

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 306164

(P2002 - 306164A)

(43)公開日 平成14年10月22日(2002.10.22)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/02	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
C 1 2 P 21/08		33/569	L 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	ZNA C

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 15数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 111478(P2001 - 111478)

(22)出願日 平成13年4月10日(2001.4.10)

特許法第30条第1項適用申請有り 2000年10月14日 日本ウイルス学会主催の「日本ウイルス学会第48回学術集会・総会」において文書をもって発表

(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

(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

(72)発明者 池上 徹郎

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

(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】 エボラウイルスを認識するモノクローナル抗体

(57)【要約】

【課題】 エボラ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】 エボラ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】 エボラ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】 エボラウイルスのザイール株、スーダン株およびレストン株の核タンパク質を認識する、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】 エボラウイルスザイール株の核タンパク質の631から739番目のアミノ酸から成るエピトープを認識する、請求項1又は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】 エボラウイルスザイール株の核タンパク質の648番目から673番目のアミノ酸から成る26アミノ酸から成るエピトープを認識する、請求項1から3の何れかに記載のモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項5】 受託番号FERM P - 18279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6】 請求項1から5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7】 請求項1から5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8】 エボラ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ーム細胞とを融合して得られる、請求項7に記載のハイブリドーマ。

【請求項9】 受託番号FERM P - 18279を有するハイブリドーマ。

【請求項10】 請求項7から9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する工程を含む、請求項1から5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11】 請求項1から5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、エボラ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12】 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含む、請求項10に記載のエボラ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5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13】 請求項1から5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、エボラ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、エボラウイルスを

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、エボラ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エボラ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】エボラウイルスへの感染は、高い致死率を伴う出血熱を発症する原因となる(World Health Organization, 1997. Part One: Background information on the organisms and the disease, p.1-3. In WHO recommended guidelines for epidemic preparedness and response: Ebola Haemorrhagic Fever(EHF))。エボラウイルスが現存する地域は限定されているが、国際的な交通や取引の増加に伴って、他の地域におけるヒト及び動物への感染の危険は増加している。エボラウイルスは、医療関係者や家庭内におけるヒトからヒトへの二次的感染を生じるので(Dowell, S. F. 他 1999. Transmission of Ebola hemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. J. Infect. Dis. 179 Suppl. 1: S87-91; 及びWorld Health Organization, 1997. Part One: Background information on the organisms and the disease, p.1-3. In WHO recommended guidelines for epidemic preparedness and response: Ebola Haemorrhagic Fever(EHF))、感染の初期の段階で診断し、社会に注意を喚起することが重要である。

【0003】遺伝的分岐に基づいて、エボラウイルスには、ザイール、スーダン、コートジボアール及びレストンと称される4サブタイプに分類されている(Feldmann, H. 他 1999. Classification, Structure, and Replication of Filoviruses, p.1-5. In H. ?D. Klenk(ed.), Marburg and Ebola viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. 235. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; Georges-Courbot, M.C. 他 1997. Isolation and phylogenetic characterization of Ebola viruses causing different outbreaks in Gabon. Emerg. Infect. Dis. 3: 59-62; 及びPeters, C.J. 他 1999. An introduction to Ebola: The virus and the disease. J. Infect. Dis. 179 Suppl. 1: iv-xvi)。ザイール株、スーダン株、及びコートジボアール株はヒト及びサルにおいて重篤な臨床症状を呈するが、レストン株はサルでのみ症状を呈する(Fisher-Hoch, S. P. 他 1992. Pathogenic potential of filoviruses: Role of geographic origin of primate host and virus strain. J. Infect. Dis. 166: 753-763; Miller, R.K. 他 1990. Filovirus infections among persons with occupational exposure to nonhuman primates. MMWR. 39: 266-267, 273; 及びMiller, R.K. 他 1990. Filovirus infections in animal handlers. MMWR. 39: 221)。エボラウイルス感染による発症は急性であり、臨床症状の

