイムノクロマト法テストストリップを下記の手順で作成した。

（4-1）抗H5抗体と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位

幅5mm、長さ36mmの細長い帯状のニトロセルロース膜をクロマトグラフ媒体のクロマト展開用膜担体3として用意した。

抗H5抗体1.0mg/mlが含有されてなる溶液0.5μlを、このクロマト展開用膜担体3におけるクロマト展開開始点側の末端から7.5mmの位置にライン状に塗布して、これを室温で乾燥し、インフルエンザウイルスH5亜型と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位31とした。抗H5抗体として、表4-1及び表4-2に記載のクローン由来のモノクローナル抗体を用いた。

#### 【0046】

（4-2）金コロイド標識抗体含浸部材 20

5mm×15mmの帯状のガラス繊維不織布に、金コロイド標識抗体溶液37.5μlを含浸せしめ、これを室温で乾燥させて金コロイド標識抗体含浸部材2とした。金コロイド標識抗体として、表4-1及び表4-2に記載のクローン由来の金コロイド標識抗体を用いた。

（4-3）イムノクロマト法テストストリップの作成

上記クロマト展開用膜担体3、上記標識抗体含浸部材2の他に、試料添加用部材5として綿布と、吸収用部材4として濾紙を用意した。そして、これらの部材を用いて、図1と同様のクロマト法テストストリップを作成した。

#### 【0047】

（5）試験-1（弱毒株検出） 30

金コロイド標識抗体及び捕捉部位形成抗体（抗H5抗体）として表4-1に記載のものを用いた全5種類のイムノクロマト法テストストリップを用意した。

A/duck/Pennsylvania/10128/84(H5N2)株を検体希釈液で希釈して2.5μg/mLに調整し、被験試料とした。そして、被験試料100μlを上記（4）で得られたテストストリップの試料添加用部材5にマイクロピペットで滴下してクロマト展開し、室温で15分放置後、上記捕捉部位31で捕捉されたA/duck/Pennsylvania/10128/84(H5N2)株と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉量を肉眼で観察した。捕捉量は、その量に比例して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で、-（着色なし）、±（微弱な着色）、+（明確な着色）、++（顕著な着色）の4段階（但し、wは弱めを示す）に区分して判定した。対照として、検体希釈液100μlを同様にクロマト展開し呈色度合いを観察した。その結果を表4-1に示した。 40

#### 【0048】

【表 4 - 1】

## 抗体の組み合わせの検討

金コロイド標識抗体	B29/1	B29/1	B29/1	3/3	A27/1
捕捉部位形成抗体	B29/1	3/3	A27/1	B29/1	B29/1
検体希釈液(対照)	—	—	—	—	—
2.5 $\mu$ g/mL 被験試料	+	±	±	±w	+

10

## 【0049】

表 4 - 1 から明らかなように、表 4 - 1 の何れの組合せの場合でも、インフルエンザウイルス H5 亜型を検出できることがわかった。

## 【0050】

## (6) 試験 - 2 (強毒株検出)

金コロイド標識抗体及び捕捉部位形成抗体(抗H5抗体)として表 4 - 2 に記載のものを  
用いた全 144 種類のイムノクロマト法テストストリップを用意した。なお、表 4 - 2 中  
、捕捉部位形成抗体はメンブレン固相化抗体と表記している。

インフルエンザウイルス H5 強毒株である A/Chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) 株 (HA 価 :  
1024HA) を検体希釈液で 625 倍に希釈して被験試料とした。そして、被験試料 100  $\mu$ l を上  
記 (4) で得られたテストストリップの試料添加用部材 5 にマイクロピペットで滴下して  
クロマト展開し、室温で 15 分放置後、上記捕捉部位 31 で捕捉された A/Chicken/Yamaguch  
i/7/04 (H5N1) 株と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉量を肉眼で観察した。捕捉量は  
、その量に比例して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で - (着色なし)、± (微弱な着  
色)、+ (明確な着色) の 3 段階に区分して判定した。対照として、検体希釈液 100  $\mu$ l を  
同様にクロマト展開し呈色度合いを観察した。その結果を表 4 - 2 に示した。

20

## 【0051】

【表 4 - 2】

金コロイド標識抗体

	A27	3	B29	25	40	48	A25	64	D31	B9	A310	B168
A27	+	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±	-
3	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B29	±	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-
25	±	-	-	-	-	+	+	+	±	-	+	±
40	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A25	±	±	±	-	±	±	-	+	-	-	+	-
64	+	±	±	-	-	±	-	+	-	-	+	-
D31	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
B9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A310	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

