

(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2003 - 12699

(P2003 - 12699A)

(43)公開日 平成15年1月15日(2003.1.15)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
C 0 7 D487/14		C 0 7 D487/14	4 C 0 5 0
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 21数)

(21)出願番号 特願2001 - 203454(P2001 - 203454)

(22)出願日 平成13年7月4日(2001.7.4)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 児玉 正昭

埼玉県さいたま市本太3 - 36 - 8

(72)発明者 佐藤 繁

岩手県気仙郡三陸町越喜来字杉下124

(72)発明者 品川 邦汎

岩手県盛岡市黒石野1 - 15 - 9

(74)代理人 100063174

弁理士 佐々木 功 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗麻酔性貝毒抗体の製法、新規抗体、該抗体を用いる E L I S A 測定キット、該製法による系標識毒標品

(57)【要約】

【課題】 麻酔性貝毒の簡便で精度が高く、しかも貝毒の種類に関係なく、感度一定に測定できるようにすること。

【解決手段】 サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数持つ任意のジチオール化合物を結合させて遊離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、他方、スルフヒドリル基指向性の任意の官能基をアミノ基に導入したタンパク質を調製し、次いで上記サキシトキシンスルフヒドリル誘導体と上記修飾タンパク質とを反応させて得られる抗原を非ヒト動物に免疫し、該動物から麻痺性貝毒を認識する抗血清を得ることを含む、麻痺性貝毒に対する抗体の製法、ならびに、この抗体を用いるELISA測定キット及び上記製法を利用して調製した標識毒標品の提供。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数持つ任意のジチオール化合物を結合させて遊離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、他方、スルフヒドリル基指向性の官能基をアミノ基に導入したタンパク質を調製し、次いで上記サキシトキシンスルフヒドリル誘導体と上記修飾タンパク質とを反応させて得られる抗原を非ヒト動物に免疫し、該動物から麻痺性貝毒を認識する抗血清を得ることを含む、麻痺性貝毒に対する抗体の製法。

【請求項2】 スルフヒドリル基を有するジチオール化合物が、1,2-エタンジチオール、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、2,3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸からなる群から選択される、請求項1に記載の抗体の製法。

【請求項3】 スルフヒドリル基指向性の任意の官能基が、マレイミド、チオフタルイミド、活性ハロゲン基からなる群から選択される、請求項1に記載の抗体の製法。

【請求項4】 請求項1に記載の方法により得られる抗体。

【請求項5】 請求項1に記載の製法により得られる抗体を用いるELISA測定キット。

【請求項6】 サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数持つ任意のジチオール化合物を結合させて遊離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、他方、スルフヒドリル基指向性の任意の官能基導入した標識化合物を調製し、次いで上記サキシトキシンスルフヒドリル誘導体と上記修飾標識化合物とを反応させて得られる、麻痺性貝毒簡易結合測定法に使用するための標識毒標品の製法。

【請求項7】 スルフヒドリル基を有するジチオール化合物が、1,2-エタンジチオール、ジチオスレイトール、2,3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸からなる群から選択される、請求項6に記載の標識毒標品の製法。

【請求項8】 スルフヒドリル基指向性の任意の官能基が、マレイミド、チオフタルイミド、活性ハロゲン基からなる群から選択される、請求項6に記載の標識毒標品の製法。

【請求項9】 標識化合物が、アガロース、ビオチン、蛍光物質および金コロイドからなる群から選択される、請求項6に記載の標識毒標品の製法。

【請求項10】 請求項6に記載の製法により得られる標識毒標品。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、麻痺性貝毒に対する抗体の製法およびその抗体に関する。さらに本発明は、上記抗体を用いるELISA測定キットおよび上記製法

により得られる麻痺性貝毒結合測定法用標識毒標品に関する。

## 【0002】

【従来の技術】麻痺性貝毒中毒は神経麻痺を主徴とする症状を呈し、その原因毒はゴニオトキシン類およびサキシトキシン類であることが判明している[安元健、麻痺性貝毒、食品衛生検査指針(理化学編、厚生省生活衛生局監修)、第300-305頁、日本食品衛生協会、1991年]。これら原因毒は麻痺性貝毒と総称され、現在、イガイ、ハマグリ等の貝類に見出される貝毒としてゴニオトキシン類、サキシトキシン類で20種以上が知られている。

【0003】この貝毒はナトリウムチャンネルをブロックする性質を有する麻痺性毒であり、渦鞭毛藻に属する植物プランクトンの数種類に含まれ、これを餌として食べた貝が毒をため込み毒化する。この貝を食すると死亡率の高い食中毒を引き起こすため、水産および食品衛生上大きな社会問題になっている。因みに、麻痺性貝毒0.5~1.0mg経口摂取しただけで感覚麻痺、悪心、下痢などの症状がでる。ヒトにおける致死量は1~3mgである。麻痺性貝毒による貝類の汚染地域は世界的に拡大傾向にあり、これらの汚染地域では毒化貝による食中毒防除のため出荷する貝の毒性をマウス試験法あるいはHPLC法により検査している。しかしこれらの測定法は精度、測定にかかる費用や労力の点で多くの問題があり、毒の簡易測定法の開発が望まれている。

【0004】このため麻痺性貝毒を定量する方法が種々開発されている。たとえば公定法であるマウスを用いた致死活性測定法[安元健、前掲; J. F. Jellettら、Toxicol, 30(10): 1143-1156(1992); W. Horwitz, Paralytic shellfish poison. In "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists"(Assoc. Official Anal. chem., Washington D. C.) pp. 881-882(1990)]、高速液体クロマトグラフィー法[Y. Oshimaら、Mycotoxins and Phycotoxins '88 (S. Natoriら編), pp.319-326, Elsevier, Amsterdam (1989)]; 特開平9-133669号公報]、神経芽細胞を用いる方法[K. Kogureら、Toxicol, 26:191-197(1989)]、抗体を用いる方法[F.S. Chuら、J. Agri. Food Chem., 44: 4043-4047(1996)]などが知られている。致死活性による測定法は、マウス試験原液を腹腔内に注射し、注射の終了した瞬間からマウスが典型的な麻痺性貝毒による症状を示して死亡する際の最後のあえぎまでの時間(致死時間)を秒単位で記録し、標準毒で作製した用量一致時間曲線から毒量を推定する方法である。高速液体クロマトグラフィー法は、麻痺性貝毒を含む試料を高速液体クロマトグラフィーにかけて麻痺性貝毒を分離し、溶出液に酸化剤を加えてアルカリ中で反応させた後、生じた蛍光性物質の蛍光を測定する方法である。神経芽細胞を用いる方法は、神経芽細胞の培養系におい

