

(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2004-125660

(P2004-125660A)

(43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/566

// C 1 2 N 15/09

F I

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00

Z N A G

A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2002-291159 (P2002-291159)

(22) 出願日 平成14年10月3日 (2002.10.3)

(71) 出願人 501203344

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

茨城県つくば市観音台3-1-1

(71) 出願人 591048520

片倉工業株式会社

東京都中央区京橋3丁目1番2号

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎

(74) 代理人 100086221

弁理士 矢野 裕也

(72) 発明者 高橋 ひとみ

茨城県つくば市吾妻2-11-806-509

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウシインターフェロン<sub>T</sub>の測定法

## (57) 【要約】

【課題】インターフェロン<sub>T</sub>の分泌動態を解明するために効果的な検出、定量が可能な測定系を開発すること。

【解決手段】配列表の配列番号3に記載の塩基配列からなるcDNAにより誘起される、ウシインターフェロン<sub>T</sub>に対する特異的な抗体を用いることを特徴とするウシインターフェロン<sub>T</sub>の免疫学的測定法並びにウシインターフェロン<sub>T</sub>を含む検体と上記のウシインターフェロン<sub>T</sub>に対する特異的な抗体を、標識したウシインターフェロン<sub>T</sub>に加え、該抗体に対する標識したウシインターフェロン<sub>T</sub>と検体中のウシインターフェロン<sub>T</sub>との競合反応を生起させ、検体中のウシインターフェロン<sub>T</sub>の量を測定することを特徴とするウシインターフェロン<sub>T</sub>の免疫学的測定法。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなる c D N A により誘起される、ウシインターフェロン に対して特異的な抗体を用いることを特徴とするウシインターフェロン の免疫学的測定法。

**【請求項 2】**

ウシインターフェロン を含む検体と請求項 1 記載のウシインターフェロン に対する特異的な抗体を、標識したウシインターフェロン に加え、該抗体に対する標識したウシインターフェロン と検体中のウシインターフェロン との競合反応を生起させ、検体中のウシインターフェロン の量を測定することを特徴とするウシインターフェロン の免疫学的測定法。 10

**【請求項 3】**

標識したウシインターフェロン が放射性同位元素で標識したものである請求項 1 記載のウシインターフェロン の免疫学的測定法。

**【請求項 4】**

配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなる c D N A により誘起される、ウシインターフェロン に対して特異的な抗体を含むことを特徴とするウシインターフェロン 測定用キット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

20

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、ウシインターフェロン の測定法に関し、詳しくはウシの胚や栄養膜細胞が分泌するウシインターフェロン あるいは組換えにより作出されたウシインターフェロン を含む溶液中のウシインターフェロン を測定する方法に関する。この方法は、ウシ胚が分泌するウシインターフェロン あるいは組換えにより作出されたウシインターフェロン の効果的な測定法である。

**【0002】****【従来の技術】**

従来、ウシ胚が分泌するウシインターフェロン あるいは組換えにより作出されたウシインターフェロン の測定（あるいは検出）方法としては、インターフェロン（以下、I F N と略記することもある。）が有する性質である抗ウイルス活性を、ある種の細胞に特定のウイルスを感染させ、その阻止力価を検定する生物検定（非特許文献 1）もしくはその存在の有無について抗体を用いて検出するイミュノプロット法（非特許文献 2）等がある。 30

これらの方法を用いることにより、I F N 共通の力価としてウシインターフェロン の力価を示すこと、あるいは抗体に反応するウシインターフェロン の有無の評価が可能である。

しかし、いずれの検出法も、操作方法が煩雑である上、多検体処理が難しいなど、満足し得る技術ではなかった。しかも、抗ウイルス活性による生物検定では、I F N 類の活性の総和として表されるため、ウシインターフェロン の活性を I F N や I F N 等の他の抗ウイルス作用を有する物質の活性と区別することができない。また、イミュノプロット法では検出感度が十分でない等の問題を抱えている。 40

そこで、これらの問題点を解消したウシインターフェロン の測定法の開発が強く要望されている。

**【0003】**

一方、I F N は、生体内でリンパ球や線維芽細胞等の様々な細胞が生産する生理活性タンパク質で、抗ウイルス作用や抗腫瘍作用等を有することが知られている。

I F N には、 、 の主要サブタイプがあり、それぞれ I F N 、 I F N および I F N と呼ばれている。

これらのうち I F N には、抗ウイルス作用が異なる近縁タンパクが存在し、これらは I 50

FN ファミリーと呼ばれている。また、IFN と IFN は類似した性質を持っていることから、IFN とアミノ酸配列の相同性が高い IFN として見出された IFN および とを合わせて、タイプ 1 IFN と呼ばれている。

#### 【0004】

ところで、タイプ 1 IFN に含まれるインターフェロン（以下、IFN と略記することもある。）は、反芻動物において着床前の栄養膜（trophoblast）細胞によって産生される妊娠認識に関与する因子として単離されたタンパク質であり、アミノ酸配列レベルでは IFN と 50～70% の相同性がある（非特許文献 3）。ウシの IFN は Imakawa らによって単離され（非特許文献 4）、ウシおよびヒツジ IFN 間のアミノ酸配列の相同性は 80.4% である。