開始時点には抗体の産生は見られないことが多い (Baize, S. 他 1999. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat. Med.* 5: 423-426 ; 及び Ksiazek, T.G. 他 1999. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl. 1: S177-187)。一方、患者の血液及び組織 (肝臓等) におけるウイルス量は非常に高い (Ksiazek, T.G. 他 1999. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl. 1: S177-187)。従って、特異的抗体よりはウイルス抗原を検出することによって、エボラウイルス感染の迅速かつ正確な一次スクリーニングを行うことができる (Peters, C.J. 他 1999. An introduction to Ebola: The virus and the disease. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl. 1: iv-xvi)。

【0004】エボラウイルス感染の抗原検出系は既に報告があり、利用されている (Ksiazek, T.G. 他 1992. Enzyme immunosorbent assay for Ebola virus antigens in tissues of infected primates. *J. Clin. Microbiol.* 30: 947-950)。しかしながら、酵素結合免疫吸収アッセイ (ELISA) についての情報は非常に少なく、例えば、この系で使用されるモノクローナル抗体の報告は、分子の特異性の点についてもなされていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、エボラ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エボラ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。

【0006】

【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、組み換えエボラウイルス核タンパク質 (rNP) に対するモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いてサンドイッチELISA法により試料中のエボラウイルス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エボラ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。

【0007】即ち、本発明によれば、エボラ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。本発明の好ましい態様によれば、エボラウイルスのザイール株、スーダン株およびレ斯顿株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；エボラウイルスザイール株の核タンパク質の631から739番目のアミノ酸から成るエピトープを認識するモノクローナル抗体またはその断片；エボラウイルスザイール株の核タンパク質の648番目から673番目のアミノ酸から成る26アミノ酸から成るエピトープを認識するモノクローナル抗体またはその断片；及び受託番号FERM P - 18279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；が提供される。

【0008】本発明の別の側面によれば、上記した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、上記した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。本発明の好ましい態様によれば、エボラ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ーム細胞とを融合して得られる、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；及び受託番号FERM P - 18279を有するハイブリドーマが提供される。

【0009】本発明のさらに別の側面によれば、上記した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。

【0010】本発明のさらに別の側面によれば、上記した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、エボラ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。本発明の好ましい態様によれば、少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含む、エボラ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) 本発明によるエボラ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、本発明によるエボラ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含むことを特徴とする、エボラ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、エボラウイルスの核タンパク質を認識することを特徴とする。エボラウイルスの種類は特に限定されず、ザイール株、スーダン株、コートジボアール株及びレ斯顿株の何れでもよい。本発

明のモノクローナル抗体は、これら4種の株の全てを認識するものでもよいし、これらのうちの一部(例えば、上記4種のうちの3種、2種又は1種)のみを認識するものでもよい。本発明のモノクローナル抗体は、目的に応じて適宜好ましい抗体を選択して使用することができる。即ち、エボラウイルスの全般的な検出や定量を目的とする場合には、上記4種の株の全てを認識するモノクローナル抗体を用いることが好ましく、また特定の株を特異的に検出したい場合には、他の株を交差反応しない特定の株に特異的なモノクローナル抗体を用いることが好ましい。

【0013】本発明のモノクローナル抗体としては、例えば、エボラウイルスザイル株の核タンパク質の631から739番目のアミノ酸から成るエピトープを認識するものが挙げられ、より具体的には、エボラウイルスザイル株の核タンパク質の648番目から673番目のアミノ酸から成る26アミノ酸から成るエピトープを認識するものが挙げられる。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3-3Dが挙げられる。モノクローナル抗体3-3Dを産生するハイブリドーマは、受託番号FERMP-18279として、平成13年3月28日付けで経済産業省 産業技術総合研究所 生命工学工業技術研究所 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3号)に寄託されている。

【0014】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、エボラ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。

【0015】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CH1(H鎖定常領域中の1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。

【0016】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。

【0017】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、エボラ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に用いられる不溶性担体を挙げることができる。

【0018】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、エボラ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-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、フィコピリタンパク、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。

【0019】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

【0020】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、上記したエボラ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、本発明のエボラ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。

【0021】まず、哺乳動物をエボラ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/JNcrj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髓腫由来細胞株が確立しているのが好ましい。

【0022】免疫に用いるエボラウイルスの核タンパク質(NP)は、天然のNPでも組み換え体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、組み換え体の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； α -グルカン(多糖体)；ムラミルジペプチド(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。

