

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] （参考）
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 16/10	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 5
15/02		33/569	L 4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08		33/577	B
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L（全 13数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－314854(P2001－314854)	(71)出願人	591222245 国立感染症研究所長 東京都新宿区戸山一丁目23番1号
(22)出願日	平成13年10月12日(2001.10.12)	(72)発明者	西條 政幸 東京都武蔵村山市学園4－7－1 国立感染症 研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室内
		(72)発明者	新倉 昌浩 東京都武蔵村山市学園4－7－1 国立感染症 研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室内
		(74)代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス（外3 名）
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを認識するモノクローナル抗体

(57)【要約】

【課題】 クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供すること。

【解決手段】 クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を認識するモノクローナル抗体またはその断片。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を認識するモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項2】 クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の201番目から306番目のアミノ酸配列を認識する、請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項3】 クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の1番目から106番目のアミノ酸配列、97番目から208番目もアミノ酸配列、299番目から406番目のアミノ酸配列、及び396番目から482番目のアミノ酸配列を認識しない、請求項1または2に記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項4】 受託番号FERM P-18554またはFERM P-18555を有するハイブリドーマが産生する、モノクローナル抗体またはその断片。

【請求項5】 請求項1から4の何れかに記載のモノクローナル抗体またはその断片をコードする遺伝子。

【請求項6】 請求項1から4の何れかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項7】 クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を含む免疫原で免疫された哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物のミエロマ細胞とを融合して得られる、請求項6に記載のハイブリドーマ。

【請求項8】 受託番号FERM P-18554またはFERM P-18555を有するハイブリドーマ。

【請求項9】 請求項6から8の何れかに記載のハイブリドーマを培養する工程、及び該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を採取し精製する工程を含む、請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項10】 請求項1から4の何れかに記載のモノクローナル抗体またはその断片を用いて免疫アッセイを行うことを特徴とする、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量のための方法。

【請求項11】 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含む、請求項10に記載のクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量のための方法。

(a) 請求項1から4の何れかに記載のモノクローナル抗体またはその断片と試料とを反応させる工程；及び

(b) 工程(1)で形成した抗原抗体複合体と、検出のための標識抗体とを反応させる工程；

【請求項12】 請求項1から4の何れかに記載のモノクローナル抗体を含むことを特徴とする、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを認識するモノクローナル抗体に関する。より詳細には、本発明は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を認識するモノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、並びに該抗体を用いるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの検出及び／又は定量のための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV, ブニヤウイルス科ナイロウイルス属)は、重症のウイルス性出血熱(クリミア・コンゴ出血熱)を起こす。CCHFVは、Hyalomma属のダニを宿主としている。CCHFVは垂直感染によりダニ-ダニ間で維持されている。一方、CCHFV感染ダニに噛まれることによりヒツジやウシなどの家畜がCCHFVに感染する。また、CCHFV感染家畜からダニがCCHFVに感染する。このようにCCHFVはヒツジやウシなどの家畜とダニ間のサイクルおよびダニ-ダニ間のサイクルで維持されている。ヒトは、CCHFV感染ダニに噛まれる経路、CCHFV感染動物の血液・組織に接触して感染する経路、およびCCHFV感染患者に接触して感染する経路で、CCHFVに感染する。

【0003】CCHFV感染症の実験室診断は、抗体の検出(特異的IgG抗体の有意な上昇の確認、特異的IgM抗体の検出)やウイルス抗原の検出(ウイルス分離、RT-PCR法など)によって行うことができる。しかしながら、現在までの所、CCHFV感染症の診断に有用な実用的な高感度のアッセイ系は確立されていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することを解決すべき課題とした。本発明はまた、上記モノクローナル抗体を用いたELISA法により血清及び臓器中のクリミア・コンゴ出血熱ウイルスを特異的に検出する方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、組換えクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いてELISA法により試料中のクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を検出することを試みた結果、この抗体により高感度でクリミア・コンゴ出血熱ウイルス核タンパク質を検出できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0006】即ち、本発明によれば、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を認識するモノクローナル抗体またはその断片が提供される。好ましくは、本発

明の抗体またはその断片は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の201番目から306番目のアミノ酸配列を認識する。

【0007】好ましくは、本発明の抗体またはその断片は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の1番目から106番目のアミノ酸配列、97番目から208番目もアミノ酸配列、299番目から406番目のアミノ酸配列、及び396番目から482番目のアミノ酸配列を認識しない。特に好ましくは、本発明の抗体またはその断片は、受託番号FERM P-18554またはFERM P-18555を有するハイブリドーマが産生する、モノクローナル抗体またはその断片である。

【0008】本発明の別の側面によれば、本発明のモノクローナル抗体またはその断片をコードする遺伝子が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが提供される。本発明のハイブリドーマは好ましくは、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を含む免疫原で免疫された哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物のミエロマ細胞とを融合して得られるものである。本発明のハイブリドーマは特に好ましくは、受託番号FERM P-18554またはFERM P-18555を有するハイブリドーマである。

【0009】本発明のさらに別の側面によれば、本発明のハイブリドーマを培養する工程、及び該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を採取し精製する工程を含む、本発明のモノクローナル抗体の製造方法が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、本発明のモノクローナル抗体またはその断片を用いて免疫アッセイを行うことを特徴とする、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量のための方法が提供される。

【0010】本発明のさらに別の側面によれば、少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含む、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量のための方法が提供される。

(a) 本発明のモノクローナル抗体またはその断片と試料とを反応させる工程；及び(b) 工程(1)で形成した抗原抗体複合体と、検出のための標識抗体とを反応させる工程；

