(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4135996号
(P4135996)

(45)発行日　平成20年8月20日(2008.8.20)　(24)登録日　平成20年6月13日(2008.6.13)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAC
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D
G01N 33/569	(2006.01)	G01N	33/569	J
G01N 33/577	(2006.01)	G01N	33/577	B
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B

請求項の数 7　(全 37 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平5-80099
(22)出願日　平成5年3月15日(1993.3.15)
(65)公開番号　特開平6-90787
(43)公開日　平成6年4月5日(1994.4.5)
審査請求日　平成12年2月29日(2000.2.29)
審判番号　不服2004-4598(P2004-4598/J1)
審判請求日　平成16年3月5日(2004.3.5)
(31)優先権主張番号　92200721.6
(32)優先日　平成4年3月13日(1992.3.13)
(33)優先権主張国　オランダ(NL)

微生物の受託番号　ECACC　93020412
微生物の受託番号　ECACC　93020413
微生物の受託番号　ECACC　93020414

(73)特許権者　390009612
アクゾ　ノーベル　ナムローゼ　フェンノートシャップ
Ａｋｚｏ　Ｎｏｂｅｌ　Ｎ．Ｖ．
オランダ国，６８２４　ベーエム　アンヘム，　フェルペルウェヒ　７６
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(72)発明者　ヤープ・ミシエル・ミデルドルプ
オランダ国、５３４３・ヘー・デー・オッス、スターリングストラート・１５１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】エプスタイン－バールウイルスに関連するペプチド及び核酸配列

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

試料液中のエプスタイン－バーウイルスに対する抗体を検出する方法であって、前記試料を、配列番号２もしくは配列番号４のアミノ酸配列から成るか、または配列番号２もしくは配列番号４のアミノ酸配列の１個もしくは数個のアミノ酸が欠失もしくは置換されているアミノ酸配列または配列番号２もしくは配列番号４のアミノ酸配列に１個もしくは数個のアミノ酸が付加されもしくは挿入されているアミノ酸配列から成り、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列から成るポリペプチドを認識する抗体に対して免疫化学的に反応するペプチドと接触させた後、前記ペプチドと前記試料中の前記抗体との間で形成された免疫複合体を検出し、前記試料中の前記抗体の有無を評価することを特徴とする、前記方法。

【請求項２】

前記ペプチドが、配列番号２もしくは配列番号４のアミノ酸配列の連続した複数アミノ酸が欠失されたアミノ酸配列から成る、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

試料液中のエプスタイン－バーウイルスに対する抗体を検出する方法であって、前記試料を、配列番号５または配列番号６のアミノ酸配列から成るペプチドと接触させた後、前記ペプチドと前記試料中の前記抗体との間で形成された免疫複合体を検出し、前記試料中の前記抗体の有無を評価することを特徴とする、前記方法。

【請求項４】

試料液中のエプスタイン－バーウイルスに対する抗体を検出する方法であって、前記試料を、配列番号５のアミノ酸配列が配列番号６のアミノ酸配列に連結されたアミノ酸配列から成るペプチドと接触させた後、前記ペプチドと前記試料中の前記抗体との間で形成された免疫複合体を検出し、前記試料中の前記抗体の有無を評価することを特徴とする、前記方法。

【請求項５】

試料液中のエプスタイン－バーウイルスを検出する方法であって、前記試料を、配列番号２、配列番号４、配列番号５若しくは配列番号６のアミノ酸配列から成るか、又は、配列番号５のアミノ酸配列が配列番号６のアミノ酸配列に連結されたアミノ酸配列から成るペプチドに対して免疫化学的に反応するモノクローナル抗体と接触させた後、形成された免疫複合体を検出し、前記試料中のエプスタイン－バーウイルスの有無を評価することを特徴とする、前記方法。

【請求項６】

前記モノクローナル抗体が、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ （ＥＣＡＣＣ）, Ｐｏｒｔｏｎ Ｄｏｗｎ（英国）にそれぞれ寄託番号９３０２０４１２、９３０２０４１３または９３０２０４１４として寄託されたハイブリドーマ細胞系により生産されたモノクローナル抗体である請求項５に記載の方法。

【請求項７】

前記モノクローナル抗体が、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ （ＥＣＡＣＣ）, Ｐｏｒｔｏｎ Ｄｏｗｎ（英国）にそれぞれ寄託番号９３０２０４１２、９３０２０４１３または９３０２０４１４として寄託されたハイブリドーマ細胞系により生産されたモノクローナル抗体とエプスタイン－バーウイルスに対する同一の反応性を有する、請求項５に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

本発明は、抗エプスタイン－バールウイルス（ＥＢＶ）抗体に対して免疫化学的に反応性のペプチド、これらのペプチドをコードする核酸配列、これらのペプチドに対するモノクローナル抗体、モノクローナル抗体を産生することが可能な細胞系及び抗イディオタイプ抗体に係る。本発明は更に、本発明の核酸配列を含む組換ベクター分子及びこれらのベクター分子で形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞に係る。本発明は更に、ＥＢＶ又は抗ＥＢＶ抗体を検出するための免疫学的試薬及び方法、並びにエプスタイン－バールウイルス核酸の増幅及び検出方法にも係る。

【０００２】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

ＥＢＶは、アフリカ（地方病性即ちｅ）形のバーキットリンパ腫（ＢＬ）に関して最初に発見された偏在性ヒトヘルペスウイルスである。その後、該ウイルスは上咽頭癌（ＮＰＣ）に関連することも発見され、感染性単核症（ＩＭ）の原因物質であることが示された。感染は通常、幼時期に行われ、一般には無症状であるが、軽度の症状を伴う場合もある。しかしながら、青年期又は成人期に感染すると、末梢における異型リンパ球の存在により特徴付けられるＩＭを生じる恐れがある。これらのリンパ球の大半はＴリンパ球であるが、ＥＢＶに感染した少数のＢリンパ球も含まれる。Ｂリンパ球の感染は、ｉｎ ｖｉｔｒｏでも行われ得る。このような細胞は形質転換されて培養により無限に増殖し、「不滅化」、「潜伏感染」又は「増殖形質転換」細胞などと呼称されている。従来知られている限りでは、ＥＢＶに感染した全個体は一生潜伏感染したままである。これは、循環末梢血液リンパ球中に少数のＥＢＶ－ゲノム陽性形質転換Ｂ細胞が一生持続的に存在することと、ウイルスが中咽頭に連続的且つ周期的に放出されることにより立証された。

【０００３】

大部分の症例ではＥＢＶ感染の結果、一時的に衰弱性であり得るが、常に良性且つ自己限

定性なリンパ増殖性疾患を生じる。しかしながら、免疫抑制された個体では結果が完全に悪性になる場合もある。故意に免疫抑制した個体、特にシクロスポリンＡで治療した臓器移植幼児、このごろではＨＩＶ感染個体の場合、又は昔からみられるような遺伝的にＸＬＰ（ｘ連関増殖症候群）遺伝子を有する疾患男子の場合のような個体がこれに該当する。これらの場合、悪性結果はＥＢＶ感染Ｂ細胞のポリクローナル増殖に起因する。更に、このような患者では口腔白斑症の病変部にウイルスの無制御な上皮複製を検出することができる。従って、免疫応答はＥＢＶ感染の制御に中枢的な役割を果たす。

【０００４】

上述のように、ＥＢＶはヘルペスウイルスの１員である。ＥＢＶは以下の構造特性を有する。

【０００５】

－ＥＢＶゲノムは直鎖状二重鎖ＤＮＡ分子（１７３０００塩基対）から構成される。

【０００６】

－ビリオンは２０面体キャプシドに包囲されたコア（タンパク質及びＤＮＡ）とキャプシドを包囲する膜エンベロープとから構成される。２０面体キャプシドは６量体又は５量体キャプソメアから構成される。膜エンベロープは外側表面にスパイクを有するタンパク質／脂質２重膜から構成される。キャプシドシェルとエンベロープとの間のスペースは、テグメントと呼称されるアモルファスタンパク質で充填されている。

【０００７】

－全ヘルペスウイルスと同様に、ＥＢＶは一次感染後に宿主中で一生潜伏感染を生じ得る。この潜伏は、ＥＢＶとそのヒト宿主との間で宿主免疫系により制御される完全な平衡を意味する。

【０００８】

従来、ほとんどの生化学的及び生物学的研究は３種のＥＢＶ原型株、即ちＢ９５－８（マーモセット細胞系で産生された形質転換ウイルス）、Ｐ３ＨＲ１（バーキットリンパ腫細胞系により産生された非形質転換ウイルス）及びＲａｊｉ（バーキットリンパ腫細胞系における潜伏ウイルス）で実施されている。

【０００９】

ここ数年間に原型ウイルス株Ｂ９５－８の完全ＤＮＡ配列が決定された。この配列の解析の結果、８０以上のオープンリーディングフレームが同定された（Ｂａｅｒら，１９８４，Ｎａｔｕｒｅ ３１０，ｐ．２０７－２１１）。

【００１０】

ＥＢＶはその生物学的特性（潜伏感染）が従来のウイルス解析に適していないため、生物学的研究に特に問題がある。更に、細胞及び宿主範囲は一般にｉｎ ｖｉｔｒｏで培養することができないヒト（及び少数の高等霊長類）Ｂリンパ球及び上皮細胞に事実上制限される。更に、ウイルスが溶菌複製する完全に許容可能な細胞型が存在しないため、大量のウイルスの製造能力は非常に制限されている。

【００１１】

Ｂ９５－８，Ｐ３ＨＲ１及びＲａｊｉ単離株のＤＮＡ分子は従来、詳細な制限エンドヌクレアーゼマッピング、大腸菌プラスミド及びバクテリオファージλへのクローニング、並びにヌクレオチド配列決定のための原型であった。

【００１２】

ＥＢＶ－ゲノムは、ユニークなタンデムに反復するＤＮＡ成分から構成される単一の二重鎖ＤＮＡ分子から構成される。ＤＮＡ分子の各末端は、ゲノムの共有結合及び循環を可能にする多重末端配列を含む。ウイルス粒子内では、ＥＢＶゲノムは直鎖形でしか検出することができない。他方、潜伏感染細胞の核の内側では円形エピソームとして存在する。

【００１３】

内部反復配列ＩＲ１～ＩＲ４は、ＥＢＶゲノムを５つのユニーク領域に分離する。Ｕ２及びＵ３領域はＥＢＶ単離株によって著しく異なり、Ｕ２はＥＢＶのＰ３ＨＲ－１株ではほぼ完全に欠失されている。

【００１４】
ＥＢＶリーディングフレームの名称はウイルスゲノムにおけるその位置に基づく。名称は、発現が開始されるＢａｍＨ１又はＥｃｏＲ１制限フラグメントの頭文字で始まる。名称の３番目の文字は、発現が標準地図上で左向きであるか右向きであるかに依存してＬ又はＲである（例えば、ＢＬＬＦ２はＢａｍＨ１制限フラグメントＬで開始する第２番目の左向きのリーディングフレームである）。
【００１５】
ＥＢＶの産生サイクルにおけるウイルス抗原の血清学的分類は、種々の蛍光法により行われる。
【００１６】
固定した潜伏感染Ｂ細胞（例えばＲａｊｉ細胞）の核中で抗補体免疫蛍光法により特異的に検出された抗原は、エプスタイン－バール核抗原（ＥＢＮＡ）として分類される。
【００１７】
化学的因子又はウイルス因子によるウイルス遺伝子発現の活性化後、ウイルスＤＮＡ合成の阻害により合成が阻止されるような初期抗原（ＥＡ）の類が検出される。使用される固定液の型（メタノール又はアセトン）に応じて２種の異なるＥＡ組即ちEA_R及びEA_Dが検出可能である。ＥＡは誘導細胞の細胞質及び核中で間接免疫蛍光法により検出可能である。ウイルスＤＮＡ合成の開始後（この合成に依存して）、ウイルス産生細胞（例えばP_3HR_1細胞）の細胞質及び核中で間接免疫蛍光法により検出可能なウイルス構造タンパク質（ＶＣＡ）が合成される。ウイルス産生のために誘導された生存可能な感染細胞の表面には、１組の抗原（ＭＡ）が間接的免疫蛍光法により検出可能である。これらの抗原はウイルスエンベロープ上にも検出することができ、ウイルス中和のための重要なターゲットである。ヒト血清中におけるＥＢＶ特異抗原の検出は、Ｍｅｎｋｅ及びＨｅｎｌｅ（Ｈｕｍａｎ　Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ，　５，　５５１－５６５，　１９７４）により記載されているような血清学的方法により定型的に実施することができる。
【００１８】
生化学及び免疫蛍光データに基づき、５種の異なる抗原分子の型を区別することができる。種々のウイルスポリペプチドはその分子量により命名され、ウイルスエンベロープタンパク質以外は共通名称がついていない。５種の異なる抗原グループは以下の通りである。
【００１９】
Ａ．潜伏状態中に発現される抗原グループ（ＥＢＮＡ及びＬＭＰ）。
【００２０】
Ｂ．ゲノム活性化及びウイルス増殖の初期誘導に関与する抗原グループ（ＩＥＡ）。
【００２１】
Ｃ．ＩＥＡ遺伝子産物により誘導され、ウイルスＤＮＡの複製に必要な抗原グループ。これらの抗原は大部分がウイルス酵素である（ＥＡ）。
【００２２】
Ｄ．ウイルス粒子の構造成分であり、ウイルスＤＮＡ合成の開始後にウイルス増殖サイクルで後期に発現される抗原グループ（ＶＣＡ）。
【００２３】
Ｅ．感染細胞の細胞膜中で発現される抗原グループ（ＭＡ）。
【００２４】
ＥＢＶのウイルスキャプシド抗原（ＶＣＡ）。
【００２５】
この抗原複合体については、使用されるポリアクリルアミドゲル系、細胞系及び化学的インデューサ並びに使用される血清が異なるため、種々の研究で同定されたＥＢＶ特異的タンパク質を比較するのは困難であるという問題もある。
【００２６】
Ｄｏｌｙｎｉｕｋら（１９７９）は、精製ビリオンに関連する合計３３個のタンパク質について記載している。洗浄剤による示差可溶化によると、ヌクレオキャプシドは少なくと

