

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/093217

発行日 平成25年6月6日 (2013.6.6)

(43) 国際公開日 平成23年8月4日 (2011.8.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/10 (2006.01)	C O 7 K 16/10	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A C	4 B O 6 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 L	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 1 1 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2011-551827 (P2011-551827)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2011/051060
 (22) 国際出願日 平成23年1月21日 (2011.1.21)
 (31) 優先権主張番号 特願2010-18741 (P2010-18741)
 (32) 優先日 平成22年1月29日 (2010.1.29)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 306008724
 富士レビオ株式会社
 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
 (74) 代理人 100088546
 弁理士 谷川 英次郎
 (72) 発明者 宮川 英二
 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
 (72) 発明者 内田 好昭
 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
 (72) 発明者 白川 貴志
 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

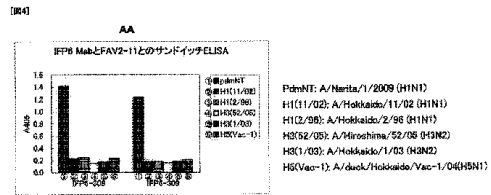
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗Pandemic (H1N1) 2009抗体及びそれを用いた免疫測定方法

(57) 【要約】

要約

ブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009を他のヒトA型インフルエンザウイルスと区別して簡便かつ迅速に検出可能な手段が開示されている。本発明の抗体又はその抗原結合性断片は、Pandemic (H1N1) 2009のアミノ酸配列中のaa420-434の領域を免疫原として作出されたものであり、該領域をエピトープとし、Pandemic (H1N1) 2009の核タンパク質と特異的に結合する。該抗体又はその抗原結合性断片を利用すれば、検体中のPandemic (H1N1) 2009を他のA型ウイルスと区別して簡便に検出できる。



AA SANDWICH ELISA OF IFP6 Mab AND FAV2-11

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列表の配列番号 2 に示すブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009のアミノ酸配列中のaa420-434の領域をエピトープとし、Pandemic (H1N1) 2009の核タンパク質と特異的に結合する抗Pandemic (H1N1) 2009抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 2】

Pandemic (H1N1) 2009以外のヒトインフルエンザウイルスの核タンパク質とは実質的に結合しない請求項 1 記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 3】

配列表の配列番号 3 に示すアミノ酸配列からなるペプチドを動物（ヒトを除く）に免疫することにより作製される請求項 1 又は 2 記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 4】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合性断片と、検体中のPandemic (H1N1) 2009の核タンパク質との抗原抗体反応を利用した免疫測定により、検体中のPandemic (H1N1) 2009を測定することを含む、ブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009の測定方法。

【請求項 6】

前記免疫測定は固相化抗体及び標識抗体を用いたサンドイッチ法により行なわれ、固相化抗体及び標識抗体の少なくともいずれか一方に前記抗Pandemic (H1N1) 2009抗体又はその抗原結合性断片が用いられる請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記免疫測定は固相化抗体及び標識抗体を用いたサンドイッチ法により行なわれ、固相化抗体及び標識抗体のいずれか一方に前記抗Pandemic (H1N1) 2009抗体又はその抗原結合性断片を用い、他方にPandemic (H1N1) 2009及びPandemic (H1N1) 2009以外のヒトA型インフルエンザウイルスの両者と抗原抗体反応する抗体又はその抗原結合性断片を用いる請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合性断片を含む、ブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009の測定キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009と特異的に反応する抗体又はその抗原結合性断片、及びこれを用いたPandemic (H1N1) 2009の測定方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

2009年4月、世界保健機構（WHO）は、これまでにヒトで感染の報告がない新型のインフルエンザウイルスの発生を確認した。この新型インフルエンザウイルスは、ブタに由来する抗原型H1N1のA型インフルエンザウイルスであり、短期間のうちに全世界に蔓延して大流行を引き起こしている。WHOでは現在この新型インフルエンザウイルスを「Pandemic (H1N1) 2009」と呼んでいる。日本においては一般に「新型インフルエンザウイルス」と呼ばれている。

【0003】

現在市販されているインフルエンザウイルス検出のための簡易キットは、核タンパク質（NP）に対する抗体を利用しているものが多いが、これらはA型共通に反応する。新型インフルエンザウイルスはA型であるから、市販の簡易キットで検出されるが、新型のみを

10

20

30

40

50

検出することはできない。そのため、新型インフルエンザの確定診断を行なうためには、PCRで最終的な確認をする必要がある（非特許文献1～4参照）。PCR法は測定感度は高いが、コスト、操作及び設備の面で問題となる場合がある。例えば、PCRを行なうための設備を持たない国・地域においては、確定診断するためにWHOや他国を頼らざるを得ない。

【0004】

新型インフルエンザウイルスのみに反応する抗体が存在すれば、PCRのための設備を持たない国・地域であっても、簡便な操作で迅速に新型インフルエンザの確定診断を行なうことが可能になる。しかしながら、A型の中で新型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009のみを認識できる抗体は報告されていない。市販のインフルエンザウイルス亜型鑑別キットの中には、新型と他のA型との間で反応の強弱に違いのある抗体を利用したものが存在するが、このような抗体のみでは定性的な判断が困難である。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】NITE/NIID Protocol for Sequencing Influenza A (H1N1) SWL Viral Genome Segments, version 1.2 (30 May 2009)

【非特許文献2】WHO "Sequencing primers and protocol", 12 May 2009 (first published 29 April 2009)

【非特許文献3】WHO "WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans-revised", publication date: 23 November 2009