【0011】本発明のさらに別の側面によれば、本発明のモノクローナル抗体を含むことを特徴とする、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量のためのキットが提供される。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施態様及び実施方法について説明する。

1. 本発明のモノクローナル抗体

本発明のモノクローナル抗体は、クリミア・コンゴ出血

熱ウイルスの核タンパク質を認識することを特徴とする。クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの株は特に限定されない。本発明のモノクローナル抗体は、7001株、7803株、78024株、88166株、8402株、66019株などを認識するが、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの任意の株を検出することができる。

【0013】本発明のモノクローナル抗体としては、例えば、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の中央部分のアミノ酸から成るエピトープを認識する。より具体的には、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の201番目から306番目のアミノ酸を認識する。

【0014】このようなモノクローナル抗体の一例としては、本明細書の実施例に記載したモノクローナル抗体1B7及び1F1が挙げられる。モノクローナル抗体1B7を産生するハイブリドーマは、受託番号FERM P-18554として、モノクローナル抗体1F1を産生するハイブリドーマは、受託番号FERM P-18555として平成13年10月5日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）に寄託されている。

【0015】本明細書で抗体と言う場合、全長の抗体だけではなく抗体の断片も包含する意味で使用される。即ち、本発明によれば、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を認識するモノクローナル抗体の断片が提供される。抗体の断片とは、機能性の断片であることが好ましく、例えば、 $F(ab')_2$ 、 Fab' などが挙げられる。 $F(ab')_2$ 、 Fab' とは、イムノグロブリンを、蛋白分解酵素（例えば、ペプシン又はパパイン等）で処理することにより製造されるもので、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体断片である。さらに、本明細書で抗体の断片と言う場合には、該抗体をコードする遺伝子由来の抗原結合部位を含む蛋白質も包含するものとする。

【0016】例えば、IgG1をパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（L鎖可変領域）とCL（L鎖定常領域）からなるL鎖、及びVH（H鎖可変領域）とCHγ1（H鎖定常領域中のγ1領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々 Fab' という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つの Fab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

【0017】また、本発明のモノクローナル抗体は、固相担体などの不溶性担体上に固定された固定化抗体として使用したり、標識物質で標識した標識抗体として使用することができる。このような固定化抗体や標識抗体は全て本発明の範囲内である。

【0018】固定化抗体とは、不溶性担体に物理的吸着あるいは化学的結合等によって担持された状態にある抗体を言う。これらの固定化抗体は、試料（例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる抗原（即ち、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質）を検出、定量、分離または精製するために用いることができる。抗体を固定化するのに使用できる不溶性担体としては、例えば、（1）ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等、並びに（2）セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げることができる。

【0019】標識抗体とは、標識物質で標識された抗体を意味し、これらの標識抗体は、試料（例えば、血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等）中に含まれる抗原（即ち、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質）を検出または定量するために用いることができる。本発明で用いることができる標識物質は、抗体に物理的結合又は化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするものであれば特に限定されない。標識物質の具体例としては、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等が挙げられ、より具体的には、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。標識物質と抗体との結合法は、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法又は過ヨウ素酸法等の公知の方法を用いることができる。

【0020】ここで、放射性同位体及び蛍光物質は単独

で検出可能なシグナルをもたらすことができるが、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルを生じる。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的である。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

【0021】2. 本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ

本発明は、上記したクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を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にも関する。本発明のモノクローナル抗体は当該ハイブリドーマを用いて製造することができる。以下、本発明のクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を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の作製方法を説明する。

【0022】先ず、哺乳動物をクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質で免疫することによって、動物体内で抗体産生細胞を調製する。哺乳動物の種類は特に限定されないが、一般的にはマウス、ラット、ウシ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ等が挙げられ、好ましくはマウス、ラット、ウサギ等のげっ歯類であり、より好ましくはマウスである。マウスの例として、A/J系統、BALB/C系統、DBA/2系統、C57BL/6系統、C3H/He系統、SJL系統、NZB系統、CBA/JN Crj系統のマウスが挙げられる。BALB/C系統のマウスは、ハイブリドーマ作製時に同系統の骨髄腫由来細胞株が確立しているので好ましい。

【0023】免疫に用いるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質（NP）は、天然のNPでも組換え体NPでもよく、化学合成したNPでもよく、またそれらの断片でもよい。好ましくは、組換え体のNPを用いる。免疫前に、NPは、免疫応答を増強させるためにアジュバントと混合してもよい。アジュバントの例としては、油中水型乳剤（例えば、不完全フロイントアジュバント）、水中油中水型乳剤、水中油型乳剤、リポソーム、水酸化アルミニウムゲル、シリカアジュバント、粉末ベントナイト、およびタピオカアジュバントの他に、BCG、*Propionibacterium acnes*などの菌体、細胞壁およびトレハロースダイコレート（TDM）などの菌体成分；グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖体（LPS）およびリピドA画分； β -グルカン（多糖体）；ムラミジペプチド（MDP）；ベスタチン；レバミゾールなどの合成化合物；胸腺ホルモン、胸腺ホルモン液性因子およびタフトシンなどの生体成分由来のタンパク質またはペプチド性物質；ならびに

それらの混合物（例えば、完全フロイントアジュバント）などが挙げられる。これらのアジュバントは、投与経路、投与量、投与時期などに依存して免疫応答の増強または抑制に効果を示す。さらにアジュバントの種類によって、抗原に対する血中抗体産生、細胞性免疫の誘導、免疫グロブリンのクラスなどに差が認められる。それゆえ、目的とする免疫応答に応じて、アジュバントを適切に選択することが好ましい。アジュバントによる処理方法は当該分野で公知である。

