

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-257138

(P2011-257138A)

(43) 公開日 平成23年12月22日(2011.12.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569 L	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 1	
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	
	GO 1 N 33/531 B	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 21 頁)		

(21) 出願番号	特願2009-159020 (P2009-159020)	(71) 出願人	504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(22) 出願日	平成21年7月3日(2009.7.3)	(74) 代理人	100102668 弁理士 佐伯 憲生
(31) 優先権主張番号	特願2009-59544 (P2009-59544)	(71) 出願人	509352945 田中貴金属工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目7番3号
(32) 優先日	平成21年3月12日(2009.3.12)	(74) 代理人	110000268 特許業務法人田中・岡崎アンドアソシエイツ
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	中屋 隆明 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内
(31) 優先権主張番号	特願2009-138714 (P2009-138714)		
(32) 優先日	平成21年6月9日(2009.6.9)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高病原性鳥インフルエンザH5N1亜型ウイルスの検出キット

## (57) 【要約】

【課題】本発明は、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型を、迅速かつ簡便に、特異的に検出するための免疫測定キット及び免疫測定方法を提供する。さらに、本発明は、H5N1亜型ウイルスを、迅速かつ簡便に、高感度で特異的に検出するためのイムノクロマトグラフ法による検出キット及び検出方法を提供する。

【解決手段】本発明者らは、H5N1亜型ウイルスを免疫原として作製したモノクローナル抗体4G6は、H5N2亜型又はH5N3亜型ウイルスとは反応せず、H5N1亜型ウイルスとのみ特異的に結合することを見出した。また、本発明者らは、モノクローナル抗体4G6を用いた免疫測定法により、鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型のみを特異的に検出できることを見出した。さらに、本発明者らは、イムノクロマトグラフ法で用いる展開液に非イオン性界面活性剤及び酸素原子及び窒素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーを添加することにより、検出の感度が高められることを見出した。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

第一試薬を判定部位に有するクロマトグラフ媒体、第二試薬と標識物質が結合した標識試薬及び展開液を含有し、イムノクロマトグラフ法によって試料中の被検物質を検出するためのキットであって、第一試薬及び第二試薬の両方又はいずれか一方が、A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体である、A型インフルエンザウイルスH5N1亜型の検出キット。

**【請求項 2】**

第一試薬が、A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体である、請求項 1 に記載の検出キット。

10

**【請求項 3】**

A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体が、H5N1亜型ウイルスのヘムアグルチニンの59番目のアミノ酸であるアスパラギン酸を含む立体構造的なエピトープを認識するモノクローナル抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の検出キット。

**【請求項 4】**

H5N1亜型ウイルスのヘムアグルチニンの59番目のアミノ酸であるアスパラギン酸を含む立体構造的なエピトープを認識するモノクローナル抗体が、マウス - マウスハイブリドーマ4G6 ( 受託番号FERM BP-11130 ) によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 3 に記載の検出キット。

**【請求項 5】**

他方の第一試薬又は第二試薬が、H5N1亜型インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンHA1ドメインの273-342aa領域に存在する連続的なエピトープを認識するモノクローナル抗体である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の検出キット。

20

**【請求項 6】**

H5N1亜型インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンHA1ドメインの273-342aa領域に存在する連続的なエピトープを認識するモノクローナル抗体が、マウス - マウスハイブリドーマ3H4 ( 受託番号FERM P-21029 ) 又はマウス - マウスハイブリドーマ3H12 ( 受託番号FERM P-21030 ) によって産生されるモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載の検出キット。

**【請求項 7】**

展開液が、HLB値が13~18である非イオン性界面活性剤を含有することを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の検出キット。

30

**【請求項 8】**

非イオン性界面活性剤の濃度が0.1~1.0%である、請求項 7 に記載の検出キット。

**【請求項 9】**

展開液が、さらに酸素原子及び窒素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーを含有することを特徴とする、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の検出キット。

**【請求項 10】**

ビニル系水溶性ポリマーの濃度が0.5~2.0%である、請求項 9 に記載の検出キット。

**【請求項 11】**

ビニル系水溶性ポリマーがポリビニルピロリドンである、請求項 9 又は 10 に記載の検出キット。

40

**【請求項 12】**

標識物質が、不溶性担体である、請求項 7 から 11 のいずれかに記載の検出キット。

**【請求項 13】**

不溶性担体が、コロイド状金粒子である、請求項 12 に記載の検出キット。

**【請求項 14】**

試料をクロマトグラフ媒体に接触させる工程、標識試薬を試料と同時に又は試料に次いでクロマトグラフ媒体に接触させる工程、及び、展開液により試料及び標識試薬を展開する工程を含有する、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の検出キットを用いた試料中のA

50

型インフルエンザウイルスH5N1亜型を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高病原性鳥インフルエンザH5N1亜型ウイルスを検出するためのキット、及び、該キットを用いた検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザとは、インフルエンザウイルスによる感染症で、鼻咽頭、のど、気管支などを標的臓器とし、38 以上の発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛などに加えて、咽頭痛、鼻汁、咳などの症状を急に発症することで知られている。わが国のインフルエンザは、毎年11月下旬から12月上旬頃に発生が始まり、翌年の1 - 3月頃にその数が増加、4 - 5月にかけて減少していくというパターンが見られる。毎年ヒトの間で流行しているインフルエンザのウイルスは、ヒトに完全に適応して、共存に近い関係を保っており、基礎疾患の存在や高齢であることなどの要因無しには、感染者の多くを死に至らしめるほどの高い病原性はない。

【0003】

インフルエンザウイルスはウイルス粒子内の核蛋白複合体の抗原性の違いから、A・B・Cの3型に分類される。A型のインフルエンザウイルスは、水禽、特にカモが起源と考えられている。A型ウイルス粒子表面にはヘムアグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)という糖タンパク質があり、HAには16の亜型が、NAには9つの亜型が存在する。カモではHA亜型のH1型からH16型までと、NA亜型のN1型からN9型までのすべての組み合わせのウイルス(144種類)が検出されている。これらのウイルスが、他の水禽や家禽、家畜、野生動物、そしてヒトへ感染して、その動物種のあいだで感染を起こし続けることにより、それぞれの種に適応して、それらの種の固有のインフルエンザウイルスとなっている。現在、ヒトの間で流行しているインフルエンザウイルス(A/ソ連型(H1N1)ウイルス、A/香港型(H3N2)ウイルス、B型ウイルス)もすべて、水禽からヒトに適応したウイルスであると考えられている。

【0004】

通常のヒトインフルエンザウイルスに対しては、毎年の流行により多くの者が免疫を有しているため、感染し症状が出たとしても、発熱は数日続くものの、多くの場合には何事も無く回復する。しかし、鳥類からヒトへと適合するに至った新型インフルエンザウイルスが出現し流行した場合には、そのウイルスに免疫を有しているものはおらず、世界中で莫大な数の罹患者の発生と、それに伴って重症者や死亡者の増加もみられることが予想されている。

【0005】

特に、A型鳥インフルエンザウイルスの中でもH5N1亜型は、本来の宿主であるカモでは病原性を示さないものの、家禽に感染した場合には死に至らしめるほどの高い病原性を示すことが知られ、高病原性鳥インフルエンザウイルスと呼ばれている。さらに、近年では、家禽におけるH5N1亜型ウイルス感染によるインフルエンザの発生から、ヒトへの感染事例が相次いで報告されている。このような状況から、H5N1亜型鳥インフルエンザウイルスが、ヒトからヒトへ効率的に感染できるように変異し、新型インフルエンザウイルスとなることが懸念されている。したがって、高病原性であるH5N1亜型鳥インフルエンザウイルスの家禽、野鳥における感染及び鳥類からヒトへの感染を早期に発見し適切に対応することが、新型インフルエンザの発生を未然に防ぐ上で非常に重要な課題となっている。

【0006】

現在、H5N1亜型鳥インフルエンザウイルスの感染の検査診断は、検体の咽頭・鼻咽頭拭い液又は総排泄口拭い液(cloacal swab)から、ウイルスを分離してRT-PCRにてH5の遺伝子を確認することにより行われている。しかし、このような検査方法には、特別な機器及び技術が要されるため、ウイルスの感染が疑われる養鶏場又は野外にて迅速かつ簡便に行

うことができない。通常のヒトインフルエンザウイルスの感染については、発症早期にインフルエンザウイルス抗原を検出するための、イムノクロマトグラフ法による迅速診断キットがすでに普及している。しかし、これらのキットはインフルエンザウイルスの感染を、他のウイルス又は細菌の感染と識別するためのものであり、インフルエンザウイルスの有するタンパク質の中でも比較的変異の少ない核タンパク質等を抗原として検出するものである。このため、インフルエンザウイルスのA型又はB型の識別は可能であるものの、同一の亜型内でしばしばその抗原性を变化させるヘムアグルチニン(HA)及びノイラミニダーゼ(NA)に基づく亜型の識別はできない。

【0007】

A型インフルエンザウイルスの亜型を識別するために、H5亜型ウイルスのHAに対するモノクローナル抗体を作製し、イムノクロマトグラフ法に基づく測定を行うことも提案されている(特許文献1及び2)。しかし、これらの測定で用いられるモノクローナル抗体は、H5型サブタイプのHAを有するH5亜型ウイルスを広く認識する。また、H5N1亜型インフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体として、2004年に京都でカラスから分離されたH5N1亜型ウイルスを免疫原として作製されたものも報告されている(特許文献3及び非特許文献1)。しかし、これらのモノクローナル抗体のいくつかは(3C11、4C12、3H12及び3H4)、H5N1亜型を含むH5型サブタイプのHAを広く認識するものであった(特許文献3)。そのため、これらの抗体を用いた免疫測定キットは、H5N1亜型のみならず、H5N2亜型、H5N3亜型などの低病原性の鳥インフルエンザウイルスも検出し、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型のみを特異的に検出できる迅速診断キットは提供されていなかった。H5N1亜型ウイルスは病原性も高く致死率も大きいことから、H5N1亜型ウイルスのみを特異的に検出する迅速診断キットを開発することが強く望まれていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2007-261988号公報