【0023】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。

【0024】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。

【0025】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。

【0026】最終免疫後、免疫した哺乳動物から脾臓細胞を摘出し、骨髓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、また骨髓腫由来の細胞株は、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。マウスの骨髓腫由来の細胞株としては、P3X63-Ag8.653、Sp2/O-Ag14、FO.1、S194/5.XX0BU.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。

【0027】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。

【0028】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。

【0029】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。

【0030】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、アフィニティークロマトグラフィ、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。

【0031】3. 本発明のモノクローナル抗体を用いたエボラ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、エボラ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；

【0032】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。

【0033】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、エボラ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。

【0034】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。

【0035】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。

【0036】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。

【0037】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。

【0038】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。

【0039】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。

【0040】4. 本発明のモノクローナル抗体を用いるエボラ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エボラ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エボラ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ことはない。

【0041】

【実施例】(A)材料及び方法

(1)細胞培養

ハイブリドーマ、及びその親細胞株であるP3/Ag568は、10%牛胎児血清(FBS)、非必須アミノ酸(G

ibco BRL)及び抗生物質(ストレプトマイシン及びペニシリン、Gibco BRL)を補充したRPMI1640(Gibco BRL)で培養した。HATサプリメント(Gibco BRL)をハイブリドーマの選択中に培地に添加した。Tn5細胞は、10%FBS、2%トリプトースホスフェートブロス(Difco)及びカナマイシンを添加したTC100(Gibco BRL)で培養した。

【0042】(2)組み換えNP

エボラウイルスザイール株の組み換え核タンパク質(rNP)をN末端にヒスチジンタグを付してバキュロウイルス発現系により発現させた。即ち、ザイール株のcDNA断片の完全オープンリーディングフレーム(Sanchez, A. 他 1989. The nucleoprotein gene of Ebola virus: cloning, sequencing, and in vitro expression. *Virology*. 170: 81-91)をPCRで増幅し、NPのN末端にインフレームでヒスチジンタグを付加するpQE31プラスミド(Qiagen)に挿入した。次いで、cDNAをヒスチジンタグごと、トランスファーベクター(pAcYM1)(Matsuura, Y. 他 1987. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 68: 1233-1250)に組み込んだ。組み換えバキュロウイルスを、トランスファープラスミド及びウイルスDNAの同時トランスフェクションによって生成した。rNPをNiアガロース(Qiagen)によって組み換えバキュロウイルスを感染させたTn5細胞ライセートから精製した。タンパク質濃度をプロテインアッセイキット(Bio-Rad, Hercules, CA)によって測定した。PCR増幅後、NPの異なる部分に相当するポリペプチドを、pGEX2Tベクター(Amersham Pharmacia, Little Chalfont, U.K.)を用いて大腸菌中でGSTとの融合タンパク質として発現させた。この実験で用いたプライマーを表1に示す。スーダン株及びレストン株の26アミノ酸を発現させるために、プライマーSNP8EF及びSNP8ERまたはRNP8EF又はRNP8ERをアニーリングし、PCR反応で埋め、pGEX2Tにクローニングした。より長いペプチドを作成するために、これらの断片を連続するPCR反応によって順番に伸長させた。ヌクレオチド配列を自動シーケンサー(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて確認した。部分NPポリペプチドをグルタチオンセファロース4B(Amersham Pharmacia)を用いて精製した。