【0024】哺乳動物の免疫は、当該分野で公知の方法に従って行われる。例えば、抗原であるNPは、哺乳動物の皮下、皮内、静脈、または腹腔内に注射する。免疫応答は、免疫される哺乳動物の種類および系統によって異なるので、免疫スケジュールは、使用される動物に合わせて適宜設定する。抗原投与は、最初の免疫後に、何回か繰り返して行う。追加免疫は、例えば、最初の免疫から4週間後、6週間後、および半年後に行うことができる。

【0025】免疫後、哺乳動物から採血し、得られた血液をNP結合活性の存在についてアッセイすることにより、哺乳動物の体内でNPに対する抗体が産生されていることを確認する。アッセイ法としては、酵素免疫測定法（ELISA法）、放射免疫アッセイ法（RIA）、蛍光抗体法等の公知の方法が挙げられる。

【0026】NP結合性抗体の産生を確認後、特異抗体産生能のある免疫細胞を細胞融合に適した状態にするために、ブースト（免疫原の追加注射）を行うことができる。ブーストで投与するNPの量は特には限定されないが、最初に免疫したNPの量の約4～5倍程度が好ましい。ブーストは、一般的には、NPと不完全フロイントアジュバントとのエマルジョンを用いて行うことができる。投与経路は、皮下、皮内、静脈、または腹腔内等から適宜選択される。

【0027】最終免疫後、免疫した哺乳動物から脾臓細胞を摘出し、骨髄腫由来の細胞株と細胞融合する。細胞融合には、増殖能力の高い細胞株を用いることが好ましく、また骨髄腫由来の細胞株は、融合する脾臓細胞の由来する哺乳動物と適合性があることが好ましい。マウスの骨髄腫由来の細胞株としては、P3X63-Ag8.653、Sp2/O-Ag14、FO・1、S194/5. XX0 BU. 1、P3/NS1/1-Ag4-1などが挙げられる。細胞融合は、当該分野で公知の方法に従って行われる。細胞融合法の例として、例えば、ポリエチレングリコール法、センダイウイルスを用いた方法、電流を利用する方法などが挙げられる。得られた融合細胞は、当該分野で公知の条件に従って増殖させることができる。産生される抗体の結合能に基づいて、所望の融合細胞を選択する。

【0028】融合細胞から産生される抗体の結合能は、当該分野で公知の方法に基づいてアッセイすることがで

きる。本発明においては、NPに特異的かつ高い結合能を有する抗体を産生する融合細胞を得るために、NPに対する結合能に基づく選別を利用して、目的の細胞株をクローニングする。抗体の結合能は、抗体産生の確認に関して上述したのと同様に、ELISA法、RIA法、蛍光抗体法などの方法を用いてアッセイすることができる。簡便で感度が高いことから、ELISA法が好ましい。

【0029】融合細胞のクローニングは、当該分野で公知の方法を用いて行うことができる。クローニング法としては、限界希釈法、軟寒天法などが挙げられ、操作が容易で再現性が高いことから、限界希釈法が好ましい。細胞融合により得られた多くの融合細胞の中から、効率よく有用な細胞を選択するために、細胞選別は、クローニングの初期の段階から行うことが好ましい。このようにして、望ましい結合能を有する抗体を産生する融合細胞株を最終的に選別することができる。

【0030】上記のようにして選別されたモノクローナル抗体産生細胞株を大量培養することにより、NPに対して特異的なモノクローナル抗体を大量に産生することができる。モノクローナル抗体産生細胞株の大量培養方法として、インビボおよびインビトロでの培養が挙げられる。インビボでの大量培養の例としては、哺乳動物の腹腔内に融合細胞を注射して増殖させ、腹水中に抗体を産生させる方法が挙げられる。インビトロでの培養では、融合細胞を培地中で培養し、抗体を培地中に産生させる。

【0031】大量培養により得られた腹水または培養上清から、当該分野で公知の方法を用いて、本発明のモノクローナル抗体を精製することができる。精製のためには、例えば、DEAE陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法などが適宜組み合わせで用いられる。本発明の抗体は、好ましくは、約90%の純度、好ましくは約95%の純度、より好ましくは約98%の純度となるように精製することができる。

【0032】3. 本発明のモノクローナル抗体を用いたクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量

本発明はさらに、本発明のモノクローナル抗体またはその断片を用いて免疫アッセイを行うことを特徴とする、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量のための方法にも関する。この方法は、好ましくは、少なくとも下記（a）及び（b）の工程を含む。

（a）本発明のモノクローナル抗体またはその断片と試料とを反応させる工程；及び（b）工程（1）で形成した抗原抗体複合体と、検出のための標識抗体とを反応させる工程；

【0033】本発明の検出及び／又は定量法は、抗体を

用いるアッセイ、即ち免疫アッセイであれば、いずれの方法でもよく、例えば、酵素免疫測定法（ELISA）、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法（RIA）、発光免疫測定法、酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、粒子凝集反応又はウエスタンブロット法等が挙げられる。

【0034】本発明の検出及び／又は定量法に供される試料としては、血液、血清、血漿、リンパ球培養上清、尿、髄液、唾液、汗、腹水、羊水、又は細胞あるいは臓器の抽出液等、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質が含まれる可能性のある生体試料であれば特に限定されない。本発明の検出及び／又は定量法を酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の標識抗体を用いた免疫測定法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法により行うこともでき、サンドイッチ法の場合には固相化抗体及び標識抗体のうち少なくとも1種が本発明のモノクローナル抗体であればよい。

【0035】固相担体としては、固定化抗体に関連して不溶性担体の具体例として本明細書中上記したものを使用できる。また、標識物質も標識抗体に関連して本明細書中上記したものを使用できる。