も７個のタンパク質から構成されると考えられる。ＶＣＡ複合体の主要成分は主要キャプシドタンパク質（ＭＣＰ）である。ＥＢＶ－ＭＣＰはウイルスゲノムのＢｃＬＦ１リーディングフレームの内側でコードされ（Ｂｅａｒら，　１９８４）、７．５～９．０のｐＩを有するＥＢＶ産生細胞系で１５３～１６０ｋＤａ非グリコシル化タンパク質として発現される。このタンパク質は細胞質中で可溶形態で合成された後、核に輸送され、キャプシドに封入され、もはや洗浄剤により可溶化されない。別の主要ＶＣＡ成分は１２５ｋＤａの分子量を有しており、グリコシル化されている。このタンパク質はウイルスゲノムのＢＡＬＦ４リーディングフレームの内側でコードされる。この糖タンパク質は最初はＶＣＡ成分として分類されたが、最近の知見によると、実際には細胞質及び核膜構造に関連するものと思われる。

【００２７】

従来記載されている実験（Ｊ．Ｍ．Ｍｉｄｄｅｌｄｏｒｐ及びＰ．Ｈｅｒｂｒｉｎｋ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈ．，　２１，　１３３－１４６，　１９８８）は、種々のＥＢＶ疾患に関して診断上関連するＥＢＶマーカータンパク質の同定及び特徴付けを目的としている。

【００２８】

これは、ＶＣＡ／ＥＡ又はＥＡの発現のために誘導されたウイルス産生細胞系ＨＨ５１４－Ｃ１６（Ｐ３ＨＲ１の超誘導体）、並びにＥＢＶ陰性細胞系Ｒａｍｏｓ及びＢｊａｂから調製された抗原を含むイムノブロットストリップを使用することにより実施された。（完全な）潜伏状態でＥＢＶゲノムを担持する細胞系即ちＸ５０－７及びＪＣ－５を使用して詳しくＥＢＮＡ／ＬＭＰを研究することができる。

【００２９】

健康な血清陽性供血者の血清と、ＩＭ患者及び慢性ＩＭ患者又は上咽頭癌のようなＥＢＶ関連腫瘍患者の血清とでＥＢＶ抗体応答のパターンが研究された。定義されたＥＢＶゲノム産物に対して反応性のポリクローナル及びモノクローナル抗体を使用し、この実験系で検出されたタンパク質バンドのいくつかを特徴付けることができる。しかしながら、これらの研究は所定の分子量を有するポリペプチドのタンパク質についてしか記載していない。これらのタンパクのＥＢＶゲノム上のコーディング配列については何ら記載されていない。イムノブロット上の免疫反応バンドが同一分子量の単一タンパク質との反応によるのか又は複数タンパクとの反応によるのかについては不明である。

【００３０】

イムノブロット法を使用すると、１８ｋＤａの分子量を有するＥＢＶ抗原を検出することが可能である。このタンパク質はウイルスＤＮＡ合成を阻止するためにホスホノ酢酸（ＰＡＡ）を使用する場合には発現されず、抗ＶＣＡ抗体を含む全血清により検出されることから、ＶＣＡ関連成分であると考えられる。別のＶＣＡ成分は４０ｋＤａの分子量を有するタンパク質である。ウイルスキャプシド抗原の多くは核ペレットに関連している。

【００３１】

現在、ＥＢＶ特異的血清診断は、かなり主観的な免疫蛍光試験により行われている。標準ウイルス産生細胞系を使用してウイルス抗原を大量生産及び精製することはできないので、より簡単で均質な診断法（例えばＥＬＩＳＡ）への発展は妨げられている。これを実現するための唯一の手段は、代替的に製造されたＥＢＶ抗原を使用することであると思われる。これらのＥＢＶ抗原は遺伝子工学法又は合成ペプチド法により製造することができる。

【００３２】

ＥＢＶ感染の種々の段階で確実な診断を実施できるように特異的且つ高感度の方法を開発するためには、免疫優性ウイルスタンパク質及びそのエピトープを同定することが極めて重要である。

【００３３】

【課題を解決するための手段】

本発明は、夫々エプスタイン－バールウイルス（ＥＢＶ）オープンリーディングフレーム

ＢＦＲＦ３及びＢｄＲＦ１の内側でコードされたＶＣＡ－ｐ１８又はＶＣＡ－ｐ４０タンパク質の少なくとも一部を含み、抗エプスタイン－バールウイルス抗体に対して免疫化学的に反応性のペプチド又はそのフラグメントを提供する。従って、夫々１７６及び３４５個のアミノ酸、並びにＥＢＶ抗体に対して免疫化学的に反応性である配列番号２及び４に示すアミノ酸配列を有するペプチドが本発明に含まれる。

【００３４】

本発明のペプチドは、試料中のＥＢＶ又はＥＢＶ抗体の存在を決定するための診断方法で使用するのに特に適しているも判明した。更に、本発明のペプチドのうちには、ＥＢＶ関連疾患の治療に適切な製薬形態で使用できるものもある。こうして得られ、ペプチド又はそのフラグメントを有効成分として含有するワクチンの製造は当業者に公知である。

【００３５】

天然ＥＢＶとは対照的に、本発明のペプチドは安全な非感染起源であるという大きな利点を有する。

【００３６】

本発明は更に、抗エプスタイン－バールウイルス抗体に対して同様に免疫化学的に反応性である該ペプチドのフラグメントも包含する。

【００３７】

本明細書で使用される「ペプチド」なる用語は、生物学的活性を有するアミノ酸の分子鎖を意味し、産物の特定長を表すものではない。従って、特にタンパク質、融合タンパク質又は融合ペプチド、オリゴペプチド及びポリペプチドが含まれる。必要に応じて本発明のペプチドは、例えばグリコシル化、アミド化、カルボキシル化又はリン酸化によりｉｎ ｖｉｖｏ又はｉｎ ｖｉｔｒｏで修飾することができる。従って、本発明のペプチドの機能的変異体、例えば酸付加塩、アミド、エステル（特にＣ末端エステル）及びＮ－アシル誘導体も本発明の一部とみなされる。本発明に含まれる個々のタンパク質又はポリペプチドには天然（通常の）変異が存在するものと理解されよう。これらの変異は、例えば配列全体のアミノ酸変異又は該配列におけるアミノ酸の欠失、置換、挿入、逆位もしくは付加により表される。生物学的及び免疫学的活性を本質的に変えないことが期待できるようなアミノ酸置換については既に報告されている。関連アミノ酸間のアミノ酸置換、又はしばしば進化中に生じた置換としては、特にＳｅｒ／Ａｌａ、Ｓｅｒ／Ｇｌｙ、Ａｓｐ／Ｇｌｙ、Ａｓｐ／Ａｓｎ、Ｉｌｅ／Ｖａｌが挙げられる（Ｄａｙｈｏｆ，Ｍ．Ｄ， Ａｔｌａｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｒｅｓ．Ｆｏｕｎｄ．，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．，１９７８，ｖｏｌ．５，ｓｕｐｐｌ．３参照）。この情報に基づき、Ｌｉｐｍａｎ及びＰｅａｒｓｏｎは迅速且つ高感度でタンパク質を比較し（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２７，１４３５－１４４１，１９８５）、相同タンパク質間の機能的類似性を決定するための方法を開発した。

【００３８】

本明細書で使用される「フラグメント」なる用語は、本発明のペプチドのサブ配列を含むアミノ酸配列を意味する。該フラグメントは、ＶＣＡ－ｐ１８又はＶＣＡ－ｐ４０タンパク質の１種以上の抗原決定基を有するペプチドである。フラグメントは特に、ＤＮＡの場合には制限エンドヌクレアーゼを使用し、ポリペプチドの場合にはプロテアーゼを使用して前駆物質分子の酵素切断により製造することができる。他の方法としては、フラグメントの化学的合成及びＤＮＡフラグメントによるペプチドフラグメントの発現などがある。

【００３９】

１つ以上のエピトープを含む本発明のペプチドの適当な免疫原フラグメントは、いわゆるペプスキャン（ｐｅｐｓｃｓａｎ）方法、即ち問題の完全ポリペプチドの部分的配列に対応する部分的に重複した一連のペプチドを合成し、抗体に対するこれらペプチドの反応性を調べる方法に基づく、特許出願ＷＯ８６／０６４８７号、Ｇｅｙｓｅｎ、Ｈ．Ｍ．ら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１，３３９８－４００２，１９８４）、Ｇｅｙｓｅｎ，Ｈ．Ｍ．ら（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．１０２，２５９－２７４，１９

８７）の方法によって検出できる。また、これらペプチドの多くの領域は、理論的考察（これらの理論的考察の予測の価値（ｐｒｅｄｉｃｔｉｖｅ　ｖａｌｕｅ）は限定られているが）に基づく指定されたエピトープであり得る。これらの領域の決定は、Ｈｏｐｐ及びＷｏｏｄｓの親水性基準（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７８，３８２４－３８２８，１９８１）とＣｈｏｕ及びＦａｓｍａｎの二次構造アスペクト（Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　４７，４５－１４８，１９８７）との組合わせに基づく。

【００４０】

本発明の好ましいペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６に示すようなアミノ酸配列のうちの少なくとも１つを含むペプチドである。最も好ましいのは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６に示すようなアミノ酸配列に連結したＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５に示すようなアミノ酸を含むペプチドである。このようなコンビペプチド（ｃｏｍｂｉ－ｐｅｐｔｉｄｅ）は、ＥＢＶ－ＶＣＡに対するＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ抗体の特異的検出に極めて有用であり、標準的な血清学的方法と同等かそれ以上の感度を有することが判明した。このようなＩｇＭ－ＥＢＶが急性一次ＥＢＶ感染の有用な診断マーカー（ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ　ｍａｒｋｅｒ）であるのに対し、ＥＢＶに対するＩｇＡは上咽頭癌の診断及び予後に有用である。ＥＢＶ－ＩｇＧは総てのヒトＥＢＶキャリヤーでは陽性であり、該ウイルスに感染していない個体では陰性である。また、特定のサブクラスの各抗体に関する抗体力価の変化も診断上の価値（ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ　ｖａｌｕｅ）を有し得る。種々のサブクラスの抗体はＥＢＶ感染の種々の段階で特異的な診断価値を有するため、本発明のコンビペプチドを例えばＥＬＩＳＡのような診断テストで使用すれば極めて有利であり得る。

【００４１】

本発明のペプチド又はそのフラグメントの製造は、公知の有機化学的ペプチド合成方法の１つ又は組換えＤＮＡ技術を用いて行う。

【００４２】

有機化学的ペプチド合成方法は、均質相中での又はいわゆる固相を用いる縮合反応による必要なアミノ酸の結合を含むとみなされる。前記縮合反応は下記のように実施し得る：

ａ）遊離カルボキシル基と別の保護された反応基とを有する化合物（アミノ酸、ペプチド）を、縮合剤の存在下で、遊離アミノ基と別の保護された反応基とを含む化合物（アミノ酸、ペプチド）と縮合させる；

ｂ）活性化カルボキシル基と別の遊離もしくは保護された反応基とを含む化合物（アミノ酸、ペプチド）を、遊離アミノ基と別の遊離もしくは保護された反応基とを含む化合物（アミノ酸、ペプチド）と縮合させる。

【００４３】

カルボキシル基の活性化は特に、カルボキシル基を、酸ハロゲン化物、アジ化物、無水物、イミダゾリド（ｉｍｉｄａｚｏｌｉｄｅ）又は活性化エステル、例えばＮ－ヒドロキシ－スクシンイミド、ｎ－ヒドロキシ－ベンゾトリアゾールもしくはｐ－ニトロフェニルエステルに変換することによって実施し得る。

【００４４】

前記縮合反応の最も一般的な方法は、カルボジイミド法、アジド法、混合無水物法、及び活性化エステルを用いる方法である。これらの方法は例えばＰｅｐｔｉｄｅｓ，Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｖｏｌ．１－３（Ｇｒｏｓｓ，Ｅ．及びＭｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，Ｊ．編）１９７９，１９８０，１９８１（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）に記載されている。

【００４５】

前述のような本発明のペプチドの適当なフラグメントを「固相」を用いて製造する方法は、例えばＪ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５，２１４９（１９６３）及びＩｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｒｅｓ．３５，１６１－２１４（１９９０）に記述されている。製造すべきペプチドのアミノ酸の結合は通常カルボキシル末端側から始まる

。

【００４６】

この方法には、反応基を担持しているか又は反応基の導入が可能な固相が必要とされる。これは例えば、反応性クロロメチル基を有するベンゼンとジビニルベンゼンとのコポリマー、又はヒドロキシメチルもしくはアミン官能基と反応するようにしたポリマー固相であり得る。特に適当な固相は例えば、Ｗａｎｇ（１９７４），Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．９５，１３２８に記述されているｐ－アルコキシベンジルアルコール樹脂（４－ヒドロキシ－メチル－フェノキシ－メチル－コポリスチレン－１％ジビニルベンゼン樹脂）である。ペプチドは合成後に緩和条件下で前記固相から分離し得る。