マンブレン固相化抗体

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

表4-2から明らかなように、クローン64, A25, 25, 48の4種がインフルエンザウイルスH5強毒株の検出に好適であることがわかった。なお、クローンA27及びA310については、表1の結果において少なくとも1つのインフルエンザウイルスH5強毒株に対して反応しないので、インフルエンザウイルスH5強毒株の検出には不適と判断した。

【0053】

実施例3 (ニワトリの類似疾病病原体を用いた特異性試験)

実施例2にて作製したイムノクロマトキット(捕捉部位に固定する抗H5抗体としてB29/1を用い、金コロイド標識抗体の抗H5抗体としてA27/1を用いた)を使用し、ニワトリにおける類似疾病病原体の特異性試験を実施した。試験は、各病原体ウイルスを検体希釈液で希釈して2.5 µg/mLに調整して被験試料とした以外、実施例2と同様の方法で行った。

10

【0054】

病原体Newcastle disease virus(株名NDV/Mongoria/705/02(APMV-1))、Avian paramyxovirus(血清型2)(株名Chicken/California/Yucaipa/56(APMV-2))、Avian paramyxovirus(血清型3)(株名Turkey/Wisconsin/68(APMV-3))、Avian paramyxovirus(血清型4)(株名Duck/Mississippi/320/75(APMV-4))、Avian paramyxovirus(血清型5)(株名Budgerigar/Kunitachi/74(APMV-5))、Avian paramyxovirus(血清型6)(株名Duck/HongKong/199/77(APMV-6))、Avian paramyxovirus(血清型7)(株名Dove/Tennessee/4/75(APMV-7))、Coronavirus(株名B-42)、Herpesvirus(株名NS1751)、Poxvirus(泗水)、Pasteurella multocida(血清型5A, 8A, 9A)、Haemophilus Paragallinarum(株名HK-1)、Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae(株名C5PT)、Aspergillus fumigates, A. flavus(株名KI-102162)を試験に供したが、表5の結果に示すとおり、いずれの病原体についても捕捉部位31での呈色は見られなかった。従って、表5に挙げた病原体すべてにおいて本発明のインフルエンザウイルスH5亜型検出用イムノクロマトキットの捕捉部位が呈色せず、反応しないことが確認された。なお、用いた病名、病原体名、株名を表5に併記した。表5中、-は捕捉部位の着色が無いことを示す。

20

【0055】

【 表 5 】

## ニフトリにおける類似疾病病原体と反応性結果

病 気	病 原 体	株 名	反 応 性
ニューカッスル病	Newcastle disease virus	NDV/Mongoria/705/02 (APMV-1)	—
鳥のパラミクソウイルス感染症	Avian paramyxovirus (血清型 2, 3, 4, 5, 6, 7)	Chicken/California/Yucaipa/56 (APMV-2) Turkey/Wisconsin/68 (APMV-3) Duck/Mississippi/320/75 (APMV-4) Budgerigar/Kunitachi/74 (APMV-5) Duck/HongKong/199/77 (APMV-6) Dove/Tennessee/4/75 (APMV-7)	— — — — — —
伝染性気管支炎ウイルス	Coronavirus	B-42	—
鶏伝染性喉頭気管炎	Herpesvirus	NS1751	—
鶏痘	Poxvirus	泗水	—
家禽コレラ	<i>Pasteurella multocida</i> (血清型 5A, 8A, 9A)	BAP0307	—
伝染性コリノーザ	<i>Haemophilus Paragallinarum</i>	HK-1	—
鶏マイコプラズマ症	<i>Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae</i>	C5PT	—
家禽のアレルギルス症	<i>Aspergillus fumigates, A. flavus</i>	KI-102162	—

10

20

30

40

【 0 0 5 6 】

実施例4 (感染実験用インフルエンザウイルスH5N1及びH9N2との反応性実験)

実施例2にて作製したイムノクロマトキット (捕捉部位に固定する抗H5抗体としてB29/1を用い、金コロイド標識抗体の抗H5抗体としてA27/1を用いた) を使用し、感染実験用イ

50

インフルエンザウイルスH5N1及びH9N2の反応性実験を実施した。インフルエンザウイルスH5N1として株名A/Ck/Yamaguchi/7/04(H5N1)、HA価1024を原液として用い、当該原液及び希釈度(10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>)に調製した希釈液を被験試料として反応に供した。また、インフルエンザウイルスH9N2として株名A/Ck/Y-55/01(H9N2)、HA価4096を原液として用い、当該原液及び希釈度(10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>)に調製した希釈液を被験試料として反応に供した。結果は表6に示した。表6中、-は捕捉部位の着色が無いことを示し、+は捕捉部位の着色が見られたことを示す。