て、 $\text{Na}^+$ を細胞外に排出する酵素 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ の活性をウアインで阻害した系に $\text{Na}^+$ 流入を促進するベラトリジンと $\text{Na}^+$ の流入を阻止する毒を持抗させ、ベラトリジンにより起こる細胞の膨潤死を阻止する毒の活性からその量を推定するもので、このアッセイ系に麻痺性貝毒を含む試料を添加したときには細胞の丸まりと細胞死が毒量に比例して抑制されることを利用した方法である。さらに、免疫学的方法は、麻痺性貝毒に対する抗体を用いて、毒に結合する抗体量を、たとえば酵素免疫測定法(たとえばELISA)等の方法で直接測定し、その抗体量から試料中の麻痺性貝毒を定量する方法である。

【0005】特に、F.S. Chuら(前掲)は抗サキシトキシン抗体/サキシトキシン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体または抗ネオサキシトキシン抗体/ネオサキシトキシン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を用いるELISAによって麻痺性貝毒の全量を測定するアッセイ方法を開示している。抗体の調製は、F.S. ChuとX. Fan, J. Assoc. Off. Anal. Chem, 1985, 68:13-16およびF. S. Chu, J. AGACInt. 1992, 75:341-345に従って調製されているが、その手順は、Johnsonら(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 117, 425)の方法に準じ、牛血清アルブミン、polylysineもしくはkeyhole limpet(カサガイ)のヘモシアニンをホルマリンを含む弱酸性水溶液中でサキシトキシンまたはネオサキシトキシンと反応させて得た結合体を、ウサギに皮下注射してポリクローナル抗体を得ることによっている。

【0006】具体的には、これらの抗体の作製に用いられた抗原は、サキシトキシンの分子内に存在する2つのグアニジウム基にホルマリンを介してタンパク質を結合したもの[Johnsonら, 上記; ChuとFan, 上記; V. RenzとG. Terplan, Arch. Lebensmittelhyg., 1988, 39, 25-56; A. Cembellaら, "Specificity and cross-reactivity of an adsorption-inhibition onzyme-linked immuno assay for the detection of paralytic shellfish toxins. In Toxic Marine Phytoplankton" (E. Graneliら編), Elsevier Science Publishers, New York, pp.339-344, 1989]、サキシトキシンの12位に存在する2つのOH基のうちの一つをはずし、残ったOH基にタンパク質を結合したもの[R. Carlsonら, "Development of immunoassays for paralytic shellfish poisoning. A radioimmunoassay for saxitoxin. In Swafood Toxins", (E.P. Ragelis編), ACS Symposium Series 262, American Chemical Society, Washington, D.C., pp.181-192]に大別できる。前者の抗原は、タンパク質の結合部位が2つのグアニジウム基のいずれかあるいは両方が明確でなく作製された抗体の反応性は発表グループにより異なるが、いずれのグループの抗体もネオサキシトキシンとの反応性は良いもので20%程度(但し、サキシトキシンとの反応性を100%とする。)であり、サキ

シトキシンとの同様IN-H誘導体であるゴニオトキシン2, 3およびデカルバモイルサキシトキシンとの反応性も50%程度と低い。また、カルバモイル-N-スルフェート誘導体であるCトキシンとは全く結合しない。一方、後者の抗体は、ネオサキシトキシンとの反応性が1%以下と報告され、他の毒成分との反応性は調べられていない。さらに、同様の抗原を用いたモノクローナル抗体の作製も試みられているが、これらは反応性、感度とも低い(R. Hackら, Food and Agriculture Immunology, 1990, 2, 47-48)。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】致死活性測定法および神経芽細胞法においては、動物や細胞の管理、検出感度、精度、特異性などの点で問題があるし、高速液体クロマトグラフィー法においては、操作は簡単で、精度も高いが、高価な機器を必要とし、麻痺性貝毒の種類によって感度が異なること、精製された外部標準の供給がないことなどの欠点を有している。また、免疫学的方法においては、抗体の反応性がサキシトキシン誘導体の種類によって異なるなどの点で問題がある。したがって、麻痺性貝毒の簡便で精度高く、しかも貝毒の種類によらず感度一定に測定できる方法の開発が望まれてきた。

【0008】さきに、本願発明者らは、麻痺性貝毒-グルタオチン(PSP-GSH)複合体(特願平10-91797号公報)をハプテンとし、これをタンパク質分子に導入した抗原を調製し、ウサギに投与したところ、麻痺性貝毒を全成分に対して反応するポリクローナル抗体を得てこれを開示した(特開2000-344799号公報)。しかし、このGSHとの複合体を用いる方法ではタンパク質分子に対するハプテンの結合量が少なく、得られた抗血清の抗体価も低く、毒をタンパク質等分子に導入するためには結合法の改良が必要であると考えられた。

【0009】本発明の第1目的は、毒をタンパク質等他の分子に導入するための、上記欠点の改良された結合法を用いる、麻痺性貝毒に対する抗体の製法の提供にある。また本発明の第2目的は、本発明による改良結合法を用いて調製した抗体の提供にある。さらに本発明の第3目的は、本発明における抗体を用いる新規ELISAキットの提供にある。また本発明の第4目的は、本発明における改良結合法を用いて調製される、麻痺性貝毒簡易測定法に使用するための標識毒標品の製法およびこの製法により調製した標識毒標品の提供にある。

【0010】この度、発明者らは、スルフヒドリル基を複数(2つ)持つジチオール化合物を用いて遊離スルフヒドリル基を持つ毒誘導体を調製し、この誘導体をスルフヒドリル基指向性官能基をアミノ基に導入したタンパク質と反応させると、毒を効率的にタンパク質に導入でき、より多くのハプテン分子を導入した抗原の作成が可能であることを見いだした。本発明における上記製法は、毒とタンパク質とを別個に修飾し、両者の反応によ

り抗原を得ることに特徴がある。本発明による抗原は、タンパク質分子当りのハプテン量が大きいので、高い抗体価を持つ抗血清が得られ、抗体が高収率で得られることが発明者らにより見いだされた。本発明における改良結合法により調製した抗体を用いると、毒のELISA測定キットの提供が可能になる。