【特許文献2】特開2008-196967号公報

【特許文献3】特開2008-104450号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Biochem Biophys Res Commun. 2009 Jan 9;378(2):197-202

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型を、迅速かつ簡便に、特異的に検出するための免疫測定キット及び免疫測定方法を提供する。さらに、本発明は、H5N1亜型ウイルスを、迅速かつ簡便に、高感度で特異的に検出するためのイムノクロマトグラフ法による検出キット及び検出方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、鋭意研究した結果、H5N1亜型ウイルスを免疫原として作製したモノクローナル抗体4G6は、H5N2亜型又はH5N3亜型ウイルスとは反応せず、H5N1亜型ウイルスとのみ特異的に結合することを見出した。また、本発明者らは、モノクローナル抗体4G6を用いた免疫測定法により、鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型のみを特異的に検出できることを見出した。さらに、本発明者らは、イムノクロマトグラフ法で用いる展開液に非イオン性界面活性剤及び酸素原子及び窒素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーを添加することにより、検出の感度が高められることを見出した。

【0012】

すなわち、本発明は、インフルエンザH5N1亜型ウイルスを特異的に検出できる免疫測定キット及び免疫測定方法に関する。また、本発明は、インフルエンザH5N1亜型ウイルスを

10

20

30

40

50

高感度で特異的に検出できるイムノクロマトグラフ法による検出キット及び検出方法に関する。

【0013】

本発明をより詳細に説明すれば、以下のとおりとなる。

(1) 第一試薬を判定部位に有するクロマトグラフ媒体、第二試薬と標識物質が結合した標識試薬及び展開液を含有し、イムノクロマトグラフ法によって試料中の被検物質を検出するためのキットであって、第一試薬及び第二試薬の両方又はいずれか一方が、A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体である、A型インフルエンザウイルスH5N1亜型の検出キット。

(2) 第一試薬が、A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体である、(1)に記載の検出キット。

(3) A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体が、H5N1亜型ウイルスのヘムアグルチニンの59番目のアミノ酸であるアスパラギン酸を含む立体構造的なエピトープを認識するモノクローナル抗体である、(1)又は(2)に記載の検出キット。

(4) H5N1亜型ウイルスのヘムアグルチニンの59番目のアミノ酸であるアスパラギン酸を含む立体構造的なエピトープを認識するモノクローナル抗体が、マウス-マウスハイブリドーマ4G6(受託番号FERM BP-11130)によって産生されるモノクローナル抗体である、(3)に記載の検出キット。

(5) 他方の第一試薬又は第二試薬が、H5N1亜型インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンHA1ドメインの273-342aa領域に存在する連続的なエピトープを認識するモノクローナル抗体である、(1)から(4)のいずれかに記載の検出キット。

(6) H5N1亜型インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンHA1ドメインの273-342 aa領域に存在する連続的なエピトープを認識するモノクローナル抗体が、マウス-マウスハイブリドーマ3H4(受託番号FERM P-21029)又はマウス-マウスハイブリドーマ3H12(受託番号FERM P-21030)によって産生されるモノクローナル抗体である、(5)に記載の検出キット。

(7) 展開液が、HLB値が13~18である非イオン性界面活性剤を含有することを特徴とする、(1)から(6)のいずれかに記載の検出キット。

(8) 非イオン性界面活性剤の濃度が0.1~1.0%である、(7)に記載の検出キット。

(9) 展開液が、さらに酸素原子及び窒素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーを含有することを特徴とする、(1)から(8)のいずれかに記載の検出キット。

(10) ビニル系水溶性ポリマーの濃度が0.5~2.0%である、(9)に記載の検出キット。

(11) ビニル系水溶性ポリマーがポリビニルピロリドンである、(9)又は(10)に記載の検出キット。

(12) 標識物質が、不溶性担体である、(7)から(11)のいずれかに記載の検出キット。

(13) 不溶性担体が、コロイド状金粒子である、(12)に記載の検出キット。

(14) 試料をクロマトグラフ媒体に接触させる工程、標識試薬を試料と同時に又は試料に次いでクロマトグラフ媒体に接触させる工程、及び、展開液により試料及び標識試薬を展開する工程、を含有する、(1)から(13)のいずれかに記載の検出キットを用いた試料中のA型インフルエンザウイルスH5N1亜型を検出する方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明の免疫測定キットは、低病原性であるH5N2亜型又はH5N3亜型とは交差反応を示さず、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型のみを迅速かつ簡便に、特異的に検出できる。さらに、本発明のイムノクロマトグラフ法による検出キットは、H5N1亜型ウイルスを、迅速かつ簡便に、実用に足る測定感度で特異的に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、本発明の検出キットを用いた2ng/mL濃度のH5N1亜型ウイルスのHAリコンビナントタンパク質（ABR社）のイムノクロマトグラフ法による検出において組成を変化させた展開液を用いた場合に、判定部位でイムノクロマトリーダーにより測定される発色強度を比較したグラフである。展開液AからHの組成は、表5に示す。イムノクロマトリーダー（浜松ホトニクス社製）の測定値が20.0以上の場合に目視によっても明確に発色が確認できる。

【図2】図2は、本発明の検出キットを用いてH5N1亜型ウイルス、H5N2亜型ウイルス、H5N3亜型ウイルス及びH1N1亜型ウイルスを検出した場合に、判定部位で得られる発色強度を示すグラフである。展開液の組成は、表5に示す。H5N1亜型ウイルスは、 $10^4$ pfu/mLの濃度でも、田中貴金属工業社製イムノクロマトリーダーによる測定で目視判定の目安とされる15.0以上の測定値を示した。一方、H5N2亜型ウイルス、H5N3亜型ウイルス又はH1N1亜型ウイルスは、 $10^6$ pfu/mLの濃度で測定値は15.0以下であり、目視では発色を確認できなかった。

10

【図3】図3は、本発明の検出キットを用いてさまざまなヘムアグルチニン（HA）亜型及びノイラミニダーゼ（NA）亜型を有するインフルエンザウイルス株を検出した場合に、判定部位で得られる発色強度を示すグラフである。本発明の検出キットでは、 $10^5$ pfu/mLの濃度において、H5N1亜型ウイルス以外のウイルス株では交差反応による発色を確認できなかった。

【発明を実施するための形態】

【0016】

20

本発明の検出キットは、第一試薬を判定部位に有するクロマトグラフ媒体、第二試薬と標識物質が結合した標識試薬及び展開液から構成される。本発明の検出キットは、抗原とこれに対する抗体による特異的な結合反応を利用して被検物質を検出するイムノクロマトグラフ法の測定原理に基づいて、試料中の被検物質である高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1（以下、AIV H5N1ともいう。）を特異的に検出するものである。

【0017】

本発明のクロマトグラフ媒体は、毛管現象を示す微細多孔性物質からなる不活性のものであって、標識試薬、被検物質等と反応しないものであれば、特にその素材が限定されるものではない。具体的には、ポリウレタン、ポリエステル、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ナイロン、ニトロセルロース又は酢酸セルロース等のセルロース誘導体等で構成される繊維状又は不織繊維状マトリクス、膜、濾紙、ガラス繊維濾紙、布、綿等が挙げられる。好ましくはセルロース誘導体やナイロンの膜、濾紙、ガラス繊維濾紙等であり、より好ましくはニトロセルロース膜、混合ニトロセルロースエステル（ニトロセルロースと酢酸セルロースの混合物）膜、ナイロン膜、濾紙である。

30

クロマトグラフ媒体の形態及び大きさは特に制限されるものではなく、実際の操作の点及び結果の観察の点において適切であればよい。操作をより簡便にするために、判定部位が表面に形成されているクロマトグラフ媒体の裏面に、プラスチック等からなる支持体を設けることもできる。この支持体の性状は特に制限されるものではないが、目視判定によって測定結果の観察を行う場合には、支持体は、標識物質によりもたらされる色彩と類似しない色彩を有するものであることが好ましく、通常、無色又は白色であることが好ましい。

40

クロマトグラフ媒体には、任意で、被検物質を含む試料を添加するための試料添加部位（サンプルパッド等）、試料中の固形成分を除去する部位（固形成分分離部位等）、展開液を添加するための展開液添加部位、判定部位に捕捉されなかった標識試薬や展開液を吸い取る吸収部位（吸収パッド等）、測定が正常に行われたことを示す対照部位等を組み入れてもよい。これらの部位の部材は、毛管現象により試料溶液や展開液が移動できれば特に限定されず、一般的には、ニトロセルロース膜、濾紙、ガラス繊維濾紙等の複数の多孔性物質からその目的に応じたものを選択して用い、第一試薬が固定化されたクロマトグラフ媒体と毛管で繋がるように配置する。

【0018】

50

本発明では、クロマトグラフ媒体に第一試薬を固定化して判定部位を形成する。第一試薬をクロマトグラフ媒体に固定化する方法としては、第一試薬をクロマトグラフ媒体に物理的又は化学的手段により直接固定化する方法と、第一試薬をラテックス粒子などの微粒子に物理的又は化学的に結合し、この微粒子をクロマトグラフ媒体に捕捉して固定化する間接固定化方法がある。