表6から明らかなように、インフルエンザウイルスH5N1では原液から希釈度10<sup>-3</sup>までは反応性が確認されたが、希釈度10<sup>-4</sup>では反応性が確認できなかった。またインフルエンザウイルスH9N2では原液及びすべての希釈液で反応性は確認されなかった。

【0057】

【表6】

### 感染実験用ウイルス H5N1 及び H9N2 との反応性実験

株名	HA価	希釈度	反応性
A/Ck/Yamaguchi/7/04(H5N1)	1024	原液	+
		10 <sup>-1</sup>	+
		10 <sup>-2</sup>	+
		10 <sup>-3</sup>	+
		10 <sup>-4</sup>	-
A/Ck/Y-55/01(H9N2)	4096	原液	-
		10 <sup>-1</sup>	-
		10 <sup>-2</sup>	-

【0058】

実施例5(インフルエンザウイルスH5N1を接種したニワトリのクロアカスワブ等からのウイルス抗原の検出)

インフルエンザウイルスH5N1をニワトリに接種し、当該ウイルスを感染させたニワトリのクロアカスワブを採取しウイルス抗原の検出を実施した。

感染対象鳥として白色レグホン種を用いた。供試ウイルスは株名A/chicken/Yamaguchi/7/04(H5N1)を用い、ウイルス液を経鼻的にニワトリに接種し、死亡するまで毎日クロアカスワブを採取した。このニワトリは感染後3日目に死亡し、その直後に気管スワブ及び各種臓器を採取した。

気管スワブ及びクロアカスワブは検体希釈液に懸濁し被験試料とした。各種臓器はそれぞれを無菌的に採材し、採材した各臓器重量に対し9倍量のPBSを添加し、磨り潰すことで10%臓器乳剤を作製した。そして、本乳剤を遠心分離し、遠心分離上清を被験試料とした。これらの被験試料を、実施例2にて作製したイムノクロマトキット(捕捉部位に固定する抗H5抗体としてB29/1を用い、金コロイド標識抗体の抗H5抗体としてA27/1を用いた)の試験に供した。また、各種臓器についてウイルス分離を実施した。その結果を表7及び表8に示す。表7及び表8中、-は捕捉部位の着色が無いことを示し、+は捕捉部位の着色が見られたことを示す。

【0059】

表7から、ウイルス接種後1、2日とも抗原検出が見られたため、本発明によれば、感染後数日経過後の感染鳥であれば、クロアカスワブからのウイルス抗原の検出が可能であることが示された。

【0060】

10

20

30

40

50

【表7】

## H5N1ウイルスを接種したニワトリのクロアカスワブからのウイルス抗原の検出

ウイルス接種後の日数				
0日	1日	2日	3日	
—	+	+	— 死亡	

【0061】

表8から、本発明によれば、気管スワブ及びすべての臓器乳剤からウイルス抗原を検出することが可能であり、臓器乳剤については、その検出結果はウイルス分離結果ともすべて一致することが示された。以上の結果より、本発明によれば、感染鳥の各種部位から採取した検体を用いてウイルス抗原を高感度に検出できることが確認された。

なお、表8にウイルス分離結果として示された数値は、ウイルス感染価（ $10^X$  EID<sub>50</sub>/ml or g）であり、上記10%臓器乳剤の10倍希釈系列を作成し、各希釈液を9～11日齢発育鶏卵に接種して2日間培養した後、該発育鶏卵から尿液を採取してHA試験に供し、その結果から算出した。

【0062】

【表8】

## H5N1ウイルスを接種したニワトリの気管スワブ、臓器乳剤からのウイルス抗原の検出

接種後 死亡まで の日数	スワブ	乳 剤					
	気管	気管	肺	肝臓	脾臓	腎臓	結腸
3	NT/+	8.50/+	8.50/+	7.60/+	7.00/+	7.25/+	6.50/+