【００４７】

所望のアミノ酸配列の合成後は、例えばトリフルオロメタンスルホン酸を用いて、又はトリフルオロ酢酸に溶解したメタンスルホン酸を用いて、樹脂からペプチドを分離する。ペプチドはまた、低級アルコール、好ましくはメタノール又はエタノールでのエステル交換（ｔｒａｎｓｅｓｔｅｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ）により担体から除去することができる。この場合は、ペプチドの低級アルキルエステルが直接形成される。また、アンモニアを用いて分離すると本発明のペプチドのアミドが得られる。

【００４８】

前記縮合反応に参加し得ない反応基は、既述のように、酸もしくは塩基を用いる加水分解又は還元によって極めて容易に再除去できる基により効果的に保護される。例えばカルボキシル基は、例えばメタノール、エタノール、第三ブタノール、ベンジルアルコール又はｐ－ニトロベンジルアルコール及び固体支持体に結合したアミンでのエステル化により効果的に保護することができる。

【００４９】

アミノ基を効果的に保護できる基としては、エトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、ｔ－ブトキシ－カルボニル（ｔ－ｂｏｃ）もしくはｐ－メトキシ－ベンジルオキシカルボニル基、又はスルホン酸から誘導された酸基、例えばベンゼンスルホニルもしくはｐ－トルエン－スルホニル基が挙げられるが、その他に、置換もしくは未置換アリールもしくはアラルキル基のような基、例えばベンジル及びトリフェニルメチル、又はオルト－ニトロフェニルスルフェニル及び２－ベンゾイル－１－メチル－ビニルのような基も使用できる。特に適当なα－アミノ保護基は例えば、塩基に敏感な９－フルオレニル－メトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）基［Ｃａｒｐｉｎｏ　＆　Ｈａｎ（１９７０），Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｅｈｍ．Ｓｏｃ．９２，５７４８］である。

【００５０】

使用可能な保護基は例えばＴｈｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１－９（Ｇｒｏｓｓ，Ｕｄｅｎｆｒｉｅｎｄ及びＭｅｉｅｎｈｏｆｅｒ編）１９７９－１９８７（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　Ｉｎｃ．）に詳述されている。

【００５１】

また、リシンのε－アミノ基を保護することも必要であり、アルギニンのグアニジン基に関しては適切なことである。この場合の一般的な保護基は、リシンの場合にはＢｏｃ基、アルギニンの場合にはＰｍｃ基、Ｐｍｓ基、Ｍｂｓ基又はＭｔｒ基である。

【００５２】

これらの保護基は、例えばトリフルオロ酢酸を用いて、又は例えば水素とパラジウムのような触媒もしくは氷酢酸中のＨＢｒを用いる緩和還元により、個々の基の種類に応じて種々の一般的方法で除去できる。

【００５３】

既述のように、本発明のペプチドは組換えＤＮＡ技術によって製造することもできる。この可能性は、ペプチドを反復配列に組込む（“ｉｎ　ｔａｎｄｅｍ”）場合、又はペプチドが（遥かに大きい）タンパク質もしくはポリペプチドの構成要素として、あるいは例えばβ－ガラクトシダーゼ（の一部分）との融合タンパク質として製造され得る場合には特

に重要である。従って、この種のペプチドも本発明の範囲内に含まれる。そのためには、組換えＤＮＡの構成要素として、本発明のペプチドをコードし且つ核酸セグメントを実質的に含まない核酸配列を使用する。前記核酸セグメントは天然のＥＢＶゲノム中で前記核酸配列の側方に位置するものである。

【００５４】

この方法は、宿主として適当な微生物中で、問題の１つ以上のペプチドをコードする核酸配列を含む組換えポリヌクレオチドを発現させることにより、所望のペプチドを製造する操作を含む。

【００５５】

従って本発明は、本発明のペプチドをコードする核酸配列も包含する。この核酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１及び／又は３に示すような核酸配列の少なくとも一部分を含むのが好ましい。

【００５６】

本明細書中の「核酸配列」は、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを意味し、リボ核酸配列及びデオキシリボ核酸配列の両方にかかわる。原則として、この用語は分子の一次構造にかかわる。従ってこの用語には、二本鎖及び一本鎖ＤＮＡと、二本鎖及び一本鎖ＲＮＡと、これらを修飾したものとが含まれる。本発明の核酸配列は、天然の状態では該核酸配列と結合しない種々の複製実行ＤＮＡに連結でき、その結果適当な宿主の形質転換又はトランスフェクションに使用し得るいわゆる組換えベクター分子が得られる。有用な組換えベクター分子は、好ましくは、例えばプラスミド、バクテリオファージ、コスミド又はウイルスに由来する。本発明の核酸配列をクローンするのに使用できる特定のベクター又はクローニングビヒクルは当業者には公知であり、その具体例としては特にｐＢＲ３２２のようなプラスミドベクター、種々のｐＵＣ、ｐＧＥＭ及びＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔプラスミド、バクテリオファージ、例えばｋｇｔ－Ｗｅｓ、Ｃｈａｒｏｎ　２８及びＭ１３由来ファージ又はウイルスベクター、例えばＳＶ４０、アデノウイルス又はポリオーマウイルスが挙げられる（Ｒｏｄｒｉｑｕｅｚ，Ｒ．Ｌ．及びＤ．Ｔ．Ｄｅｎｈａｒｄｔ編，Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ ｓｕｒｖｅｙ ｏｆｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ ｖｅｃｔｏｒ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｕｓｅｓ，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，１９８８；Ｌｅｎｓｔｒａ，Ｊ．Ａ．ら，Ａｒｃｈ．ｖｉｒｏｌ．１１０，１－２４，１９９０も参照のこと）。本発明の組換えベクター分子の構築に使用される方法は当業者には公知であり、特にＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．らの論文（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８９）に記述されている。例えば、本発明の核酸配列をクローニングベクターに挿入する操作は、遺伝子及び所望のクローニングビヒクルの両方を同じ制限酵素で切断すると、相補ＤＮＡ末端が形成されるために容易に実施できる。

【００５７】

本発明の組換えベクター分子は更に、所望の形質転換体の選択に使用し得る１つ以上のマーカー活性、例えばｐＢＲ３２２中のアンピシリン及びテトラサイクリン耐性、例えばｐＵＣ８におけるアンピシリン耐性及びβ－ガラクトシダーゼのα－ペプチドを含み得る。

【００５８】

本発明は、対応する核酸配列の発現によって本発明のペプチドを産生することができる、核酸配列又は前述の組換え発現ベクター分子で形質転換又はトランフェクションした宿主細胞も包含する。適当な宿主細胞は、ペプチドをコードする核酸配列によって、又はこのような核酸配列を含み且つ所望であれば前述の核酸配列によりコードされる前記ペプチドの発現に使用し得る組換えベクター分子によって形質転換できる微生物又は細胞である。この宿主細胞は原核生物由来のもの、例えば大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ及びＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ種のような細菌に由来するもの；又は真核生物由来のもの、例えばＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのような酵母あるいはより高等な真核細胞、例えば昆虫細胞、植物細胞、もしくはＨｅＬａ細胞及びチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を含む哺乳動物細胞

に由来するものであり得る。一般的には、本発明で有用な組換えベクター分子の構築には真核細胞の方が好ましい。発現のためには、本発明の核酸配列を発現ベクター中に導入する。即ち、前記配列を発現制御配列に操作可能なように結合する。このような制御配列はプロモーター、エンハンサー、オペレーター、インデューサー、リボソーム結合部位等を含み得る。従って本発明は、形質転換又はトランフェクションした宿主細胞中で自分が含んでいるＤＮＡ配列を発現することができる、発現制御配列に作用可能なように結合し前述の特定したペプチドをコードする核酸配列を含む組換えベクター分子を提供する。勿論、クローニングベクターの選択された部位に挿入されるヌクレオチド配列は、形質転換又はトランフェクションされた宿主が少なくとも１つの免疫原性決定基を有するポリペプチドを産生する限り、本発明のペプチドをコードする完全核酸配列のフラグメントだけを含み得る。

【００５９】

本発明のペプチドに対する抗体も本発明の範囲に含まれる。前述の方法で形成されたペプチド又はそのフラグメントはポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を産生するのに使用される。本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体は当業者によって容易に産生できる。本発明のＶＣＡ－ｐ１８タンパク質の種々のエピトープに対する好ましい抗体は、Ｐｏｒｔｏｎ Ｄｏｗｎ（ＵＫ）のＥｕｒｏｐｅａｎ Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）に寄託番号９３０２０４１３又は９３０２０４１２で寄託去れたラット－マウスハイブリドーマ細胞系によって産生した抗体と同様の反応性をＶＣＡ－ｐ１８に対して示す抗体である。ＶＣＡ－ｐ４０タンパク質のエピトープに対する好ましい抗体は、Ｐｏｒｔｏｎ Ｄｏｗｎ（ＵＫ）のＥｕｒｏｐｅａｎ Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）に暫定的寄託番号９３０２０４１４で寄託されたマウス－マウスハイブリドーマ細胞系によって産生した抗体と同様の反応性をＶＣＡ－ｐ４０に対して示す抗体である。

【００６０】

本発明のモノクローナル抗体を分泌できる無限増殖性化した細胞系も本発明の範囲に含まれる。モノクローナル抗体を産生する細胞系の形成は、例えばＫｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎの方法（Ｋｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎはモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを形成する技術を創案した（Ｇ．Ｋｏｈｌｅｒ及びＣ．Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，１９７５，Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７；１９７６，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１－５１９））、Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルスでの形質転換、腫瘍形成性ＤＮＡによるＢリンパ球の直接形質転換方法、ヒトもしくはマウス－ヒトハイブリッド骨髄腫細胞系を融合相手とするヒトＢリンパ球の直接融合、又はＥＢＶ形質転換Ｂ細胞と前記骨髄腫細胞系との直接融合によって実施し得る。

【００６１】

本発明の好ましい細胞系は、Ｐｏｒｔｏｎ Ｄｏｗｎ（ＵＫ）のＥｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）に寄託番号９３０２０４１３、９３０２０４１２、９３０２０４１４で寄託された細胞系である。これらの細胞系は、１９７７年のブダペスト条約の条件に従い、１９９３年2月４日にＥＣＡＣＣに寄託された。

【００６２】

寄託番号９３０２０４１３及び９３０２０４１２の細胞系はどちらも、ＶＣＡ－ｐ１８タンパク質の２つのエピトープに対するモノクローナル抗体（それぞれＥＢＶ．ＯＴ１５Ｅ及びＥＢＶ．ＯＴ１５１）を産生することができる。これらの細胞系はラット－マウスハイブリドーマ細胞系である。暫定的寄託番号９３０２０４１４の細胞系は、ＶＣＡ－ｐ４０タンパク質のエピトープに対する抗体を産生することができ、マウス－マウスハイブリドーマ細胞系である。これらの細胞系によって産生された抗体は、それぞれのタンパク質のエピトープを同定するのに使用した（後述の実施例で説明する）。

【００６３】

本発明のペプチドに対する抗体はモノクローナルでもポリクローナルでも、組織試料中で

その場で検出するための診断及び免疫細胞化学で極めて有用であり、ニュートラライズしている抗体は受動免疫療法で極めて有用である。特にモノクローナル抗体は抗イディオタイプ抗体の産生に使用し得る。抗イディオタイプ抗体の産生方法は当業者には公知である。本発明のモノクローナル抗体と反応する抗イディオタイプ抗体は既述のように本発明の範囲に含まれる。

【００６４】

抗-イディオタイプ抗体は、免疫グロブリンの種々の部分に対する抗体である。抗-イディオタイプ抗体の亜集団は、「抗-イディオタイプβ」または「内部像」として公知である。これらの抗-イディオタイプβ抗体は、抗原と構造的または三次元的に酷似している（Uytdehaag,F.G.C.Mら，Immunol.Rev；90；93-113；1986）。この種の抗-イディオタイプ抗体は、動物モデルでの感染病に特異的なワクチンとして広く使用されている（Hiernaux J.R.；Infect.Immun.；56；1407-1413；1988，Kennedy,R.C.ら：Science 232；220-223；1986）。アッセイで使用する場合には、抗-イディオタイプ抗体は多量に産生され得る。

【００６５】

抗-イディオタイプ抗体の産生方法は当業界で公知である。例えば、本発明の抗-イディオタイプ抗体は、モノクローナル抗体でBALB/cマウスを免疫感作し、標準文献方法に従ってグルタルアルデヒドを用いてKLHに結合させ、フロイント完全アジュバントと混合することにより得られる。これらのマウスの脾臓細胞を不死化し、このようして得られたハイブリドーマを抗-イディオタイプ抗体産生に関してスクリーニングし得る。ハイブリドーマのスクリーニングは、例えば、本発明のモノクローナル抗体を固相（マイクロタイタープレートのウエル）に結合させ、次いで固相を生長ハイブリドーマの培養上清とインキュベートすることにより実施し得る。西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に結合させたEBVペプチドを添加してもよい。培養上清中の抗-イディオタイプ抗体の存在は、このペプチド結合体と、固相上にコートしたモノクローナル抗体との結合阻害により示される。

【００６６】

抗-イディオタイプ抗体は、例えば、EBV-抗体を使用する免疫アッセイに於けるヒト及び/または動物EBV-抗原の結合を阻害するために使用し得る。あるいは、抗-イディオタイプ抗体は、以後記載する免疫試薬の模擬薬として使用してもよい。前記抗-イディオタイプ抗体は、EBVの診断及び治療並びに、EBV-抗原の重要なエピトープ領域の解明にも有用である。本発明の１種以上のペプチドまたは抗体を含む免疫化学試薬は、本発明の一部である。