【0036】測定の方法は公知の方法（日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」、第3版、医学書院、1987年、北川常廣ら編「蛋白質核酸酵素別冊No. 31 酵素免疫測定法」、共立出版、1987年）により行うことができる。例えば、固相化抗体と試料を反応させ、同時に標識抗体を反応させるか、又は洗浄の後に標識抗体を反応させて、固相化抗体－抗原－標識抗体の複合体を形成させる。そして未結合の標識抗体を洗浄分離して、結合標識抗体の量より試料中の抗原量を測定することができる。具体的には、酵素免疫測定法（ELISA）の場合は標識酵素にその至適条件下で基質を反応させ、その反応生成物の量を光学的方法等により測定する。蛍光免疫測定法の場合には蛍光物質標識による蛍光強度を、放射免疫測定法の場合には放射性物質標識による放射線量を測定する。発光免疫測定法の場合は発光反応系による発光量を測定する。

【0037】本発明の検出及び／又は定量法を免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応又は粒子凝集反応等の免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、目視的に測る測定法により実施する場合には、溶媒としてリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませてもよい。

【0038】抗体を固相担体に感作させて用いる場合には、固相担体としては、ポリスチレン、スチレン－ブタジエン共重合体、（メタ）アクリル酸エステル類ポリマー、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、赤血球、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することができる。

【0039】この感作の方法としては、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの方法の併用等の公知の方法を使うことができる。測定の操作法は公知の方法により行うことができるが、例えば、光学的方法により測定する場合には、試料と抗体、又は試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、エンドポイント法又はレート法により、透過光や散乱光を測定する。

【0040】また、目視的に測定する場合には、プレートやマイクロタイタープレート等の容器中で、試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、凝集の状態を目視的に判定する。なお、目視的に測定する代わりにマイクロプレートリーダー等の機器を用いて測定を行ってもよい。

【0041】4. 本発明のモノクローナル抗体を用いるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質の検出及び／又は定量のためのキット

本発明のキットは、本発明により提供されるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を認識するモノクローナル抗体またはその断片を含むものである。ここで言うモノクローナル抗体またはその断片としては、本明細書中上記した固定化抗体とや標識抗体でもよい。例えば、本発明により提供されるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの核タンパク質を認識するモノクローナル抗体を一次抗体として使用する場合、本発明のキットには、抗原抗体結合反応により形成された複合体を検出するための二次抗体を含めてもよい。本発明のキットには、該キットを効率的かつ簡便に利用できるようにするために、これら抗体以外に種々の補助剤を含めてもよい。補助剤としては、例えば固体状の二次抗体を溶解させるための溶解剤、不溶化担体を洗浄するために使用される洗浄剤、抗体の標識物質として酵素を使用した場合に酵素活性を測定するための基質、その反応停止剤などの免疫学的測定試薬のキットとして通常使用されるものが挙げられる。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0042】

【実施例】（A）材料と方法

（1）CCHFVの組換え核蛋白の発現

CCHFVのヒスチジンタグ（His-tag）がN末端側に付加された組換え核蛋白（His-CCHFV NP）を発現する組換えバキュロウイルス、Ac-His-CCHFV NPを作製した。その組換えバキュロウイルスのポリヘドリンプロモーター

の下流に挿入された遺伝子の配列と発現する蛋白(組換え核蛋白)のアミノ酸配列をそれぞれ図1と図2に示す(図1及び図2、並びに配列表の配列番号1及び2)。核蛋白cDNAの由来は、CCHFV中国株(8402株)であり、中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所第二出血熱研究室唐青博士より供与を受けた。Ac-HisCCHFV NPを昆虫細胞に感染させることにより、His-CCHFV NPを発現させ、さらに、Ni²⁺カラムクロマトグラフィー(QIAexpressionist, QIAGEN社)を用いて精製した。昆虫細胞で発現されたHis-CCHFV NPおよび精製されたHis-CCHFV NPをSDS-PAGEで確認した。

【0043】(2)モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

BALB/cマウスを、精製されたHis-CCHFV NPをアジュバント(Inject Alum, Pierce社)とともに3回免疫した。免疫後、脾臓単核細胞を採取し、その脾臓単核細胞とマウスミエローマ細胞P3/Ag568と融合させ、融合細胞(ハイブリドーマ)の中から、His-CCHFV NPに対する抗体を産生する細胞株を得た。

【0044】(3)モノクローナル抗体のタイピングおよび精製

得られたモノクローナル抗体のタイピングは、マウスのそれぞれのイムノグロブリンに特異的な抗体を用いて行った。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから産生される抗体は、MabTrap GII (Pharmacia Biochemica社)に含まれるアニフィティークロマトグラフィー抗体精製用担体を用いて、精製した。

【0045】(4)ウサギ抗His-CCHFV NP血清の作製
精製されたHis-CCHFV NP蛋白を、アジュバント(Inject Alum, Pierce社)と混合したうえで、ウサギに4回免疫した。高力価の抗His-CCHFV NP抗体価を有することが確認された後、ウサギ血清を採取した。

【0046】(5)蛋白濃度の測定
精製されたHis-CCHFV NPおよびモノクローナル抗体の蛋白濃度は、Bradford法により測定した。

【0047】(6)抗原検出enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

リン酸緩衝液(PBS)でモノクローナル抗体を希釈し、100ng/100μlの濃度になるように調製した。96ウェイトプレートの各ウェルに、抗体含有PBSを100μl加え、一晚4℃で静置した。翌日、0.05%Tween-20含有PBS(T-PBS)で3回洗浄し、各ウェルに200μlの5%スキムミルク含有T-PBS(M-T-PBS)を加え、37℃1時間置いた。T-PBSで洗浄後、M-T-PBSで段階希釈されたCCHFV液(7. 参照)または精製されたHis-CCHFV NPを各ウェルに100μl加え、37℃1時間置いた。次いで、T-PBSで3回洗浄後、M-T-PBSで1000倍に希釈されたウサギ抗His-CCHFV NP血清を加え、37℃1時間置いた。次いで、T-PBSで3回洗浄し、M-T-PBSで1000倍希釈されたhorseradish peroxidase(HRP0)-標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(Zymed社)100μlを各