ウイルス分離／イムノクロマトキット

【0063】

実施例6（インフルエンザウイルスH5N1との反応性試験）

実施例 2 にて作製したイムノクロマトキット（捕捉部位に固定する抗H5抗体としてNo.64を用い、金コロイド標識抗体の抗H5抗体としてNo.64を用いた）を使用し、インフルエンザウイルスH5N1との反応性試験を実施した。インフルエンザウイルスH5N1原液として、A/Chicken/Yamaguchi/7/04（HA価：1024HA）、A/Hongkong/483/97（HA価：512HA）、A/Chicken/Suphanburi/1/04（HA価：512HA）、A/Vietnam/1194/04（HA価：512HA）、A/Whooperswan/Mongolia/3/05（HA価：16HA）を用いた。対照のインフルエンザウイルス原液としてA/Swan/Hokkaido/51/96（H5N3）（HA価：256HA）、A/Chicken/Ibaraki/1/05（H5N2）（HA価：512HA）およびA/Chicken/Italy/99（H7N1）（HA価：512HA）、A/Chicken/Netherlands/03（H7N7）（HA価：512HA）を用いた。これらのウイルス原液を検体希釈液にて希釈して被験試料を調製し、反応に供した。なお、A/Chicken/Yamaguchi/7/04はウイルス原液を625倍に希釈して被験試料とし、それ以外の株は125倍に希釈して被験試料とした。

10

結果を図2に示した。図2から明らかなように、このイムノクロマトキットは、すべてのH5亜型に対し反応性を示し、また対照としたH7亜型に対しては、反応性は示さなかった。

#### 【0064】

さらに、上記のイムノクロマトキット（捕捉部位に固定する抗H5抗体としてNo.64を用い、金コロイド標識抗体の抗H5抗体としてNo.64を用いた）及び別のイムノクロマトキット（捕捉部位に固定する抗H5抗体としてNo. B29/1を用い、金コロイド標識抗体の抗H5抗体としてNo. A27/1を用いた）を用意し、A/Chicken/Yamaguchi/7/04、A/Hongkong/483/97、A/Chicken/Suphanburi/1/04、A/Vietnam/1194/04、A/Whooperswan/Mongolia/3/05、A/Swan/Hokkaido/51/96（H5N3）及びA/Chicken/Ibaraki/1/05（H5N2）の各ウイルス原液を検体希釈液で25、125及び625倍に希釈した被験試料を調製し、反応に供した。

20

結果を表9に示した。表9から明らかなように、抗H5抗体としてNo.64を用いたイムノクロマトキットは、インフルエンザウイルスH5強毒株及び弱毒株と良好に反応し、とりわけ、インフルエンザウイルスH5強毒株の検出に好適である。

#### 【0065】

【表9】

## インフルエンザウイルスH5亜型に対する反応性

インフルエンザウイルスH5亜型	希釈倍数	抗体組み合わせ	
		A27×B29	64×64
A/Swan/Hokaido/51/96 (H5N3 弱毒株)	×25	+++	++
	×125	++	+
	×625	+	±
A/Chicken/Ibaraki/1/05 (H5N2 弱毒株)	×25	+	+
	×125	±	+
	×625	-	±
A/Chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1 強毒株)	×25	+++	+++
	×125	+	++
	×625	-	+
A/HongKong/483/97 (H5N1 強毒株)	×25	±	++
	×125	±	+
	×625	-	±
A/Vietnam/1194/04 (H5N1 強毒株)	×25	+	+++
	×125	±	++
	×625	-	+
A/Chicken/Suphanburi/1/04 (H5N1 強毒株)	×25	+	+++
	×125	±	+++
	×625	-	++
A/Whooperswan/Mongolia/3/05 (H5N1 強毒株)	×25	+	+++
	×125	±	++
	×625	-	+

10

20

## 【0066】

上記のイムノクロマトキット（捕捉部位に固定する抗H5抗体としてNo.64を用い、金コロイド標識抗体の抗H5抗体としてNo.64を用いた）を使用し、動物由来インフルエンザウイルスH1からH15の各亜型に対する反応性試験を実施した。各ウイルス株を検体希釈液にて希釈して調製し、被験試料とした。そして、被験試料100 $\mu$ lを滴下してクロマト展開し、室温で15分放置後に目視判定を行った。結果を表10に示した。