直接的に固定化する方法としては、物理吸着を利用しても良いし、共有結合によってもよい。一般にクロマトグラフ媒体がニトロセルロース膜又は混合ニトロセルロースエステル膜の場合、物理吸着を行うことができる。共有結合ではクロマトグラフ媒体の活性化には一般的に臭化シアン、グルタルアルデヒド、カルボジイミド等が用いられるが、いずれの方法も用いることができる。間接的に固定化する方法としては、不溶性微粒子に第一試薬を結合した後、クロマトグラフ媒体に固定化する方法がある。不溶性微粒子の粒径はクロマトグラフ媒体に捕捉されるが移動することのできないサイズのものを選択することができ、好ましくは平均粒径10 $\mu$ m程度以下の微粒子である。このような粒子として抗原抗体反応に使用されるものが種々知られている。本発明においては、感度調整の容易さ等の点から直接固定化の方が好ましい。また、クロマトグラフ媒体への第一試薬の固定化には、いろいろな方法が使用できる。例えば、マイクロシリンジ、調節ポンプ付きペン、インキ噴射印刷等、種々の技術が使用可能である。判定部位の形態としては特に限定されないが、円形のスポット、クロマトグラフ媒体の展開方向に垂直に延びるライン、数字、文字や+、-などの記号等として固定化することもできる。

さらに、必要に応じて、第一試薬を固定化した後のクロマトグラフ媒体に、ブロッキング処理を行うこともできる。ブロッキング処理に用いることのできるブロッキング剤としては、ウシ血清アルブミン、スキムミルク、カゼイン、ゼラチン等の蛋白質の他、Blocking Peptide Fragment (TOYOBO) や親水性高分子ポリマー等の市販のブロッキング剤が挙げられる。

#### 【0019】

本発明の標識試薬は、標識物質に第二試薬を結合して構成する。標識物質としては、酵素又は不溶性担体を用いることができる。酵素としては、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ等があり、それぞれの酵素に対応する公知の発色基質と共に用いることができる。不溶性担体としては、金、銀、白金のようなコロイド状金属粒子、酸化鉄のようなコロイド状金属酸化物粒子、硫黄などのコロイド状非金属粒子及び合成高分子よりなるラテックス粒子、その他を用いることができる。コロイド状金属粒子及びコロイド状金属酸化物粒子には、例えば、コロイド状金粒子、コロイド状銀粒子、コロイド状白金粒子、コロイド状酸化鉄粒子、コロイド状水酸化アルミニウム粒子などが挙げられる。特に、コロイド状金粒子とコロイド状銀粒子が適当な粒径において、コロイド状金粒子は赤色、コロイド状銀粒子は黄色を示す点で好ましい。これらのコロイド状金属粒子の平均粒径は1nm~500nm、特に強い色調が得られる10nm~150nmであることが好ましく、より好ましくは40nm~100nmの範囲内である。ラテックス粒子としては、例えばスチレンとメタクリル酸との共重合体、スチレンとイタコン酸との共重合体などを挙げることができる。これらのラテックス粒子の平均粒径は50nm~500nmの範囲内であることが好ましい。本発明の標識試薬に用いられる標識物質としては、不溶性担体が好ましく、さらにコロイド状金属粒子が好ましく、特にコロイド状金粒子が好ましい。

コロイド状金属粒子として、例えばコロイド状金粒子を用いる場合には、市販のものを用いてもよい。あるいは、常法、例えば塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元する方法によりコロイド状金粒子を調製することができる。

本発明で用いる第二試薬を標識物質で標識化する方法としては、物理吸着や化学結合などの公知の方法により行うことができる。例えば、第二試薬をコロイド状金粒子で標識化する場合は、金粒子がコロイド状に分散した溶液に第二試薬である抗体を加えて物理吸着させた後、牛血清アルブミン溶液や前述の市販ブロッキング剤などを添加して抗体が未結合である粒子表面をブロッキングすることにより調製する。

## 【0020】

本発明の第一試薬又は第二試薬として用いることのできる抗体は、被検物質であるインフルエンザウイルスH5N1亜型と結合する抗体である。そのような抗体であれば、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、第一試薬又は第二試薬のいずれか一方、より好ましくは両方にモノクローナル抗体を用いることが好ましい。これらの抗体は、クロマトグラフ媒体への固定化又は標識物質との結合に際して、Fab又はF(ab')<sub>2</sub>等の結合性のある断片として用いることもできる。本発明の第一試薬又は第二試薬として用いる抗体がAIV H5N1に結合可能であれば、クロマトグラフ媒体の判定部位においてAIV H5N1の存在を検出することができる。しかし、低病原性であるH5N2亜型又はH5N3亜型等の他の亜型ウイルスとは交差反応を示さず、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型のみを特異的に検出するためには、第一試薬及び第二試薬のいずれか一方又は両方にA型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体を用いるのが好ましい。

10

## 【0021】

A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体とは、免疫蛍光アッセイ(IFA)、ウエスタンブロッティング等の手法により、AIV H5N1、AIV H5N1が感染した細胞又はAIV H5N1のヘムアグルチニンタンパク質等のAIV H5N1抗原には反応するが、AIV H5N2又はAIV H5N3等の他の亜型ウイルス抗原とは反応性を示さない抗体である。AIV H5N1抗原への結合性と他の亜型ウイルスへの結合性とを比較した実験で、より低濃度のAIV H5N1のみに特異的な反応性を示す抗体であれば本発明の抗体として好適に用いることができる。より好ましくは、AIV H5N1のみに見出すことのできる連続的なアミノ酸配列からなるエピトープ又は立体構造的なエピトープを認識する抗体を用いるのがよい。AIV H5N1のみに特異的に存在することが確認されたエピトープとしては、AIV H5N1の表面タンパク質であるヘムアグルチニンの59番目のアミノ酸であるアスパラギン酸を含む立体構造的なエピトープが挙げられる。HAの59番目のAspは、2003年から現在に至るまでの間に流行しているAIV H5N1株の間で、高度に保存されている(1813株/1870株)。一方、AIV H5N2及びAIV H5N3では、HAの59位にAspを有するウイルス株は知られていない。このようなAIV H5N1に特異的に存在することが確認されたエピトープを認識する抗体が、本願発明の抗体としては好ましく、具体的な例としては、マウス-マウスハイブリドーマ4G6(受託番号FERM BP-11130)が産生するモノクローナル抗体4G6が挙げられる。

20

30

本発明で用いられるAIV H5N1に特異的な抗体は、AIV H5N1抗原を特異的に認識する限りにおいて、抗体の供給源、またはそれが作製される様式に関して限定することを意図していない。また、AIV H5N1に特異的なエピトープに対して特異的な反応性を有する限り、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、又はFv等のフラグメントも用いることもでき、抗体の可変領域のCDR部分とFR部分の由来が異なってもよい。

## 【0022】

本発明で用いられるA型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体は、パラホルムアルデヒド等で不活化したAIV H5N1、AIV H5N1が感染したMDCK細胞等の細胞若しくはAIV H5N1に由来するHA遺伝子を発現させた形質転換細胞、又は、AIV H5N1から精製されたHAタンパク質若しくはリコンビナントタンパク質等を免疫原として、マウス、ウサギ等の公知の免疫動物に投与することにより作製することができる。本発明の抗体として好適な、AIV H5N1に由来するHAの59番目のアミノ酸であるアスパラギン酸を含む立体構造的なエピトープを認識する抗体を作製する場合には、上記免疫原の他、H5N1 HAのAsp59を含むH5N1 HAと他の亜型ウイルスに由来するHAからなるキメラHAを発現する形質転換細胞又は1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたH5N1 HAを発現する形質転換細胞等も免疫原として用いることができる。さらには、ファージディスプレイ等による市販のペプチドライブラリキットを抗体4G6でスクリーニングすることにより、4G6のエピトープを模倣するペプチドを得ることができるので、これを免疫原として用いることもできる。

40

抗体をモノクローナル抗体として得る場合には、免疫原を投与された免疫動物から脾細胞を採取し、公知の標準的な手法を用いてミエローマ細胞と融合して、抗体産生ハイブリ

50

ドーマを作製する。あるいは、抗体遺伝子のライブラリをAIV H5N1抗原でスクリーニングすることにより、ハイブリドーマを作製することなく、モノクローナル抗体を得ることもできる。モノクローナル抗体の取得に用いられるライブラリでは、抗体タンパク質とそれをコードする遺伝子がディスプレイ技術により1対1で対応付けられており、目的とする抗原に対してスクリーニングすることにより、直ちに所望の抗体の遺伝子を取得することができる。ディスプレイ技術としては、ファージディスプレイが代表的なものであるが、イーストディスプレイ、バクテリアディスプレイ等の細胞を用いる方法の他、cDNAディスプレイ、mRNAディスプレイ、リボソームディスプレイ等の無細胞翻訳系を用いる方法も知られている。

A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体をスクリーニングする方法としては、AIV H5N1、AIV H5N1が感染した細胞又はAIV H5N1のHA等を抗原として用い、免疫蛍光アッセイ (IFA)、ウエスタンブロットティング等により、他の亜型ウイルスと比較してAIV H5N1抗原により強い反応性を示す抗体を選択する方法が挙げられる。特に、H5N1 HAのAsp59を含む立体構造的なエピトープを認識する抗体をスクリーニングするためには、AIV H5N1又はAIV H5N1が感染した細胞等のHAタンパク質の立体構造を保持しているものを抗原として用い、ハイブリドーマの培養上清又はライブラリのメンバーが抗体4G6と抗原の結合を阻害する活性を指標として、抗体を選択することができる。他のスクリーニング方法としては、H5N1に由来するHAを発現する形質転換細胞と、当該HAのAsp59を他のアミノ酸に置換したH5N1 HA変異体を発現する形質転換細胞を用いて、Asp59を有するH5N1 HAを発現する細胞への特異的な反応性を指標として、抗体をスクリーニングすることも