20

【非特許文献4】吉田宏、「新型インフルエンザ対策は地道に」、「第4回 流行先回りする備えを」、[online]、2009年9月18日、Science Portal（独立行政法人科学技術振興機構）、[平成22年1月4日検索]、インターネット<<http://scienceportal.jp/HotTopics/interview/interview43/04.html>>

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、本発明は、Pandemic (H1N1) 2009を他のヒトA型インフルエンザウイルスと区別して簡便かつ迅速に検出可能な手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

30

【0007】

本願発明者らは、新型インフルエンザウイルス特異的抗体の作製及び利用を行なうことを立案した。NPはインフルエンザウイルスA型において保存性が高く、そのため、亜型を区別できる抗体を作出するにはNPはターゲットとして不向きであると通常考えられている。実際、既存の簡易キットは、NPをターゲットとした抗体を用いてA型全般を検出可能にしている。亜型の区別には、変異が起こる頻度が高いヘマグルチニン（HA）をターゲットとすることが通常は望ましい。しかしその一方、ウイルス中のHAの含有率はNPに比べ低いため、本願発明者らは、より高感度で検出するためにはNPが適していると考えた。そこで、NPのアミノ酸配列を新型とその他のインフルエンザウイルスとの間でアラインメントし、鋭意検討した結果、新型特異的なアミノ酸置換が起こっている領域を見出した。そして、その領域をエピトープとするモノクローナル抗体の作出に成功し、さらに、該抗体を利用して新型インフルエンザウイルスのみを検出可能な免疫測定系を確立することに成功し、本願発明を完成した。

40

【0008】

すなわち、本発明は、配列表の配列番号2に示すブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009のアミノ酸配列中のaa420-434の領域をエピトープとし、Pandemic (H1N1) 2009の核タンパク質と特異的に結合する抗Pandemic (H1N1) 2009抗体又はその抗原結合性断片を提供する。また、本発明は、上記本発明の抗体又はその抗原結合性断片と、検体料中のPandemic (H1N1) 2009の核タンパク質との抗原抗体反応を利用した免疫測定により、検体中のPandemic (H1N1) 2009を測定することを含む、ブタ由来ヒトA型イ

50

ンフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009の測定方法を提供する。さらに、本発明は、抗体又はその抗原結合性断片を含む、ブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009の測定キットを提供する。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、新型インフルエンザウイルスであるブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009を特異的に検出できる抗Pandemic (H1N1) 2009抗体及びその抗原結合性断片が初めて提供され、また、該抗体又はその抗原結合性断片を用いたPandemic (H1N1) 2009の免疫測定方法が初めて提供された。従来法では、Pandemic (H1N1) 2009であるか否かを確定するためには、PCR等によりウイルスのゲノム配列を確認する必要があった。A型と新型との間で反応の強弱に差異のある抗体も知られているが、このような抗体では定性的な判断が困難である。一方、本発明の抗Pandemic (H1N1) 2009抗体又はその抗原結合性断片によれば、1回の免疫測定のみで新型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009を検出可能になる。本発明の抗Pandemic (H1N1) 2009抗体又はその抗原結合性断片を用いて簡易キットを作製すれば、複数のキットを組み合わせて使用したり、あるいはPCR等によりゲノム配列を最終的に確認することなく、単独のキットのみで迅速・簡便にPandemic (H1N1) 2009を検出可能になる。本発明の抗体又はその抗原結合性断片は他のA型との交差反応性も極めて低く、定性的な判断を簡便・迅速に行なうことができるため、臨床現場で非常に有利である。

10

【図面の簡単な説明】

20

【0010】

【図1】実施例で免疫原として用いたペプチド6-INF420-434と、各種A型インフルエンザウイルスの対応領域とのアラインメントを示す図である。

【図2】実施例で確立した抗Pandemic (H1N1) 2009抗体について、ウエスタンブロットにより反応の特異性を確認した結果を示す図である。

【図3】組み換え核タンパク質を固相化したプレート及び実施例で確立した抗Pandemic (H1N1) 2009抗体を用いてELISAを行ない、抗体の特異性を確認した結果を示す図である。

【図4】実施例で確立した抗Pandemic (H1N1) 2009抗体を用いて構築したサンドイッチELISA測定系により、各種A型インフルエンザウイルス試料を測定した結果を示す図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の抗体が認識するインフルエンザウイルスは、2009年に世界的大流行を起こし始めたブタ由来のヒトA型インフルエンザウイルスの亜型である。日本では一般に「新型インフルエンザウイルス」と呼ばれており、WHOでは「Pandemic (H1N1) 2009」との称呼が公式に用いられている。本明細書においては、このインフルエンザウイルスを「Pandemic (H1N1) 2009」という。Pandemic (H1N1) 2009のNP遺伝子の塩基配列及びNPのアミノ酸配列の代表例を配列表の配列番号1及び2に示す。該配列は、Pandemic (H1N1) 2009の分離株の一つであるA/California/07/2009(H1N1)のNPのアミノ酸配列であり、GenBankにアクセッション番号GQ338390(塩基配列)及びACS94534(アミノ酸配列)で登録されている。

40

【0012】

本発明の抗体は、Pandemic (H1N1) 2009のNPのaa420-434(第420番アミノ酸～第434番アミノ酸の意)の領域をエピトープとする。配列番号3には、このaa420-434の領域のアミノ酸配列を取り出して示す。ここで、「aa420-434の領域をエピトープとする」という表現には、aa420-434の全長をエピトープとすることのみならず、aa420-434の領域内の一部の領域をエピトープとすることも包含される。下記実施例に記載されるように、この領域全長からなるペプチドを免疫原として用いて作製された抗体は、Pandemic (H1N1) 2009のNPと特異的に結合するが、そもそもの免疫原が配列番号3に示されるaa420-434の領域からなるペプチドであるから、当然ながら、該抗体はNPのうちのaa420-434の領域(全長又はその一部)を認識して結合しているのであり、エピトープはNPのaa420-434の領域(全長又はその一部)ということになる。従って、配列番号3に示されるアミノ酸配列から