ウェルに加え、37℃1時間置き、最後にT-PBSで3回洗浄後発色基質ABTS液(Roche Diagnostics社)100μlを各ウェルに加えた。37℃30分間反応させ、405nmの波長で吸光度を測定した。

【0048】(7)CCHFV液の作製

Vero E6細胞にCCHFV中国66019株を感染させ、2%ウシ胎児血清含有イーグルMEN液でその細胞を7日間培養した。7日間の培養後、培養液および細胞を採取し、-80℃の凍結融解処理を2回施し、1%の濃度になるようにNP-40を加え、さらに、3000回転/分で遠心したその上清をウイルス液とした。NP-40を加える前のウイルス液のウイルス感染価は、Vero E6細胞を用いた50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)を求める方法で測定した。また、CCHFVのその他の株(中国株7803、7001、88166、78024、8402株)のウイルス液は、各ウイルスを乳飲子マウスの脳内に接種し、麻痺などの神経症状が出現した後、採取した脳を1%NP-40含有PBSで混和し、3000回転/分で遠心した。その上清をそれぞれのCCHFV中国株のウイルス液とした。

【0049】(8)CCHFV核蛋白の分割された組換え蛋白の発現

設計したプライマーを用いて、表1に示すような分割されたCCHFV核蛋白を発現するようにcDNAを増幅し、pGEX-2Tベクター(Pharmacia Biotech社)のクローニングサイトに挿入し、組換え蛋白をGST融合蛋白として大腸菌で発現させた。発現された分割CCHFV核蛋白を、表1に示すように、GST-CCHFV NP1(アミノ酸位置1-106)、GST-CCHFV NP2(アミノ酸位置97-208)、GST-CCHFV NP3(アミノ酸位置201-306)、GST-CCHFV NP4(アミノ酸位置299-406)およびGST-CCHFV NP5(アミノ酸位置396-482)とした。

【0050】(9)ウエスタンブロッティング法
モノクローナル抗体の抗原確認部位は、ウエスタンブロッティング法により確認した。

【0051】(B)結果

(1)Ac-His-CCHFV NP感染によるHis-CCHFV NPの発現と精製

図3にAc-His-CCHFV NP感染によるTn5細胞でのHis-CCHFV NPの発現および精製されたHis-CCHFV NPのSDS-PAGE所見を示す。His-CCHFV NPが効率よく発現し、精製されていることが確認された。

【0052】(2)モノクローナル抗体

His-CCHFV NPに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。組換え核蛋白およびウイルス核蛋白を高感度に出検するのに有効なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ1B7および1F1株が樹立された。ハイブリドーマのクローン1B7株は、受託番号FERM P-18554として、ハイブリドーマのクローン1F1株は、受託番号FERM P-18555として平成13年10月5日付けで独立行政法人産業技術

総合研究所 特許微生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）に寄託されている。ハイブリドーマ1B7および1F1株から産生されるモノクローナル抗体を、それぞれモノクローナル抗体1B7、モノクローナル抗体1F1とする。両ハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体はIgG1、 κ タイプであった。

【0053】（3）モノクローナル抗体1B7および1F1の抗原認識部位

表 1. ウエスタンブロット法によるモノクローナル抗体の CCHFV の分割された核蛋白に対する反応性.

組換え核蛋白	アミノ酸位置	ウエスタンブロット法による反応	
		1B7	1F1
His-CCHFV NP	1-482	+	+
GST-CCHFV NP1	1-106	-	-
GST-CCHFV NP2	97-208	-	-
GST-CCHFV NP3	201-306	+	+
GST-CCHFV NP4	299-406	-	-
GST-CCHFV NP5	396-482	-	-

【0055】（4）モノクローナル抗体1B7およびモノクローナル抗体1F1を用いた抗原検出ELISAのHis-CCHFV NP検出感度

両モノクローナル抗体を用いた抗原検出ELISAでは、ほぼ200pg/100 μ lの濃度のHis-CCHFV NP液を検出できた。つまり、最小200pgのHis-CCHFV NPを検出できる感度を有していた（図4）。

【0056】（5）CCHFV66019株のウイルス感染価と抗原検出ELISA

CCHFVウイルス感染価を50TCID₅₀/mlに調製し、そのウイルス液を約4000倍希釈したウイルス液中の核蛋白を確実に検出できた（図5）。

【0057】（6）モノクローナル抗体1B7を用いた抗原検出ELISAのCCHFV中国株の核蛋白の検出

モノクローナル抗体1B7を用いた抗原検出ELISAで、すべての株の核蛋白を検出できた。

【0058】（C）実施例の考察

本発明者のCCHFV核蛋白に対するモノクローナル抗体を用いたCCHFV核蛋白検出ELISAは、クリミア・コンゴ出血熱の診断に有用である。ここにはデータは示していないが、実際の急性期のCCHFV患者血清にあるCCHFV核蛋白を*

*両モノクローナル抗体は、CCHFV-NP3（CCHFV核蛋白のアミノ酸位置にして201番目から306番目、図2においては213番目から318番目）に、ウエスタンブロット法で反応した。両モノクローナル抗体は、482アミノ酸からなるCCHFVの核蛋白のほぼ中央のアミノ酸配列を認識することが明らかにされた（表1）。