10

IFN は、プロスタグランジン F<sub>2</sub>（この物質は妊娠していない反芻家畜において、卵巣の黄体の生理学のおよび内分泌学的な退行へ誘導する）の子宮からの分泌を阻害することが知られている（非特許文献 5）。これは、抗黄体退行作用と呼ばれ、この作用を持つ IFN は、妊娠認識の確立に寄与しているものと考えられている。

#### 【0005】

また、IFN を子宮内に投与することで、反芻家畜の発情周期延長効果が確認されており（非特許文献 6）、IFN には受胎率向上を含めた利用が期待されている。その他の生理活性としては、抗ウイルス作用に加え、細胞増殖抑制作用があることが見出されている。

さて、畜産分野での IFN は、ウシの受胎促進関連の生理活性物質として利用される可能性が高い。様々な発現系で作出される組換えウシ IFN を、ウシ IFN 特異的に検出並びに定量し、独自の量として示すことが産業利用の上で必要である。しかし、ウシ IFN に特異的な測定系が未だ確立されておらず、これらの早期解明のために効果的な検出並びに定量が可能な測定系の開発が待たれている現状である。

20

#### 【0006】

##### 【非特許文献 1】

日本化学会編、新生化学実験講座、第 12 巻、372 - 378（1989）

##### 【非特許文献 2】

Anal. Biochem., 166: 368 - 379（1987）

##### 【非特許文献 3】

Nature, 330; 337, 1987

30

##### 【非特許文献 4】

Mol. Endocrinol., 3; 127 - 139, 1989

##### 【非特許文献 5】

J. Reprod. Fert., 76; 841, 1986

##### 【非特許文献 6】

J. Dairy Sci., 78(9); 1921 - 1931, 1995

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、ウシ胚よりウシ IFN（以下、b IFN と略記することもある。）のクローンを得、組換え体および b IFN に対する特異抗体を作出した。これらを用いることにより、ウシ胚が分泌する b IFN あるいは組換えにより作出された b IFN を、生物検定あるいはイミュノプロット法によらないで、b IFN の検出および定量が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

40

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

請求項 1 記載の本発明は、配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなる cDNA により誘起される、ウシインターフェロンに対して特異的な抗体を用いることを特徴とするウシインターフェロンの免疫学的測定法である。

50

請求項 2 記載の本発明は、ウシインターフェロン を含む検体と請求項 1 記載のウシインターフェロン に対する特異的な抗体を、標識したウシインターフェロン に加え、該抗体に対する標識したウシインターフェロン と検体中のウシインターフェロン との競合反応を生起させ、検体中のウシインターフェロン の量を測定することを特徴とするウシインターフェロン の免疫学的測定法である。

請求項 3 記載の本発明は、標識したウシインターフェロン が放射性同位元素で標識したものである請求項 1 記載のウシインターフェロン の免疫学的測定法である。

請求項 4 記載の本発明は、配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなる c D N A により誘起される、ウシインターフェロン に対して特異的な抗体を含むことを特徴とするウシインターフェロン 測定用キットである。

10

#### 【 0 0 0 9 】

#### 【 発明の実施の形態 】

本発明の b I F N の測定法は、 b I F N に対して特異的な抗体を用いた免疫学的測定法を用いることにより、 b I F N を検出・測定することを特徴とするものである。

本発明の方法を適用できる対象は、 b I F N を含有する溶液である。また、本発明における I F N とは、タイプ 1 に分類される分子種を意味している。

#### 【 0 0 1 0 】

b I F N の測定においては、上記 b I F N を放射性同位元素、例えば <sup>1 2 5</sup> I にて標識する。該標識した b I F N に対し、測定すべき b I F N を含む検体とともに、一定量の配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなる c D N A により誘起される、b I F N に対する特異的な抗体（以下、一次抗体と略することもある。）並びに一次抗体に対する二次抗体を反応させ、該一次抗体に対する標識 b I F N と検体中の b I F N との競合反応により、溶液中に標識 b I F N と一次抗体（抗 b I F N 抗体）および二次抗体からなる免疫複合体を形成させ、沈澱させた免疫複合体（b o u n d ; B）と液層の部分（f r e e ; F）とを分離した後、沈澱物中の該標識 b I F N のシグナルを測定することにより、測定すべき b I F N の量を知る。一次抗体並びに二次抗体の添加量は、標識 b I F N や検体中の b I F N の状態を考慮して、適宜選択することができる。

20

#### 【 0 0 1 1 】

前記したように、本発明の方法を実施するにあたり、ウシ胚より b I F N の c D N A クローンを得、組換え体および b I F N に対する特異的な抗体を作出する。b I F N の c D N A クローンは、I F N 遺伝子および I F N 遺伝子は増幅せず、I F N 遺伝子のみが増幅されるように設計した 1 対のプライマー（配列表の配列番号 1 および 2）を用いて、体外受精由来ウシ透明帯脱出胚盤胞より得られた栄養膜細胞、ウシ子宮より回収した胎子の栄養膜細胞などから抽出した m R N A を R T - P C R 法に供し、シグナルペプチド領域を含む b I F N c D N A（配列番号 3）を増幅し、p C R I I にクローニングする。