10

20

30

40

50

#### 【0023】

AIV H5N1に特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体の1つである抗体4G6は、以下のとおり作製した。A/crow/Kyoto/53/2004 H5N1ウイルスを、20%ショ糖クッションとともに超遠心分離法 (25,000rpm、1時間) で精製し、4%パラホルムアルデヒドで固定したものを抗原として、フロイント完全アジュバントとともにBALB/c雌マウスに投与し最初の免疫を行った ( $2 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/マウス)。2週間後、アジュバントを含まない不活化ピリオンで、マウスをブースター免疫した。2度目のブースター免疫から3日後に、免疫したマウスから脾細胞を採取し、公知の標準的な手法を用いて、PAIミエロマ細胞と融合した。10 - 15日後、抗体産生ハイブリドーマクローンを、AIV H5N1が感染したMDCK細胞を抗原として用いた免疫蛍光アッセイ (IFA) によって選択した。抗体4G6はH5N1ウイルスが感染したMDCK細胞を認識したがH5N2ウイルス又はH5N3ウイルスが感染したMDCK細胞を認識しなかった。さらに、抗体4G6が、H5N1亜型ウイルスに由来するHAタンパク質を認識することを確認するために、クレード2.5 (A/crow/Kyoto/53/2004) だけでなくクレード1 (A/Thailand/Kan353/2004) のH5N1ウイルスからPCRにて増幅したHA遺伝子をpPolIプラスミドにクローン化し、発現プラスミドpCAGGSにクローン化したPB2、PB1、PA及びNP遺伝子とともに293T細胞にトランスフェクトしてH5N1-HA発現細胞を作製した。抗体4G6は、いずれのH5N1-HA発現293T細胞も認識した。

抗体4G6の認識エピトープを詳細に解析するために、H5N1-HA及びH5N3-HA由来の6のキメラpPolI-HAプラスミドを、H5N1-HA及びH5N3-HAの1-86 aa、1-194 aa又は1-340 aaのドメインを交換することで構築した。一連のpPolI-キメラHAプラスミドをpCAGGS-PB2、-PB1、-PA及び-NPと共に293T細胞にトランスフェクトし、細胞を固定してIFAの抗原として用いた。抗体4G6は、H5N1-HA (1-86 aa) - H5N3-HA (87-567 aa) キメラHA、H5N1-HA (1-194 aa) - H5N3-HA (195-567 aa) キメラHA及びH5N1-HA (1-340 aa) - H5N3-HA (341-567 aa) キメラHAを発現する293T細胞を認識したが、H5N3-HA (1-86 aa) - H5N1-HA (87-567 aa) キメラHA、H5N3-HA (1-194 aa) - H5N1-HA (195-567 aa) キメラHA及びH5N3-HA (1-340 aa) - H5N1-HA (341-567 aa) キメラHAを発現する293T細胞を認識しなかった。すなわち、抗体4G6は、H5N1に由来するHAの1-86 aa領域の立体構造的なエピトープと結合した。A/crow/Kyoto/53/2004 (H5N1)、A/Thailand/Kan353/2004 (H5N1)、A/Duck/Hong Kong/342/78 (H5N2) 及びA/Duck/Hong Kong/820/80 (H5N3) それぞれのHAの1-86 aa領域における

推定アミノ酸配列のアラインメントを行ったところ、H5N1 HAにおいてH5N2 HA及びH5N3 HAとはアミノ酸が異なる部位が3箇所見出された(51、59及び61位)。そこで、これらの部位のH5N1亜型のアミノ酸を、それぞれH5N2亜型又はH5N3亜型の対応するアミノ酸と同一になるよう置換した、1アミノ酸置換変異HAタンパク質(K51R、D59S又はD61N)を作製し、293T細胞で発現させた。この発現細胞に対してIFAを行ったところ、抗体4G6は、H5N1 HAの51位のLysをArgに置換した変異体及び61位のAspをAsnに置換した変異体を認識したものの、H5N1 HAの59位のAspをSerに置換した変異体は認識しなかった。このことから、抗体4G6は、H5N1亜型ウイルスのHAの59番目のアミノ酸であるアスパラギン酸を含む立体構造的なエピトープを認識する抗体であることが示された。

モノクローナル抗体4G6を産生するマウス-マウスハイブリドーマ4G6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に受託日2009年5月21日、受託番号FERM BP-11130で寄託されている。

#### 【0024】

A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体は、AIV H5N1を特異的に検出する凝集法、放射免疫測定法、酵素免疫測定法及びイムノクロマトグラフ法等の公知の免疫測定法に用いることができる。特に、イムノクロマトグラフ法においては、クロマトグラフ媒体の判定部位を形成する第一試薬として、又は標識試薬を構成する第二試薬として、その両者又はいずれか一方に好適に用いることができる。より好ましくは、クロマトグラフ媒体の判定部位に被検物質であるAIV H5N1を効率よく捕捉するために、AIV H5N1を特異的に認識する抗体を第一試薬として用いることができる。

#### 【0025】

AIV H5N1を特異的に認識する抗体をイムノクロマトグラフ法の第一試薬又は第二試薬に用いた場合に、他方の第一試薬又は第二試薬は、AIV H5N1と結合できる抗体であればいずれも用いることができ、それらの抗体は他の亜型ウイルスと反応性を示す抗体であってもよい。好ましい抗体としては、被検物質のAIV H5N1とそれを特異的に認識する抗体との結合を阻害しない抗体が挙げられ、より好ましくは、AIV H5N1に特異的な抗体が認識するエピトープと異なるエピトープを認識する抗体がよい。そのような抗体としては、例えば、AIV H5N1ヘムアグルチニンのHA1ドメインの273-342aa領域に存在する連続的なアミノ酸配列を認識する抗体等が挙げられる。

AIV H5N1に結合する抗体は、H5亜型サブタイプを有するインフルエンザウイルス又はウイルス感染細胞等を免疫原として公知の標準的な方法で作製することができる。また、AIV H5N1ヘムアグルチニンのHA1ドメインの273-342aa領域に存在する連続的な配列を認識する抗体は、マウス-マウスハイブリドーマ3C11、4C12、3H4及び3H12が産生する抗体として得ることもできる(特許文献3)。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にそれぞれ受託番号FERM P-21027、FERM P-21028、FERM P-21029又はFERM P-21030で寄託されている。

#### 【0026】

本発明の展開液は、イムノクロマトグラフ法において移動相を構成する。イムノクロマトグラフ法では、クロマトグラフィーの原理を応用して、被検物質と結合した標識試薬と未結合の標識試薬を、被検物質を捕捉可能な固定相とそれに接して連続的に流れる移動相からなる系を用いて分離する。展開液は、毛管現象を示す微細多孔性物質からなるクロマトグラフ媒体中を、被検物質及び標識試薬を移動(展開)させるために用いられる。

本発明の展開液は、通常、水を溶媒とし、リン酸塩、トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩、HEPES、グッド等の緩衝剤、塩化ナトリウムなどの無機塩を含有することが好ましい。さらに、必要に応じて、ウシ血清アルブミン(BSA)等のタンパク質成分(含有量は通常0.01重量%~10重量%)、防腐剤等を含んでもよい。本発明で用いられる展開液は、さらに非イオン性界面活性剤を含有し、より好ましくはさらにポリビニルピロリドンを代表とする酸素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーを含有する。

#### 【0027】

展開液に添加する非イオン性界面活性剤としては、好ましくはHLB値が10~18、さらに

10

20

30

40

50

好ましくはHLB値が13~18のポリオキシエチレン系界面活性剤を用いることができる。好適なポリオキシエチレン系界面活性剤の例としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（商品名「Tween」シリーズ）、ポリオキシエチレンp-t-オクチルフェニルエーテル（商品名「Triton」シリーズ）、ポリオキシエチレンp-t-ノニルフェニルエーテル（商品名「TritonN」シリーズ）等を挙げることができる。より具体的には、「Tween」シリーズでは、特にTween20（商品名）（HLB値16.7）、Tween40（商品名）（HLB値15.6）、Tween60（商品名）（HLB値15.0）、Tween80（商品名）（HLB値14.9）、「Triton」シリーズでは、特にTritonX-100（商品名）（HLB値13.5）、Nonidet P-40（商品名）（HLB値13.1）、TritonX-102（商品名）（HLB値14.6）、TritonX-165（商品名）（HLB値15.8）、TritonX-405（商品名）（HLB値17.9）、「TritonN」シリーズでは、特にTritonN-101（商品名）（HLB値13.5）、TritonN-111（商品名）（HLB値13.8）、TritonN-150（商品名）（HLB値15.0）等を挙げることができる。これらの非イオン性界面活性剤は、単独でも2種以上を混合して用いることもできる。上記した非イオン性界面活性剤の含有量は、特に限定されないが、展開液全体の重量に対して0.01~10.0重量%の範囲であり、好ましくは0.1~5.0重量%、より好ましくは0.1~1.0重量%、さらに好ましくは0.3~1.0重量%の範囲である。