【0054】

【表1】

*検出することも可能であった。CCHFV核蛋白検出ELISAの検体としては、急性期患者血清、肝臓や腎臓などの組織などが考えられる。これまでのところ、血清学的診断のほか、CCHFV感染症の診断には、検体を乳飲子マウスの脳内接種によるウイルス分離、培養細胞を用いたウイルス分離、および、RT-PCR法を用いたウイルスゲノムを検出する方法によっていた。本発明のハイブリドーマ1B7および1F1株が産生するモノクローナル抗体、および、ウサギ抗His-CCHFV NP血清を用いたCCHFV核蛋白検出ELISAは、短時間で判定可能なCCHFVの診断に有用な方法である。

30 【0059】

【発明の効果】本発明により、CCHFVの組換え核蛋白に対するモノクローナル抗体が提供される。さらに本発明により、当該モノクローナル抗体を用いた新たなウイルス抗原検出法としてCCHFVの核蛋白の高感度検出が可能な抗原検出enzyme-linked immunosorbent assay系が確立された。このシステムは、CCHFの診断に有用である。

【0060】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kokuritsu Kansensyo Kenkyu
usyocho

<120> A monoclonal antibody recognizing Crimean-Congo hemorrhagic fever

virus

【0061】

<230> A11549A

<240> 2485

<212> DNA

<213> Crimean-Congo hemorrhagic fever virus

<400> 1

atgagaggat cgcacacca tcaccatcac ggat
 ccatgg agaataaaat cgaggtgaat 60
 aacaaagatg aatgaacaa gtggtttgaa gagt
 tcaaga aaggaaatgg acttgtggat 120
 actttcaciaa actcctactc cttttgtgag agtg
 ttccaa atctggaaag gtttgtgttt 180
 cagatggcca gtgccaccga tgacgcaciaa aagg
 attcca tctacgcac agctctagt 240
 gaagcaacca aattttgtgc acccatatac gagt
 gtgcct gggtttagctc cactggcatt 300
 gtgaagaagg gactggagtg gttcgaaaag aatg
 caggaa ccattaaatc ttgggatgaa 360
 agctacactg agctgaaagt tgaggtcctt aaaa
 tagaac agcttgccaa ttaccaacag 420
 gctgctctca agtggaggaa ggacataggt ttcc
 gtgtca atgcaaatac ggcagcctta 480
 agccacaagg tccttgca gaacaaagtc cctg
 gcgaaa ttgtaatgtc cgtcaaagaa 540
 atgtttgtcag atatgatcag aagaaggaa ttga
 ttctca acagaggtgg cgatgaaaat 600
 ccacgaggcc cagtgcgcg tgaacatgtg gagt
 ggtgca gggaatttgt caaaggcaag 660
 tacatcatgg ctttaaccc gccctggggg gaca
 tcaaca agtcaggccg atcaggaata 720
 gcacttggtt caacaggcct tgccaagctc gcag
 agactg aggggaaggg agtgtttgat 780
 gaaac2aaa agactgtaga ggctctcaac gggt
 aatttg4aaacaciaa ggacgaagtt 840
 gaa2aa2aa gtgccgacaa catgataaca aacc
 ttttcaCrimantCgongahgonchagi900
 gactctc2aaactcgtc tgcacttcgt gcac
 a400t2cacagattga cactgcttcc 960
 MetArgGlySerHisHisHisHisHisHisHis
 GlySerMetCysGlyTyrTyrTyrTyrTyrTyr
 ca1ttccttt ttgagct5gg gaaacaacca aggg10
 g1acG1uaG1aaatgaasgahgscaptG108Met Asn
 LysG1rcpCphec1ugG1gtPhggtaagaag cttt
 atgagc tctttg20ga tgactcattc 114025
 LysG1aaG1yggatcG1yG1yG1yG1yG1yG1yG1y
 ThrCysncSggC1yaaSeraphgaaatg 1200
 ggtgtctgc35ttggaacaat cctgtg40c aatc
 CysG1uaSgctG1dcBrggatcLggaG126Arg Phe
 ValaPheag1ncMet1aaSerctacggaca aaca
 ccgaa50ccaacaatcc gtgtgcc55g 1320
 A1aaThgtaspag1pg1agG1naLysaAspaSeraGle
 Tyr11aaSerac1ag1aG1acatt 1380
 g65gcctctg agcacctgct70caccaatcc cttg
 tcggca agcagctctcc attccagaat 1440
 G1utA1aaThrtLysgPheafysG1acPngtI1ecTyr
 G1utCys1a1gaTrp Val Ser 1485

【0062】

15

30

45

60

75

80

85

90

95

Ser Thr Gly Ile Val Lys Lys Gly Leu Glu

Trp Arg Lys Asp Ile Gly Phe Arg Val Asn
 Ala Asn Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 1
 60
 Ser His Lys Val Leu Ala Glu Tyr Lys Val
 Pro Gly Glu Ile Val Met
 165 170 175
 Ser Val Lys Glu Met Leu Ser Asp Met Ile
 Arg Arg Arg Asn Leu Ile
 180 185 190
 Leu Asn Arg Gly Gly Asp Glu Asn Pro Arg
 Gly Pro Val Ser Arg Glu
 195 200 205
 His Val Glu Trp Cys Arg Glu Phe Val Lys
 Gly Lys Tyr Ile Met Ala
 210 215 220
 Phe Asn Pro Pro Trp Gly Asp Ile Asn Lys
 Ser Gly Arg Ser Gly Ile
 225 230 235 2
 40
 Ala Leu Val Ala Thr Gly Leu Ala Lys Leu
 Ala Glu Thr Glu Gly Lys
 245 250 255
 Gly Val Phe Asp Glu Ala Lys Lys Thr Val
 Glu Ala Leu Asn Gly Tyr
 260 265 270
 Leu Asp Lys His Lys Asp Glu Val Asp Lys
 Ala Ser Ala Asp Asn Met
 275 280 285
 Ile Thr Asn Leu Leu Lys His Ile Ala Lys
 Ala Gln Glu Leu Tyr Lys
 290 295 300
 Asn Ser Ser Ala Leu Arg Ala Gln Gly Ala
 Gln Ile Asp Thr Ala Phe
 305 310 315 3
 20
 Ser Ser Tyr Tyr Trp Leu Tyr Lys Ala Gly
 Val Thr Pro Glu Thr Phe
 325 330 335
 Pro Thr Val Ser Gln Phe Leu Phe Glu Leu
 Gly Lys Gln Pro Arg Gly
 340 345 350
 Thr Lys Lys Met Lys Lys Ala Leu Leu Ser
 Thr Pro Met Lys Trp Gly 17
 355 360 365