30

#### 【 0 0 1 2 】

続いて、これをトランスファーベクター p A c Y M 1 にリクローニングし、バキュロウイルスの D N A と共に S F 2 1 A E 細胞、カイコ細胞（B m N 細胞：B o M o 細胞）、鱗翅目ヤガ科の昆虫細胞〔S f 9 細胞、I P L B S F - 2 1 A E 細胞（S F 2 1 A E 細胞）（ハスモンヨトウガ；S p o d e p t e r a f r u g i p e d a 由来）、B T I T N 5 B 1 - 4 細胞（T N 5 細胞）（イラクサキンウクバ；T r i c o p l u s i a n i 由来）等の細胞〕に同時トランスフェクションを行い、常法にしたがって組換えウイルスを得る。

40

次に、この組換えウイルスを昆虫細胞に感染させて培養し、培養上清に組換え型 b I F N を分泌、蓄積させた後、精製し、当該精製物の抗ウイルス活性を測定する。

I F N の抗ウイルス活性は、ウシ腎由来細胞（M D B K 細胞）とシンドビスウイルス（S i n d b i s v i r u s）を用い、一般に知られている抗ウイルス活性測定法（日本

50

化学会編、新生化学実験講座、第12巻、372 - 378 (1989)、東京化学同人発行)にしたがって測定することができる。

#### 【0013】

次に、bIFN に対する特異的な抗体は、上記ヤギ細胞発現系由来 bIFN を、常法にしたがってアジュバントと等量混合して雌家兎の皮内に投与した後、追加免疫を繰り返して行う。得られた血清を免疫学的手法で検定して目的とする特異的な抗体を得る。この家兎血清が一次抗体である。

一方、二次抗体の抗家兎ヤギ血清は、家兎IgG を常法にしたがってアジュバントと等量混合してヤギリンパ節内に投与した後、追加免疫を3回反復し、血清を得ることができる。この血清が抗家兎ヤギ血清で、二次抗体である(生体の科学、38(5):361 - 362, 1987、若林 克己、免疫法の実験)。

なお、bIFN に対する特異抗体としては、上記の他にマウスモノクローナル抗体、マウスポリクローナル抗体およびこれらに対する抗マウスヤギ(あるいはヒツジ、家兎)血清なども使用可能である。

#### 【0014】

前記反応に用いる一次抗体並びに二次抗体の添加量は、標識 bIFN や測定対象溶液中の bIFN の状態を考慮して、適宜選択することができる。通常は、一次抗体については500 ~ 20000倍、好ましくは2000 ~ 8000倍の範囲で、二次抗体については10 ~ 100倍、好ましくは30 ~ 60倍の範囲で用いる。

また、標識および既知濃度を得るために用いる bIFN としては限定されるものではなく、広く bIFN を使用することができる。その中でも、ヤギ細胞およびカイコ虫体の発現系により作出された bIFN が好ましいものである。標識は、前記<sup>1 2 5</sup> I 以外に、例えば酵素、蛍光物質、ランタノイド元素、発光物質、スピン試薬などを用いる手法でも可能である。

#### 【0015】

本発明によれば、例えば胚を移植したウシより得た子宮灌流液あるいは組換えにより作出した bIFN 溶液と標識した bIFN 、既知濃度の bIFN 、一次抗体並びに二次抗体とを反応させる測定系により、測定対象溶液中の bIFN 濃度を知ることができる。

本発明の方法においては、bIFN のみに反応する特異的な抗体を用いるために、他のタイプ1IFNを含まず、bIFN の検出並びに定量を行うことができる。

#### 【0016】

##### 【実施例】

以下に、本発明を実施例等により詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

製造例1 ( bIFN 遺伝子組換えバキュロウイルスの調製 )

##### (1) bIFN cDNAのクローニング

体外受精・体外培養し、発育したウシ透明帯脱出胚盤胞より得られた栄養膜細胞から抽出したmRNAを用いて、RT-PCR法によって bIFN のcDNAをクローニングした。

#### 【0017】

IFN 遺伝子の塩基配列は、IFN の塩基配列と非常にホモロジーが高いため、Flintら(J. Reprod. Fert. Suppl., 43(1991), 13 - 25) およびRobertら(J. Reprod. Fert. Suppl., 43(1991), 3 - 12)によって報告されている bIFN cDNAの塩基配列および bIFN IIまたは の塩基配列を比較し、翻訳領域の外側でIFN の遺伝子は増幅するが、IFN IIまたは は増幅しない後記の2種類のプライマー(配列表の配列番号1および2)を設計した。

#### 【0018】

前記の2種類のプライマーを用いたRT-PCR法で増幅してきたフラグメントをPCR

10

20

30

40

50

IIベクター（インビトロゲン社製）に組み込んだ。翻訳領域の内にあり、IFN の遺伝子は増幅するが、IFN は増幅しないプライマーを設計してPCRを行い、クローンを選択した。得られたクローンの塩基配列を決定し、既に報告されている bIFN

cDNAの塩基配列（データベース名：ジーンバンク、アクセッション番号：AF238612）と比較することにより、2カ所に違いがあるものの、99.6%の一致を確認した（配列番号3）。

#### 【0019】

得られた bIFN cDNAを、T4DNAリガーゼ [DNA ligation kit Ver. 2（タカラ社製）使用]を用い、クローニングベクター pCR IIベクター（インビトロゲン社製）のクローニング部位に連結した。さらに、これをコンピテントセルJM109 [COMPETENT high（タカラ社製）]へ形質転換し、常法にしたがってクローニングした。