50

なるペプチドを動物（ヒトを除く）に免疫することにより作製された抗体は、Pandemic（H1N1）2009のNPのaa420-434の領域をエピトープとする抗体に該当し、本発明の範囲に含まれる。なお、本発明において、「配列番号2に示すアミノ酸配列中のaa420-434の領域」とは、単に配列番号2に示すアミノ酸配列を基準としてアミノ酸残基の位置を示しているに過ぎず、対象のPandemic（H1N1）2009が配列番号2に示すアミノ酸配列からなるNPを有するウイルスに限定されるものではない。

【0013】

本発明の抗体は、Pandemic（H1N1）2009のNPに特異的に結合する。ここで、「特異的に結合する」とは、Pandemic（H1N1）2009のNPとのみ結合し、他のヒトインフルエンザウイルスのNPとは実質的に結合しないことを意味する。「実質的に結合しない」とは、他のヒトインフルエンザウイルスのNPとは検出可能なレベルで結合しない（すなわち、他のヒトインフルエンザウイルスのNPとの結合がバックグラウンド以下である）か、又は検出し得るレベルで結合しても、その結合の程度がPandemic（H1N1）2009のNPとの結合よりも明らかに少なく、Pandemic（H1N1）2009のNPと結合しているわけではないことが当業者にとって明瞭な程度にしか結合しないことを意味する。好ましくは、本発明の抗体は、Pandemic（H1N1）2009のNPとのみ結合し、他のヒトインフルエンザウイルスのNPとは検出可能なレベルで結合しない。他のヒトインフルエンザウイルスとしては、例えば、Aソ連型やA香港型等の季節性のインフルエンザウイルスが挙げられる。下記実施例に記載されるように、A型間ではNP配列の保存性が非常に高いが、本発明の抗体はPandemic（H1N1）2009以外のA型インフルエンザウイルスとは結合せず、Pandemic（H1N1）2009のみを特異的に検出することが可能である。なお、本明細書において、「ヒトインフルエンザウイルス」とは、ヒトからヒトへの感染力を有するインフルエンザウイルスである。

【0014】

本発明の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よいが、免疫測定等のためには、再現性の高いモノクローナル抗体が好ましい。

【0015】

本発明の抗体は、配列番号3に示すアミノ酸配列からなるペプチドを免疫原として使用し、周知の常法に従い、該ペプチドを適宜アジュバントとともに動物（ヒトを除く）に免疫することで作製することができる。このような低分子のペプチドは単独では免疫原性が低いいため、通常はキャリアタンパク質とコンジュゲートして使用する。キャリアタンパク質としては、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）やカゼイン等、種々のものが公知であり、いずれを用いてもよい。コンジュゲートの方法も各種の方法が公知である。例えば、MBS（マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド）法によりペプチドとキャリアタンパク質をコンジュゲートする場合には、ペプチドにシステインを付加し、架橋剤を用いてシステインのチオール基（-SH）とキャリアタンパクのアミノ基（-NH₂）とを結合させることができる。本発明において、「配列番号3に示すアミノ酸配列からなるペプチドを免疫する」といった場合には、キャリアタンパク質とコンジュゲートした形態のペプチドを免疫することも含まれる。このようにして、適宜アジュバントとともに動物（ヒトを除く）に該ペプチドを免疫することで、配列番号3に示すアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体を誘起することができる。

【0016】

モノクローナル抗体の作製方法も周知の常法である。具体的には、例えば、免疫した動物から採取した脾細胞やリンパ球のような抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを調製し、配列番号3に示すペプチド又はPandemic（H1N1）2009のNPと結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、これを増殖させて培養上清から抗Pandemic（H1N1）2009モノクローナル抗体を得ることができる。

【0017】

本発明の抗体から抗原結合性断片を調製することも可能である。「抗原結合性断片」とは、例えば免疫グロブリンのFab断片やF(ab')₂断片のような、当該抗体の対応抗原に対する結合性（抗原抗体反応性）を維持している抗体断片を意味する。このような抗原結合性

10

20

30

40

50

断片も免疫測定に利用可能であることは周知であり、もとの抗体と同様に有用である。Fab断片やF(ab')₂断片は、周知の通り、モノクローナル抗体をパインやペプシンのようなタンパク分解酵素で処理することにより得ることができる。なお、抗原結合性断片は、Fab断片やF(ab')₂断片に限定されるものではなく、対応抗原との結合性を維持しているいかなる断片であってもよく、遺伝子工学的手法により調製されたものであってもよい。また、例えば、遺伝子工学的手法により、一本鎖可変領域 (scFv: single chain fragment of variable region) を大腸菌内で発現させた抗体を用いることもできる。scFvの作製方法も周知であり、上記の通りに作製したハイブリドーマのmRNAを抽出し、一本鎖cDNAを調製し、免疫グロブリンH鎖及びL鎖に特異的なプライマーを用いてPCRを行なって免疫グロブリンH鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を増幅し、これらをリンカーで連結し、適切な制限酵素部位を付与してプラスミドベクターに導入し、それで大腸菌を形質転換し、大腸菌からscFvを回収することによりscFvを作製することができる。このようなscFvも「抗原結合性断片」として本発明の範囲に包含される。