【図面の簡単な説明】 360 す。 365
 【図1】図1は、A c-H i s-C C H F V N P の発現するH i s-C C H F V N P の塩基配列を示す。 370 375
 【図2】図2は、A c-H i s-C C H F V N P の発現するH i s-C C H F V N P の塩基配列を示す。 385 390
 【図3】図3は、A c-H i s-C C H F V N P の昆虫細胞でのH i s-C C H F V N P の発現（1）と精製されたH i s-C C H F V N P （2）のSDS-PAGE法による解析を示す。 395 4
 【図4】図4は、モノクローナル抗体1B7（■）およ

び 1 F 1 (●) を用いた抗原検出 ELISA による His-CCHFV NP の検出を示す。

【図 5】図 5 は、モノクローナル抗体 1 B 7 (■) およ

【図 1】

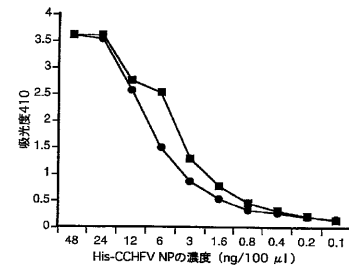
図 1. Ac-His-CCHFV NP が発現する His-CCHFV NP の遺伝子の塩基配列.

10	20	30	40	50	60
ATGAGAGGAT	CGCATCACCA	TCACCATCAC	GGATCCATGG	AGAATAAAAT	CGAGGTGAAT
70	80	90	100	110	120
AACAAAGATG	AAATGAACAA	GTGGTTTGAA	GAGTTCAGA	AAGGAAATGG	ACTTGTGGAT
130	140	150	160	170	180
ACTTTCACAA	ACTCCTACTC	CTTTTGTGAG	AGTGTTCCAA	ATCTGGAAGG	GTTTGTGTTT
190	200	210	220	230	240
CAGATGGCCA	GTGCCACCGA	TGACGCACAA	AAGGATTCCA	TCTACGCATC	AGCTCTAGTG
250	260	270	280	290	300
GAAGCAACCA	AATTTTGTGC	ACCCATATAC	GAGTGTGCTT	GGGTTAGCTC	CACTGGCATT
310	320	330	340	350	360
GTGAAGAAAG	GACTGGAGTG	GTTTCGAAAAG	AATGCAGGAA	CCATTAAATC	TTGGGATGAA
370	380	390	400	410	420
AGCTACACTG	AGCTGAAAGT	TGAGGTCCCT	AAAATAGAAC	AGCTTGCCAA	TTACCAACAG
430	440	450	460	470	480
GCTGCTCTCA	AGTGGAGGAA	GGACATAGGT	TTTCGTGTCA	ATGCAAAATC	GGCAGCCTTA
490	500	510	520	530	540
AGCCACAAGG	TCCTTGCAGA	GTACAAAGTC	CCTGGCGAAA	TTGTAATGTC	CGTCAAAGAA
550	560	570	580	590	600
ATGTTGTTCAG	ATATGATCAG	AAGAAGGAAC	TTGATTCTCA	ACAGAGGTGC	CGATGAAAAT
610	620	630	640	650	660
CCACGAGGCC	CAGTGAGCCG	TGAACATGTG	GAGTGGTGCA	GGGAATTGTG	CAAAGGCAAG
670	680	690	700	710	720
TACATCATGG	CTTTCAACCC	GGCCTGGGGG	GACATCAACA	AGTCAGGCCG	ATCAGGAATA
730	740	750	760	770	780
GCACTTGTGT	CAACAGGCCT	TGCCAAGCTC	GCAGAGACTG	AGGGGAAGGG	AGTGTTTGAT
790	800	810	820	830	840
GAAGCCAAAA	AGACTGTAGA	GGCTCTCAAC	GGGTACCTTG	ACAAACACAA	GGACGAAGTT
850	860	870	880	890	900
GACAAAGCAA	GTGCCGACAA	CATGATAACA	AACCTTCTCA	AACACATTGC	TAAGGCACAA
910	920	930	940	950	960
GAGCTTTTACA	AAAACCTGTC	TGCACCTTCG	GCACAGGGTG	CACAGATTGA	CACTGCTTTT
970	980	990	1000	1010	1020
AGCTCATACT	ACTGGCTCTA	CAAGGCCCGC	GTGACTCCAG	AAACCTTCCC	GACTGTCTCA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CAGTTCTCTT	TTGAGCTAGG	GAAACAACCA	AGGGGTACCA	AGAAAATGAA	GAAGCACTTT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTGAGCACCC	CAATGAAGTG	GGGTAAGAAG	CTTTATGAGC	TCTTTGTGTA	TGACTCATTC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CAGCAAAACA	GGATCTACGT	GCACCTTGCC	GTGTTGACAG	CTGGCAGAAT	CAGTGAAATG
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GGTGTCTGCT	TTGGAACAAT	CCCTGTGGCC	AATCCCGATG	ATGCTGCCCA	GGGATCTGGA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CACACCAAGT	CCATTCTTAA	CCTACGGACA	AACACCGAAA	CCAACAATCC	GTGTGCCAAG
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ACAATTGTCA	AGTTGTTTGA	AATTCAAAAA	ACAGGATTTA	ATATACAAGA	CATGGACATT
1390	1400	1410	1420	1430	1440
GTAGCCTCTG	AGCACCTGCT	GCACCAATCC	CTTGTGCGCA	AGCAGTCTCC	ATTCCAGAAT
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GCCTACAACG	TCAAGGGCAA	TGCCACCAGT	GCCAACATCA	TCTGA.....	