10

20

30

40

50

#### 【0028】

展開液にさらに添加するビニル系水溶性ポリマーとしては、酸素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーが好ましく、ビニルアルコール、ビニルメチルエーテル、（メタ）アクリル酸、ヒドロキシアルキル（メタ）アクリレート、（メタ）アクリルアミド、ジメチル（メタ）アクリルアミド、ビニルピロリドン等の酸素原子含有極性基を有する水溶性ビニル系モノマーの二重結合が開裂した構造単位を有するポリマーを挙げることができる。より好ましくは酸素原子及び窒素原子含有極性基を有する水溶性ビニル系モノマー、さらに好ましくは酸素原子含有極性基を有する非イオン性水溶性ビニル系モノマー及び酸素原子及び窒素原子含有極性基を有する非イオン性水溶性ビニル系モノマーの二重結合が開裂した構造単位を有するポリマーを挙げることができる。特に好ましいものとしては、ビニルピロリドンの二重結合が開裂した構造単位を有するポリマーを挙げることができる。

これらのビニル系水溶性ポリマーは、本発明の効果が損なわれない程度に、酢酸ビニル、アルキル（メタ）アクリレートなどの他のビニル系モノマーが、例えば50モル%以下、好ましくは30モル%以下、特に好ましくは15モル%以下の割合で共重合されたものであってもよい。

好ましい具体例としては、ポリビニルピロリドン（以下、PVPともいう。）、ジメチルアクリルアミド/ビニルピロリドン共重合体（ジメチルアクリルアミドの共重合割合が50モル%以下のもの）、ビニルアルコール/ビニルピロリドン共重合体（ビニルアルコールの共重合割合が50モル%以下のもの）、酢酸ビニル/ビニルピロリドン共重合体（酢酸ビニルの共重合割合が20モル%以下のもの）などを挙げることができる。

これらのビニル系水溶性ポリマーの分子量は、通常1万~100万、特に10万~100万であることが好ましく、20万~50万であることがより好ましい。また、ビニル系水溶性ポリマーの濃度は、展開液全体の重量に対して0.01~5.0重量%であることが好ましく、0.1~3.0重量%、さらには0.5~2.0重量%であることがより好ましい。

#### 【0029】

先の出願（特願2008-182630号）では、イムノクロマトグラフ法の展開液の組成と測定感度の関係が詳細に検討されている。この出願全体の内容を、参考文献として本願の明細書に取り込む。

先の出願の明細書中では、被検物質としてインフルエンザウイルス核タンパク質又はヒトヘモグロビンタンパク質を検出するイムノクロマトグラフ法で検討が行われた。非イオン性界面活性剤であるTween20を展開液に添加すると測定感度が上昇し、さらに酸素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーであるPVPを展開液に添加するとその効果が増強された。一方、イオン性界面活性剤であるコール酸ナトリウムを展開液に添加した場

合には、有意な測定感度の上昇は見られなかった。また、水溶性ポリマーとしてカルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC・Na) 又はポリエチレングリコール (PEG) を用いた場合には、被検物質を含まない陰性試料において顕著な非特異的反応があった。展開液に加えられた非イオン性界面活性剤及び酸素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーの奏する効果は、被検物質がヒトヘモグロビンタンパク質であるイムノクロマトグラフ法の場合にも同様に奏された。展開液に非イオン性界面活性剤及びPVPに代表される酸素原子含有極性基を有するビニル系水溶性ポリマーを添加することで、被検物質を含む陽性試料を測定した際の判定部位での発色強度 (シグナル) は増強するが、被検物質を含まない陰性試料を測定した際の発色強度 (ノイズ) は抑制され、良好なシグナル/ノイズ比を得ることができた。展開液中のビニル系水溶性ポリマーの濃度は、非イオン性界面活性剤の存在下 (例えば0.05重量% Tween20及び0.3重量% TritonX-100) において、0.3重量%で有意な感度の上昇が観察され、0.6重量%及び1.5重量%で用いた場合には、その効果が顕著であった。これらの結果をまとめて次の表 1 に示す。

10

【 0 0 3 0 】

【表 1】

水溶性高分子	界面活性剤	核タンパク濃度 (ng/mL)				S/N
		0	5	10	50	
PVP	Tween 20	—	+	+	+++	+++
PVP	なし	—	—	±	++	++
なし	Tween 20	—	—	±	++	++
なし	なし	—	—	—	+	+
CMC・Na	Tween 20	++	++	++	+++	+
PVP	Triton X-100	—	+	+	+++	+++
PEG	Triton X-100	++	++	++	+++	+
PVP	コール酸 Na	—	—	±	+	+
PVP	Tween 20 + Triton X-100	—	+	++	+++	+++

20

30

【 0 0 3 1 】

このような非イオン性界面活性剤やビニル系水溶性ポリマーによるシグナル/ノイズ比の向上についての詳細な理由は必ずしも明らかではないが、次のような理由が考えられる。

イムノクロマトグラフ法の標識試薬に標識物質としてラテックス粒子又はコロイド状金属粒子等の不溶性担体が用いられる場合、それらの粒子の表面は負に荷電していることが知られている (例えば、特開平 5 - 1 3 3 9 5 6 号公報参照)。例えば、コロイド状金属粒子では、その製造過程で添加される還元剤由来のアニオンがその表面に吸着しており、相互の凝集が妨げられて分散した状態を保っている。そして、この状態のコロイド状金属粒子に、表面電荷を中和しない程度の低濃度の界面活性剤を添加すると、粒子が鎖状に数個程度凝集することが知られている (特開 2 0 0 6 - 5 8 7 8 1 号公報)。本発明で用いられる展開液は、非イオン性界面活性剤に加えて、粒子の分散剤としても知られるビニル系水溶性ポリマーを含有する。そして、両者の効果のバランスにより、クロマトグラフ媒体上の判定部位において、間接的に捕捉された不溶性担体が数個程度凝集することにより、判定部位で観察される陽性シグナルの増幅が起きているのではないかと考えられる。特に、コロイド状金属粒子においては、凝集によって判定部位に蓄積する粒子の数が増加することにより、目視判定される発色強度が増強するのみならず、粒子の光吸収スペクトル特性が変化することにより、判定部位においてより明瞭な陽性シグナルを得ることができ

40

50

ると考えられている。

【0032】

本発明の検出キットは、試料中に被検物質である高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型が含まれる場合に、特異的にこれを検出できる。本発明の検出キットに適用できる試料としては、H5N1亜型ウイルスを含有することが疑われるものであれば特に制限されない。ヒト、ブタ、ウマ等の哺乳類では、インフルエンザウイルスは主に気道に感染するが、鳥類においては気道及び腸管（大腸）への感染が認められる。したがって、好ましい試料としては、上気道のウイルス感染の診断に適している鼻腔拭い液、咽喉拭い液、気道拭い液の他、鳥類から採取される場合には、総排泄口拭い液（cloacal swab）及び排泄物等が挙げられる。また、高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染により死亡したことが疑われる動物について試験する場合には、上記の試料の他、脳、脾臓、心臓、肺、膵臓、肝臓、腎臓を含む代表的な内臓器官及び当該動物の飲み水等も好適な試料として用いられる。ウイルス感染の診断のためには、検出キットに適用される試料はインフルエンザの臨床症状発現後3日以内に採取されたものが好ましい。

10

試料が液体である場合には、クロマトグラフ媒体に直接適用することもできるが、通常、試料は展開液に懸濁又は希釈して、クロマトグラフ媒体に接触させる。

【0033】

本発明の検出キットを用いて被検物質を検出する方法としては、例えば、以下のような操作が行われる。

本発明の1態様としては、被検物質を含む試料溶液を、予め標識試薬と混合し、液相中で被検物質-標識試薬複合体を形成した後、クロマトグラフ媒体と接触させる。試料溶液と共に又は遅れて、展開液をクロマトグラフ媒体と接触させる。展開液は移動相を構成し、被検物質-標識試薬複合体と共に移動（展開）する。被検物質-標識試薬複合体が、クロマトグラフ媒体の判定部位を移動する際に、固定化された第一試薬がこれを捕捉し、標識試薬が間接的に判定部位に結合することとなる。判定部位に存在する標識試薬を、標識物質が不溶性担体である場合には直接、標識物質が酵素である場合には基質を作用させ反応産物について、目視又はデンストメーター等により、発色強度の確認を行うことで検出又は定量することができる。

20

本発明のさらなる態様では、標識試薬を、クロマトグラフ媒体における移動相の展開移動経路上、すなわち展開液が適用される端部と判定部位との間の領域に存在させることもできる。クロマトグラフ媒体に標識試薬を存在させる場合、標識試薬が展開液に速やかに溶解して毛管作用によって自由に移動できるように標識試薬を支持させるのが好ましい。支持させる部位には、それらの試薬の再溶解性を良好にするため、サッカロース、スクロース、トレハロース、マルトース、ラクトース等の糖類、マンニトール等の糖アルコールを添加して塗布したり、これらの物質を予めコーティングしたりしておくこともできる。標識試薬を塗布し乾燥することによりクロマトグラフ媒体に存在させる場合には、クロマトグラフ媒体に直接行うこともできるし、別の多孔性物質、例えばセルロース濾紙、ガラス繊維濾紙、ナイロン不織布に塗布、乾燥し標識試薬保持部材を形成した後、第一試薬が固定化されたクロマトグラフ媒体と毛管で繋がるように配置してもよい。

30

【0034】

本発明者らは、本発明の検出キットの一例として、モノクローナル抗体3H4、3H12及び4G6を第一試薬又は第二試薬として用い、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型の検出を行った。展開液には、非イオン性界面活性剤を含有する展開液（展開液A、表5参照）を用いた。試料の添加後15分の時点で目視判定した結果を次の表2～4に示す。