10

#### 【0020】

(2) bIFN 組換えAcバキュロウイルス（bIFN・AcNPV）の作成 bIFN cDNAがクローニングされたプラスミド（pCR/bIFN）を鋳型にして、2種類のプライマー（配列表の配列番号4および5）を利用して、PCR法により bIFN cDNAの増幅と共にcDNAの5'末端並びに3'末端に制限酵素の認識配列を導入した。PCR法には、EX Taqポリメラーゼ（タカラ社製）を使用した。

20

#### 【0021】

得られた bIFN cDNA/Bam HI Bam HI を制限酵素 Bam HI で処理した後、pAcYM1にクローニングし、トランスファーベクターを構築した。続いて、バキュロウイルス（Autographica californica nuclear polyhidrosis virus: AcNPV）のDNAと共に、Spodoptera frugiperda 細胞系であるSF21AE細胞に同時に導入することによって相同組換えを行い、bIFN 遺伝子組換えAcバキュロウイルス（CPd/bIFN・AcNPV）を得た。

#### 【0022】

(3) bIFN 組換えBmバキュロウイルス（bIFN・BmNPV）の作成 bIFN cDNAがクローニングされたプラスミド（pCR/bIFN）を鋳型にして、2種類のプライマー（配列表の配列番号6および7）を利用して、PCR法により bIFN cDNAの増幅と共にcDNAの5'末端に制限酵素 Bam HI を、3'末端に制限酵素Eco RIの認識配列を導入した。PCR法には、EX Taqポリメラーゼ（タカラ社製）を使用した。

30

#### 【0023】

得られた bIFN cDNA/Bam HI Eco RI を制限酵素 Bam HI および Eco RI で処理した後、カイコ（Bombyx mori）バキュロウイルス（BmNPV:カイコ核多角体病ウイルス）用のトランスファーベクター pBM050（Maeda, S. "In Insect Cell Biochemistry", p. 1-31）のマルチクローニングサイトの制限酵素切断部位 Bg IIIおよび Eco RI に、T4DNAリガーゼ [DNA ligation kit Ver. 2（タカラ社製）使用]を用いて連結した。

40

#### 【0024】

このベクターでコンピテントセルJM109 [COMPETENT high（タカラ社製）]を形質転換し、常法によりクローニングして bIFN 遺伝子組換えトランスファープラスミド pBM050/bIFN を得た。

#### 【0025】

最後に、トランスファープラスミド pBM050/bIFN とバキュロウイルス BmNPV CPd株（システインプロテアーゼ欠損株）DNAをカイコBmN細胞に同時に導入することによって相同組換えを行い、bIFN 遺伝子組換えBmバキュロウイルス

50

(C P d / b I F N ・ B m N P V) を得た。

【0026】

製造例2 ( b I F N ・ A c N P V とヤガ細胞発現系由来 b I F N ( A c b I F N ) の調製)

(1) ヤガ細胞培養上清の取得

b I F N 遺伝子組換え A c バキュロウイルス ( C P d / b I F N ・ A c N P V ) を *Tricoplusia ni* ( ヤガ科昆虫 ) 由来の細胞系である B T I T N 5 B 1 - 4 ( 以下、T N 5 と略記することもある。 ) 細胞に感染させ、無血清培地 E X - C E L L 4 0 1 ( J R H B i o s c i e n c e 社製 ) 中で 2 8 ° C で 4 日間培養し、培養上清に組換え型 A c b I F N を分泌、蓄積させた。

10

【0027】

(2) ヤガ細胞培養上清より得られた A c b I F N の精製

続いて、超遠心 ( 1 2 0 0 0 × g 、 1 5 分間 ) および限外ろ過膜 ( 商品名 : セントリコン ) により組換えウイルスを除去した後、得られた組換え型ウシ A c b I F N を含む画分を 5 0 ~ 7 0 % 硫酸アンモニウムで沈殿させ、これを弱陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムとして D E A E s e p h a r o s e C L 6 B ( ファルマシア社製 ) を用い、溶出液として 1 M K C l - 5 0 m M T r i s - H C l ( p H 6 . 0 ) 0 ~ 1 0 0 % の濃度勾配で溶出した。流速は、 0 . 5 m l / m i n とした。

【0028】

溶出した画分のうち、 1 0 0 m M K C l のときに溶出された画分をさらに強陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムとして P O R O S H S / H ( ファルマシア社製 ) を用い、溶出液として 1 M N a C l - 1 0 m M クエン酸ナトリウム ( p H 5 . 5 ) 0 ~ 5 0 % の濃度勾配で溶出した。流速は、 5 . 0 m l / m i n とした。

20

続いて、強陽イオン交換クロマトグラフィーによって得たピークを、ゲルろ過クロマトグラフィーに供し、ヤガ細胞発現系由来の組換え A c b I F N の精製物を得た。なお、カラムとして H i L o a d 1 6 / 6 0 S u p e r d e x ( ファルマシア社製 ) 、溶出液として P B S を用い、流速は 0 . 5 m l / m i n とした。