【0011】また本発明における抗体の製法によれば、毒を樹脂または蛍光物質等の担体と効率的に結合させる得ることも発明者らは見いだした。蛍光物質等マーカーを結合させた場合、毒性は若干低減するが、本発明による抗原は毒の活性部位が露出されているので、毒性を残したままの標識毒標品の調製が可能になる。

【0012】したがって、本発明の第1の態様では、サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数(2つ)持つジチオール化合物を結合させて遊離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、他方、スルフヒドリル基指向性官能基をアミノ基に導入したタンパク質を調製し、次いで上記サキシトキシンスルフヒドリル誘導体と上記修飾タンパク質とを反応させて得られる抗原を非ヒト動物に免疫し、該動物から麻痺性貝毒を認識し得る抗血清を得ることを含む、麻痺性貝毒に対する抗体の製法が提供される。

【0013】スルフヒドリル基を有する上記ジチオール化合物は、1,2-エタンジチオール、ジチオスレートール、2,3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸ジチオエリスリトールからなる群から選択するのが好ましい。スルフヒドリル基指向性官能基を持つ化合物は、マレイミド、チオフタルイミド、活性ハロゲン化合物からなる群から選択するのが好ましい。

【0014】また本発明の第2の態様では、第1態様における製法により得られた抗体が提供される。

【0015】また本発明の第3の態様では、第1態様において得られた抗体を用いる新規ELISAキットが提供される。

【0016】また本発明の第4の態様では、サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数(2つ)持つジチオール化合物を結合させて遊離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、次いでチオール指向性官能基を導入したアガロースまたはビオチン、蛍光物質、金コロイドなどの標識化合物をこの誘導体に反応させることからなる、麻痺性貝毒簡易結合測定に用いるための標識毒標品が提供される。

【0017】さらに本発明は第5の態様においては、上記標識毒標品の製法を用いた標識毒標品が提供される。本発明における毒標品は非アイソトープ系のビオチン標識系および蛍光標識系標品であり、これらの製法を図7に示す。

【0018】本発明における上記製法は、遊離スルフヒドリル基指向性の任意の官能基、特にマレイミド、チオフタルイミド、活性ハロゲン等が中性水溶液中、温和な

条件下にチオール基と定量的に反応することを応用したものであり、PSP-GSH複合体もしくはその他のアミド縮合を用いる結合法に比べ、本発明によれば遙かに高収率かつ容易に麻痺性貝毒をタンパク質や標識化合物とを結合させることが可能である。

【0019】以下、ジチオール化合物としてエタンジチオール(EDT)を採用した場合の本発明における抗体の製法を述べる。

【0020】サキシトキシシン-EDT複合体は、ゴニオトキシシン(ゴニオトキシシン2,3、あるいはこれらの組合せ)とジチオール基を有するEDTとを混合・加熱(約70)すると、EDTのイオウ分子を介してゴニオトキシシン類の11位のOSO<sub>2</sub>基と置換反応することにより得ることができる。本発明では、この複合体はいわゆるハプテン抗原、すなわち抗体とは結合するが抗体を誘発する能力のない物質である。一般にこのようなハプテン抗原にタンパク質を共有結合させて大分子とすることによって免疫原とし得る場合もあることが知られているが、本発明におけるタンパク質もまた同様の動きをもつものである。そのようなタンパク質として、たとえばアルブミンやカサガイヘモシアニン(KLH)が例示できる。

【0021】本発明はまた、第2の態様において、麻痺性貝毒成分であるサキシトキシシン、ゴニオトキシシン2,3、ネオサキシトキシシン、ゴニオトキシシン1,4、ゴニオトキシシン5、およびCトキシシン1,2のいずれとも50%以上の相対反応性(但し、サキシトキシシンとの反応性を100%とする。)を示す、麻痺性貝毒に対する抗体を提供する。

【0022】本発明の抗体は、麻痺性貝毒であるIN-H誘導体(サキシトキシシン、ゴニオトキシシン2,3)、IN-OH誘導体(ネオサキシトキシシン、ゴニオトキシシン1,4)、カルバモイル-N-ルスフェート誘導体(ゴニオトキシシン5、およびCトキシシン1,2)のすべてをほぼ同様に認識することができる。ここで「ゴニオトキシシン2,3」などの表現はゴニオトキシシン2とゴニオトキシシン3との混合物を意味する。麻痺性貝毒の名称および構造については、たとえば、安元健、麻痺性貝毒、食品衛生検査指針(理化学編、厚生省生活衛生局監修)、第300~305頁、日本食品衛生協会、1901年; Intergovernmental Oceanographic Commission(IOC) Manual and Guides No.33(1995), UNESCO's Workshops, France, pp.81-94などに記載されている。本発明の実施態様により、本発明の抗体は上記方法によって得られたものである。

【0023】

【発明の実施の形態】本発明の抗体の製造において使用される抗原は、サキシトキシシン-EDT-タンパク質複合体である。この複合体は以下のようにして製造することができる。サキシトキシシン部分の原料としてゴニオトキシシン2、ゴニオトキシシン3またはそれらの任意割合の混合物を使用することができる。これらの原料成分は、イ

ガイ、ハマグリ、ホタテガイ等の貝類の0.1規定塩酸による加熱抽出物から活性炭処理、ゲル濾過クロマトグラフィー（たとえばBio-GelP-2（バイオラッド社）使用）、イオン交換クロマトグラフィー（たとえばBio-Rex70（バイオラッド社）使用）などの処理を経て精製することができる。

【0024】上記のようにして得られてゴニオトキシシンにEDT（還元型が好ましい。）を加熱下に反応させると、EDTのSH基がその電子共与性のためにゴニオトキシシンの11位の炭素原子を求核攻撃し、その結果OSO<sub>2</sub>基が離脱し、該11位の炭素原子に-S-（EDT）が結合し、これによってサキシトキシシン-EDT複合体が生成する。該反応は、中性条件下で反応物質を加熱することによって起こる。一般にpH6.5~7.5、好ましくはpH7.0~7.5の適切な緩衝液、たとえば磷酸アンモニウム緩衝液、酢酸アンモニウム緩衝液等を用いて反応を行うことができる。また、反応温度は、一般に室温から約100℃、好ましくは50℃から80℃、より好ましくは約70℃である。反応後、目的の生成物を、調製用高速液体クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、逆相分配クロマトグラフィー等の手段を単独で又は組合わせて実施し、精製することができる。生成物の同定は、赤外分光法、質量分析法、NMR法、元素分析、アミノ酸分析などの通常の測定法によって行うことができる。