10

20

30

40

50

【0018】

本発明の抗体又はその抗原結合性断片を用いた免疫測定によれば、NP配列の保存性が非常に高いA型間であっても、Pandemic (H1N1) 2009のみを特異的に認識することができる。すなわち、本発明はまた、上記本発明の抗体又はその抗原結合性断片と、被検試料中のPandemic (H1N1) 2009の核タンパク質との抗原抗体反応を利用した免疫測定により、被検試料中のPandemic (H1N1) 2009を測定することを含む、ブタ由来ヒトA型インフルエンザウイルスPandemic (H1N1) 2009の測定方法を提供する。なお、本発明において、「測定」という語には、検出、定量、半定量が包含される。

【0019】

免疫測定自体はこの分野において周知であり、反応様式で分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法、ウェスタンブロット法等がある。また、標識で分類すると、放射免疫測定、蛍光免疫測定、酵素免疫測定、ビオチン免疫測定等があり、いずれの方法を用いてもPandemic (H1N1) 2009を免疫測定することができる。特に限定されないが、サンドイッチ法や凝集法は、操作が簡便で大掛かりな装置等を必要としないため、本発明の測定方法として好ましく適用することができる。中でも、医療現場で迅速・簡便にPandemic (H1N1) 2009を検出する観点からは、サンドイッチELISAやイムノクロマトグラフィー等のサンドイッチ法がより好ましい。

【0020】

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Pandemic (H1N1) 2009抗体（ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも可）を固相に不動化し、検体と反応させ、洗浄後、標識した抗ヒトA型インフルエンザウイルス抗体（Pandemic (H1N1) 2009以外のヒトA型インフルエンザウイルスとも結合可能なものでよく、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも可）を反応させ、洗浄後、固相に結合した標識抗体を測定する。これによりPandemic (H1N1) 2009を測定することができる。固相化抗体と標識抗体はこの逆であってもよい。なお、免疫測定では、抗体に代えて、該抗体の抗原結合性断片を用いることもできる。

【0021】

この分野で周知の通り、インフルエンザウイルスのNPは3量体で存在しているので、固相化抗体と標識抗体が同一の抗体であっても、インフルエンザウイルスNPのサンドイッチアッセイが可能である。従って、本発明の方法においては、Pandemic (H1N1) 2009のNPに特異的に結合する同一の抗体を固相化抗体と標識抗体の両者に用いることも可能である。抗Pandemic (H1N1) 2009抗体を固相化抗体及び標識抗体のいずれか一方にのみ用いる場合、他方としては、例えば、Pandemic (H1N1) 2009以外のヒトA型インフルエンザウイルスNPとも結合する、A型を共通して検出可能な抗体を用いることができるし、あるいは、上記本発明の抗Pandemic (H1N1) 2009抗体とは異なる部位でPandemic (H1N1) 2009のNPと結合する抗Pandemic (H1N1) 2009 NP抗体を他方の抗体として用いることもできる。ここで、A

型を共通して認識可能な抗体とは、具体的には、A型インフルエンザウイルスの各種亜型のNPに共通して結合するA型検出用抗体であり、B型インフルエンザウイルスNPとは実質的に、好ましくは検出可能なレベルで結合しないものである。そのような抗ヒトA型インフルエンザウイルスNP抗体は各種のものが公知であり、市販のインフルエンザ検査キットにも用いられているので、入手は容易である。

【0022】

イムノクロマトグラフィー自体及びそれに用いられる器具（以下、「イムノクロマト器具」と呼ぶことがある）は周知であり、ヒトインフルエンザウイルスを検出するイムノクロマトグラフィー用キットが各種市販されている。ラテラルフロー方式のイムノクロマトグラフィーの具体例を以下に簡単に説明する。ニトロセルロース膜のような多孔性素材からなる、通常、帯状のマトリックス上に、本発明の抗Pandemic (H1N1) 2009モノクローナル抗体を固相化した検出ゾーンと、その上流（後述の展開液が流れる方向における上流側）に位置し、標識した抗ヒトA型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体（Pandemic (H1N1) 2009以外のヒトA型インフルエンザウイルスとも結合する）を点着した標識試薬ゾーンを含む。標識試薬ゾーンには検体が添加され、かつ、標識抗体は、標識試薬ゾーンから流出してマトリックス内を流れる必要があるため、通常、標識試薬ゾーンは、標識抗体を点着した多孔性のパッドにより構成される。マトリックスの上流端には、展開液を貯蔵した展開液槽が設けられている。さらに、通常、上記検出ゾーンの下流に、標識抗体の展開が起きたかどうかを確認するための、抗標識抗体を固相化した展開確認部と、さらにその下流に、流れて来た展開液を吸収するための多孔性の吸収パッドが設けられた展開液吸収ゾーンで構成されている。さらに、標識が酵素標識である場合には、標識試薬ゾーンよりも上流に、標識酵素の基質を点着した基質ゾーンが設けられている。