【0029】

精製したヤガ細胞発現系由来の組換え A c b I F N の抗ウイルス活性は、前記したウシ腎由来細胞 ( M D B K 細胞 ) とシンドビス ウイルス ( S i n d b i s v i r u s ) を用い、一般に知られている抗ウイルス活性測定法で測定した。

30

A c b I F N 感染 T N 5 細胞の培養上清をトリシン - ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミド電気泳動 ( S D S - P A G E ) した後、クマシーブリアントブルー ( C B B ) 染色したところ、分子量約 2 3 k D a に相当するバンドが得られた。このバンドについて、ウエスタンブロット法を行ったところ、b I F N であることが確認され、  $1 \times 10^7$  u n i t s / m l 以上の抗ウイルス活性が認められた。

【0030】

製造例3 ( b I F N ・ B m N P V とカイコ虫体発現系由来 b I F N ( B m b I F N ) の調製)

(1) カイコ体液の取得

40

カイコを宿主とし、組換え体ウイルスである b I F N ・ B m N P V を用い、下記の方法で b I F N を発現させた。すなわち、5 齢 1 日のカイコに製造例 2 で得られた b I F N ・ B m N P V を接種し、人工飼料を用いて飼育した。

カイコ体液は、感染後 4 日目に、病虫の足をシリンジで刺して回収した。回収した体液に、最終濃度 5 m M となる量のジチオスレイトール ( D T T ) を添加し、8 0 ° C で保存した。この体液 ( 粗 B m b I F N 体液 ) の抗ウイルス活性は、  $1 . 0 6 \times 10^8$  u n i t s / m l で、比活性は  $3 . 0 6 \times 10^6$  u n i t s / m g であった。

【0031】

カイコ 2 0 頭分の粗 B m b I F N 体液約 1 5 m l を、5 0 m M トリス塩酸緩衝液 ( p H 8 . 0 ) にて 1 0 倍に希釈した。この希釈液 1 5 0 m l に濃塩酸 ( 和光純薬社製 ) を

50

、液のpHが2.0付近になるまで添加した。その状態で30分～1時間程度攪拌(4以下)した後、5規定の水酸化ナトリウムを用いpHを8.0付近まで上昇させた。この溶液を12000rpm、30分間遠心分離して上清を得た。

#### 【0032】

(2) カイコ体液より得られたBmb IFN の精製

上記(1)で得た上清150mlを、陰イオン交換カラム [QセファロースFF(ファルマシア社製)] に添加した。50mMのNaClを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)で洗浄後、300mMのNaClを含む50mM トリス塩酸緩衝液(50ml)で溶出させて一次精製液を得た。

#### 【0033】

この溶出液を、銅イオンを結合させた金属キレートカラム [キレーティング・セファロースFF(Chelating Sepharose FF(ファルマシア社製))] に添加した。次いで、このカラムを500mMのNaClを含む50mM 酢酸緩衝液(pH5.0)で洗浄後、500mMのNaClを含む50mM 酢酸緩衝液(pH4.0)で溶出し、精製Bmb IFN 溶液45mlを得た。得られた精製Bmb IFN 溶液は、 $1.37 \times 10^7$  units/mlの抗ウイルス活性で、比活性は $6.01 \times 10^8$  units/mgであった。

#### 【0034】

製造例4 (b IFN に対する特異的な抗体の作成)

ヤギ細胞発現系由来Ac b IFN を、常法に従ってアジュバントと等量混合し、雌家兔の皮内に投与した。最初の免疫から4週間後に追加免疫を行い、以後2週間間隔で3回の追加免疫を行った。得られた血清を免疫学的手法で検定し、b IFN に対する反応が上昇したことを確認し、全採血してb IFN に対する特異的な抗体(一次抗体)を得た。

家兔IgGを、常法に従ってアジュバントと等量混合し、ヤギの後肢リンパ節に投与した。最初の免疫から4週間後に追加免疫を行い、以後2週間間隔で3回の追加免疫を行った。得られた血清を免疫学的手法で検定し、家兔IgGに対する反応が上昇したことを確認し、全採血して抗家兔ヤギ血清(二次抗体)を得た。

#### 【0035】

実施例1

(1) b IFN の $^{125}$ I 標識

ヤギ細胞発現系由来b IFN を、常法に従って0.2M リン酸緩衝液(以下、PBと略記することもある。)を用いて2.5μg/25μlとなるように調整した。標識反応に用いる溶液は、他にクロラミンT(2mg/0.2M PB)、sodium metabisulfate(以下、SMB Cと略記することもある。)(2.5mg/0.05M リン酸緩衝液(以下、PBと略記することもある。))、1%ウシ血清アルブミンを含む0.01M リン酸緩衝生理食塩水(以下、PBSと略記することもある。))、移動溶液(KI 100mg, シュークロース 0.8g, 10%トライトン X-100 0.1mlを水にて10mlに調整)であり、分画カラムはBio-Gel P-60(バイオラド社製)を用いて作成した。

#### 【0036】

次に、1.5mlの反応チューブに $^{125}$ I 250μCi(パーキンエルマー社、NEZ-033)5μlと、上記のように調整したAc b IFN 25μlとクロラミンT 10μlを入れて反応させた後、SMB C 25μlを添加して反応を停止させた。