【００６７】

本発明の「免疫化学試薬」という用語は、通常本発明の１種以上のペプチド及び標識物質または好適な支持体からなる。本明細書中で使用し得る「支持体」という用語は、ミクロ試験ウエル若しくはキュベット、チューブ若しくはキャピラリー、膜、フィルタ、試験片の内壁、または、例えば、ラテックス粒子、赤血球、染料ゾル、金属ゾル若しくは、ゾル粒子などの金属化合物、キャリヤ蛋白質（例えば、BSAまたはKLHなど）の表面を指す。本明細書中で使用し得る「標識物質」とは、中でも、放射性同位体、蛍光性化合物、酵素、染料ゾル、金属ゾル、またはゾル粒子としての金属化合物を指す。サンプル中のEBVに対する抗体の検出方法に於いては、本発明の免疫化学試薬をサンプルと接触させる。その後、サンプル中のペプチドと抗体との間に形成した免疫複合体の存在を検出し、このように検出することによりサンプル中のEBV抗体の存在が知られ、定量的に測定され得る。

【００６８】

免疫化学試薬の性質及び特徴に依存して、生起する免疫化学反応は、所謂サンドイッチ反応、凝集反応、拮抗反応または阻害反応である。

【００６９】

サンプル中のEBVを検出するために、本発明の１種以上のペプチドを含む本発明の免疫化学試薬をサンプル及び抗-EBVと接触させ、その後、形成した免疫複合体の存在を検出し、次いでこれから、サンプル中のEBVの存在を決定し得る。

【００７０】

サンプル中のEBVを検出するための特に好適な方法は、標識物質のついた本発明のペプチドとEBV抗原（サンプル中に存在する）との間の拮抗反応に基づいており、これによりペプチド及び抗原は、固体支持体に結合したEBVに対する抗体と競合する。

【００７１】

本発明は、さらに、本発明の抗体をサンプルと接触させ、その後、サンプル中のエプスタイン-バーウイルスの存在の尺度である形成された免疫複合体の存在を検出することを特徴とする、サンプル中のエプスタイン-バーウイルスの検出方法も含む。本発明の試験キットは、必須の構成成分として上記記載の免疫化学試薬を含む。EBV抗体を検出するためにサンドイッチ反応を実施する場合、試験キットは、例えば、固体支持体（例えば、ミクロ試験ウエルの内壁）にコートされた本発明のペプチド及び本発明の標識ペプチドまたは標識抗-抗体のいずれかを含み得る。拮抗反応を実施する場合には、試験キットは、固体支持体にコートした本発明のペプチド及びEBVに対する標識抗体、好ましくは前記ペプチドに対するモノクローナル抗体を含み得る。凝集反応に於いては、試験キットは、粒子またはゾルにコートした本発明のペプチドを含有する免疫化学試薬を含み得る。試験キットのもう一つの態様としては、例えば、固体支持体にコートされているEBVに対する抗体上の結合部位を検出するためのEBVとの拮抗反応に於いて、免疫化学試薬として本発明の標識ペプチドを使用することである。

【００７２】

欧州特許第201,814号及び同第329,822号に各々記載の、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または核酸配列をベースとする増幅（NASBA）などの核酸増幅方法によりEBV DNAまたはRNAを検出するために、試験に於いて配列番号１及び/または３に示される新規ヌクレオチド配列を使用することも本発明の範囲内である。前記エプスタイン-バールウイルス核酸配列の核酸増幅を実施し、増幅された配列を検出するために、本発明のプライマーの少なくとも１つの核酸配列またはそのフラグメントを使用する、サンプル中のエプスタイン-バーウイルス核酸配列を増幅及び検出するための方法は、本発明の一部である。上記記載の増幅方法を実施するための、本発明のヌクレオチド配列の少なくとも一部に対応する少なくとも１セットのプライマーを含む試験増幅キットも本発明の一部である。

【００７３】

【実施例】

本発明を、以下の実施例によりさらに説明する。

【００７４】

実施例１

EBV蛋白質をコードする新規DNA配列を単離且つ同定する方法。

【００７５】

新規EBVマーカー分子を同定するための通常の方法は、以下の段階に細分され得る。

【００７６】

１．EBVマーカー分子と特異的に反応性の抗体試薬の同定及び産生。

【００７７】

２．EBV発現細胞から単離されたポリ-A選択mRNA若しくは全細胞mRNAからのc-DNAバンクの調製または、好ましくはλgt11ファージ中でのウイルスゲノムのフラグメントからのゲノムDNA-バンクの調製、次いで上記抗体試薬を用いる、ファージによって合成された蛋白質のスクリーニング。

【００７８】

３．反応性ファージの精製及び、ファージのゲノム内に含まれるEBV-特異的なインサート配列の同定。

【００７９】

４．対応するEBV-特異的読み取り枠を配置するための、公知プロトタイプEBV-ゲノム配列と該インサート配列との相関。

【００８０】

５．代替的宿主細胞（例えば、E.Coli、バキュロウイルス、酵母若しくは高等真核細胞）

または代替的発現、cq.産生システム中での同定した読み取り枠のクローニング、発現及び産生。

【００８１】

これらの方法は、以下詳細に概説され且つ図１に記載のスキームに示されている。

【００８２】

（フェイズ１：）

細胞培養及び細胞抽出物

P3HR1-誘導細胞系HH514.c16をローラーボトル内で懸濁培養として増殖し、Middeldorp及びHerbrink（J.Virol.Meth., 21, 113-146, 1988）により記載の如く正確に20ng/ml 12-テトラデカノホルボール-13-アセテート（TPA）及び3mM 酪酸ナトリウムを使用する、VCA-及びEA-発現を誘導した。EA-抗原のみを選択的に発現するために、誘導した細胞培養に0.5mM ホスホノ酢酸を添加することにより、ウイルス性DNAポリメラーゼをブロックした。

【００８３】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体を産生するために、BALB/cマウスをVCA-誘導HH514細胞の核画分（F.Wielaardら., J.Virol.Meth., 21, 105-115, 1988）または、これらの細胞若しくは代替的発現系由来の十分に精製した蛋白質で免疫感作した。ハイブリドーマが標準プロトコルにより産生し、上清を標準EBV免疫蛍光試験及び、VCA-誘導HH514細胞由来の抗原抽出物を含むイムノブロット片上で分析した（Middledorp及びHerbrink, J.Virol.Meth., 21, 133-146, 1988）。

【００８４】

抗VCA-p18抗体のアフィニティー精製

抗VCA-p18抗体を、Robinson及びMillerの方法（The herpesviruses, vol.1, 151-192, 1991, Publ.Plenum Publishing Corp.New York）を少し変形することによりヒトEBV-陽性血清から精製した。概略すると、10%アクリルアミドゲル中で電気泳動分離後、蛋白質をPVDF-膜（Millipore Corporation, Bedford,USA）上にブロットし、VCA-p18に対応するPVDF-膜上の領域を切り出し、アフィニティーマトリックスとして使用した。ストリップへの抗体の非特異的な結合は、ブロッキング溶液［リン酸緩衝塩水pH7.4（PBS）中、5% 乾燥粉末ミルク、4% ウマ血清］中で一晩インキュベーションすることにより防止した。その後、希釈したヒト血清（ブロッキング溶液中１:25）中でストリップを２時間インキュベートした。0.05% Tween-20を含むPBSで３回洗浄後、連続２回のインキュベーションに於ける結合抗体を0.1M グリシン、pH2.7で溶離した。溶離液を1M Tris/HCl（pH9.0）の1/20容量で中和した。最後に、溶離液をPBSに対して透析し、アリコート中－20℃で貯蔵した。

【００８５】

（フェイズ２：）

HH514.c16細胞のRNA精製

Maniatisら（Molecular cloning：A laboratory manual；Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982）により記載の如く、グアニジニウム/CsCl法により誘導したHH514.c16細胞から全RNAを単離した。ポリ（A^+）RNAの精製を、Ausubelら［Current protocols in molecular biology（1991）Greene Publishing Associates, John Wiely&Sons, New York]に記載の如くオリゴ（dT）クロマトグラフィー（Pharmacia,Inc., Piscataway N.Y.）で実施した。

【００８６】

ノーザンブロット分析

全RNA（10μg）をグリオキサール（P.S.Thomas, Methods in Enzymology, 100, 255-266, 1983）により変性し、アガロースゲル上で電気泳動した。臭化エチジウム染色後、分離したRNAをニトロセルロース上に真空-ブロットした。３時間プレハイブリダイゼーション後、フィルタを、［α-32P］-標識（Amersham, Bristol, UK）されたランダムプライマー型の若しくはニックトランスレーションされたDNAプローブと42℃で一晩ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション溶液は、50%ホルムアミド、５×SSPE、５×Denhardts溶液

［0.1%（w/v）ポリビニルピロリドン、0.1%（w/v）BSA、0.1%（w/v）Ficoll］、0.2mgの超音波処理サケ精子DNA/ml及び0.5% SDSからなる。続いて、ブロットを洗浄し、増感板を使用してＸ線フィルム（Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y., USA）に対し露光した。

【００８７】

λ-gt11に於けるcDNAライブラリーの構築

ポリ（Ａ$^+$）-選択RNA５μgを水酸化メチル水銀で変性した。cDNA合成ではオリゴ（dT）またはヘキサヌクレオチドのいずれかでプライマー処理した。第１及び第２のストランド合成方法は、Gubler及びHoffman（Gene,25,263-269,1983）に記載の方法と同一であった。EcoRI-メチル化、EcoRI-リンカー付加及びEcoRI消化後、改質したcDNAを、Maniatisらに記載のセファロースCL4B（Pharmacia製）クロマトグラフィーによりサイズ選択した。0.5kB～3.0kBの種々のサイズのcDNAを、ホスファターゼで処理したλgt11-アームに結合し、次いで、Packageneキット（Promega,San Diego,USA）を使用するin vitroパッケージングを実施した。

【００８８】

λgt11ライブラリーの免疫スクリーニング

オリゴ（dT）プライマー処理ライブラリーの組換体ファージを全部で１×10^4及びヘキサヌクレオチドプライマー処理ライブラリーの組換体５×10^5を、アフィニティー精製したヒト抗p18抗体またはモノクローナル抗体EBV.OT41Aとの免疫学的反応性に関してスクリーニングした（Maniatisら参照）。免疫反応性のプラークを、製造業者（Promega）により記載の如く、各々アルカリホスファターゼ結合抗ヒトまたは抗マウスIgGで検出した。

【００８９】

（フェイズ３：）

ヌクレオチド配列分析

反復プラークリフティング及び免疫スクリーニングにより精製した陽性プラークのインサートDNAを、その5'-末端に制限部位を含むλgt11フランキング配列のプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅した。好適な制限酵素で消化した後、DNA-フラグメントをpGEM-4Z中にサブクローン化し、Sangerら（Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 74, 5463-5467, 1977）の方法の変形を使用する配列キット（Pharmacia, Uppsala, Sweden）を使用して両側から配列決定した。

【００９０】

（フェイズ４：）

配列の配置

Wisconsin大学、遺伝学コンピュータグループのソフトウエアプログラム（Gribshovら, Nucl.Acid res., 14. 327-334, 1986）を使用して、配列を、EMBL-配列データベースに寄託してあるEBV-B95-8プロトタイプ（Baerら., Nature 310, 207-211, 1984）の公知配列と一直線に配置した。

【００９１】

（フェイズ５：）

E.coli中のBFRF3及びBdRF1のクローニング及び発現

EBVゲノムによってコードされる読み取り枠（ORFs）、BFRF3及びBdRF1を、ターゲットとしてHH514.c16培養上清から蔗糖密度勾配遠心分離により単離したウイルス粒子から精製したウイルスDNAを使用するPCRにより増幅した。その5'-末端に制限部位を含むプライマーの各セットを、LacZ遺伝子の5'末端の第５コドンに配置されている発現ベクターpMLB1113（PBR322の誘導体）（Zagurski及びBerman,Gene,27,183-101,1984）のEcoRI-HindIII部位の増幅フラグメントをクローニングするために使用した。これらの構築物から発現した蛋白質は、β-ガラクトシダーゼの最初の5アミノ酸、その後に続く、β-ガラクトシダーゼの残りにそのC-末端で結合した組換体蛋白質からなる。非融合蛋白質を同様に構築したが、但し、挿入物の3'末端に停止コドンを挿入した。

【００９２】

組換体蛋白質のE.coli発現

形質転換したE.coli培養物を、１mM IPTG（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド）を添加して誘導した。２時間で、誘導後の細菌細胞を遠心分離により収集し、SDS-PAGEサンプル緩衝液に懸濁させ、次いでイムノブロッティングにより分析した。

【００９３】

実施例２

ＶＣＡ－ｐ１８及びＶＣＡ－ｐ４０タンパク質の免疫反応性

実施例１に概説した手順で得られたタンパク質の免疫反応性をイムノブロット分析によって試験した。このために、ＶＣＡで誘導されたＨＨ５１４.ｃ１６細胞、あるいは、ＢＦＲＦ３－もしくはＢｄＲＦ１－β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質またはβ－ガラクトシダーゼ単独を発現する大腸菌の全細胞タンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、ニトロセルロースにブロットした。これらのブロットから調製したストリップを個別の血清及び抗体の調製物と共にインキュベートした。