【0025】サキシトキシシンのような低分離化合物はハプテンに属し、それ自体は抗原性をもたないが、抗原性をもつタンパク質を担体として、これと共有結合した複合体はハプテンに対する特異抗体を産生する抗原となる。ハプテン-タンパク質複合体を免疫注射するとハプテン部分は抗原決定基として認識され、抗ハプテン抗体が産生されると考えられている。このとき、余分な抗原決定基ができにくい選択的な結合方法でハプテン抗原を作製する必要がある。ハプテンの部分構造に対する認識は、ハプテンと担体であるタンパク質の結合部位付近では弱く、より離れた部分構造を認識しやすい。したがって、タンパク質と結合する際には、ハプテン中の適切な結合位置を選択することが大切である。本発明者らにより先に見出されたサキシトキシシンの11位にEDT基が結合した構造をもつサキシトキシシン-EDT複合体（特願平10-91797号）は、免疫抗原として好ましいだけでなく、麻痺性貝毒のほぼ全ての種類を高い反応性で検出可能とする麻痺性貝毒を産出し得る利点をもつ。

【0026】担体となるタンパク質としてはアルブミン、ヘモシアニンなどを使用できるが、これらに限定されず、本発明の抗体を誘発可能とする任意のタンパク質を使用できる。サキシトキシシン-EDT複合体に担体タンパク質を結合する際には、該複合体のEDT部分を利用して、（反応性官能基を導入した）担体タンパク質とマレイミド法（T. Kitagawaら, J. Biochem. 92:585-590, 19

82) やカルボジイミド法(D. Exleyら, FEBS Lett., 91: 162-165, 1978)などで結合させて、サキシトキシシン-GSH-タンパク質複合体を生成することができる。たとえば後述の実施例にはサキシトキシシン-EDT-牛血清アルブミン複合体の製造例を示すが、ここでは先ずサキシトキシシン-EDT複合体を作り、一方アルブミンをその遊離アミノ基を介してメルカプトサクシニル化し、両者を反応させることにより担体タンパク質をサキシトキシシン-EDTに結合させる。得られた複合体の精製は、慣用のタンパク質精製法を適宜組合わせて実施できる。そのような方法には、たとえば、塩析、溶媒沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動、クロマトフォーカシング、限外濾過などが含まれる。

【0027】ゴニオトキシシン2, 3に換えて、ゴニオトキシシン1、ゴニオトキシシン4又はそれらの混合物を原料としてEDTと反応させる場合には、ネオサキシトキシシン-EDT複合体が得られる。さらにこの複合体を上記と同様に担体タンパク質と反応させることによってネオサキシトキシシン-EDT-タンパク質複合体を得ることができ、得られた生成物はサキシトキシシン-EDT-タンパク質複合体と同様に麻痺性貝毒に対する抗体の産生に使用することができる（以下参照）。

【0028】本発明のサキシトキシシン-EDT-タンパク質複合体を、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、等の動物に免疫することによって該複合体に対する抗体を作製することができる。通常、免疫原溶液を、フロイントの完全アジュバント、不完全アジュバント、リピアジュバントシステム（RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH INC）、ムラミルペプチド（Calzyme社）、水酸化アルミニウム、リポポリサッカライドなどのアジュバントと乳化混合し、動物に皮下、皮内、または筋肉に注射した後、2~4週間の間隔で同様の操作を行い数回追加免疫し、放血後抗血清（ポリクローナル抗体）を得ることができる。定期的に放血血清をサキシトキシシンとの反応性について測定し、高力価が達成されるまで追加免疫を実施する。抗原の量は、抗原刺激を受ける動物の種類によって異なるが、たとえばウサギの場合10μg~数mg、マウスの場合数μg~数10mgである。

【0029】上記のようにして得られた麻痺性貝毒に対する抗血清はさらに、たとえば硫酸分画、ついでイオン交換クロマトグラフィーで処理することによりIgG抗体に精製することができる。あるいはサキシトキシシンをデキストランゲルまたはアガロースゲルに化学的に結合させたゲルを用いるアフィニティークロマトグラフィーによって抗体を精製することができる。抗体の作製および精製については、たとえば生物化学実験法15「免疫学入門」（1982）学会出版センターに詳細に記載されており参照可能である。

【0030】本発明の方法では、免疫後1ヶ月程度から

抗体価の上昇が見られ、サキシトキシンに対する抗血清の場合約4ヶ月後に抗血清1mlあたり0.5nmolのサキシトキシンを結合する力価が得られる。本抗血清はネオサキシトキシンとの反応は幾分低かったが、免疫5ヶ月後の血清では両者の貝毒との反応性はほとんど差がなかった。また、図2に免疫4, 5ヶ月目の血清の麻痺性貝毒の各種成分との反応性を示すが、4ヶ月目の血清はネオサキシトキシンおよびゴニオトキシン1, 4との反応性が幾分劣るが、5ヶ月目の血清は各成分との反応に大きな差が認められなかった。このように、本発明の抗体は麻痺性貝毒のほぼすべての成分と免疫学的に反応し、特に麻痺性貝毒成分であるサキシトキシン、ゴニオトキシン2, 3、ネオサキシトキシン、ゴニオトキシン1, 4、ゴニオトキシン5、およびCトキシン(C1, C2)のいずれとも50%以上、好ましくは60%以上の相対反応性(但し、サキシトキシンとの反応性を100%とする。)を示す。これに対して従来公知の抗体の多くは、麻痺性貝毒の全成分に共通のグアニジウム基にタンパク質を結合させたものを抗原としているため、一部の麻痺性貝毒成分に強い特異性を示す反面、ほとんど結合しない成分も存在する。貝毒の検出の信頼度を上げるためには、抗体はほとんどすべての貝毒成分と同程度に反応するのが望ましい。