その後、反応チューブに移動溶液100μlを添加し、分画カラムへ移し、0.05M PBを500μl毎に試験管に分画採取した。得られた溶出画分について、キュリーメーターにて比放射活性を測定し、最初のピーク画分にあたる溶出画分を標識b IFN とし、これを測定に用いた。

$^{125}$ Iとb IFN 並びにクロラミンTの反応時間については、実際に様々な反応時

10

20

30

40

50



間について実施し、結合画分と遊離画分との比を測定した。その結果を図1に示す。図中、縦軸の $B/F(\%)$ は $^{125}I$ で標識された $bIFN(B)$ と $bIFN$ に結合しなかった遊離 $^{125}I(F)$ の比を示す。 $B/F$ 比が40%程度の反応時間で最良のアッセイができるため、この実験結果より標識反応時間は45秒とした。

#### 【0037】

##### (2) 一次抗体の希釈倍率の検討

実際の測定反応に用いる試薬については、標識 $bIFN$ 、既知濃度の $bIFN$ 並びに測定溶液の希釈には0.1% トライトン X-100(バイオラド社製)、1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製) 添加PBSを用いた。また、一次抗体の希釈には、1%正常家兔血清添加エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物(以下、EDTAと略記することもある。)-PBSを、二次抗体として抗家兔ヤギ血清を用い、当該二次抗体の希釈には、3.5%ポリエチレングリコール添加EDTA-PBSを用いた。

10

#### 【0038】

一次抗体の希釈倍率について検討した。標識 $bIFN$ は $10000\text{cpm}/100\mu\text{l}$ となるように調整し、二次抗体は40倍希釈し、さらに一次抗体を様々な濃度に調整した。

反応は直径12.5mm、長さ750mmのガラス製試験管に標識 $bIFN$ を $5000\text{cpm}/50\mu\text{l}$ 、一次抗体を $50\mu\text{l}$ 、0.1% トライトン X-100添加1%ウシ血清アルブミン添加PBSを $150\mu\text{l}$ を混合し4 にて一晚反応後、二次抗体 $125\mu\text{l}$ を添加、混合し、さらに4 にて一晚反応させた。その後、3000回転、30分間、4 にて遠心し、上清を吸引除去後、沈殿物の放射活性を測定した。図2の横軸に $bIFN$ に対する特異的な抗体(一次抗体)の希釈倍率を、縦軸に標識 $bIFN$ と特異的 $bIFN$ 抗体との結合率の変化を示す。この結果より、一次抗体は2000倍から8000倍希釈の範囲で適用できることが明らかとなった。

20

#### 【0039】

##### (3) $bIFN$ の反応曲線並びに他のタイプ1 $IFN$ との交差性の確認

次に、 $bIFN$ の反応曲線について検討するため、蚕虫体由来 $bIFN$ を $1000\text{ng}/\text{ml}$ に調整し、以後倍希釈により7.8 $\text{ng}/\text{ml}$ までの8段階の既知濃度 $bIFN$ を準備した。

30

標識 $bIFN$ は $10000\text{cpm}/100\mu\text{l}$ となるように調整し、二次抗体は40倍希釈し、さらに一次抗体は2000倍希釈に調整した。反応は、直径12.5mm、長さ750mmのガラス製試験管に標識 $bIFN$   $5000\text{cpm}/50\mu\text{l}$ 、一次抗体 $50\mu\text{l}$ 、0.1% トライトン X-100添加1%BSA添加PBS  $100\mu\text{l}$ 、さらに既知濃度 $bIFN$ を $50\mu\text{l}$ 混合し、4 にて一晚反応後、二次抗体 $125\mu\text{l}$ を添加、混合し、さらに4 にて一晚反応させた。

#### 【0040】

その後、3000回転、30分間、4 にて遠心し、上清を吸引除去後、沈殿物の放射活性を測定した。同時にタイプ1 $IFN$ との交差性を確認するため、ノバルティス社より提供を受けたウシ組換え $IFN$ (1 $\text{ng}/\text{ml}$ から $100000\text{ng}/\text{ml}$ )、ヒト組換え $IFN$ (1 $\text{ng}/\text{ml}$ から $1000\text{ng}/\text{ml}$ 、PEPROTECH EC LTD 製)についても同様に反応させた。その結果を図3に示す。図中、横軸の濃度( $\text{ng}/\text{ml}$ )は $bIFN$ 、ウシ組換え $IFN$ あるいはヒト組換え $IFN$ の濃度を、縦軸は一次抗体との結合率(%)を示す。図中の は既知濃度 $bIFN$ の結合率を、 はウシ組換え $IFN$ の結合率を、 はヒト組換え $IFN$ の結合率を、それぞれ示す。図3の結果から、既知濃度 $bIFN$ では競合反応により、7.8 $\text{ng}/\text{ml}$ から $1000\text{ng}/\text{ml}$ の濃度において良好な反応曲線が得られることがわかった(実験反復回数=8回)。

40

また、ウシ組換え $IFN$ およびヒト組換え $IFN$ は、いずれも本測定に用いた一次抗体と反応しないため、濃度に変化しても検出限界付近の測定値が得られるのみであり、本