10

20

30

【0023】

使用時には、検体を標識試薬ゾーンに添加し、展開液槽を破って展開液をマトリックスの上端部に施す。展開液は、マトリックスの毛管現象により下流に向かって流れる。展開液が基質ゾーンを通過する際に基質が展開液中に溶出され、基質を含む展開液が流れていく。展開液が標識試薬ゾーンを通過する際に、標識抗体と検体とが展開液中に溶出され、基質、標識抗体及び検体を含む展開液が流れていく。検体中にPandemic (H1N1) 2009が含まれる場合には、該ウイルスのNPと標識抗体が、抗原抗体反応により結合する。これらの混合物が検出ゾーンまで流れてくると、検出ゾーンにおいて、固相化抗体と該ウイルスのNPとが抗原抗体反応により結合する。その結果、該ウイルスのNPを介して標識抗体が検出ゾーンに固定される。従って、検出ゾーンに固定された標識を測定することにより、該ウイルスを検出することができる。検体中にPandemic (H1N1) 2009が含まれていない場合には、固相化抗体には何も結合されないため、標識抗体は検出ゾーンに固定されず、より下流に流れていく。従って、検出ゾーンでは標識は検出されない。検出ゾーンの下流の展開液確認部には、抗標識抗体が固相化されているため、標識抗体は展開液確認部に固定される。展開液確認部に標識が検出された場合には、展開液はそこまで正しく流れて来たということが確認される。展開液は、さらにその下流の吸収パッドに吸収される。

【0024】

なお、上記したイムノクロマト器具の例では、抗Pandemic (H1N1) 2009モノクローナル抗体を固相化抗体とし、Pandemic (H1N1) 2009以外のヒトA型インフルエンザウイルスとも結合する抗ヒトA型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を標識抗体として説明したが、固相化抗体と標識抗体はこの逆であってもよい。固相化抗体と標識抗体をどちらも同一の抗Pandemic (H1N1) 2009モノクローナル抗体としてもよい。

40

【0025】

本発明の免疫測定方法に適用される検体としては、Pandemic (H1N1) 2009が含まれているか否かを検出したい検体であれば何でもよく、血液（全血、血漿、血清を包含）、唾液、痰等の体液や、粘膜のぬぐい液、器具や設備のぬぐい液等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0026】

50

本発明の抗Pandemic (H1N1) 2009抗体又はその抗原結合性断片は、免疫測定に用いる試薬類等と組み合わせて、Pandemic (H1N1) 2009測定キットとして提供することができる。抗Pandemic (H1N1) 2009抗体又はその抗原結合性断片は、プレートやニトロセルロース膜等の固相に不動化した形態であってよい。免疫測定に必要なその他試薬類は、通常の免疫測定キットに含まれるものと同様でよい。該キットは、例えば、上記したイムノクロマト器具であり得る。

【実施例】

【0027】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0028】

1. Pandemic (H1N1) 2009に特異的な領域の検索

Pandemic (H1N1) 2009分離株数種 (A/California/07/2009(H1N1) [GenBank ACS94534]、A/California/14/2009(H1N1) [GenBank ACQ76305]など) 及び季節性のA型インフルエンザウイルス数種 (A/Puerto Rico/8/34(H1N1) [GenBank ABP64722]、A/New Caledonia/20/1999(H1N1) [GenBank ACX46209]、A/USSR/92/77(H1N1) [GenBank ABD60937]、A/Brazil/11/1978(H1N1) [GenBank BAA00475]、A/Chile/1/1983(H1N1) [GenBank ABO38344]、A/Texas/36/1991(H1N1) [GenBank ACF41937]、A/Beijing/262/1995(H1N1) [GenBank ACF41871]など) のNPアミノ酸配列をアラインメントし、Pandemic (H1N1) 2009に特異的な配列領域の候補としてaa420-434のFERATVMAAFSGNNE (配列番号3) を見出した。配列番号3 (ペプチド6-INF420-434) と代表的なA型インフルエンザウイルス分離株とのアラインメントを図1に示す。

【0029】

上記で見出したPandemic (H1N1) 2009のNPのaa420-434の配列の特異性を調べるため、該配列をデータベース検索 (BLAST及びFASTA) にかけた。その結果を表1に示す。

【0030】

【表1-1】

ウイルス株	亜型	株数
ヒト新型	H1N1	81
swine	H1N1	40
	H1N2	27
	H3N2	14
	H3N1	2
	H2N3	1
turkey	H3N2	4
	H1N1	5
duck	H1N2	1
	H3N8	1
chicken	H1N1	1
Mallard	H3N2	1
		計178

【0031】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

その他のヒト分離株(全てブタ由来)

A/Ontario/1252/2007(H3N2)	1
A/Maryland/12/1991(H1N1)	1
A/Iowa/CEID23/2005(H1N1)	1
A/Ohio/3523/1988(H1N1)	1
A/Ohio/3559/1988(H1N1)	1
A/Wisconsin/10/1998(H1N1)	1
	計6

10

【 0 0 3 2 】

登録されているPandemic (H1N1) 2009 (表 1 中では「ヒト新型」と示す) の分離株81株は全てこれと同一の配列を含んでいた。その他のヒト分離株では6株が検出されたのみであり、この6株はいずれもブタ由来のウイルスであった。ヒト分離株以外では、swineを中心に92株が検出された。以上より、この領域の配列はヒト分離株ではPandemic (H1N1) 2009に特異的であり、ヒト以外ではswine分離株で該配列が見出されたことは、Pandemic (H1N1) 2009がブタを起源とすることと一致する。この配列を認識する抗体を取得できればPandemic (H1N1) 2009の特異的検出が可能になると考えられた。

20

【 0 0 3 3 】

2. Pandemic (H1N1) 2009特異的抗体の作製

上記で同定したPandemic (H1N1) 2009特異的配列 (配列番号 3) からなるペプチド6-IN F420-434を免疫原として用いてPandemic (H1N1) 2009特異的抗体の作出を試みた。