【0031】本発明のサキシトキシン-EDT-タンパク質複合体を抗原として用いることによって定法によりモノクロナール抗体を作製することも可能である。具体的には、マウスやラットなどのげっ歯類に該複合体を免疫後に脾臓を無菌的に取り出し、脾臓細胞を調製した後、ミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマをHAT培地等の選別用培地で選別し、動物細胞培養用培地中で継代培養するか、または該げっ歯類の腹腔内に移植培養し腹水からモノクロナール抗体を採取することができる。モノクロナール抗体の作製については、MilsteinとKholer, Nature256:495(1976); 属性化学実験講座, 免疫生化学研究法(日本生化学会編)等に記載される方法を使用できる。

【0032】上記のようにして得られた抗体は、麻痺性貝毒を含む疑いのある食品等の検体中の貝毒の測定に使用することができる。測定は慣用の抗原抗体反応を用いて行うことができ、固相法もしくは均質法、競合法もしくは非競合法、サンドイッチ法などの方法を使用えき \*

試料および試薬類

アジュバント: Complele Adjuvant Freund's

Wako

Bio-Gel P-2 ゲル濾過樹脂, mesh size: fine

Bio-rad

BiotinPE(AC5)<sub>2</sub>Maleimide ビオチンラベル試薬

Dojindo

PAEM N-[2-(2-Pyridyamino)eth

yl]maleimide Wako

BSA: 牛血清アルブミン

Wako,

IRA grande

DMSO: ジメチルスルフォキシド

Wako,

\*。たとえば、サンドイッチ法を用いる場合には、過剰量の標識化第二抗体を用いるが、標識としてペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、<sup>125</sup>I、<sup>82</sup>P等の放射性同位体、FITC等の蛍光物質、アクリジニウムなどの化学発光物質を用いることができる。標識の種類に依存して、ELISAなどの酵素抗体法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法の使用が可能である。さらに、本発明の抗体は、臭化シアン等で活性化されたデキストラン樹脂(たとえばSephadex<sup>TM</sup>類)、アガロース樹脂(たとえばBio-Gel<sup>TM</sup>類)、等の樹脂に結合するときには問題の貝毒を分離除去するためのアフィニティーカラム担体とすることができる。

【0033】ジチオール化合物としてエタンジチオール(EDT)以外の化合物を採用した場合の実施形態も、上記とほぼ同じである。

【0034】本発明に係わる他の関連文献は次のようである:

Hollingworth T. Wekell MM(1990):Paralytic shellfish posison. In:OfficialMethods of Analysis, 15th edition, K. Hellrich ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, pp.881-882.

Oshima Y(1995): Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In:Manual on Harmful Marine Algae, 10C Manuals and Guides No. 33, Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD eds., Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp.81-94.

Sato S, Sakai R, Kodama M(2000): Identification of thioether intermediates in the reductive transformation of gonyautoxins into saxitoxins by thios. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:1787-1789.

Sommer H. Meyer KF(1937): Paralytic shellfish poisoning. Arch. Pathol. 24: 560-568.

【0035】

【実施例】以下の実施例によって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0036】本発明の記載に関連する略号は次のようである:



ロプレートリーダーで492nmの吸収(OD)を測定した。試験は3連で行った。

【0042】実施例6

ビオチン標識STXの作成

凍結乾燥状態の精製EDT-STX複合体(15 μmol)を、1.4mLの10mMリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解し、これに6mg(10 μmol)のBiotin-PE(AC5)2-maleimideを600 μLのDMSOに溶解したものを混合した。5 で一晩静置後、0.05M酢酸で5mLで洗浄後、0.05M酢酸-メタノール(1:1v/v)10mLで吸着成分を溶出した。含水酸性メタノール溶出液に含まれるビオチン標識STXの濃度をHPLC蛍光法で定量するとともに、同画分の毒性マウス試験法で調べた。

【0043】実施例7

蛍光標識STXの作成

6mgのPAEM-2塩酸塩(Mw253.69)を精製EDT-STX複合体(23 μmol)とともに2.3mLの50mMリン酸緩衝液中、室温で2日間静置した。反応混合物をBio-GEL P-2のカラム(1.5 x 20cm)に添加し、200mLでカラムを洗浄後0.1酢酸、次いで0.5M酢酸で吸着成分を溶出した。希酢酸溶出液は10mLずつ分取し、各画分をHPLC蛍光法で調べPEAE-E 20 DT-STX結合体(蛍光標識STX)の溶出をモニターした。単離したPAEM-EDT-STX結合体の毒性マウス試験法で調べた。

【0044】実施例8

PSPならびにPSP-ナール複合体の定量

供試溶液中のPSPはHPLCの蛍光法(Oshima, 1995)で定量\*

抗原溶液中のBSA濃度およびBSAに結合したPSP量

抗原	抗原溶液のタンパク濃度 (μg/mL)	PSP:BSA	
		モル比	重量比(%)
BSA-EDT-STX(新規抗原)	1497	5.4	2.3
BSA-EDT-neoSTX	607	8.9	4.1
BSA-GS-STX	684	1.0	0.4
BSA-GS-neoSTX	788	0.1)	-

【0047】実施例11

ウサギ血清の抗体価の推移

図3にBSA-EDT-STX結合体を免疫したウサギ(STX-EDT-BSA-1およびSTX-EDT-STX-2)の抗体価の推移を示す。2羽のウサギとも免疫開始後3ヶ月目より抗体価の有意な上昇が認められ、4ヶ月目以降の抗体価は増減を繰り返しながら推移した。NeoSTX-EDT-STX結合体を免疫したウサギの抗体価もほぼ同様に推移したが、BSA-EDT-STX結合体を免疫した場合に比べて抗体価の上昇は低かった。いずれのウサギも免疫開始後7ヶ月を過ぎた時点で全採血し、得た血清を以下の試験に用いた。

【0048】実施例12

抗血清によるPSP成分の吸収

図4にBSA-EDT-STX-1から得た血清およびBSA-neoSTX-1から得た血清による各PSP成分の吸収量を示した。無免疫のウサギの血清(正常血清)は1mL当たりいずれのPSP成分も0.1nmol未満と検出限界未満であった。これに対

\*した。溶液中の結合型PSPすなわちEDT-STX等のチオール-PSP複合体およびタンパクに結合したPSP等の量は、溶液の一部を10%メルカプトエタノールを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)に希釈し5分間煮沸した後HPLC蛍光法で分析して得られたSTX群と、メルカプトエタノール処理前のGTX群の和を比較することにより算出した。