40

【0035】

【表 2】

H5N1 亜型ウイルス(10 <sup>6</sup> pfu/mL)					
		第一試薬			
		3H4	3H12	4G6	Pab
第二試薬	3H4	±	±	+	±
	3H12	±	±	+	-
	4G6	+	+	-	-
	Pab	-	-	-	++

10

【 0 0 3 6 】

【表 3】

H5N1 亜型ウイルス(10 <sup>4</sup> pfu/mL)					
		第一試薬			
		3H4	3H12	4G6	Pab
第二試薬	3H4	-	-	-	-
	3H12	-	-	-	-
	4G6	-	-	-	-
	Pab	-	-	-	+

20

【 0 0 3 7 】

【表 4】

H1N1 亜型ウイルス(10 <sup>6</sup> pfu/mL)					
		第一試薬			
		3H4	3H12	4G6	Pab
第二試薬	3H4	-	-	-	-
	3H12	-	-	-	-
	4G6	-	-	-	-
	Pab	-	-	-	+

30

【 0 0 3 8 】

本発明の検出キットは10<sup>6</sup>pfu/mL濃度のH5N1亜型ウイルスを検出できる一方、10<sup>6</sup>pfu/mL濃度のH1N1亜型ウイルスを検出しなかった。このように、第一試薬又は第二試薬にA型インフルエンザウイルスH5N1亜型を認識する抗体を用いた場合には、H5N1亜型ウイルスを検出することが可能となるが、特に第一試薬又は第二試薬として抗体4G6を用いた場合には、顕著な特異性が認められた。さらに、本発明の検出キットは、10<sup>6</sup>pfu/mL濃度の低病原性鳥インフルエンザウイルスH5N2亜型及びH5N3亜型にも交差反応性を示さなかった(図2参照)。一方、比較対照として、第一試薬及び第二試薬にAIV H5N1を免疫原として作製したポリクローナル抗体(Pab)を用いた場合には、H5N1亜型ウイルスのみならず、H1N1亜型ウイルスも検出され、AIV H5N1のみを特異的に検出することはできなかった。このように、第一試薬及び/又は第二試薬に、A型インフルエンザウイルスH5N1亜型を特異的に認識する抗体を用いる本発明の検出キット、好ましくは第一試薬及び/又は第二試薬に抗体4G6を用いる本発明の検出キットは、AIV H5N1を特異的に検出可能であった。

40

【 0 0 3 9 】

さらに本発明者らは、検出キットの測定感度を向上させるため、検出キットを構成する展開液に着目し、展開液の組成について検討を行った。本発明の検出キットでは、測定対

50

象を $10^6$ pfu/mL濃度のAIV H5N1から、200ng/mL濃度のH5N1亜型ウイルスのHAリコンビナントタンパク質（ABR社）に代えても、同様の特異的な検出結果が得られることが明らかになったので、展開液の検討においては被検物質としてH5N1亜型ウイルスに代えて2ng/mL濃度（ $10^4$ pfu/mL濃度のAIV H5N1相当）のH5N1型サブタイプのHAリコンビナントタンパク質を用いた。また、第一試薬及び第二試薬の組み合わせの代表的なものとして、第一試薬に抗体4G6を、第二試薬に抗体3H4を選択した。

先の検討では、非イオン性界面活性剤を含む展開液として、120mM NaCl、50mM Tris-HClに0.7重量%ウシ血清アルブミン（BSA）、0.3重量% TritonX-100、0.1重量% Tween20を加えたもの（展開液A）を用いた。この展開液に、さらなる添加剤として、ポリビニルピロリドンを用いることを検討した。結果を表5及び図1に示す。

これらの結果からも明らかのように、展開液を調整することにより、現在市販されているヒトのインフルエンザ感染の迅速診断キットの測定感度である、試料の添加後15分の時点において $10^4$ pfu/mL濃度のウイルスを目視判定できるという感度で、H5N1亜型ウイルスの検出も可能となることが分かった。一方、展開液の組成を変えても $10^6$ pfu/mL濃度のH5N2亜型ウイルス又はH5N3亜型ウイルスは検出されなかった。

【0040】

【表5】

展開液		A	B	C	D	E	F	G	H
組成	NaCl	120mM	120mM	120mM	120mM	120mM	120mM	120mM	120mM
	Tris-HCl, H8.0	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
	BSA	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%
	TritonX-100	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.2%	0.2%	0.2%
	Tween20	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.3%	0.3%	0.3%
	PVP	0.00%	0.30%	0.65%	0.70%	0.70%	0.70%	0.80%	0.90%
発色強度		3.1	15.1	24.2	27.1	29.7	36.2	40.1	46.2

【0041】

非イオン性界面活性剤を含む展開液に、さらに0.3重量%、0.65重量%又は0.7重量%の濃度でPVPを添加したところ、PVPの濃度依存的にイムノクロマト媒体の判定部位における発色強度が増強した（展開液B-D）。判定部位に間接的に結合したコロイド状金粒子による発色について、目視による判定及びイムノクロマトリーダー（浜松ホトニクス社製）による測定を行った。イムノクロマトリーダー（浜松ホトニクス社製）の測定値が20.0以上の場合に目視によって明確に発色が確認できる。非イオン性界面活性剤を含有する展開液にさらにPVPを添加することで、発色強度の増強が見られ、0.65重量%以上の濃度でPVPを添加した場合には、より明確な陽性反応が得られた。次に、PVPの添加による発色強度の増強効果が、非イオン性界面活性剤の濃度により影響を受けるか検討した。0.7重量% PVPの存在下において、非イオン性界面活性剤の濃度を増加したところ、さらなる発色強度の増強が見られた（展開液D-F）。さらに、0.3重量% Tween20及び0.2重量% TritonX-100の条件下で、PVPの濃度を0.7重量%から0.9重量%まで増やすと、判定部位における発色強度が、より一層、増強した（展開液F-H）。このように、本発明の展開液に非イオン性界面活性剤及びPVPを添加することにより、判定部位における発色強度の増強が見られる。この効果は、特願2008-182630号の明細書において詳細に検討されたものと一致した。

【0042】

展開液の組成を変更することにより、本発明の検出キットにおいて高感度化が可能であることが明らかとなったので、実際に、非イオン性界面活性剤及びPVPを添加した展開液を用いて、鳥インフルエンザウイルスの測定を行った。H5N1亜型ウイルスとして、抗体の作製に用いたA/crow/Kyoto/53/2004(H5N1)株の他、2007年にエジプトでニワトリより分離

されたA/chicken/Egypt/CL-61/2007(H5N1)株を用いた。対照としては、ヒトから分離されたH1N1亜型ウイルス(A/Puertorico/8/34)、カモより分離されたH5N2亜型ウイルス(A/duck/HongKong/342/78)及びH5N3亜型ウイルス(A/duck/HongKong/820/80)を用いた。判定部位における発色について、目視による判定及びイムノクロマトリーダー(田中貴金属工業社製)による測定を行った。イムノクロマトリーダー(田中貴金属工業社製)の場合、測定値が15.0以上で目視によって明確に発色が確認できる。各種展開液を用いて、A型インフルエンザウイルスを測定した場合の発色強度を表6及び図2に示す。

【0043】

【表6】

		展開液				
		A	C	F	H	
試料 (pfu/mL)	H5N1/Kyoto	10 <sup>6</sup>	30.2	285.7	334.0	270.0
		10 <sup>5</sup>	21.5	214.0	225.0	267.3
		10 <sup>4</sup>	4.5	42.0	41.7	64.3
		10 <sup>3</sup>	0.0	1.3	2.0	1.7
	H5N1/Egypt	10 <sup>6</sup>	24.5	259.0	285.0	278.7
		10 <sup>5</sup>	7.2	69.0	96.0	122.3
		10 <sup>4</sup>	0.2	6.0	10.0	17.7
		10 <sup>3</sup>	0.0	0.0	0.3	0.0
	H5N2	10 <sup>6</sup>	0.5	7.0	1.7	10.0
	H5N3	10 <sup>6</sup>	0.0	2.3	0.0	0.0
	H1N1	10 <sup>6</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0

【0044】

非イオン性界面活性剤及びPVPを添加した展開液を用いたところ、目標とする10<sup>4</sup>pfu/mL濃度のH5N1亜型ウイルスの検出が可能となった(intensity 15で、目視判定+)。一方、H5N2亜型ウイルス及びH5N3亜型ウイルスは、10<sup>6</sup>pfu/mLという高濃度で測定しても、判定部位での発色は目視にて認められなかった。展開液に非イオン性界面活性剤及びPVPを加えることで、被検物質であるAIV H5N1を含む陽性試料を測定した際の判定部位での発色強度(シグナル)を増強することができる一方、AIV H5N1を含まない陰性試料を測定した際の発色強度(ノイズ)を抑制できた。イムノクロマトグラフ法の展開液に加えらるる添加剤には、増感剤としてシグナルの強度を高める効果を有するものがいくつか知られるが、同時にノイズの強度も増強してしまうため、陰性試料を測定した時に擬陽性反応を生じてしまうものも少なくない。しかし、非イオン性界面活性剤及びPVPを含有する展開液を用いた場合には、シグナルの強度が高められるため、低濃度のH5N1亜型ウイルスであっても感度よく測定できる一方、H5N1亜型以外のウイルス(H5N2亜型ウイルス又はH5N3亜型ウイルス等)を測定した際に生じるノイズの発生は抑制され、H5N1亜型ウイルスを高感度で特異的に検出することが可能であった。このような、展開液による測定感度の上昇効果は、第二試薬に抗体3H12を用いても同等に奏された。また、第一試薬及び第二試薬に用いるモノクローナル抗体を交換しても同様であった。