【0043】

【表1】

Table 1. PCR primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	NP region amplified (Subtype)
EBO (Z) NP/F	CAAGGATCCGAGTATGGATTCTCG	From A. A. 1 (Zaire)
EBO (Z) NP/R	ATGGATCCATGCTCATTCACTGAT	To A. A. 739 (Zaire)
EBO NP8F	CCGGATCCACTCAAGAGGCCA	From A. A. 631 (Zaire)
EBO NP8R	TGCGAATTCAGTATGATGTTGC	To A. A. 739 (Zaire)
EN8/2-1R	AAAAGAATTCATCATCTTCATCA	To A. A. 674 (Zaire)
EN8/1.5R	CTAGAATTCATCTTCATCATATGATAAT	To A. A. 673 (Zaire)
EN8/2-2R	CAGGAATTCATCTCATATGATAATAC	To A. A. 672 (Zaire)
EN8/2.5R	CTGAATTCACATCATATGATAATACAAAAC	To A. A. 671 (Zaire)
EN8/2-14F	GGATCCATGTATCGCCACATTC	From A. A. 651 (Zaire)
EN8/2-15F	GGATCCGAGATGTATCGCCAC	From A. A. 650 (Zaire)
EN8/2-16F	GGATCCGAGGAGATGTATCGC	From A. A. 649 (Zaire)
EN8/2-17F	GGATCCTTTGAGGAGATG	From A. A. 648 (Zaire)
SNP8EF	CGCGGATCCCTAGAGAAACATATATCATCTCCTAAAAACACAG -GGTCCATTG	From A. A. 648 (Sudan)
SNP8ER	GCTGAATTCATCACTCATTAGGTGATAATAATTGATTGCCTCAA -ATGGACCCCTGTG	To A. A. 673 (Sudan)
RNP8EF	CGCGGATCCCTTAGGAGAGACATATCACCATCTGCTGAGAACTCAA -GGTCCATTG	From A. A. 648 (Reston)
RNP8ER	GCTGAATTCATCACTCATTAGGTGATAATAATTGATTGAGCTCAA -ATGGACCCCTGTG	To A. A. 673 (Reston)
SN8EF+	GGATCCCTCCCAATCAACTCTAAAAAGAGTTCCGCACTAGAAGAA -ACATATTATCATC	From A. A. 638 (Sudan)
SN8ER+	GAATTCAGCCACTTTCAGTGCTAAAAGCAATGGTTCATCACTCA -TTAGGTGATAATAATTG	To A. A. 683 (Sudan)
SN8EF2+	GGATCCTCTGAAAGTGAAGCTCTCCCAATCAACTCTA	From A. A. 633 (Sudan)
SN8ER2+	GAATTCCTCAAAGATATATTCCTTGCCACTTTCAGTGCTAA	To A. A. 688 (Sudan)
SN8ER3+	GAATTCATTCAAGGGAGTCTGAAAGATATATTCCTTGCC	To A. A. 693 (Sudan)
SN8ER4+	GAATTCACCTCTCTAAGGCCTCTTCACTCAACCACGGCGGGT -AGGCTTCTCAAGGGAGTCTGAAAGAT	To A. A. 708 (Sudan)
SN8ER5+	GAATTCATACCGCCAGAGGAATTGCTGGCCATCAATGACCAGAT -AACGATTTCTCTCTAAGGCCTCCTT	To A. A. 724 (Sudan)
SN8ER6+	GAATTCAGTCATGTTGAAGAACGGCAAGGAACTTGTCCCGTAGGC -TCATTACCGCCAGAGGAATTG	To A. A. 738 (Sudan)
RES-N8F	GCTGGATCCTCACAATTGAATGAAGACC	From A. A. 631 (Reston)
RES-N8R	GTGGAATTTCTACTGATGGTGCTGCAA	To A. A. 739 (Reston)

【0044】(3) ELISA

マイクロエルイムプレート (Falcon, Franklin Lakes, NJ) に、リン酸緩衝液 (PBS) 中の 100 ng / ウエルの精製 rNP 又は部分 NP を 4 で一晩コートし、5% スキムミルクでブロッキングした。試料 (100 µl) を各ウエルに添加し、結合した抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRPO) 標識抗マウス IgG (Zymed, San Francisco, CA) 及び A B T S 基質溶液 (Boehringer Mannheim, Germany) により検出した。

【0045】(4) モノクローナル抗体の樹立

BALB / c マウスに精製 rNP を 3 又は 4 回免疫した。最後の免疫の 3 日後に脾臓細胞を採取し、PEG (Gibco BRL) により P3 / A g 5 6 8 細胞に融合した。ハイブリドーマ細胞の培養上清を抗原として精製 rNP を用いて ELISA によりスクリーニングした。モノクローナル抗体を MA b Trap GII 抗体精製キット (Amersham Pharmacia) を用いて培養上清から精製した。モノクローナル抗体のアイソタイプはマウスモノクローナル抗体アイソタイプキット (Gibco BRL) を用いて決定した。