【0045】実施例9

マウス試験法

供試液のマウス毒性をA.O.A.C.法(Hollingworth and W ekel, 1990)に従って求めた。ddy系雄マウス(体重±1g)を使用し、1試料につき5尾のマウスを用い致死時間の中間値からPSPの用量致死時間曲線(Sommer and Mcyer, 1937)に従った投与した毒値(mouse unit = MU)を算出した。IMUは15分で1匹のマウスを殺す毒量に相当する。

【0046】実施例10

PSP-タンパク結合体(抗原)の作成

図2に示す手順でBSA-EDT-STX結合体および同様の手順で調製したBSA-EDT-neoSTX結合体を調製した。以前我々はグルタチオン-PSP複合体をBSAに導入して抗原を作成しているが、今回新たに作成したEDTを介する結合法により、より多数のPSP分子がタンパクを導入した抗原の作成に成功した(表1)。

【表1】

してBSA-STX-1血清1mLは1.3nmolのPSPを吸収した。BSA-neoSTX-1血清によるPSPの吸収はこれに比べ低かった。

【0049】実施例13

STX固相化プレート上での各PSP成分の競合

PSP成分の顕著な吸収が認められたBSA-STX-1血清を用いて、PSPのELISAによる定量法の開発を試みた。主々検討の結果、STXの中性のリン酸緩衝液を添加して固相化した反応プレートを用いるindirect two step法により定量的にPSP成分を分析することが可能となった。図5に示すようにIC50値を与える濃度はSTX、GTX2+3で4.7nM, neoSTX, dcSTX, GTX5, GTX1+4で30.100nM, GTX6で約200nMであった。このようにPSPの成分により抗体に対する反応性は若干異なるものの、いずれの成分に対しても同法によりマウス試験法の10.100倍の高感度での検出が可能である。抗体は、プリン骨格を持つアデノシン(Ade)やカフェイン(Caf)、およびグアニジル基を持つアルギニン(Arg)など、PSPと部分的に構造の類似す

る生体成分には全く反応しなかった(図6)。しかし興味あることにBSA-STX-1抗体に対してPSPと同じ薬理作用を持つフグ毒テトロドトキシン(TTX)は高濃度で交差が認められた。

【0050】実施例14

標識付きPSP誘導体の調製および比毒性

マレイミド基とスルフヒドリル基は中性水溶液中穏和な条件下で反応し結合体を形成する。マレイミド基を持つ種々のラベル化合物が市販されているが、本試験ではこれらの中からピオチンラベル試薬と水溶性の蛍光ラベル試薬を選び、これらを導入して標識付きSTX誘導体を作成した(図7)。これら2種の誘導体に加え、スルフヒドリル基のマスキング剤であるNEMを同様の手順で導入したNEM-EDT-STX誘導体を調製した。これら標識付き誘導体はBio-Gel P-2等のカラムクロマトグラフィーにより他のPSP成分から分離することが出来た(図8)。精製して得た誘導体を腹腔内投与したマウスはPSPを投与した場合と同じ症状を示して死亡した。グルタチオン-PSP複合体(Sato et al., 2000)およびEDT-STX誘導体はSTXの100分の1未満の比毒性しか示さなかったのに対し、EDT-STXを出発物質とするこれら標識付きPSP誘導体は、STXの30分の1ないし7分の1と、N-sulfocarbamoyl基を持つ天然成分(C14, GTX5,6)のそれに匹敵する比毒性を示した(図9)。

【0051】

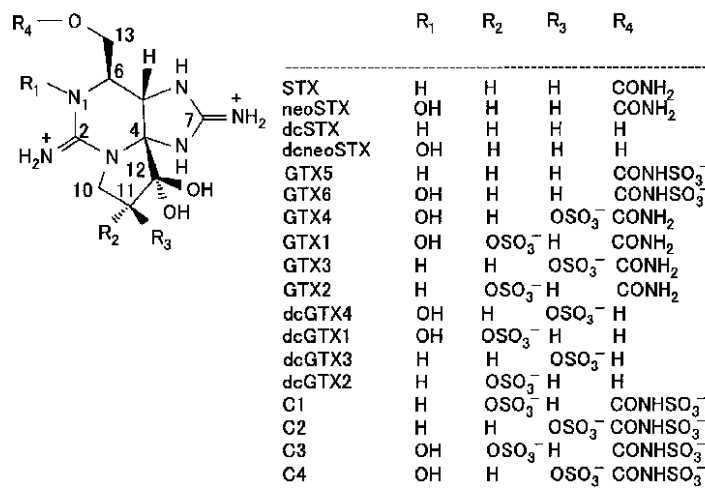
【発明の効果】本発明によるBSA-EDT-STXを抗原として\*

\*調製したポリクロナール抗体は、neoSTXに対する親和性は若干低かったが、他の麻痺性貝毒にはほぼ同様の親和性を示した。本抗体を用いて試験的に作成したELISAは、毒成分によって値は若干異なるものの、マウス試験の10から100倍の感度で毒を検出することができた。

【図面の簡単な説明】

- 【図1】麻痺性貝毒(PSP)の構造式と非毒性を示した図である。
- 【図2】本発明における抗原(BSA-EDT-STX結合体)の製法を示した図である。
- 【図3】本発明におけるBSA-EDT-STX結合体を免疫したウサギの抗体価を推移を示した図である。
- 【図4】抗血清によるPSPの吸収量を示した図である。
- 【図5】各PSP成分のSTX固相プレート上での抗STX抗体に対する反応を示した図である。
- 【図6】PSP以外の成分のSTX固相プレート上での抗STX抗体に対する反応を示した図である。
- 【図7】本発明における非アイソトープ系標識付きPSP誘導体の構造を示した図である。
- 【図8】蛍光標識付きSTX(PAEM-EDT-STX)のBio-Gel P-2カラムクロマトグラフィー上での分離を示した図である。
- 【図9】各PSP成分、PSP-チオール複合体および標識付きPSP誘導体の比毒性を示した図である。