【００９４】

イムノブロット手順

イムノブロット手順は基本的に、Ｍｉｄｄｅｌｄｏｒｐ及びＨｅｒｂｒｉｎｋ（Ｊ.Ｖｉｒｏｌ.Ｍｅｔｈ.、２１、ｐ１３３～１５９、１９８８）の記載の手順に従って行なった。この手順を以下に要約する。ＳＤＳ－ＰＡＧＥタンパク質をニトロセルロースフィルター（０.２μ、Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　＆　Ｓｃｈｕｅｌｌ、Ｄｅｎ　Ｂｏｓｃｈ、オランダ）に移した。ブロッキングバッファ（Ｔｒｉｓ緩衝塩水（ＴＢＳ）中の４％粉末ドライミルク、５％ウマ血清）と共に室温（ＲＴ）で少なくとも１時間のインキュベーションを行なうことによって、フィルターに対する抗体の非特異的結合を阻害した。ヒト血清をブロッキングバッファによって適当な希釈度に希釈し、少なくとも１時間インキュベートした。ブロットまたはストリップをＴＢＳ＋０.０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０（ＴＢＳｔ）で３回洗浄し、アルカリ性ホスファターゼ（ＡＰ）に結合した抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｐｒｏｍｅｇａ）、またはＨＲＰに結合した抗マウスＩｇＧもしくは抗ラットＩｇＧ（Ｏｒｇａｎｏｎ　Ｔｅｋｎｉｋａ　Ｃａｐｐｅｌ、Ｂｏｘｔｅｌ、オランダ）をブロッキングバッファ中に適当に希釈した溶液に添加した。更にインキュベーション及び洗浄処理した後、ＡＰの基質としてニトロブルーテトラゾリウム（ＮＢＴ）及び５－ブロモ－４－クロロ－インドリルホスフェート（ＢＣＩＰ）を用い、ＨＲＰの基質として４－クロロ－ナフトールを用いて、ブロットを発色させた。

【００９５】

得られたブロットを図２のａ～ｄに示す。ブロットのレーン１～１２では以下の血清を夫々使用した：

１．β－Ｇａｌに対するマウスモノクローナル抗体（Ｐｒｏｍｅｇａ）；

２．天然ウイルスキャプシドタンパク質（ＥＢＶ.ＯＴ４１Ａ）で免疫感作することによって増強したＶＣＡ－Ｐ４０に対するマウスモノクローナル抗体；

３．ウイルスＶＣＡ－Ｐ１８の特異的イムノアフィニティ精製によって得られたウイルスＶＣＡ－Ｐ１８に単一特異性のヒト抗体；

４－５．ヒトＥＢＶ－血清陰性の血清；

６－１６．ウイルスＶＣＡ－Ｐ１８及びＶＣＡ－Ｐ４０に対して異なる相対反応性を有するヒトＥＢＶ－血清陽性の血清。

【００９６】

図２のａは、１２.５％アクリルアミド中の還元性ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離した天然ウイルスポリペプチドの免疫反応性を示す。抗β－ガラクトシダーゼ抗体（１）は陰性であるが、ＶＣＡ－ｐ４０に特異的な抗血清（２）及びＶＣＡ－ｐ１８に特異的な抗血清（３）は夫々のウイルスタンパク質と反応する。ヒトＥＢＶ－陰性血清で染色したストリップ４及び５は反応性を全く示さないが、健常な血清陽性血液のドナー（６～１５）または活性ＥＢＶ疾患患者（１６）中で観察したストリップ６～１６は、ＥＢＶ－タンパク質に対して種々の免疫反応性を示す。ＶＣＡ－ｐ１８及びＶＣＡ－ｐ４０のバンドの位置を右側に示す。

【００９７】
図２のｂは、１０％アクリルアミド中の還元性ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離されたＶＣＡ－ｐ１８　β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質（ＢＦＲＦ３－ＬａｃＺ）を発現する大腸菌に由来の全細胞タンパク質の免疫反応性を示す。抗β－ガラクトシダーゼ抗体（１）及び抗ＶＣＡ－ｐ１８抗体（３）は、１３４ｋＤａの出発融合タンパク質が大腸菌中でタンパク質分解によって断片化されることによって生じた複数のタンパク質バンドと特異的に反応する。抗ＶＣＡ－ｐ４０モノクローナル抗体（２）は、ヒトＥＢＶ－陰性の血清（４－５）と全く同様に陰性である。ウイルスＶＣＡ－ｐ１８に対して種々の反応性を示すヒト血清は、融合タンパク質に対しても同様の種々の反応性を示す。ここでも多数のバンドの染色は大腸菌中の融合タンパク質のタンパク質分解に起因する。

【００９８】
図２のｃは、大腸菌中のＶＣＡ－ｐ４０－β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質を同様に分析した結果を示す。このタンパク質はタンパク質分解の作用を受け難いので１５６ｋＤａに単一バンドを生じる。図２のｃは図２のｂと同様に解釈できる。

【００９９】
図２のｄは、β－ガラクトシダーゼ単独を発現する大腸菌を用いた対照ブロットを示す。

【０１００】
上記の試験より、個々の大腸菌構築物が夫々の融合タンパク質を実際に発現することは明らかである。ヒト血清は、発現されたタンパク質に対して天然ウイルスタンパク質に対するときと同じ反応性を示す。

【０１０１】
実施例３
免疫吸着
本発明の代替ペプチド及び対応する天然ウイルスタンパク質の免疫化学的一致は、（１種または複数の）天然ウイルスタンパク質を含むイムノブロットに反応性のヒト血清に、種々の濃度の本発明のペプチドを予め吸収させると、このブロットにおいて対応天然ウイルスタンパク質に対する特異的抗体反応性が消失することによって証明できる。この方法によれば、免疫化学的一致を証明できるだけでなく、イムノブロット上のウイルスタンパク質の免疫反応性が単一種の（主要）タンパク質種に対する抗体結合によって媒介されるという確実な証拠も得られる。

【０１０２】
上記のごとき実験をＶＣＡ－ｐ１８マーカータンパク質に対して行なった。

【０１０３】
即ち、３人の健康なＥＢＶ－血清陽性のドナーから得られたヒト血清（血清９２、血清２１４及び血清２１９）の免疫反応性を、１０％アクリルアミドゲル中の還元性ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離したＶＣＡ－誘導ＨＨ５１４細胞から得られた核抗原を含むニトロセルロースストリップ上のイムノブロット分析によって試験した。イムノブロット分析の前に、漸増量の精製ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質またはβ－ガラクトシダーゼ単独を血清に予め吸収させるために、＋４℃で一夜維持した。Ｎ－クロロ－ナフトールを沈降性基質として用い、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒトＩｇＧを用いてＩｇＧ－反応性に関し染色した。

【０１０４】
この実験の結果を図３に示す。１：１００に希釈した１ｍｌの血清に予め吸収させるために使用した精製ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質の量を、図３に示すようなイムノブロットの夫々のレーンで分析すると以下の結果が得られた：
レーン１：０μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ；
レーン２：０.０１μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ；
レーン３：０.１μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ；
レーン４：０.５μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ；
レーン５：１μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ。

【０１０５】
β－ガラクトシダーゼ単独を予め吸収させたレーンをレーンβとして示す。
【０１０６】
図３より、予吸収処理中にＶＣＡ－ｐ１８を示すバンド（矢印）の反応性が、ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質の濃度増加に伴って喪失されることが理解されよう。β－ガラクトシダーゼ単独を予め吸収させても全く効果がないこと、また、予吸収処理が別のＥＢＶ－タンパク質との反応性にも全く影響を与えないことが理解されよう。近縁でないタンパク質（例えば７２ｋＤのＥＢＮＡまたは４０ｋＤのＶＣＡ－ｐ４０）の染色は生じない。
【０１０７】
上記の実験から、ヒト血清抗体によるウイルスＶＣＡ－ｐ１８の免疫染色はこれらの血清にＢＦＲＦ３融合タンパク質を予め吸収させることによって特異的に阻害され、これがＶＣＡ－ｐ１８とＢＦＲＦ３読取枠によってコードされるタンパク質との免疫化学的一致を証明することが明らかである。これらの実験はまた、ヒト血清とＶＣＡ－ｐ１８との反応性が単一ウイルスタンパク質との相互作用によって生じることを示す。
【０１０８】
実施例４
ＰＥＰＳＣＡＮによる免疫反応性エピトープの局在
ペプチド合成及びイムノスクリーニング（ＰＥＰＳＣＡＮ）
１２個のアミノ酸（ＡＡ）の長さを有し且つＯＲＦ　ＢＦＲＦ３及びＢｄＲＦ１のアミノ酸配列の１１個のアミノ酸がオーバーラップしたペプチドを、Ｇｅｉｊｓｅｎらによって最初に記載された化学的に活性化したポリエチレンピン上に全自動固相ペプチド合成法（Ｐｒｏｃ.Ｎａｔ.Ａｃａｄ.Ｓｃｉ.、アメリカ、８３、３９９８～４００２、１９８４）によって合成した。健康なＥＢＶ血清陽性のドナーから採取した１５の血清を用い、ＥＢＶ特異的抗体に対する免疫反応性を、Ｍｉｄｄｅｌｄｏｒｐ及びＭｅｌｏｅｎによって記載された方法（Ｊ.Ｖｉｒｏｌ.ｍｅｔｈ.、２１、１４７～１５９、１９８８）で決定した。ＶＣＡ－ｐ１８配列に由来の１２個のアミノ酸から成るペプチドのＰＥＰＳＣＡＮ分析の結果を図４に示す。Ｘ軸の数字は、分析した１２量体（１２－ｍｅｒ）ペプチドの各々のＶＣＡ－ｐ１８配列上の初期位置を示す。ＢＦＲＦ３読取枠にコードされたＶＣＡ－ｐ１８タンパク質の１２量体ペプチドに対して反応性を有していたヒト血清のパーセンテージを図４のＹ軸に示す。同一組のピンに対するＥＢＶ－血清陰性のヒト血清の平均反応性を上回る標準偏差の３倍を陽性反応と定義する。図４から、３つの免疫支配性ドメインを定義できる：ドメインＩ；ＡＡ１２０～１４０、ドメインII：ＡＡ１５２～１５５、ドメインIII：ＡＡ１５９～１６５（これらの数字はまたＰＥＰＳＣＡＮに使用した１２量体ペプチドの初期位置を示す）。表１は、この試験に使用した個々の血清の各々に対して最も反応性の大きいペプチドを詳細に示している。表１の第１レーンは、個々の血清の番号を示す。第２レーンは、ドメインＩの内部の最も反応性の大きいペプチドのＰＥＰＳＣＡＮ　ＯＤ４５０値（４５０ｎｍの光学密度）を示す。このペプチドはレーン３に示されている。レーン４及び５はドメインII及びIIIに対する同様のデータを示す。
【０１０９】
【表１】

表１：
１５ＥＢＶ　ＶＣＡ－ｐ１８陽性血清の免疫学的応答（ＶＣＡ－ｐ１８の重要なエピトープドメイン中に局在するもっとも反応性の高いペプチドの応答のみを記載する）

血清番号	ドメインＩ（ペプチド120－140）		ドメインＩＩ（ペプチド152－155）		ドメインＩＩＩ（ペプチド159－165）	
	Ｅｌｉｓａ OD_{450}	ペプチド A.A.－配　列	Ｅｌｉｓａ OD_{450}	ペプチド A.A.－配　列	Ｅｌｉｓａ OD_{450}	ペプチド A.A.－配　列
１	１．４１８	１２０－ＴＡＶＡＱＳＡＴＰＳＶＳ－１３２	－	－	－	－
２	１．８２０	１２０－ＴＡＶＡＱＳＡＴＰＳＶＳ－１３２	０．６７８	１５５－ＤＴＧＳＧＧＧＧＱＰＨＤ－１６７	０．４２３	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
３	１．２２８	１２８－ＰＳＶＳＳＳＩＳＳＬＲＡ－１４０	－	－	０．８０８	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
４	１．２３０	１２８－ＰＳＶＳＳＳＩＳＳＬＲＡ－１４０	－	－	０．７６１	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
５	０．５４０	１２８－ＰＳＶＳＳＳＩＳＳＬＲＡ－１４０	－	－	１．３５４	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
６	０．７３１	１２９－ＳＶＳＳＳＩＳＳＬＲＡＡ－１４１	－	－	１．４４１	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
７	０．３８５	１２９－ＳＶＳＳＳＩＳＳＬＲＡＡ－１４１	－	－	０．７７０	１６３－ＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲＫ－１７５
８	１．３６０	１３１－ＳＳＳＩＳＳＬＲＡＡＴＳ－１４３	－	－	１．３４３	１６０－ＧＧＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧ－１７２
９	１．５９８	１３１－ＳＳＳＩＳＳＬＲＡＡＴＳ－１４３	０．５１０	１５３－ＡＶＤＴＧＳＧＧＧＧＱＰ－１６５	１．４８１	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
１０	１．５９１	１３１－ＳＳＳＩＳＳＬＲＡＡＴＳ－１４３	０．４７４	１５３－ＡＶＤＴＧＳＧＧＧＧＱＰ－１６５	１．４８１	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
１１	１．２５１	１３１－ＳＳＳＩＳＳＬＲＡＡＴＳ－１４３	０．９５８	１５２－ＡＡＶＤＴＧＳＧＧＧＧＱ－１６４	０．７７４	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
１２	１．８３９	１３３－ＳＩＳＳＬＲＡＡＴＳＧＡ－１４５	－	－	０．４０７	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
１３	１．１２８	１３４－ＩＳＳＬＲＡＡＴＳＧＡＴ－１４６	０．４６０	１５４－ＶＤＴＧＳＧＧＧＧＱＰＨ－１６６	１．５３５	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
１４	１．０６４	１３８－ＲＡＡＴＳＧＡＴＡＡＡＳ－１５０	－	－	１．３１９	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４
１５	０．６９５	１３８－ＲＡＡＴＳＧＡＴＡＡＡＳ－１５０	－	－	０．６４４	１６２－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲ－１７４