【0046】(5) ポリクローナル抗体

ウサギポリクローナル抗体は、アルミニウムアジュバンド (Pierce, Rockford, IL) 中に乳化した精製 rNP を

皮下注射することによって作製した。この抗血清の力価は、抗原として rNP 発現細胞を用いる免疫蛍光アッセイにおいて、> 1 : 10,000 であった。

【0047】(6) 抗原捕捉 ELISA

精製したモノクローナル抗体を室温で 2 時間、100 µl の PBS 中において 100 ng / ウエルの濃度でマイクロエルイムプレート (Falcon) にコートした後、PBS 中の 5% スキムミルクで室温で 1 時間ブロッキングした。プレートを 0.5% Tween 20 を含有する PBS (PBST) で洗浄した後、100 µl の rNP 含有試料又は臨床試料を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを PBST で洗浄し、0.5% スキムミルク中に 1 : 1000 に希釈した 100 µl のウサギポリクローナル抗体を各ウエルに添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、プレートを PBST で洗浄し、HRPO 標識抗ウサギ IgG (Zymed) を添加した。プレートを室温で 1 時間インキュベートした。PBST でさらに洗浄後、100 µl の A B T S 基質溶液 (Boehringer) を添加し、室温で 30 分間インキュベーションした後、光学濃度 (OD) を 405 nm で測定した。

【0048】(7) 臨床試料

フィリピンでエボラウイルスレストン株に天然で感染したカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 由来の組織お

よび血清を臨床試料として使用した。これらの試料は - 80 又は液体窒素中で保管した。これらの動物におけるレストン感染の状態は既に確立している (Miranda, M.E. 他 1999. Epidemiology of Ebola(Subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. J. Infect. Dis. 179 Suppl. 1: S115-119)。肝臓及び脾臓組織 (約 10% w/vol) を、0.05% Tween20, 1% Triton X100及び5%スキムミルクを含むPBS中でホモジナイズした。遠心後、上清を出発物質として使用した。血清は1%Tritonを添加して不活化し、5%スキムミルク中に希釈した。

【0049】(8) ウエスタンプロット

SDS-PAGE及びウエスタンプロット分析は、10%アクリルアミドゲル及びImmobilon ナイロンメンブレン (Millipore, Bedford, MA) を用いて行った。モノクローナル抗体を含有する腹水を1:1000に希釈して使用した。結合した抗体は、HRPO標識抗マウスIgG (Zymed) およびPOD基質 (和光純薬) を用いて検出した。GSTに対するポリクローナル抗体はAmersham Pharmaciaから購入した。

【0050】(B) 結果

(1) モノクローナル抗体の樹立

rNP反応性IgG抗体を分泌する12のハイブリドーマ株を樹立した。これらの抗体を精製後、抗原捕捉ELISAで試験した。図1に示すように、2つの抗体3-3D及び2-11Gがこの試験では反応性であった。他のモノクローナル抗体は、rNPの濃度を上げて、抗体3-3D及び2-11Gのような特異的反応を示さなかった。抗体3-3D及び2-11GのアイソタイプはIgG1であった。なお、抗体3-3Dを産生するハイブリドーマは、受託番号FERM P-18279として、平成13年3月28日付けで経済産業省 産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所 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3号) に寄託されている。

【0051】(2) 抗原捕捉ELISA

抗体3-3D及び2-11Gを用いる抗原捕捉ELISAの感度を調べた。このELISAで検出できたrNPの最小量はいずれの抗体でも、約33ng/ウエルであった (図1)。天然のNPと抗体3-3D及び2-11Gとの反応性を確認するために、エボラウイルスレストン株に感染したサルからの臨床試料を使用した。図2に示す通り、抗体3-3Dを用いる抗原捕捉ELISAによりレストン陽性組織 (A) 及び血清 (B) 試料においてエボラNPを検出することができた。2つの動物からの2つの肝臓試料 (肝臓1及び肝臓2) において、1:160又は1:320の希釈倍率まで陽性反応が示された。脾臓試料は1:160の希釈倍率まで陽性反応を示し、血清試料は1:160の希釈倍率まで陽性であった。未感染のサル由来の同様に処理した組織において

は、組織試料では1:10、血清試料では1:20という低い希釈倍率においても結果は陰性であった。これらの結果は、抗体3-3Dを使用する抗原捕捉ELISA法は感度が高く、エボラウイルスレストンに感染したサル由来の臨床試料に応用できることを示している。