び 1 F 1 (●) を用いた抗原検出 ELISA による CCHFV 66019 株ウイルス液からの核蛋白の検出を示す。NC は陰性コントロールを示す。

【図 4】

図 4. モノクローナル抗体 (■) および 1F1 (●) を用いた抗原検出 ELISA による His-CCHFV NP の検出.



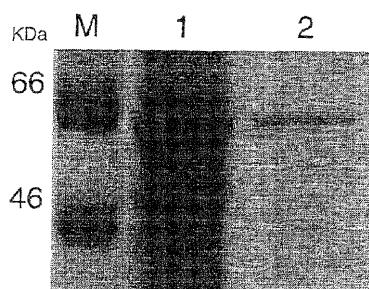
【図2】

図2. Ac-His-CCHFV NPが発現する His-CCHFV NP のアミノ酸配列.

10	20	30	40	50	60
MRGSHHHHHH	GSMENKIEVN	NKDEMKNWFE	EFKKGNGLVD	TFTNSYSFCE	SVPNLERFVF
70	80	90	100	110	120
QMASATDDAQ	KDSIYASALV	EATKFCAPIY	ECAWVSSTGI	VKKGLEWFEK	NAGTIKSWDE
130	140	150	160	170	180
SYTELKVEVP	KIEQLANYQQ	AALKWRKDIG	FRVNANTAAL	SHKVLAEYKV	PGEIVMSVKE
190	200	210	220	230	240
MLSDMIRRRN	LILNRGGDEN	PRGPVSREHV	EWCREFVKGK	YIMAFNPPWG	DINKSGRSGI
250	260	270	280	290	300
ALVATGLAKL	AETEGKGVFD	EAKKTVEALN	GYLDKHKDEV	DKASADNMIT	NLLKHIAKAQ
310	320	330	340	350	360
ELYKNSSALR	AQGAQIDTAF	SSYWLYKAG	VTPETFPTVS	QFLFELGKQP	RGTKMKKAL
370	380	390	400	410	420
LSTPMKWGKK	LYELFADDSF	QQNRIYVHPA	VLTAGRISEM	GVCFGTIPVA	NPDDAAQSGS
430	440	450	460	470	480
HTKSILNLRT	NTETNNPCA	TTVKLFIEIQK	TGFNIQMDI	VASEHLLHQS	LVGKQSPFQN
490	500	510	520	530	540
AYNVKGNATS	ANII*.....				

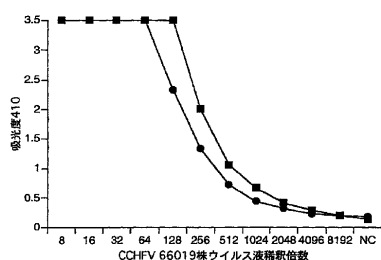
【図3】

図3. Ac-His-CCHFV NPの昆虫細胞での His-CCHFV NPの発現(1)と精製された His-CCHFV NP(2)の SDS-PAGE 法による解析.



【図5】

図5. モノクローナル抗体 1B7 (■) および 1F1 (●) を用いた抗原検出 ELISA による CCHFV 66019 株ウイルス液からの核蛋白の検出. NC は陰性コントロール



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	33/569		C
	33/577	5/00	B
(72)発明者	新倉 昌浩 東京都武蔵村山市学園4-7-1 国立感 染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス 室内	(72)発明者	森川 茂 東京都武蔵村山市学園4-7-1 国立感 染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス 室内
(72)発明者	倉根 一郎 東京都武蔵村山市学園4-7-1 国立感 染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス 室内	Fターム(参考)	4B024 AA11 BA53 CA02 GA03 HA15 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 4B065 AA92X AA95X AB05 AC14 BA08 CA25 CA46 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA53 FA72 GA26

专利名称(译)	识别克里米亚/刚果出血热病毒的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2003116565A	公开(公告)日	2003-04-22
申请号	JP2001314854	申请日	2001-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	日本国立感染症研究所		
申请(专利权)人(译)	国立感染症研究所所长		
[标]发明人	西條政幸 新倉昌浩 倉根一郎 森川茂		
发明人	西條 政幸 新倉 昌浩 倉根 一郎 森川 茂		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/10 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/569 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/10 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/569.L G01N33/577.B C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C12N5/00.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AA95X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA53 4H045/FA72 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性识别克里米亚-刚果出血热病毒的单克隆抗体。 识别克里米亚-刚果出血热病毒的核蛋白的单克隆抗体或其片段。

組換え核蛋白	アミノ酸位置	ウエスタンブロット法による反応	
		IB7	IF1
His-CCHFV NP	1-482	+	+
GST-CCHFV NP1	1-106	-	-
GST-CCHFV NP2	97-208	-	-
GST-CCHFV NP3	201-306	+	+
GST-CCHFV NP4	299-406	-	-
GST-CCHFV NP5	396-482	-	-