【0045】

さらに、本発明の検出キットが、H5N1亜型ウイルスのみを特異的に検出できるか詳細に確認するために、さまざまなヘムアグルチニン(HA)亜型及びノイラミニダーゼ(NA)亜型を有するインフルエンザウイルス株を用いて交差反応性試験を行った。結果を表7及び図3に示す。

【0046】

【表 7】

インフルエンザウイルス株	目視判定
A/Puerto Rico/8/34(H1N1)	—
A/Duck/HongKong/278/78(H2N9)	—
A/duck/Ukraine/1/63(H3N8)	—
A/duck/Czechslovakia/1/56(H4N6)	—
A/crow/Kyoto/53/2004 (H5N1)	+
A/chicken/Egypt/CL-61/2007(H5N1)	+
A/duck/HongKong/342/78 (H5N2)	—
A/duck/HongKong/820/80 (H5N3)	—
A/turkey/Massachusetts/3470/65 (H6N2)	—
A/wigeon/osaka/1/2001 (H7N7)	—
A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N3)	—
A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)	—
A/chicken/Germany/N/49 (H10N7)	—
A/duck/England/1/56 (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

## 【 0 0 4 7 】

このように、本発明の検出キットによれば、H5N1亜型のインフルエンザウイルスを高感度に検出できる一方、H5N1亜型以外のウイルスは目視にて全く検出できなかった。すなわち、本発明の検出キットは、高い特異性をもってH5N1亜型インフルエンザウイルスを検出可能であることが明らかとなった。

20

## 【 0 0 4 8 】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

## 【実施例】

## 【 0 0 4 9 】

## 実施例 1

## 1. クロマトグラフ媒体上への判定部位の作製

25×2.5cmのニトロセルロース膜（ミリポア社製：HF120）に、抗体塗布機（BioDot社製）を用いて、5重量%のイソプロピルアルコールを含むリン酸緩衝液（pH7.4）で1.3mg/mLの濃度になるように希釈した抗高病原性インフルエンザウイルスA（H5N1）モノクローナル抗体3H4、3H12又は4G6のいずれか（第一試薬）を塗布し、42℃で60分間乾燥させ、クロマトグラフ媒体上へ判定部位を作製した。

30

## 【 0 0 5 0 】

## 2. 標識試薬溶液の作製

金コロイド懸濁液（田中貴金属工業社製：平均粒子径60nm）0.5mLに0.1mLの50mMリン酸緩衝液（pH7.4）を加え混和し、5mMリン酸緩衝液（pH7.4）で希釈した抗高病原性インフルエンザウイルスA（H5N1）モノクローナル抗体3H4、3H12又は4G6のいずれか（第二試薬）を0.1mL加え、室温で10分間静置した。次いで、10mMリン酸緩衝液で希釈された10重量%のウシ血清アルブミン（BSA）を0.1mL加え、十分攪拌した後、8000×gで15分間遠心分離を行った。上清を除去した後、pH7.4の10mMリン酸緩衝液を1mL加えた。超音波破碎機を用いてコロイド状の標識試薬をよく分散させた後、8000×gで15分間遠心分離した。上清を除去し、前記リン酸緩衝液を加えて超音波破碎機にてよく分散し、標識試薬溶液とした。

40

## 【 0 0 5 1 】

## 3. クロマトグラフ媒体の作製

上記作製した標識試薬溶液を16×100mmのグラスファイバー製パッド（ミリポア社製：GFCP203000）に均一に添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、標識試薬保持部材とした。次いで、バックシートから成る基材に、上記にて判定部位を作製したニトロセルロース膜、標識試薬保持部材、試料を添加する部分に用いるグラスファイバー製サンプルパッ

50

ド（ポール社製：8000006801）、および展開した試料や標識試薬などを吸収するための吸収パッドを貼り合わせた。最後に、裁断機で幅が5mmとなるように裁断し、クロマトグラフ媒体を作製した。

【0052】

#### 4. 測定

上記3にて作製したクロマトグラフ媒体を用いて、被検物質である高病原性インフルエンザウイルスA/crow/Kyoto/53(H5N1)を含む試料を用いてその存在の有無を測定した。すなわち、0.3重量% Triton X-100（登録商標、HLB値13.5）、0.1重量% Tween20（登録商標、HLB値16.7）、0.7重量% 牛血清アルブミンと120mM塩化ナトリウムを含む50mMトリス - 塩酸緩衝溶液(pH8.0)から成る液を展開液（展開液A、表5参照）とし、ここにpH7.4の10mMリン酸緩衝生理食塩水で希釈された各種インフルエンザウイルスを加え120 $\mu$ Lとしたものを検体とした。すなわち、 $10^6$ pfu/mL（表2）または $10^4$ pfu/mL（表3）の高病原性インフルエンザウイルスA/crow/Kyoto/53(H5N1)を陽性検体、 $10^6$ pfu/mLのインフルエンザウイルスA/Puertorico/8/34(H1N1)（表4）を陰性検体として、クロマトグラフ媒体のサンプルパッド上に載せて展開させ、15分後に目視判定をした。判定部位におけるテストラインの赤い線を確認できるものを「+」、赤い線は確認できるが、非常に色が薄いものを「±」、赤い線を確認できないものを「-」とした。表2～4に結果を示す。

10

【0053】

#### 比較例1

第一試薬および第二試薬ともに抗高病原性インフルエンザウイルスA(H5N1)ポリクローナル抗体を用いたことを除いては、実施例1と同様に測定した。表2～4に結果を示す。

20

【0054】

#### 実施例2

第一試薬に抗体4G6を、第二試薬に抗体3H4を用いて、表5に記載の各種組成の展開液を使用し、被検物質として2ng/mLのH5N1 HAリコンビナントタンパク質（ABR社）を用い、イムノクロマトリーダー（浜松ホトニクス社製）による発色強度測定を行ったことを除いては、実施例1と同様に測定した。表5及び図1に結果を示す。

【0055】

#### 実施例3

第一試薬に抗体4G6を、第二試薬に抗体3H4を用いて、表5に記載の展開液A、C、FおよびHを使用し、被検物質である各種インフルエンザウイルス、すなわち $10^6$ pfu/mL、 $10^5$ pfu/mL、 $10^4$ pfu/mLまたは $10^3$ pfu/mLの高病原性インフルエンザウイルスA/crow/Kyoto/53/2004(H5N1)、 $10^6$ pfu/mL、 $10^5$ pfu/mL、 $10^4$ pfu/mLまたは $10^3$ pfu/mLの高病原性インフルエンザウイルスA/chicken/Egypt/CL-61/2007(H5N1)、 $10^6$ pfu/mLのインフルエンザウイルスA/duck/HongKong/342/78(H5N2)、 $10^6$ pfu/mLのインフルエンザウイルスA/duck/HongKong/820/80(H5N3)またはインフルエンザウイルスA/Puertorico/8/34(H1N1)を用い、イムノクロマトリーダー（田中貴金属工業社製）による発色強度測定を行ったことを除いては、実施例1と同様に測定した。表6及び図2に結果を示す。

30

【0056】

#### 実施例4

第一試薬に抗体4G6を、第二試薬に抗体3H4を用いて、表5に記載の展開液Hを使用し、 $10^5$ pfu/mLの表7に記載の各種インフルエンザウイルスを用い、目視判定と共にイムノクロマトリーダー（田中貴金属工業社製）による発色強度測定を行ったことを除いては、実施例1と同様に測定した。表7及び図3に結果を示す。