30

## 【0067】

【表 10】

型	株 名	HA価	反応性	
			No.64 X No.64	10 <sup>-1</sup>
H1N1	A/Duck/Tottori/723/80	256	—	—
H2N2	A/Singapore/1/57	256	—	—
H3N8	A/Duck/Mongoria/4/03	256	—	—
H4N6	A/Duck/Czeck/56	512	—	—
<b>H5N2</b>	<b>A/Duck/Pennsylvania/10128/84</b>	<b>128</b>	<b>5+</b>	<b>5+</b>
H6N2	A/Turkey/Massachusetts/3740/65	256	—	—
H7N7	Seal/ Massachusetts/1/80	—	—	—
H8N4	A/Turkey/Ontario/67	256	—	—
H9N2	A/Turkey/Wisconsin/6	512	—	—
H10N7	A/Chicken/Germany/N/49	2048	—	—
H11N6	A/Duck/Eng/1/56	512	—	—
H12N5	A/dk/Alberta/60/7	512	—	—
H13N6	A/Gull/Maryland/704/77	512	—	—
H14N5	A/Mallard/Astrakhan/263/82	1024	—	—
H15N8	A/Duck/Australia/341/83	128	—	—

## 【0068】

表10から明らかなように、このイムノクロマトキットは、インフルエンザウイルスH5亜型以外のインフルエンザウイルスとは反応せず、H5亜型に対して特異的に反応することが示された。

## 【0069】

実施例7（インフルエンザウイルスH5N1を接種したニワトリのクロアカスワブ等からのウイルス抗原の検出）

インフルエンザウイルスH5N1（A/Chicken/Yamaguchi/7/04、以下「山口株」と略称）をニワトリに接種し、当該ウイルスを感染させたニワトリの気管スワブ及びクロアカスワブを採取し、イムノクロマトキットによるウイルス抗原の検出を実施した。また死亡鳥から気管、腎臓、結腸を採取し、臓器乳剤を作製し、イムノクロマトキットによるウイルス抗

10

20

30

40

50

原の検出を実施した。

感染対象鳥として、ポリスブラウン種を用いた。ウイルス液を経鼻的にニワトリに接種し、死亡するまで毎日クロアカスワブ及び気管スワブを接種した。

気管スワブ及びクロアカスワブは検体希釈液に懸濁し被験試料とした。各種臓器はそれぞれ無菌的に採材し、採材した各臓器重量に対し9倍量のPBSを添加し、磨り潰すことで10%臓器乳剤を作製した。そして本乳剤を遠心分離し、遠心分離上清を被験試料とした。これらの被験試料を実施例2にて作製したイムノクロマトキット（捕捉部位に固定する抗H5抗体としてNo.64を用い、金コロイド標識抗体の抗H5抗体としてNo.64を用いた）の試験に供した。そして、捕捉部位の呈色の程度を、目視で、-（着色なし）、±（微弱な着色）、+（明確な着色）、++（顕著な着色）、+++（より顕著な着色）の5段階で評価した。結果を表11及び表12に示した。なお、表11及び表12中、dは日数を示し、(D)はその日に死亡したことを意味する。

また、上記気管スワブ及び上記クロアカスワブ並びに各種臓器の上記10%臓器乳剤を用いて実施例5と同様の方法でウイルス感染価（ $10^X$  EID<sub>50</sub>/ml or g）を算出し、結果を表11及び表12に示した。

【0070】

【表 1 1】

		気管スワブ		クロアカスワブ	
		イムノクロマト法 目視判定	ウイルス感染価 (10 <sup>x</sup> EID <sub>50</sub> /ml or g)	イムノクロマト法 目視判定	ウイルス感染価 (10 <sup>x</sup> EID <sub>50</sub> /ml or g)
H5N1	# 1	1d	-	3.5	-
	# 2	1d	-	2.3	-
	# 3	2d (D)	+	6.5	±
	# 4	2d (D)	+	6.5	±
	# 5	3d (D)	+	≤ 1.5	±
山口株	# 6	3d (D)	+	4.5	++
	# 7	3d (D)	+	5.3	+
	# 8	3d (D)	+	4.5	+
	# 9	3d (D)	-	3.8	±
	# 10	4d (D)	+	4.0	+

【 0 0 7 1 】

10

20

30

40

【表 1 2】

	気管		腎臓		結腸		
	イムノクロマト法 目視判定	ウイルス感染価 (10 <sup>x</sup> EID <sub>50</sub> /ml or g)	イムノクロマト法 目視	ウイルス感染価 (10 <sup>x</sup> EID <sub>50</sub> /ml or g)	イムノクロマト法 目視	ウイルス感染価 (10 <sup>x</sup> EID <sub>50</sub> /ml or g)	
	#1	1d	-	2.5	-	3.5	-
#2	1d	-	≤ 0.8	-	-	-	-
#3	2d (D)	++	6.5	++	8.5	++	7.3
#4	2d (D)	+	7.3	++	7.5	++	7.3
#5	3d (D)	+	7.2	+	7.3	+	6.3
#6	3d (D)	+	6.3	++	7.5	++~+++	7.3
#7	3d (D)	+	6.5	+	8.5	+	6.0
#8	3d (D)	+	5.5	++	8.8	+	7.5
#9	3d (D)	±	6.0	±	7.5	±	6.8
#10	4d (D)	+	6.3	++	8.5	++~+++	7.3