【0052】(3) モノクローナル抗体3-3Dのエピトープマッピング

モノクローナル抗体3-3Dを用いたELISA法が、レストン株及びザイル株以外のエボラウイルスのNPの場合にも適用可能かどうかを調べるために、モノクローナル抗体3-3Dによって認識されるエピトープのマッピングを行った。ザイル株NPの全アミノ酸配列を包含するように各々約100アミノ酸から成る8個のオーバーラップするペプチドを作成した。モノクローナル抗体3-3Dは、ウエスタンプロット及びELISAにおいて631から739番目のアミノ酸残基に対応するペプチドと反応性を示した。最小のエピトープを特定するために、抗体の認識に必要なC末端のアミノ酸残基をまず決定した。図3Aに示す通り、ウエスタンプロットで十分な反応性を示すためには、673番目のアミノ酸は必要であった。十分な反応性を示すためには、C末端の673番目のアミノ酸から始まって上流の26アミノ酸が必要であり、23アミノ酸では反応は弱かった (図3B)。これらの結果は、モノクローナル抗体3-3DはNPの648番目から673番目のアミノ酸から成る26アミノ酸によって形成される立体エピトープを認識していることを示す。

【0053】(4) モノクローナル抗体3-3Dとエボラウイルスの他の株との交差反応性ザイル株において抗体の認識に必要なであった26アミノ酸を含むC末端の109アミノ酸 (ザイル株及びレストン株) 又は106アミノ酸 (スーダン株) から成る長いペプチドで試験した場合、モノクローナル抗体3-3Dはウエスタンプロット及びELISA (図4) でこれら3種のペプチドと反応した。これらの結果は、モノクローナル抗体3-3Dを用いるELISAは、スーダン株、ザイル株およびレストン株のNPを検出できることを示す。

【0054】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体は、エボラウイルスを特異的に認識することができる。また、本発明の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エボラウイルスを特異的に検出する方法が提供される。また、本発明のELISAシステムでは、臨床試料以外には生ウイルスは含まれていないので、高度のセキュリティー封じ込めが不要であり、通常の実験室で本システムを再生産することができ、非感染性組み換えタンパク質により調製することができる二次ポリクローナル抗体を入手することも可能である。

【0055】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kokuritsu Kansensyo Kenky
usyocho

<120> A monoclonal antibody rec
ognizing Ebola virus

【0056】

<130> A11166A

<200> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 1

caaggatccg agtatggatt ctcg

【0057】

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 2

atggatccat gtcattcac tgat

【0058】

24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 3

ccgggatcca ctcaagaggc ca

【0059】

22

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 4

tgccaattca ctgatgatgt tgc

【0060】

23

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 5

aaaagaattc actcatcctt catca

【0061】

25

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 6

ctagaattca atccttcac atatgataat

【0062】

30

<210> 7

<211> 29

<212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 7
 caggaattc**cb**cttcatcata tgataatac
【 0 0 6 3 】 29
 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 8
 ctgaattcac atcatatgat aatacaaac
【 0 0 6 4 】 30
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 9
 ggatccatgt atgccacat tc
【 0 0 6 5 】
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 10
 ggatccgaga tgtatcgcca c
【 0 0 6 6 】 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 11
 ggatccgagg agatgtatcg c
【 0 0 6 7 】 21
 <210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 12
 ggatcctttg aggagatg
【 0 0 6 8 】 18
 <210> 13
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 18
 cgcgatccc tagaagaaac atattatcat ctcc
【 0 0 6 9 】 taaaaa cacaggtcc atttg 55
 <210> 14
 <211> 57
 <212> DNA