50

測定に用いた b I F N に対する特異的な抗体との交差性は認められなかった（実験反復回数 = 3）。

#### 【 0 0 4 1 】

##### （ 4 ）回収率の検討

次に、この測定系における回収率を検討するため、カイコ虫体発現系由来 B m b I F N 1 5 . 6 2 5 ~ 1 0 0 0 n g を、ウシ継代栄養膜細胞培養上清に添加し、前記（ 3 ）の方法と同様に反応後、その放射活性を測定した。その結果を表 1 に示す。

得られた結果からも明らかなように、既知濃度 b I F N の回収率は良好であることがわかった（実験反復回数 = 4 回）。

#### 【 0 0 4 2 】

##### 【表 1】

表 1 既知濃度 b I F N 添加による回収率

添加濃度 (ng/ml)	平均回収率 (%)	平均誤差 (%)
15.625	95.9	23.5
31.25	91.2	13.6
62.5	95.8	15.6
125	108.4	19.1
250	121.4	16.9
500	119.2	15.9
1000	124.7	2.6

10

20

#### 【 0 0 4 3 】

##### （ 5 ） b I F N 含有溶液の測定

次に、本測定系において b I F N が含まれている溶液を実際に測定した。その内容は、体外培養系により作出した 8 日齢のウシ胚（ 0 日齢 = 体外受精、以下、D 8 ウシ胚と略すこともある。）を発情周期を同期化した発情後 7 日の受胎牛に複数移植し、さらに発情後 1 7 日に非外科的に子宮灌流を行って胚を回収した子宮灌流液、並びにウシ 4 4 回あるいは 4 8 回継代栄養膜細胞（以下、4 4 T B または 4 8 T B と略すこともある。）の培養上清、標準曲線の最高用量のタンパク質濃度に調整した組換え体陰性対照液として各 5 0 μ l 用いて前記（ 3 ）の方法と同様に反応後、その放射活性を測定した。その結果を図 4 に示す。図中、縦軸は b I F N 量 ( n g / m l ) を示す。

30

図 4 から明らかなように、b I F N の存在が予想されるものでは数十ナノグラムの値、陰性対照では検出限界程度の結果が得られ、b I F N の測定が可能であった（実験反復回数 = 4 回）。なお、子宮灌流液中に確認された胚の数を優良胚 / 退行胚として示すと、子宮灌流液（ 1 ）では 0 / 0、（ 2 ）では 2 / 3、（ 3 ）では 9 / 3 であった。

#### 【 0 0 4 4 】

##### 【発明の効果】

本発明の方法によれば、ウシ胚の培養液、妊娠子宮灌流液あるいは組換えにより作出した b I F N 溶液において、従来行われていた生物検定あるいはイミュノプロット法では、実施できなかった I F N の検出、定量を行うことが可能である。そのため、本発明を用いて、受胎促進に必要な b I F N を測定したり、あるいはこれまで不明であったウシ胚発育過程における b I F N の分泌動態を明らかにすることにより、様々な受胎率向上技術や体外培養環境の改善などにつながることが期待される。

40

#### 【 0 0 4 5 】

##### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> 独立行政法人 農業技術研究機構

<120> ウシインターフェロンの測定法

<130> P141283K

<160> 7

10

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Bos Taurus

<400> 1

ctgaagggttc acccagaccc ca 22

20

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Bos taurus

<400> 2

gaaatgaaca caggtgagtg tacg 24

30

<210> 3

<211> 703

<212> DNA

<213> Bos taurus

40

<400> 3

ctgaagggtc acccagaccc catctcagcc agcccagcag cagccacatc tccccatgg 60  
 ccttcgtgct ctctctactg atggccctgg tgctggtcag ctacggcccg ggacgatctc 120  
 tgggttgita cctgtctgag gaccacatgc taggtgccag ggagaacctc aggcctcctgg 180  
 cccgaatgaa cagactctct cctcctccct gtctgcagga cagaaaagac ttiggtcttc 240  
 ctacagagat ggtggagggc aaccagctcc agaaggatca ggctatctct gtgctccatg 300  
 agatgctcca gcagtgttc aacctcttct acacagagca ctgctctgct gccttggaaca 360  
 ccaccttctt ggagcagctc tgcactgggc tccaacagca gcctggaggac ctggacgcct 420  
 gcctgggccc agtgaatggga gagaaagact ctgacatggg aaggatgggc cccattctga 480  
 ctgtgaagaa gtacttcag ggcatccaatg tctaccigaa agaaaaagaa tacagtgaact 540  
 gcgcctggga aatcatcaga atggagatga tgagagccct ctcttcatca accaccttgc 600  
 aaaaaagggt aagaaagatg ggtggagatc tgaactcact ttgagatgac tctcgctgac 640  
 taagatgcca catcaccttc gtacactcac ctgtgttcat ttc 703