H5N1

山口株

10

20

30

40

表 1 1 よりウイルス接種 2 日後より気管スワブ及びクロアカスワブにおいて抗原検出が確認された。したがって、本発明によれば感染後数日経過後の感染鳥であれば、気管及びクロアカからのウイルス抗原の検出が可能である。また、表 1 1 から、本発明のイムノクロマト法による検出結果は、ウイルス分離によるウイルス感染価とも一致することがわかる。

【 0 0 7 3 】

表 1 2 から、本発明によれば、すべての臓器乳剤からウイルス抗原を検出することが可能であることがわかる。以上の結果より、本発明によれば、感染鳥の各種部位から採取した検体を用いてウイルスを高感度に検出できることが確認された。また、表 1 2 から、本発明のイムノクロマト法による検出結果は、ウイルス分離によるウイルス感染価とも一致することがわかる。

10

【産業上の利用可能性】

【 0 0 7 4 】

本発明は、インフルエンザウイルス H 5 亜型のヘマグルチニン蛋白に対する抗体を用いたサンドイッチ式免疫測定法、特に、イムノクロマトグラフィー測定法およびイムノクロマト法テストストリップを提供するものであり、インフルエンザウイルス H 5 亜型に属するウイルスを特異的に簡単な方法で迅速に検出できるので、当該ウイルスに起因する鳥、ヒト等の疾病を迅速かつ簡便に診断するために有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 5 】

20

【図 1】 a はイムノクロマト法テストストリップの平面図、 b は a で示されたイムノクロマト法テストストリップの縦断面図。

【図 2】 実施例 6 の結果を示すグラフである。

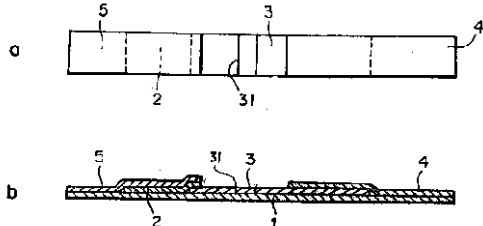
【符号の説明】

【 0 0 7 6 】

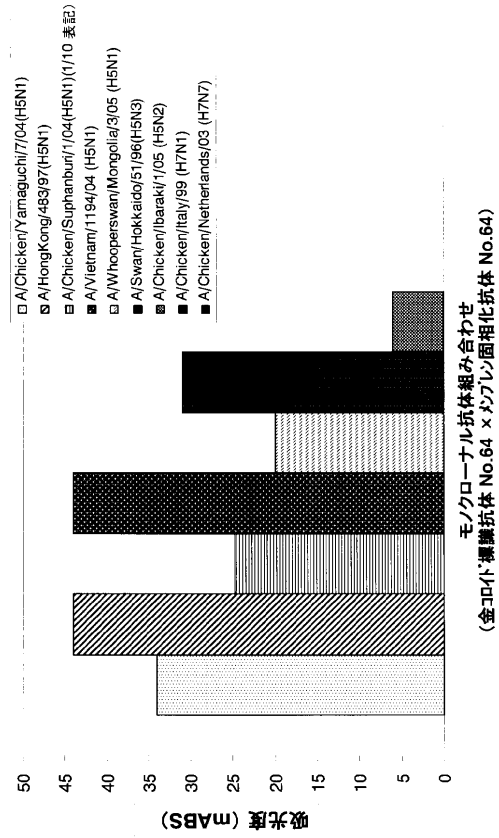
- 1 粘着シート
- 2 含浸部材
- 3 膜担体
- 3 1 捕捉部位
- 4 吸収用部材
- 5 試料添加用部材

30

【図1】



【図2】



【配列表】

0005525688000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 14/11 (2006.01) C 1 2 N 15/00 C  
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 0 7 K 14/11  
C 1 2 P 21/08

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第2005/007697(WO, A1)  
PHILPOTT M. et al., Neutralizing epitopes of the H5 hemagglutinin from a virulent avian influenza virus and their relationship, J Virol., 1989年 8月, Vol.63. No.8, p.3453-3458  
Ya Ha et al., The EMBO Journal, 2002年 3月, Vol.21, No.5, P.865-875

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
P u b M e d  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