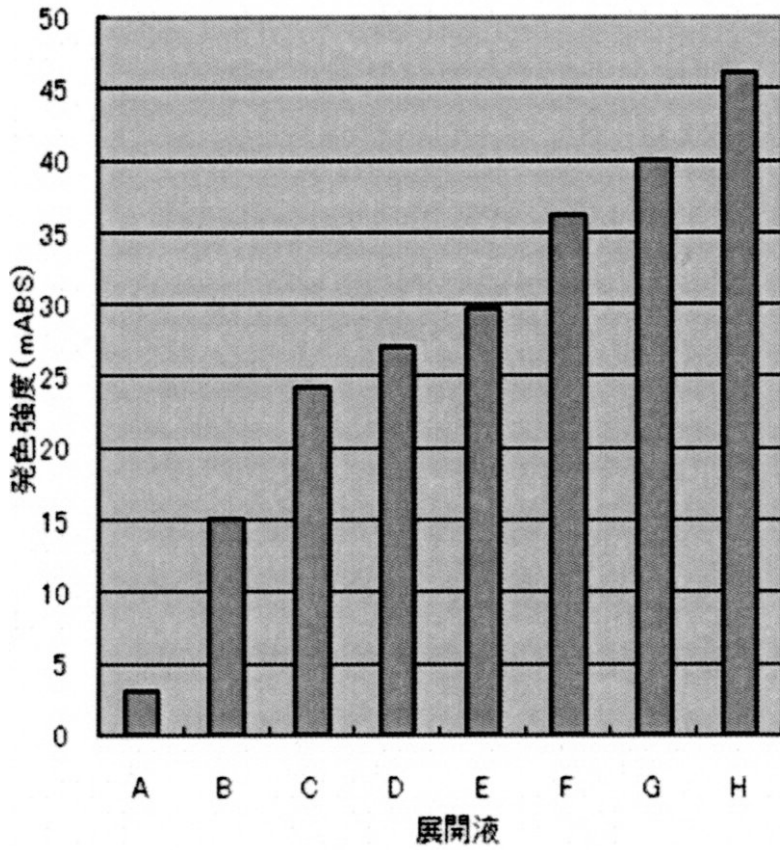
40

【産業上の利用可能性】

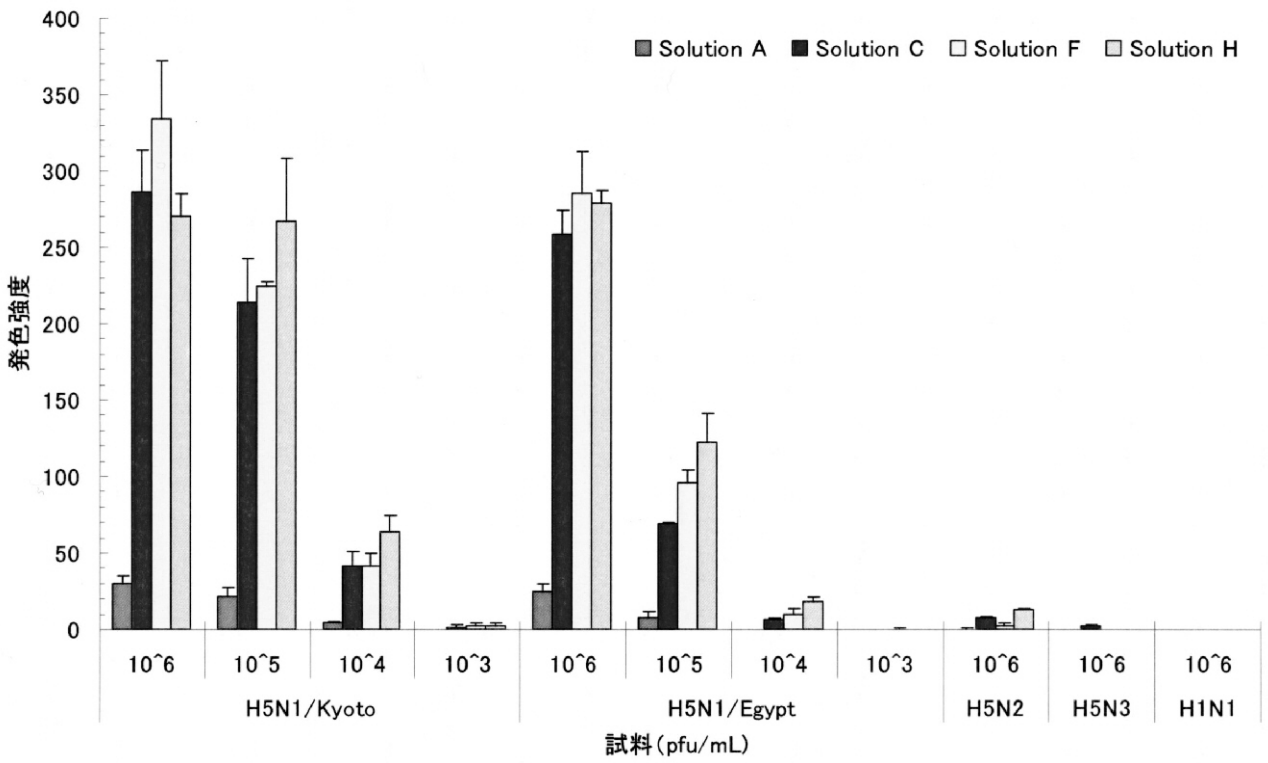
【0057】

本発明の検出キットは、実用に足る測定感度を有し、特異的に高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型を検出できるので、H5N1亜型ウイルスによるインフルエンザ感染を迅速かつ簡便に検査できるといふ、産業上の利用可能性を有する。

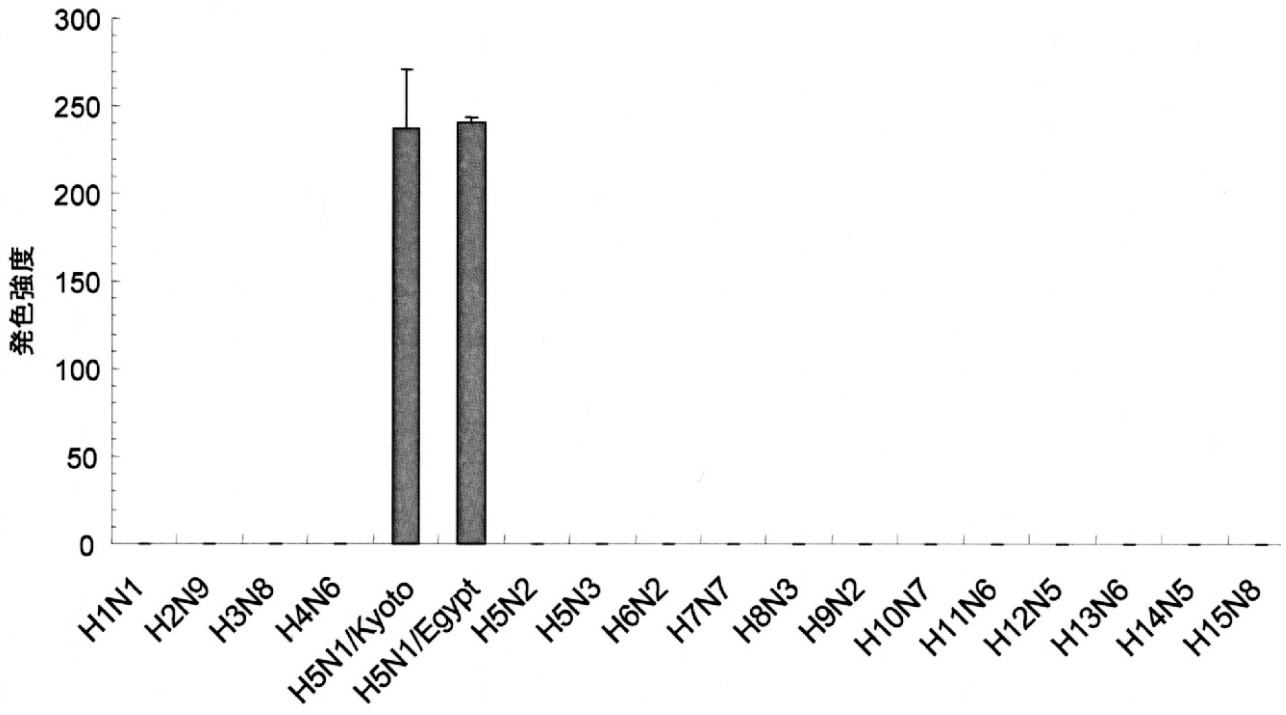
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



---

フロントページの続き

特許法第30条第1項適用申請有り 1.平成20年10月1日に第56回日本ウイルス学会学術集会・会長  
森島 恒雄発行の「第56回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集」において発表 2.平成20年1  
1月14日にインターネットに掲載のBiochemical and Biophysical Resea  
rch Communications 378(2009)197-202)において発表

(72)発明者 ドゥ アナリワ

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 芝井 勇亮

神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内

(72)発明者 伊藤 大輔

神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内

(72)発明者 岩本 久彦

神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内

专利名称(译)	高致病性禽流感H5N1亚型病毒检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011257138A</a>	公开(公告)日	2011-12-22
申请号	JP2009159020	申请日	2009-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学 田中贵金属工业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学 田中贵金属工业株式会社		
[标]发明人	中屋隆明 ドウアナリワ 芝井勇亮 伊藤大輔 岩本久彦		
发明人	中屋 隆明 ドウ アナリワ 芝井 勇亮 伊藤 大輔 岩本 久彦		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/56983 G01N2333/11		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z G01N33/553 G01N33/531.B		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	2009059544 2009-03-12 JP 2009138714 2009-06-09 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)	(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2011-2 (P2011-2 平成23年12月22日(2011.12.22))
	(43) 公開日 平成23年12月22日(2011.12.22)		
公开的是高致病性禽流感病毒亚型H5N1，迅速且简单地说，提供了免疫测定试剂盒和免疫测定用于特异性地检测。此外，在本发明中，H5N1亚型病毒，快速和简单地提供了一个检测试剂盒和免疫层析通过在高灵敏度特异性检测的检测方法。本发明人已经发现，其中H5N1亚型病毒制备作为免疫原不与H5N2亚型H5N3或病毒亚型反应的单克隆抗体4G6，看特异性结合H5N1亚型病毒它被发现。此外，本发明人发现，通过使用单克隆抗体4G6的免疫测定，被认为是仅特异性检测禽流感病毒亚型H5N1。此外，本发明人已经发现，通过添加具有非离子表面活性剂和氧原子和一个含有氮原子的开发用于免疫色谱法的使用溶液的极性基团的乙烯类水溶性聚合物，检测的灵敏度提高我也发现了。【选择图】无	(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード(参考)
		GO 1 N 33/569 (2006.01) GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/553 (2006.01) GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/569 L GO 1 N 33/543 5 2 1 GO 1 N 33/543 5 4 1 Z GO 1 N 33/553 GO 1 N 33/531 B
	(21) 出願番号 特願2009-159020 (P2009-159020) (22) 出願日 平成21年7月3日(2009.7.3) (31) 優先権主張番号 特願2009-59544 (P2009-59544) (32) 優先日 平成21年3月12日(2009.3.12) (33) 優先権主張国 日本国(JP) (31) 優先権主張番号 特願2009-138714 (P2009-138714) (32) 優先日 平成21年6月9日(2009.6.9) (33) 優先権主張国 日本国(JP)	(71) 出願人 504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号 (74) 代理人 100102668 弁理士 佐伯 憲生 (71) 出願人 509352945 田中贵金属工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目7番3 110000268 (74) 代理人 特許業務法人田中・岡崎アンドアソ ツ (72) 発明者 中屋 隆明 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立 人大阪大学内	審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全)
			最終頁に