10

<210>4

20

<211>28

<212>DNA

<213>Bos taurus

<400>4

cgggatccat ggcttcgtg ctctctct 28

30

<210>5

<211>31

<212>DNA

<213>Bos taurus

<400>5

cgggatcctc aaagtgaatt cagatctcca c 31

40

<210>6

<211>22

<212>DNA

<213>Bos taurus

<400>6

agaggatccc catggccttc gt 22

10

<210>7

<211>22

<212>DNA

<213>Bos taurus

<400>7

gcgaattcctt agtcagcgag ag 22

20

【図面の簡単な説明】

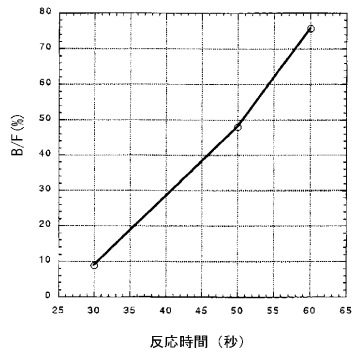
【図1】実施例1(1)の b I F N 標識反応時間の検討結果を示す。

【図2】実施例1(2)の標識 b I F N と特異的 b I F N 抗体との結合率を示す。

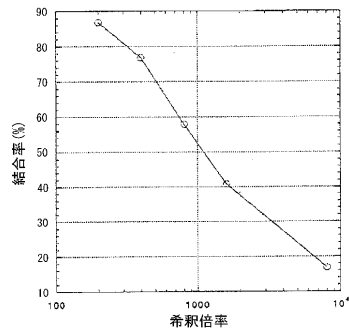
【図3】実施例1(3)の b I F N の反応曲線並びに他のタイプ1 I F Nとの交差性を示す。

【図4】実施例1(5)の b I F N 含有溶液の b I F N 量の測定結果を示す。 30

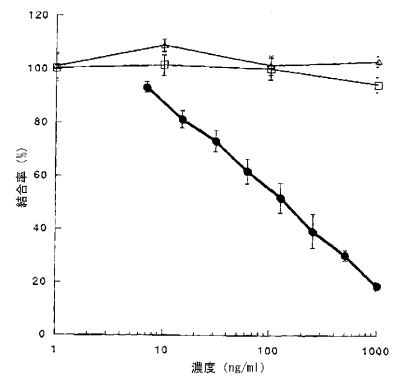
【図 1】



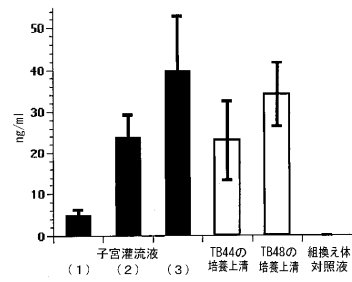
【図 2】



【図 3】



【図 4】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 下司 雅也  
茨城県牛久市刈谷町4丁目34番地
- (72)発明者 岡野 彰  
千葉県柏市豊住5-12-12
- (72)発明者 平子 誠  
栃木県那須郡西那須野町千本松800 草試東宿舎A302
- (72)発明者 高 橋 昌志  
熊本県菊池郡西合志町大字須屋2391-2 RC-D棟304
- (72)発明者 横溝 祐一  
茨城県つくば市並木4-919-103
- (72)発明者 犬丸 茂樹  
茨城県つくば市下広岡1055-76
- (72)発明者 長屋 英和  
東京都三鷹市井の頭4-25-13
- Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 DA02 GA11 HA11

专利名称(译)	牛干扰素 $\tau$ 的测量方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004125660A</a>	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2002291159	申请日	2002-10-03
申请(专利权)人(译)	独立行政法人农业·生物系特定产业技术研究机构 片仓工业株式会社		
[标]发明人	高橋ひとみ 下司雅也 岡野彰 平子誠 高橋昌志 横溝祐一 犬丸茂樹 長屋英和		
发明人	高橋ひとみ 下司雅也 岡野彰 平子誠 高▼橋▲昌志 横溝祐一 犬丸茂樹 長屋英和		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 G01N33/566		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.G G01N33/566 C12N15/00.A G01N33/53.GZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA11		
代理人(译)	榆亚矢野		
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 特開2004- P2004- (43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.22)
	(51) Int. Cl. <sup>7</sup> G01N 33/53 G01N 33/566 // C12N 15/09	FI GO1N 33/53 ZNAG GO1N 33/566 C12N 15/00 A	テーマコード(参) 4B024
	(21) 出願番号 (22) 出願日	特願2002-291159 (P2002-291159) 平成14年10月3日(2002.10.3)	(71) 出願人 501203344 独立行政法人農業・生物系特定産業研究機構 茨城県つくば市観音台3-1-1 591048520 片倉工業株式会社 東京都中央区京橋3丁目1番2号 100074077 弁理士 久保田 藤郎 100086221 弁理士 矢野 裕也 (72) 発明者 高橋ひとみ 茨城県つくば市吾妻2-11-8 09
	審査請求 有 請求項の数 4 O L (全)		

要解决的问题：开发一种能够有效检测和定量的测量系统，以阐明干扰素 $\tau$ 的分泌动力学。解决方案：牛干扰素 $\tau$ 和牛干扰素的免疫学测定方法，其特征在于，使用针对由序列表中SEQ ID NO：3所示核苷酸序列的cDNA诱导的针对牛干扰素 $\tau$ 的特异性抗体。将包含 $\tau$ 和针对上述牛干扰素 $\tau$ 的特异性抗体的样品添加至标记的牛干扰素 $\tau$ ，并且在样品中引起标记的牛干扰素 $\tau$ 和样品中的牛干扰素 $\tau$ 之间的竞争反应。牛干扰素 $\tau$ 的免疫学测定方法，包括测定牛干扰素 $\tau$ 的量。[选择图]无