<213> Synthetic DNA
 <400> 14
 gctgaattc~~ca~~atcactcatt aggtgataat aatt
【0070】 gattgc ctcaaatgga cctgtg 57
 <210> 15
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 15
 cgcggtacct taggagagac ataccacat ctgc
【0071】 tgagaa ctcaaggtcc attg 55
 <210> 16
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 16
 gctgaattca atccttcac atgtgataat aatt
【0072】 gatagc ttcaaatgga ccttgag 57
 <210> 17
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 17
 ggatccctcc caatcaactc taaaagagt tccg
【0073】 cactag aagaacata ttatcatc 58
 <210> 18
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 18
 gaattcagcc actttcagtg ctaaagcaa tggg
【0074】 ttcac actcattagg tgataataat 60
 tg
 <210> 19
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 19
 ggatcctctg aaagtgaagc tctccaatc aact
【0075】 cta 37
 <210> 20
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 20
 gaattctcaa agatatattc cttgccactt tcag
【0076】 tgctaa 40
 <210> 21
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Synthetic DNA
 <400> 21
 gaattcat~~20~~ aagggagtct gaaagatat attc
【0077】 cttgcc 40
 <210> 22
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 22
 gaattcactt ctctaaggcc tccttctcac tcaa
【0078】 ccacgg cggtaggct tctcaaggg 60
 agtctggaaa gat
 <210> 23 73
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 23
 gaattcatac cggccagagg aattgctggc catc
【0079】 aatgac cagataacga ttttcttct 60
 ctaaggcctc ctt
 <210> 24 73
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 24
 gaattcagtc atgttgaaga acggcaagga actt
【0080】 gtcccg taggctcatt accggccaga 60
 ggaattg
 <210> 25
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 25
 gctggatcct cacaattgaa tgaagacc
【0081】 28
 <210> 26
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Synthetic DNA
 <400> 26
 gtggaattct tactgatggt gctgcaa

【図面の簡単な説明】 27

【図1】 図1は、抗原捕捉ELISAでの各モノクローナル抗体の反応性を示す図である。精製モノクローナル抗体(; 3-3D、 ; 2-11G、 ; 2-1G、 x ; 3-3D)を100ng/ウエルの濃度でマイクロプレートにコートし、rNPの捕捉能を、抗原捕捉ELISAでrNPの量を変化させて調べた。

【図2】 図2は、抗原捕捉ELISAでのレストン株に感染した臨床試料の反応性を示す図である。

21

(A) 2頭の感染したサルからの2種の肝臓(及び)及び脾臓()を捕捉ELISAで調べた。未感染のサルからの肝臓(x)及び脾臓()を使用して反応の特性を示す。

(B) 感染()及び2頭の未感染(及び)のサルからの血清を捕捉ELISAで調べた。

【図3】 図3は、ウエスタンブロットによるモノクローナル抗体3-3Dのエピトープのマッピングを示す。

(A) 各々NP(ザイール株)のアミノ酸位置631-

671、672、673又は674に対応するGST融合ペプチドを含む細菌ライセートを、モノクローナル抗体3-3Dとの反応性について調べた。

(B) 各々NP (ザイル株) のアミノ酸位置648、649、650及び651から673に対応するGST融合ペプチドを含む細菌ライセートを、モノクローナル抗体3-3Dとの反応性について調べた。各融合ペプチドの同様の発現レベルを示すために、同時に同様に調製した膜を抗GST抗体で染色した。

【図4】 図4は、エボラウイルスの3種の株由来のNP*10

*上のエピトープ領域に対するモノクローナル抗体3-3Dの反応性を示す図である。ザイル株()及びレ斯顿株()のアミノ酸位置631-739、又はスーダン株()のアミノ酸位置633-738に対応するGST融合ペプチド(100ng/ウエル)をマイクロプレートにコートし、ELISAにおいてモノクローナル抗体3-3Dとの反応性について調べた。無関係のGST融合ペプチド()を陰性コントロールとして用いた。