実施例５

ＢＦＲＦ３によってコードされたＶＣＡ－ｐ１８タンパク質またはＢｄＲＦ１によってコードされたＶＣＡ－ｐ４０タンパク質に対するラット及びマウスのモノクローナル抗体によるＰＥＰＳＣＡＮ分析

実施例４に記載の手順と同様にしてヒト血清に対するＰＥＰＳＣＡＮ分析を行なって、モ

ノクローナル抗体によって検出された直鎖状エピトープの位置を作図した。

【０１１０】

図５及び図６は、各々が異なる直鎖状エピトープを検出するＶＣＡ－ｐ１８に対する２つのラットモノクローナル抗体（夫々ＥＢＶ.ＯＴ１５Ｅ及びＥＢＶ.ＯＴ１５Ｉ）を用いたかかる分析のＰＥＰＳＣＡＮ結果を示す。

【０１１１】

図７は、ＢｄＲＦ１読取枠によってコードされたＶＣＡ－ｐ４０に対するマウスモノクローナル抗体（ＥＢＶ.ＯＴ４１Ａ）のＰＥＰＳＣＡＮ結果を示す。ＶＣＡ－ｐ４０（ＢｄＲＦ１）配列に対する２つのラットモノクローナルの交差分析及びＶＣＡ－ｐ１８（ＢＦＲＦ３）配列に対するマウスモノクローナルの交差分析（ｖｉｃｅ－ｖｅｒｓａ）は明白な陰性結果を示す。

【０１１２】

図７から、ＥＢＶ.ＯＴ４１ＡがＶＣＡ－ｐ４０タンパク質のＣ末端領域に明確な直鎖状エピトープを認識することが明らかである。

【０１１３】

実施例６

コンピュータ分析及びＰＥＰＳＣＡＮによるＢＦＲＦ３にコードされたＶＣＡ－ｐ１８タンパク質に由来の合成ペプチドの選択、及びこれらのペプチドと正常ヒトドナー血清との免疫反応性の分析

ｔ－ＢＯＣ化学を用いた標準固相合成によって合成ペプチドを調製した。

【０１１４】

ＢＦＲＦ３によってコードされたＶＣＡ－ｐ１８タンパク質に由来のペプチドを、Ｊａｍｅｓｏｎ及びＷｏｌｆ（ＣＡＢＩＯＳ　４、１８１～１８６、１９８８）によって開発されたコンピュータプログラム「抗原性指数」を用いて予測された高い抗原性に基づいて、または実施例４に記載したようなＰＥＰＳＣＡＮにおける機能性の高抗原反応性に基づいて選択した（図８のペプチド１及び２は前者に基づいて選択され、図８のペプチド３及び４は後者に基づいて選択された。ペプチド３及び４は表１のドメインＩ＋II及びドメインIIIを示す）。更に、ＰＥＰＳＣＡＮによって同定された最も反応性の大きい３つのドメインを結合させ、ＰＥＰＳＣＡＮ反応性の低いペプチド領域を除去した結合ペプチドを調製した（図８のペプチド５）。

【０１１５】

以下のアミノ酸配列を有するペプチド１～５を、０.０５Ｍの$NHCO_3$バッファ　ｐＨ９.６中に１μｇ／ｍｌの濃度で、固相、即ちポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルにコートし、４℃で一夜維持した。リン酸塩緩衝塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７.４で２回洗浄した後でウェルに１００μｌのヒト血清を充填し、０.０５％Ｔｗｅｅｎ　２０を含有するＰＢＳ（ＰＢＳＴ）で１：１００に希釈し、３７℃で１時間インキュベートした。ＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した後で、ＰＢＳ－Ｔ中に適当な希釈度で希釈したＨＲＰ標識ヒツジ抗ヒトＩｇＧ抗体を添加し、３７℃で１時間インキュベートした。ＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した後で、結合した酵素活性を、テトラメチルベンジジンを基質として用いることによって検出した。３０分後に、１００μｌの１ＭのH_2SO_4を添加することによって反応を停止させた。Ｍｕｌｔｉｓｃａｎホトメーターを使用して４５０ｎｍの吸光度を測定した。標準免疫蛍光血清学または前述のイムノブロット分析を用いて血清中のＥＢＶ抗体を試験した。

【０１１６】

以下のペプチドを使用した：

ペプチド１：H_2N－ＧＶＰＲＲＱＲＡＩＤＫＲＱＲＡ－ＣＯＯＨ；

ペプチド２：H_2N－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲＫＫＱ－ＣＯＯＨ；

ペプチド３：H_2N－ＡＶＤＴＧＳＧＧＧＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲＫＫＱ－ＣＯＯＨ；

ペプチド４：H_2N－ＳＴＡＶＡＱＳＡＴＰＳＶＳＳＳＩＳＳＬＲＡＡＴＳＧＡＴＡＡＡ－ＣＯＯＨ；

ペプチド５：ペプチド４のＣ末端及びペプチド３のＮ末端の外部（ｅｘｔｒａ）システイン残基を用いＳ－Ｓ－架橋によって結合させたペプチド４と３との結合ペプチド。

【０１１７】

図８は、固相にコートしたペプチド１～５及び標準手順に従って１：１００の希釈度で使用した健康なヒト血液ドナーのランダムパネルとを用いたＥＬＩＳＡ実験の結果を示す。

【０１１８】

次にこれらの血清について、ウイルスＶＣＡ－ｐ１８との反応性をイムノブロットによって試験した。

【０１１９】

これらの実験によれば、自然感染した個体から得られた血清の場合、ほとんど全部の血清がペプチド１に対して陰性であり且つペプチド２は試験血清の約５０％だけと反応したので、「抗原性指数」プログラムに基づいたコンピュータ予測では、これらの血清に対する免疫原性に関する予測値が全く得られないことは明らかである。ＰＥＰＳＣＡＮに基づいて選択されたペプチドは試験血清の夫々に対して６０～８０％の良好な反応性を示す。意外にも、ペプチド３と４とを結合させた結合ペプチドは、ヒト血清に対して９５％の反応性を示す。Ｐ１８イムノブロット陰性血清は選択されたペプチド類に対して反応性を全く示さない。

【０１２０】

実施例７

ＢＦＲＦ３によってコードされたＶＣＡ－ｐ１８タンパク質に由来の結合ペプチド５と種々のサブクラスのヒト血清抗体との反応性

実施例６に示すようなアミノ酸配列を有している結合ペプチド５を用い、種々のサブクラスのヒト血清免疫グロブリンに対す反応性をＥＬＩＳＡによって試験した（実施例６に記載の手順）。全ての場合に、実施例６と全く同様に結合ペプチド５を固相に使用した。１：１００に希釈した血清を使用して実施例６に記載したように抗体反応性を検出した。結果を図９～１１に示す。ＩｇＧ反応性を阻害するために、製造業者の指示通りにＧｕｌｌ－Ｓｏｒｂ（Ｇｕｌｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ.、Ｓａｌｔ　Ｌａｋｅ　Ｃｉｔｙ、Ｕｔａｈ、米国）をヒト血清に予め吸収させ、このヒト血清中でＩｇＭ反応性を検出した。ヒトＩｇＭのＨ鎖に特異的なＨＲＰ標識ヒツジ抗ヒトＩｇＭ抗体によってＩｇＭ抗体を検出した。

【０１２１】

また、抗ＩｇＡ特異的ＨＲＰ標識第二抗体を使用し、Ｇｕｌｌ　Ｓｏｒｂで処理した血清中のＩｇＡ反応性を検出した。図９の血清（ＩｇＧ）は、標準血清学によってＶＣＡ－ＩｇＧ陽性の７６人の健康な血清陽性の血液ドナーとＥＢＶ抗体陰性の９人のドナーとから得られた。

【０１２２】

図１０の血清（ＩｇＭ）は、標準血清学によってＶＣＡ－ＩｇＭ陽性の２６人の単核細胞症患者とＶＣＡ－ＩｇＭ陰性でＶＣＡ－ＩｇＧ陽性の１８人の健康なドナーとから得られた。

【０１２３】

図１１の血清（ＩｇＡ）は、ＩｇＡ特異的データは入手できなかったがＩｇＧ－ＶＣＡ陽性の３５人の鼻咽頭癌患者とＶＣＡ－ＩｇＧ陽性の７人の健康なドナーとから得られた。

【０１２４】

上記実験より、ＶＣＡ－ｐ１８に由来の結合ペプチドがＥＢＶ－ＶＣＡに対するＩｇＧ、ＩｇＭ及びＩｇＡ抗体の特異的検出に使用でき、標準血清学的方法と同様の感度またはより優れた感度を有することが理解されよう。すべての場合にＥＢＶ陰性血清は陰性である。

【０１２５】

【配列表】

配列番号：１

配列の長さ：５３８塩基対
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１２６】
【表２】

```
CATGATGGCA CGCCGGCTGC CCAAGCCCAC CCTCCAGGGG AGGCTGGAGG CGGATTTTCC  60
AGACAGTCCC CTGCTTCCTA AATTTCAAGA GCTGAACCAG AATAATCTCC CCAATGATGT 120
TTTTCGGGAG GCTCAAAGAA GTTACCTGGT ATTTCTGACA TCCCAGTTCT GCTACGAAGA 180
GTACGTGCAG AGGACTTTTG GGGTGCCTCG GCGCCAACGC GCCATAGACA AGAGGCAGAG 240
AGCCAGTGTG GCTGGGGCTG GTGCTCATGC ACACCTTGGC GGGTCATCCG CCACCCCCGT 300
CCAGCAGGCT CAGGCCGCCG CATCCGCTGG GACCGGGGCC TTGGCATCAT CAGCGCCGTC 360
CACGGCCGTA GCCCAGTCCG CGACCCCCTC TGTTTCTTCA TCTATTAGCA GCCTCCGGGC 420
CGCGACTTCG GGGGCGACTG CCGCCGCCTC CGCCGCCGCA GCCGTCGATA CCGGGTCAGG 480
TGGCGGGGGA CAACCCCACG ACACCGCCCC ACGCGGGGCA CGTAAGAAAC AGTAGCCC   538
```

配列番号：２
配列の長さ：１７６アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１２７】
【表３】

```
Met Ala Arg Arg Leu Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gly Arg Leu Glu Ala
1               5                  10                  15

Asp Phe Pro Asp Ser Pro Leu Leu Pro Lys Phe Gln Glu Leu Asn Gln
            20                  25                  30

Asn Asn Leu Pro Asn Asp Val Phe Arg Glu Ala Gln Arg Ser Tyr Leu
        35                  40                  45

Val Phe Leu Thr Ser Gln Phe Cys Tyr Glu Glu Tyr Val Gln Arg Thr
    50                  55                  60

Phe Gly Val Pro Arg Arg Gln Arg Ala Ile Asp Lys Arg Gln Arg Ala
65                  70                  75                  80

Ser Val Ala Gly Ala Gly Ala His Ala His Leu Gly Gly Ser Ser Ala
                85                  90                  95

Thr Pro Val Gln Gln Ala Gln Ala Ala Ala Ser Ala Gly Thr Gly Ala
            100                 105                 110

Leu Ala Ser Ser Ala Pro Ser Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro
        115                 120                 125

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
                165                 170                 175
```

配列番号：３
配列の長さ：１０３８塩基対
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：不明
配列の種類：Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１２８】
【表４】

```
ATGCTATCAG GTAACGCAGG AGAAGGAGCA ACAGCCTGCG GAGGTTCGGC CGCCGCGGGC   60
CAGGACCTCA TCAGCGTCCC CCGCAACACC TTTATGACAC TGCTTCAGAC CAACCTGGAC  120
AACAAACCGC CGAGGCAGAC CCCGCTACCC TACGCGGCCC CGCTGCCCCC CTTTTCCCAC  180
CAGGCAATAG CCACCGCGCC TTCCTACGGT CCTGGGGCCG GAGCGGTCGC CCCGGCCGGC  240
GGCTACTTTA CCTCCCCAGG AGGTTACTAC GCCGGGCCCG CGGGCGGGGA CCCGGGTGCC  300
TTCTTGGCGA TGGACGCTCA CACCTACCAC CCCCACCCAC ACCCCCCTCC GGCCTACTTT  360
GGCTTGCCGG GCCTCTTTGG CCCCCCTCCA CCCGTGCCTC CTTACTACGG ATCCCACTTG  420
CGGGCAGACT ACGTCCCCGC TCCCTCGCGA TCCAACAAGC GGAAAAGAGA CCCCGAGGAG  480
GATGAAGAAG GCGGGGGGCT ATTCCCGGGG GAGGACGCCA CCCTCTACCG CAAGGACATA  540
GCGGGCCTCT CCAAGAGTGT GAATGAGTTA CAGCACACGC TACAGGCCCT GCGCCGGGAG  600
ACGCTGTCCT ACGGCCACAC CGGAGTCGGA TACTGCCCCC AGCAGGGCCC CTGCTACACC  660
CACTCGGGGC CTTACGGATT TCAGCCTCAT CAAAGCTACG AAGTGCCCAG ATACGTCCCT  720
CATCCGCCCC CACCACCAAC TTCTCACCAG GCAGCTCAGG CGCAGCCTCC ACCCCCGGGC  780
ACACAGGCCC CCGAAGCCCA CTGTGTGGCC GAGTCCACGA TCCCTGAGGC GGGAGCAGCC  840
GGGAACTCTG GACCCCGGGA GGACACCAAC CCTCAGCAGC CCACCACCGA GGGCCACCAC  900
CGCGGAAAGA AACTGGTGCA GGCCTCTGCG TCCGGAGTGG CTCAGTCTAA GGAGCCCACC  960
ACCCCCAAGG CCAAGTCTGT GTCAGCCCAC CTCAAGTCCA TCTTTTGCGA GGAATTGCTG 1020
AATAAACGCG TGGCTTGA                                               1038
```