【 0 0 3 4 】

6-INF420-434は常法により合成した。6-INF420-434のN末端にはシステインを付加し、このシステイン中のチオール基を用いてMBS (マレイミドベンゾイルオキシコハク酸イミド) 法によりサイログロブリン (CALBIOCEM) を結合させた。これをフロイントアジュバント (DIFCO) とともにマウスに免疫し、常法のハイブリドーマ法により、免疫原に対する抗体を産生するハイブリドーマを作製した。Pandemic (H1N1) 2009のNP全長をスクリーニングに用いて、ELISA分析により、該NPに結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、モノクローナル抗体を2ライン取得した (IFP6-308、IFP6-309)。

30

【 0 0 3 5 】

3. 抗Pandemic (H1N1) 2009抗体の反応性の確認

上記で取得したモノクローナル抗体の反応性をウエスタンブロットにより確認した。ニトロセルロース膜にPandemic (H1N1) 2009 (膜A)、並びに季節性インフルエンザウイルスA/Hokkaido/11/2002 (H1N1) (膜B) 及びA/Hiroshima/52/2005 (H3N2) (膜C) を感染させたMDCK細胞の溶解物を転写し、各種モノクローナル抗体又は血清 (ポリクローナル抗体) で検出した。結果を図 2 に示す。また、図 2 の結果を下記表 2 にまとめて示す。抗体FAV2-11は、市販のインフルエンザ検出キットに使用されている公知の抗A型NP抗体であり、A型を共通して検出可能な抗体である。

40

【 0 0 3 6 】

【表 2】

	pdm H1N1	seasonal H1	seasonal H3
IFP6-308	+	-	-
IFP6-309	+	-	-
FAV2-11	+	+	+
α H1トリ血清	+	+	+
α H3トリ血清	+	+	+

50

【 0 0 3 7 】

6- INF420-434免疫から確立したモノクローナル抗体Mab IFP6-308及びIFP6-309は、Pandemic (H1N1) 2009のNPタンパクに反応し、季節性インフルエンザH1N1とH3N2には反応しないことが確認された。

【 0 0 3 8 】

次に、固相化NPを用いたELISAにより、Mab IFP6-308及びIFP6-309の反応性を確認した。常法によりPandemic (H1N1) 2009及び季節性インフルエンザウイルスの組み換えNPを複製し、これをプレートに固相化して波長405 nmにおける吸光度を測定した。使用した組み換えNPを下記表3に示す。

【 0 0 3 9 】

【表3】

	株名	配列表	GenBank accession No.
NP-NT(pdm)	A/Narita/1/2009(H1N1)	配列番号4	GQ169303 (遺伝子)
		配列番号5	ACR20063 (タンパク質)
NP-NC(H1)	A/New Caledonia/20/99(H1N1)	配列番号6	CY033625 (遺伝子)
		配列番号7	ACF41882 (タンパク質)
NP-KK(H3)	A/Kitakyushu/159/93(H3N2)	配列番号8	AF038254 (遺伝子)
		配列番号9	AAC63462 (タンパク質)

10

【 0 0 4 0 】

結果を図3に示す。この場合にも上記と同様に、Mab IFP6-308及びIFP6-309はPandemic (H1N1) 2009のNPタンパクに反応し、季節性インフルエンザH1N1とH3N2には反応しないことが確認された。

20

【 0 0 4 1 】

4. 抗Pandemic (H1N1) 2009抗体を用いたサンドイッチELISA

上記で確立した抗Pandemic (H1N1) 2009モノクローナル抗体IFP6-308及びIFP6-309を用いて、サンドイッチELISAによるPandemic (H1N1) 2009の測定系を構築した。Mab IFP6-308及びIFP6-309は固相抗体としてプレートに固相化し、各種ヒトA型インフルエンザウイルスを共通して検出可能な公知の抗体FAV2-11を標識抗体として使用した。試料として、以下の6分離株をそれぞれ感染させたMDCK細胞の溶解物を使用し、構築した測定系で測定を行なった。

30

PdmNT: A/Narita/1/2009 (H1N1)

H1(11/02): A/Hokkaido/11/02 (H1N1)

H1(2/96): A/Hokkaido/2/96 (H1N1)

H3(52/05): A/Hiroshima/52/05 (H3N2)

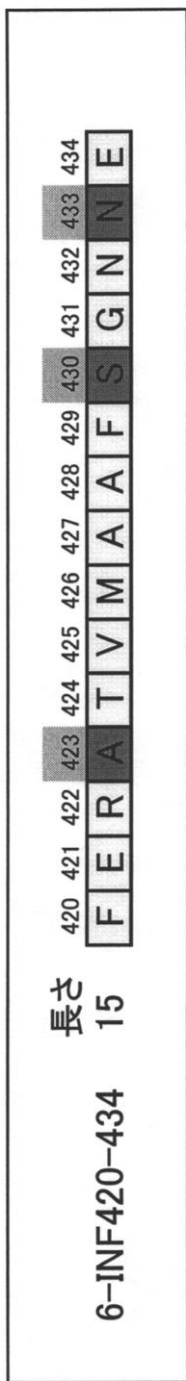
H3(1/03): A/Hokkaido/1/03 (H3N2)

H5(Vac-1): A/duck/Hokkaido/Vac-1/04(H5N1)

【 0 0 4 2 】

結果を図4に示す。上記で確立した抗Pandemic (H1N1) 2009抗体をサンドイッチの固相固体として用いた本測定系では、Pandemic (H1N1) 2009以外への交叉反応性は極めて低いことが確認された。このように、上記で確立した抗Pandemic (H1N1) 2009抗体を用いた測定系によれば、単一回の免疫測定のみで、Pandemic (H1N1) 2009を他のA型インフルエンザウイルスと区別して簡便・迅速に測定可能である。