【図1】

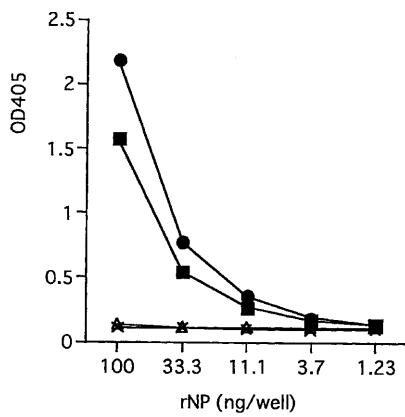


図1. MAb3-3DによるサンドイッチELISA法によるrNPの検出
●; 3-3D、■; 2-11G、x; 3-7D、△; 2-1G

【図2】

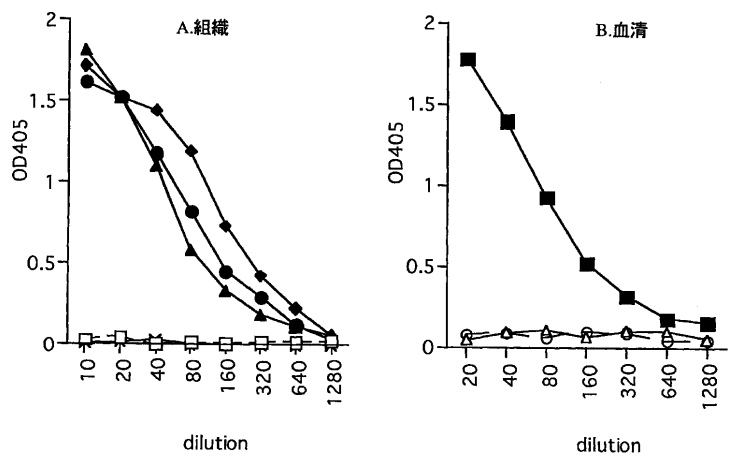


図2. レ斯顿株感染サル血清、組織でのNPの検出

▲; 脾臓、●; 肝臓1、◆; 肝臓2、■; 血清
□; 非感染脾臓、x; 非感染肝臓、○; 非感染血清1、△; 非感染血清2

【図3】

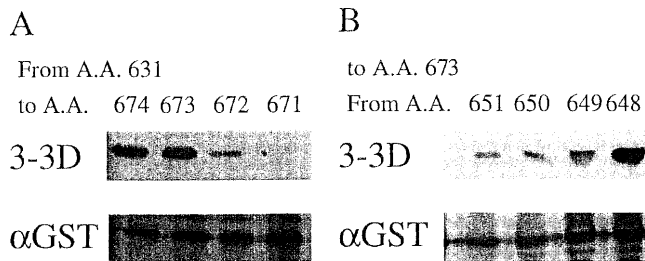


図3. MAb3-3Dのエピトープマッピング

A. アミノ酸631から671、672、673および674に相当するオリゴペプチドとGSTの融合蛋白と3-3Dの反応性をウエスタンブロットにて検討した。
B. アミノ酸648、649、650および651から673に相当するオリゴペプチドとGSTの融合蛋白と3-3Dの反応性をウエスタンブロットにて検討した。

【図4】

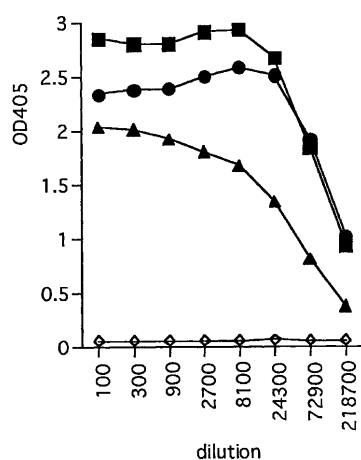


図4. MAb3-3Dのスーダン株NPとの交差反応性

スーダン株(▲)、ザイール株(■)およびレストン株(●)のC末端106(スーダン株)ないし107アミノ酸(ザイール株およびレストン株)とGSTとの融合蛋白の3-3Dとの反応性をELISA法で検討した。

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⁸ (参考)
G 0 1 N 33/569 C 1 2 N 5/00 B

(72) 発明者 池上 徹郎
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

(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

(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

(72) 発明者 倉根 一郎
東京都新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所ウイルス第1部

Fターム(参考) 4B024 AA14 BA32 GA03 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA15
4B065 AA91X AB05 BA08 CA25
CA46
4H045 AA11 AA30 CA01 DA76 EA52
FA72

专利名称(译)	识别埃博拉病毒的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2002306164A	公开(公告)日	2002-10-22
申请号	JP2001111478	申请日	2001-04-10
[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	新倉昌浩 池上徹郎 西條政幸 森川茂 倉根一郎		
发明人	新倉 昌浩 池上 徹郎 西條 政幸 森川 茂 倉根 一郎		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/10 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/569		
FI分类号	C07K16/10 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/569.L C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA15 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/EA52 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种特异性识别埃博拉病毒的单克隆抗体。识别埃博拉病毒核蛋白的单克隆抗体或其片段。