配列番号：４
配列の長さ：３４５アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１２９】
【表５】

```
Met Leu Ser Gly Asn Ala Gly Glu Gly Ala Thr Ala Cys Gly Gly Ser
1               5                  10                  15

Ala Ala Ala Gly Gln Asp Leu Ile Ser Val Pro Arg Asn Thr Phe Met
            20                  25                  30

Thr Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asn Lys Pro Pro Arg Gln Thr Pro
        35                  40                  45

Leu Pro Tyr Ala Ala Pro Leu Pro Pro Phe Ser His Gln Ala Ile Ala
    50                  55                  60

Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ala Val Ala Pro Ala Gly
65                  70                  75                  80

Gly Tyr Phe Thr Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Pro Ala Gly Gly
                85                  90                  95

Asp Pro Gly Ala Phe Leu Ala Met Asp Ala His Thr Tyr His Pro His
            100                 105                 110

Pro His Pro Pro Pro Ala Tyr Phe Gly Leu Pro Gly Leu Phe Gly Pro
        115                 120                 125

Pro Pro Pro Val Pro Pro Tyr Tyr Gly Ser His Leu Arg Ala Asp Tyr
    130                 135                 140

Val Pro Ala Pro Ser Arg Ser Asn Lys Arg Lys Arg Asp Pro Glu Glu
145                 150                 155                 160

Asp Glu Glu Gly Gly Gly Leu Phe Pro Gly Glu Asp Ala Thr Leu Tyr
                165                 170                 175
```

（配列番号：４の配列のつづき）

【０１３０】

【表６】

（配列番号：4の配列のつづき）

```
Arg Lys Asp Ile Ala Gly Leu Ser Lys Ser Val Asn Glu Leu Gln His
            180                 185                 190

Thr Leu Gln Ala Leu Arg Arg Glu Thr Leu Ser Tyr Gly His Thr Gly
        195                 200                 205

Val Gly Tyr Cys Pro Gln Gln Gly Pro Cys Tyr Thr His Ser Gly Pro
    210                 215                 220

Tyr Gly Phe Gln Pro His Gln Ser Tyr Glu Val Pro Arg Tyr Val Pro
225                 230                 235                 240

His Pro Pro Pro Pro Pro Thr Ser His Gln Ala Ala Gln Ala Gln Pro
                245                 250                 255

Pro Pro Pro Gly Thr Gln Ala Pro Glu Ala His Cys Val Ala Glu Ser

            260                 265                 270

Thr Ile Pro Glu Ala Gly Ala Ala Gly Asn Ser Gly Pro Arg Glu Asp
        275                 280                 285

Thr Asn Pro Gln Gln Pro Thr Thr Glu Gly His His Arg Gly Lys Lys
    290                 295                 300

Leu Val Gln Ala Ser Ala Ser Gly Val Ala Gln Ser Lys Glu Pro Thr
305                 310                 315                 320

Thr Pro Lys Ala Lys Ser Val Ser Ala His Leu Lys Ser Ile Phe Cys
                325                 330                 335

Glu Glu Leu Leu Asn Lys Arg Val Ala
            340                 345
```

配列番号：５
配列の長さ：２４アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３１】
【表７】

```
Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala
                5                   10                  15

Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
            20
```

配列番号：６
配列の長さ：３０アミノ酸

配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３２】
【表８】

Ser	Thr	Ala	Val	Ala	Gln	Ser	Ala	Thr	Pro	Ser	Val	Ser	Ser	Ser Ile
				5					10					15
Ser	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	
			20					25						

配列番号：７
配列の長さ：１５アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３３】
【表９】

Gly	Val	Pro	Arg	Arg	Gln	Arg	Ala	Ile	Asp	Lys	Arg	Gln	Arg	Ala
				5					10					15

配列番号：８
配列の長さ：１５アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３４】
【表１０】

Gly	Gln	Pro	His	Asp	Thr	Ala	Pro	Arg	Gly	Ala	Arg	Lys	Lys	Gln
				5					10					15

配列番号：９
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３５】
【表１１】

Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro Ser Val Ser
5 10

配列番号：１０
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３６】
【表１２】

Pro Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala
5 10

配列番号：１１
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３７】
【表１３】

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala
5 10

配列番号：１２
配列の長さ：１２アミノ酸

配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３８】
【表１４】

Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser
5 10

配列番号：１３
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１３９】
【表１５】

Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala
5 10

配列番号：１４
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４０】
【表１６】

Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr
5 10

配列番号：１５

配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４１】
【表１７】

Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ser
5 10

配列番号：１６
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４２】
【表１８】

Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln
5 10

配列番号：１７
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４３】
【表１９】

Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro
5 10

配列番号：１８

配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４４】
【表２０】

Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His
5 10

配列番号：１９
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４５】
【表２１】

Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp
5 10

配列番号：２０
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４６】
【表２２】

Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly
5 10

配列番号：２１
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４７】
【表２３】

Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg
5 10

配列番号：２２
配列の長さ：１２アミノ酸
配列の型：アミノ酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルス
配列
【０１４８】
【表２４】

Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys
5 10

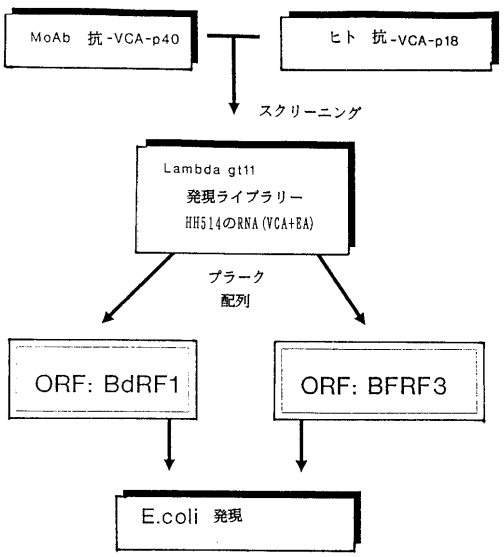
【図面の簡単な説明】
【図１】ＥＢＶによってコードされており且つＶＣＡ－ｐ４０及びＶＣＡ－ｐ１８タンパク質をコードする遺伝子を同定するために使用される方法の概略図である。
【図２】（ａ）ＥＡ及びＶＣＡを発現させるように誘導されたウイルス産生細胞系ＨＨ５１４の核抗原抽出物のウェスタンブロットを示す。
（ｂ）ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質を発現する大腸菌の全細胞溶解物のウェスタンブロットを示す。
（ｃ）ＢｄＲＦ１－β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質を発現する大腸菌の全細胞溶解物のウェスタンブロットを示す。
（ｄ）β－ガラクトシダーゼだけを発現する大腸菌の全細胞溶解物のウェスタンブロットを示す。
ブロットを１組のヒト血清によってプローブした。ブロットのレーン１～１６に以下の血清を夫々使用した：

１．β－Ｇａｌに対するマウスモノクローナル抗体（Ｐｒｏｍｅｇａ）；
２．天然ウイルスキャプシドタンパク質（ＥＢＶ.ＯＴ４１Ａ）で免疫感作することによって増強したＶＣＡ－Ｐ４０に対するマウスモノクローナル抗体；
３．ウイルスＶＣＡ－Ｐ１８による特異的イムノアフィニティ精製によって得られたウイルスＶＣＡ－Ｐ１８に単一特異性のヒト抗体；
４－５．ヒトＥＢＶ－血清陰性の血清；
６－１６．ウイルスＶＣＡ－Ｐ１８及びＶＣＡ－Ｐ４０に対して異なる相対反応性を有するヒトＥＢＶ－血清陽性の血清。
【図３】以下の量のＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質を予め吸収させたニトロセルロースストリップ上の３つのヒト血清（血清９２、血清２１４及び血清２１９）のイムノブロット：
レーン１：０μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ；
レーン２：０.０１μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ；
レーン３：０.１μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ；
レーン４：０.５μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ；
レーン５：１μｇ　ＢＦＲＦ３－β－ガラクトシダーゼ。
β－ガラクトシダーゼが単独に存在するレーンをレーンβとして示す。
【図４】ＰＥＰＳＣＡＮ分析の結果：ＶＣＡ－１８配列に由来の１２量体ペプチドと反応性の健康なＥＢＶ血清陽性ドナーに由来の１５人のヒト血清のパーセンテージ。ＶＣＡ－ｐ１８タンパク質のアミノ酸配列の内部の１２量体ペプチドの初期位置をＸ軸に示す。
【図５】ＶＣＡ－ｐ１８に対するラットモノクローナル抗体（ＥＢＶ.ＯＴ１５Ｅ）を用いたＶＣＡ－ｐ１８由来の１２量体ペプチドの分析のＰＥＰＳＣＡＮ結果（４５０ｎｍの光学密度）を示す。
【図６】ＶＣＡ－ｐ１８に対するラットモノクローナル抗体（ＥＢＶ.ＯＴ１５Ｉ）を用いたＶＣＡ－ｐ１８由来の１２量体ペプチドの分析のＰＥＰＳＣＡＮ結果（４５０ｎｍの光学密度）を示す。
【図７】ＶＣＡ－ｐ４０に対するマウスモノクローナル抗体（ＥＢＶ.ＯＴ４１Ａ）によるＶＣＡ－ｐ４０タンパク質から誘導された１２量体ペプチドの分析のＰＥＰＳＣＡＮ結果を示す。
【図８】健康な血液ドナーから得られた４３人のヒト血清サンプルのＥＬＩＳＡ反応性（４５０ｎｍの光学密度）を試験するために、ＢＦＲＦ３によってコードされたＶＣＡ－ｐ１８タンパク質に由来の選択された合成ペプチドに対するＩｇＧ－反応性を試験した結果を示す。
△：標準血清学的分析による陰性血清を示す；
□：標準血清学的分析による陽性血清を示す；
◇：標準血清学的分析によってＥＢＶ抗体を特定できないがイムノブロットで陰性の血清を示す；
＊：標準血清学によって陽性であるがイムノブロット上の抗ｐ１８抗体に陰性血清を示す。
ペプチド１：H_2N－ＧＶＰＲＲＱＲＡＩＤＫＲＱＲＡ－ＣＯＯＨ；
ペプチド２：H_2N－ＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲＫＫＱ－ＣＯＯＨ；
ペプチド３：H_2N－ＡＶＤＴＧＳＧＧＧＧＱＰＨＤＴＡＰＲＧＡＲＫＫＱ－ＣＯＯＨ；
ペプチド４：H_2N－ＳＴＡＶＡＱＳＡＴＰＳＶＳＳＳＩＳＳＬＲＡＡＴＳＧＡＴＡＡＡ－ＣＯＯＨ；
ペプチド５：Ｓ－Ｓ－架橋によって結合させたペプチド４と３との結合ペプチド。
【図９】結合ペプチド５と抗体（ａ）ヒトＩｇＧ（７６　ＶＣＡ－Ｉ.Ｆ.陽性血清）との免疫反応性の分析（ＥＬＩＳＡ）を示す。
【図１０】結合ペプチド５と抗体（ｂ）ヒトＩｇＭ（２６　ＩｇＭ　陽性血清）との免疫反応性の分析（ＥＬＩＳＡ）を示す。
【図１１】結合ペプチド５と抗体（ｃ）ヒトＩｇＡ（ＮＰＣ患者の３５血清）との免疫反