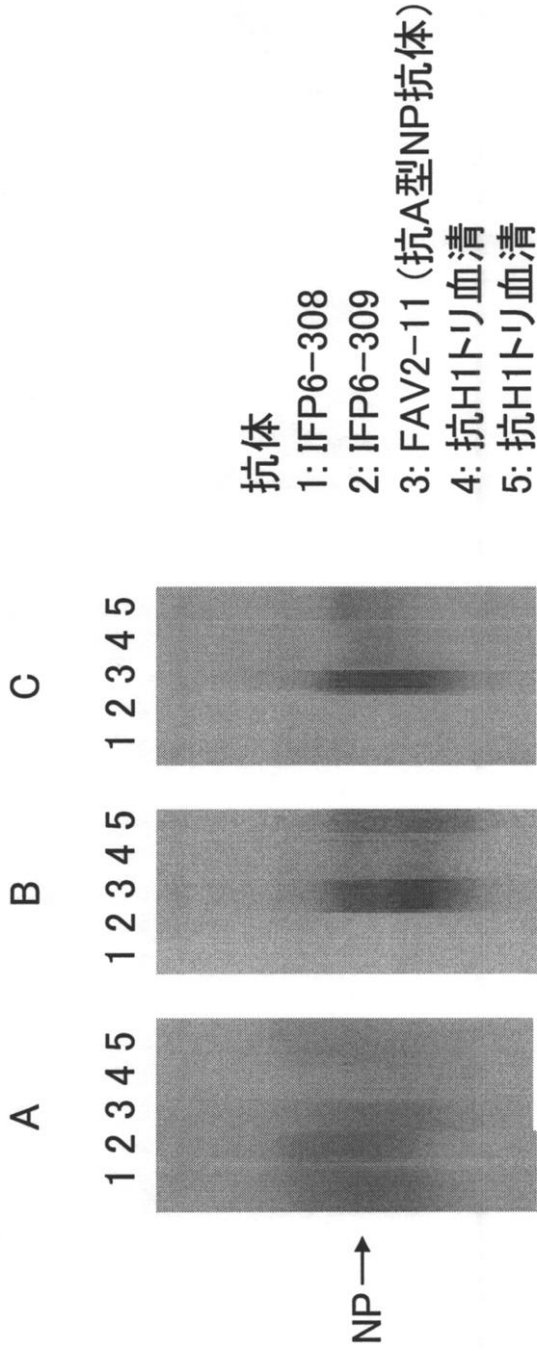
40



6-INF420-434	1	-----	FERATVMAAFSGNNE	-----
ACR20063	1	FSVQRNLP	FERATVMAAFSGNNE	GRTSDMRTE
BAE94700	1	FSVQRNLP	FERATI	MAAFTGNTEGRTSDMRTE
ACF41882	1	FSVQRNLP	FDKTTI	MAAFTGNTEGRTSDMRAE
AAC63462	1	FSVQRNLP	FEKSTVMAAFTGNTE	GRTSDMRAE

ACR20063: A/Narita/1/2009(H1N1) [Pandemic (H1N1) 2009]
 BAE94700: A/duck/Hokkaido/Vac-1/04(H5N1) [トリ分離株]
 ACF41882: A/New Caledonia/20/1999(H1N1) [季節性]
 AAC63462 : A/Kitakyushu/159/93(H3N2) [季節性]

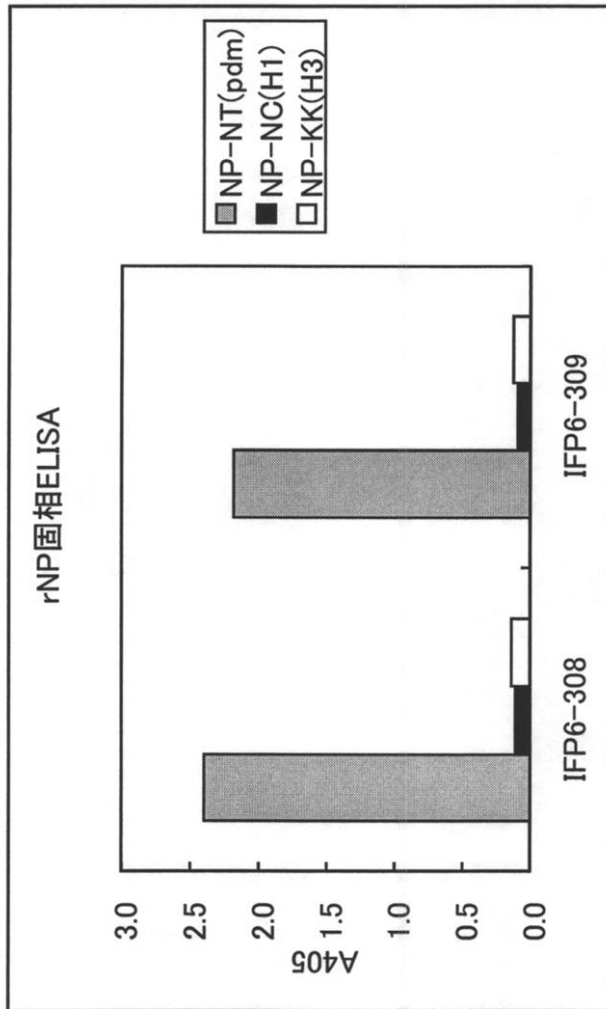
【 図 2 】



ニトロセルロース膜

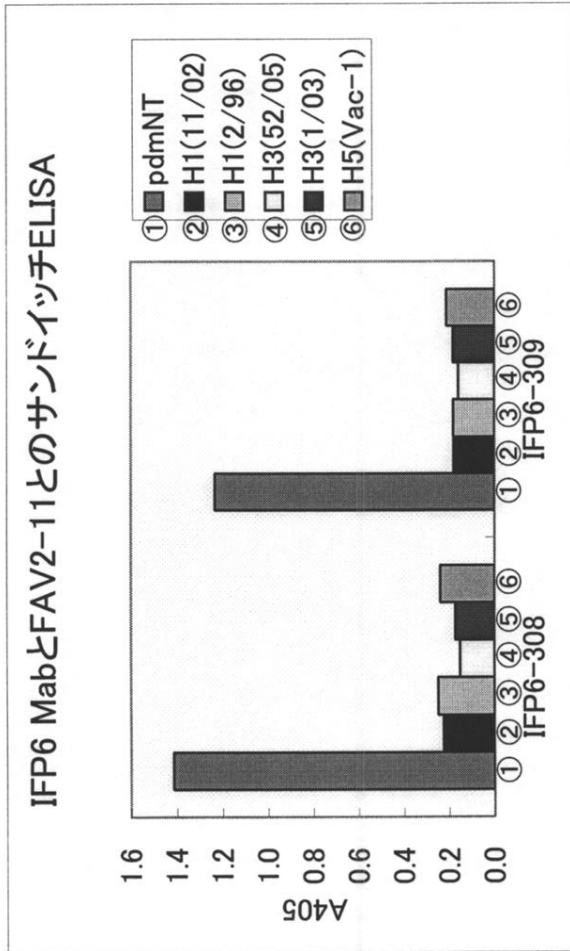
- A: A/Narita/1/2009 (H1N1) infected-MDCK cell lysate
- B: A/Hokkaido/11/2002 (H1N1) infected-MDCK cell lysate
- C: A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) infected-MDCK cell lysate

【 図 3 】



NP-NT(pdm):
A/Narita/1/2009 (H1N1)
NP-NC(H1):
A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
NP-KK(H3):
A/Kitakyushu/159/93 (H3N2)

【 図 4 】



PdmNT: A/Narita/1/2009 (H1N1)
 H1(11/02): A/Hokkaido/11/02 (H1N1)
 H1(2/96): A/Hokkaido/2/96 (H1N1)
 H3(52/05): A/Hiroshima/52/05 (H3N2)
 H3(1/03): A/Hokkaido/1/03 (H3N2)
 H5(Vac-1): A/duck/Hokkaido/Vac-1/04(H5N1)

【 配列表 】

2011093217000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/051060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/02(2006.01)i, C07K16/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/543 (2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08 (2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/02, C07K16/10, C12N15/09, G01N33/543, G01N33/569, G01N33/577, C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIYOSHI-AKIYAMA, T., et al., Development of an immunochromatographic assay specifically detecting pandemic H1N1 (2009) influenza virus., J. Clin. Microbiol., 2010.01.13, Vol.48, No.3, p.703-708	1-8
Y	GARTEN, R.J., et al., Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans., Science, 2009.07.10, Vol.325, No.5937, p.197-201	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 February, 2011 (14.02.11)		Date of mailing of the international search report 22 February, 2011 (22.02.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/051060									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/02(2006.01)i, C07K16/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/02, C07K16/10, C12N15/09, G01N33/543, G01N33/569, G01N33/577, C12P21/08											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	MIYOSHI-AKIYAMA, T., et al., Development of an immunochromatographic assay specifically detecting pandemic H1N1 (2009) influenza virus., J. Clin. Microbiol., 2010.01.13, Vol. 48, No. 3, p. 703-708	1-8									
Y	GARTEN, R. J., et al., Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans., Science, 2009.07.10, Vol. 325, No. 5937, p. 197-201	1-8									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「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 「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 「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) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 14.02.2011		国際調査報告の発送日 22.02.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明	4B 4867								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448								

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/577		B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08		

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

(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 富士レピオ株式会社内

(72)発明者 宮本 和慶

東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レピオ株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA14 BA51 GA01 HA15

4B064 AG27 CA20 DA15

4H045 AA11 DA76 EA50 FA72 FA74

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

专利名称(译)	抗大流行 (H1N1) 2009抗体和使用其的免疫测定方法		
公开(公告)号	JPWO2011093217A1	公开(公告)日	2013-06-06
申请号	JP2011551827	申请日	2011-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	宫川英二 内田好昭 白川貴志 藤井信之 宫本和慶		
发明人	宫川 英二 内田 好昭 白川 貴志 藤井 信之 宫本 和慶		
IPC分类号	C07K16/10 C12N15/02 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/1018 G01N33/56983 G01N2333/11		
FI分类号	C07K16/10 C12N15/00.ZNA.C G01N33/53.D G01N33/569.L G01N33/543.511.N G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA14 4B024/BA51 4B024/GA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA15 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	谷川荣次郎		
优先权	2010018741 2010-01-29 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

总结 公开了一种能够通过简单，快速地将与其他人类甲型流感病毒区分开来检测猪源性人类甲型流感病毒大流行 (H1N1) 2009的方法。本发明的抗体或其抗原结合片段是通过使用大流行性 (H1N1) 2009的氨基酸序列中的aa420-434的区域作为免疫原，并使用该区域作为表位的大流行性 (H1N1) 2009产生的抗体或其抗原结合片段。它与核蛋白特异性结合。通过使用抗体或其抗原结合片段，可以通过将其与其他A型病毒区分开来轻松检测样品中的Pandemic (H1N1) 2009。