応性の分析（ＥＬＩＳＡ）を示す。

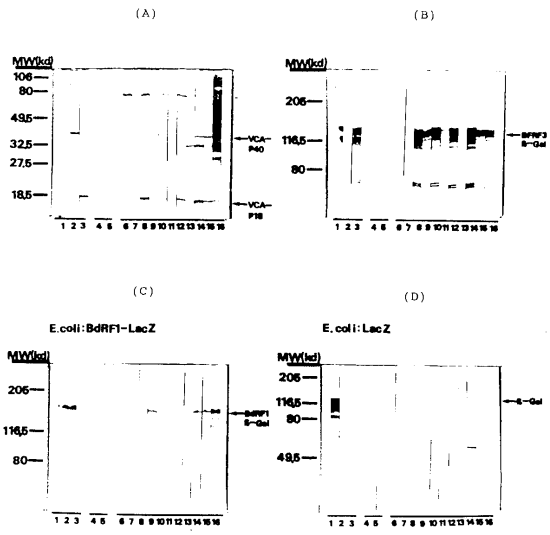
【図１】

FIGURE 1

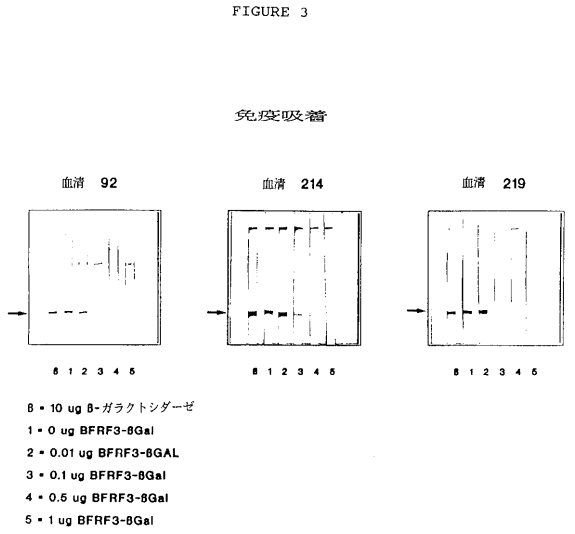


【図２】

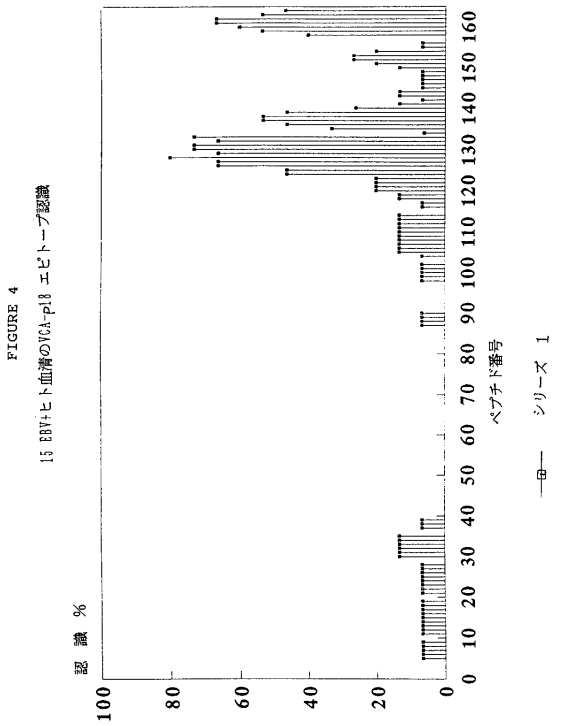
FIGURE 2



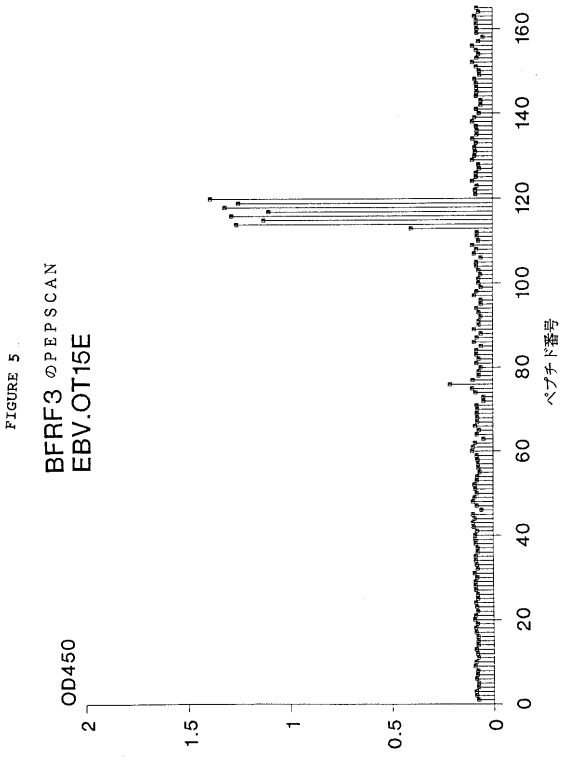
【図３】


FIGURE 3
免疫吸着
血清 92
血清 214
血清 219
B 1 2 3 4 5
B 1 2 3 4 5
B 1 2 3 4 5
B = 10 ug β-ガラクトシダーゼ
1 = 0 ug BFRF3-βGal
2 = 0.01 ug BFRF3-βGAL
3 = 0.1 ug BFRF3-βGal
4 = 0.5 ug BFRF3-βGal
5 = 1 ug BFRF3-βGal

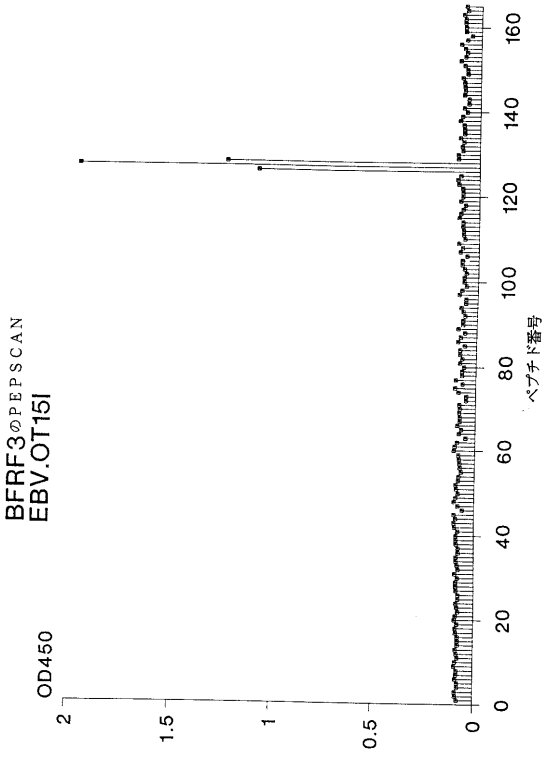
【図４】


FIGURE 4
15 EBVキャリア血清のVCA-p18 エピトープ認識
認 識 %
0 20 40 60 80 100
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160
ペプチド番号
シリーズ 1

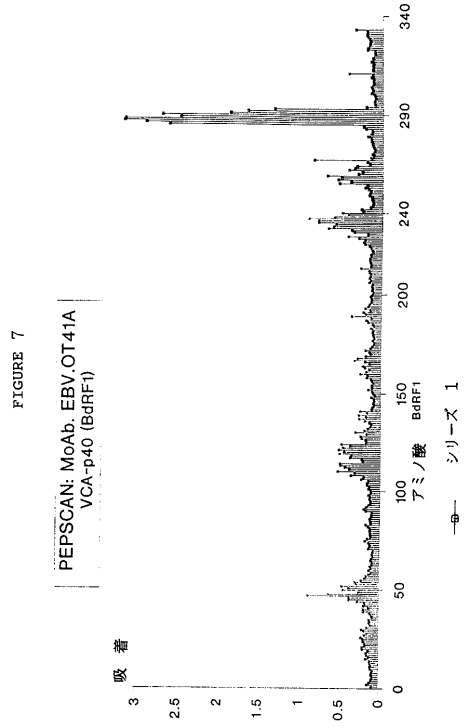
【図５】


FIGURE 5
BFRF3 のPEPSCAN
EBV.OT15E
OD450
0 0.5 1 1.5 2
0 20 40 60 80 100 120 140 160
ペプチド番号

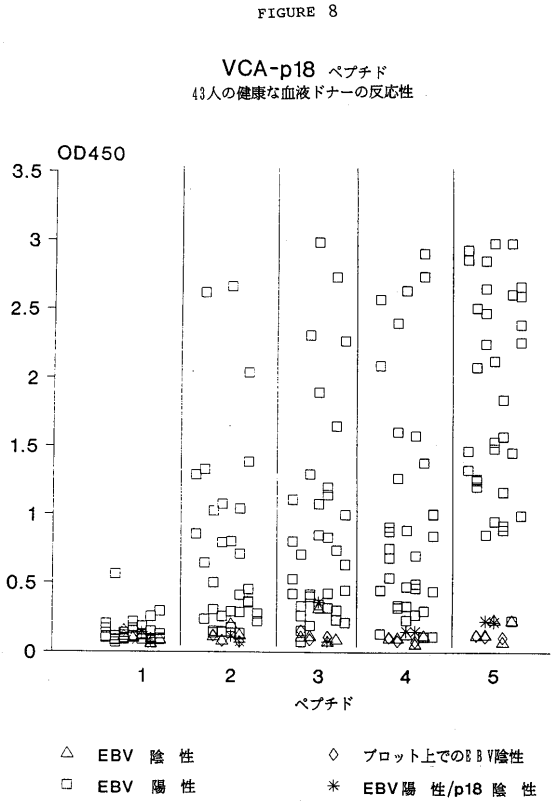
【図６】


FIGURE 6
BFRF3のPEPSCAN
EBV.OT15I
OD450
0 0.5 1 1.5 2
0 20 40 60 80 100 120 140 160
ペプチド番号

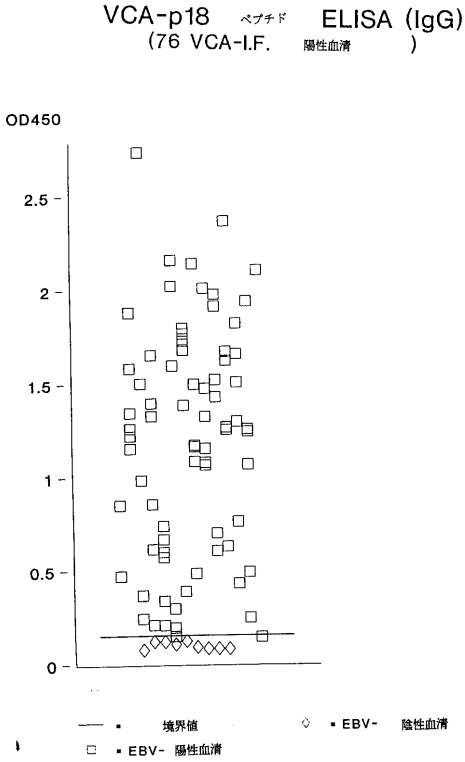
【図７】


FIGURE 7
PEPSCAN: MoAb. EBV.OT41A
VCA-p40 (BdRF1)
吸着
アミノ酸
BdRF1
シリーズ 1

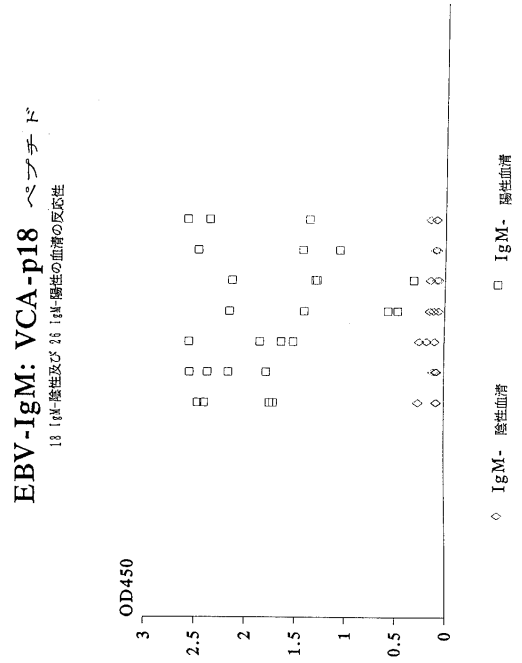
【図８】


FIGURE 8
VCA-p18 ペプチド
43人の健康な血液ドナーの反応性
OD450
ペプチド
EBV 陰性
EBV 陽性
ブロット上でのEBV陰性
EBV陽性/p18陰性

【図９】

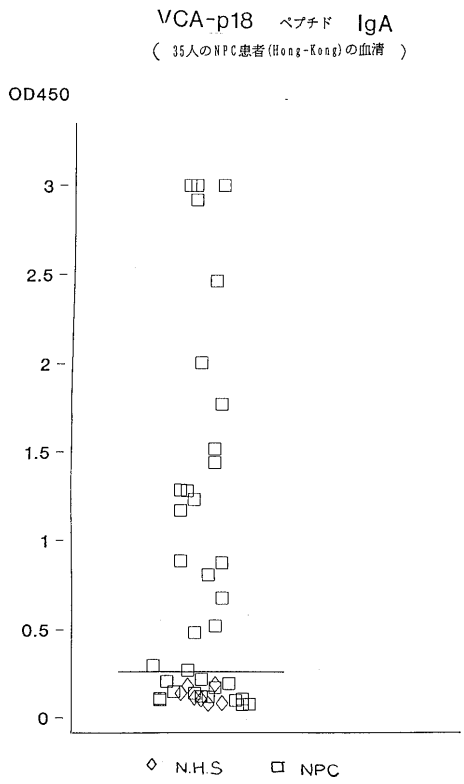

FIGURE 9
VCA-p18 ペプチド ELISA (IgG)
(76 VCA-I.F. 陽性血清)
OD450
境界値
EBV- 陰性血清
EBV- 陽性血清

【図１０】


FIGURE 10
EBV-IgM: VCA-p18 ペプチド
18 IgM-陰性及び 28 IgM-陽性の血清の反応性
OD450
IgM- 陽性血清
IgM- 陰性血清

【図１１】

FIGURE 11



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08
C12R	*1/91*	*(2006.01)*	C12R	1:91

合議体
審判長　種村　慈樹
審判官　小暮　道明
審判官　平田　和男

(56)参考文献　国際公開第９１／０８２２４（WO, A1）
特開平２－００２３９９（JP, A）
J. Immunol., Vol. 130, No. 2（1983）p. 919－924
J. Gen. Virol., Vol. 66, Pt. 5（1985）p. 1113－1122
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 89, No. 1（1992）p. 378－382
Nature, Vol. 310, No. 5974（1984）p. 207－211
Virology, Vol. 147, No. 1（1985）p. 99－109
Mol. Biol. Med., Vol. 1, No. 1（1983）p. 21－45
J. Gen. Virol., Vol. 56, Pt. 1（1981）p. 105－118
J. Virol. Methods., Vol. 21, No. 1－4（1988）p. 133－146

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N15/00-15/90
C07K1/00-19/00
PUBMED
BIOSIS/WPI
SWISSPROT/PIR/GENESEQ