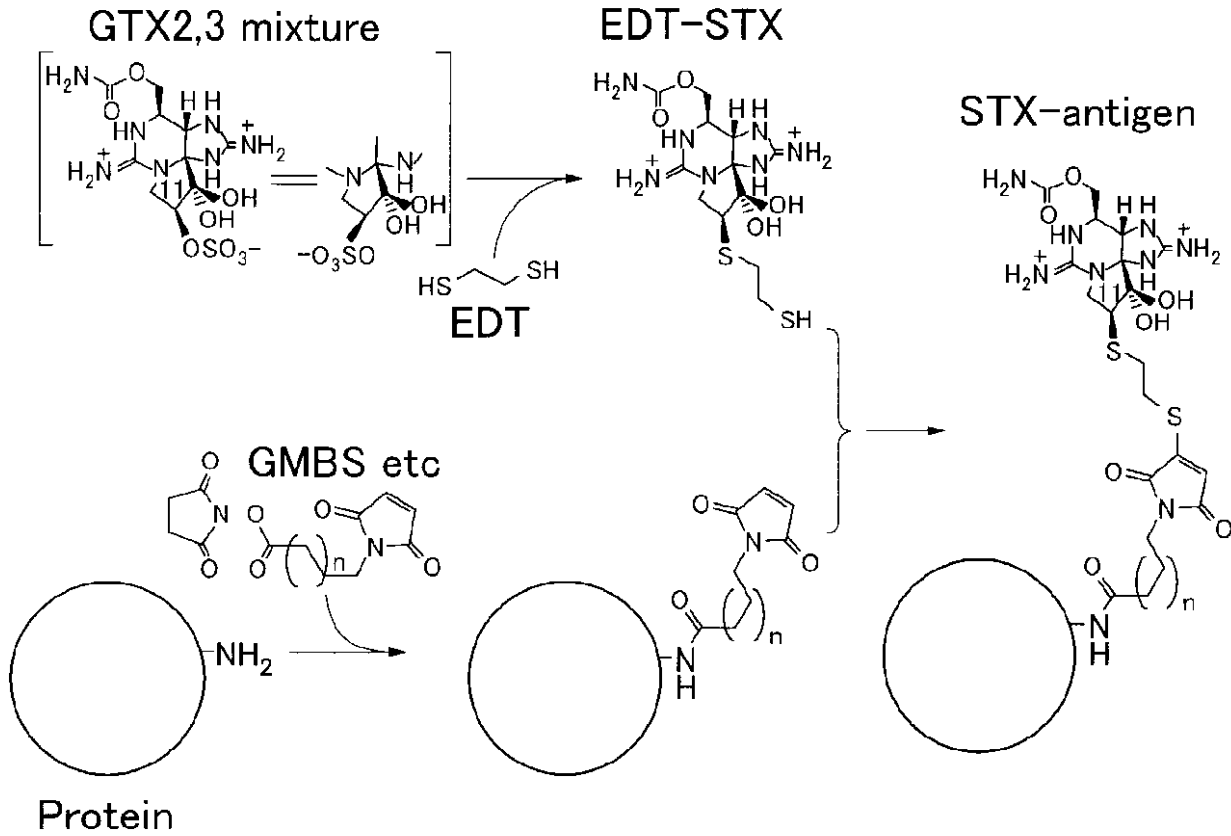
【図1】



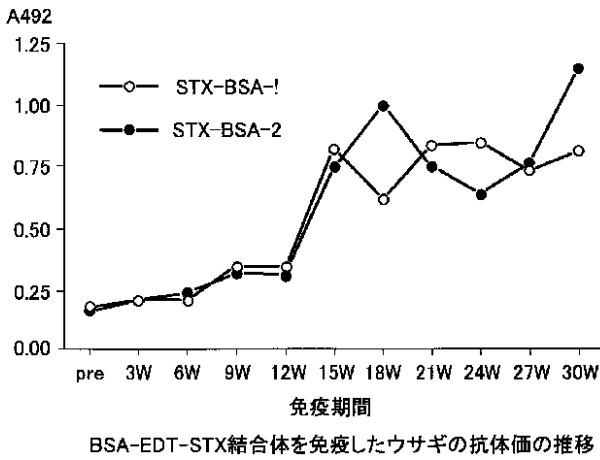
麻痺性貝毒(PSP)の構造式と比毒性

【図2】

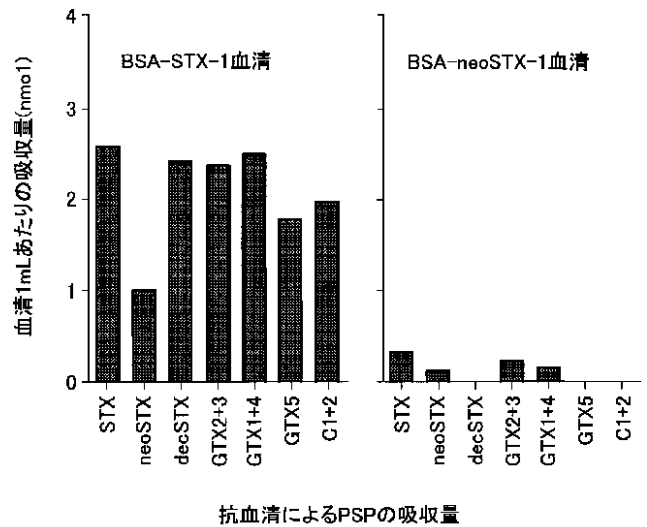
抗原(BSA-EDT-PSP結合体)の調整法



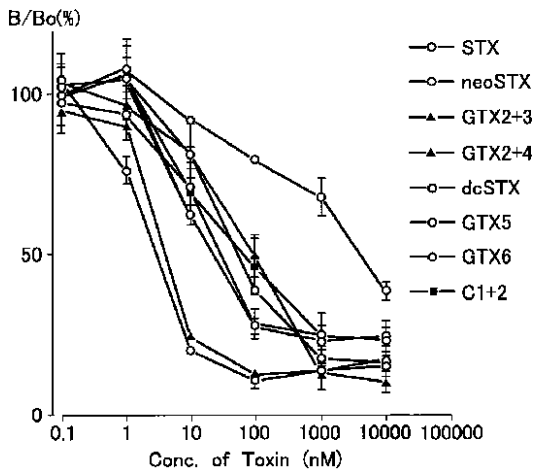
【図3】



【図4】

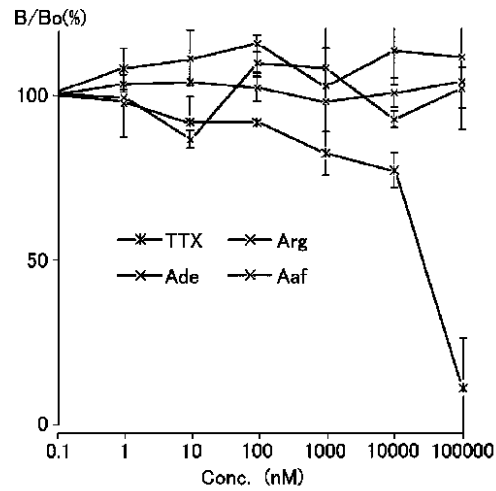


【図5】



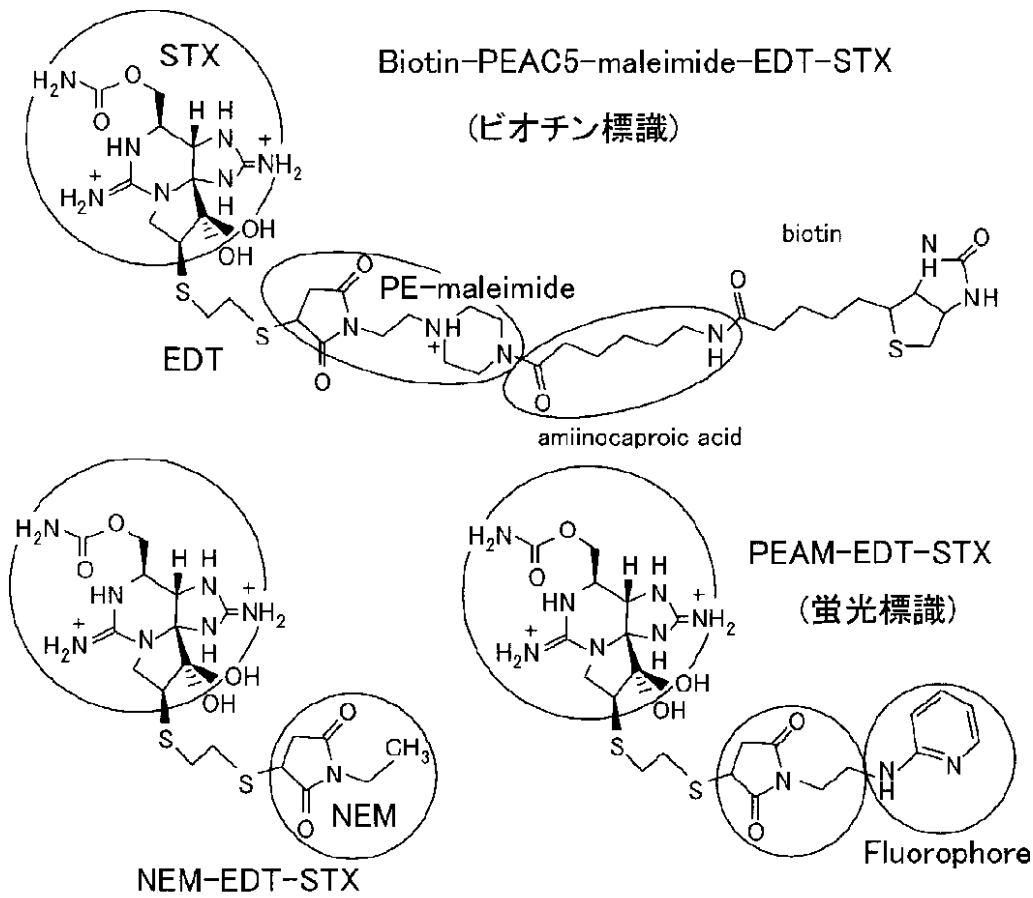
各PSP成分のSTX固相プレート上での抗STX抗体に対する反応

【図6】



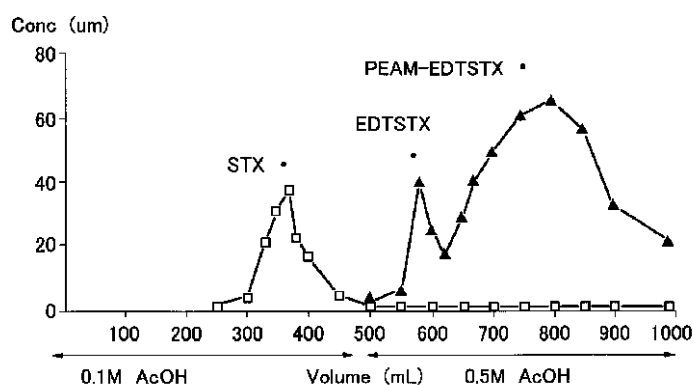
PSP以外の成分のSTX固相プレート上での抗STX抗体に対する反応

【図7】



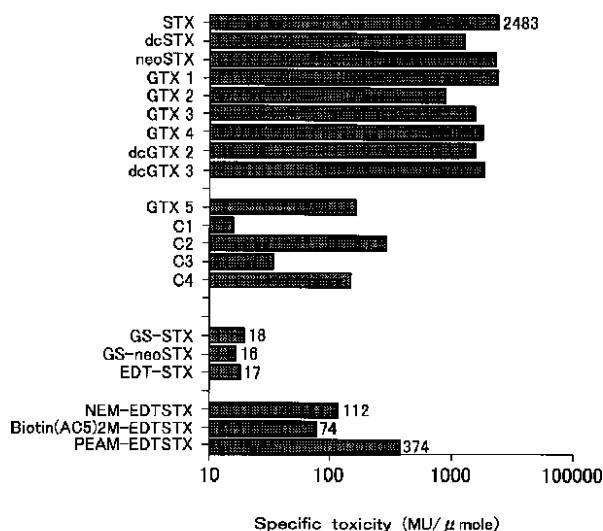
標識付きPSP誘導体の構造

【図8】



蛍光標識付きSTX(PAEM-EDT-STX)のBio-Gel P-2カラムクロマトグラフィー上での分離

【図9】



各PSP成分、PSP-チオール複合体および標識付きPSP誘導体の比毒性

## 【手続補正書】

【提出日】平成14年6月24日(2002.6.24)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】抗麻酔性貝毒抗体の製法、新規抗体、該抗体を用いるELISA測定キット、該製法による系標識毒標品

【特許請求の範囲】

【請求項1】サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数持つ任意のジチオール化合物を結合させて遊

離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、他方、スルフヒドリル基指向性の官能基をアミノ基に導入したタンパク質を調製し、次いで上記サキシトキシンスルフヒドリル誘導体と上記調整タンパク質とを反応させて得られる抗原を非ヒト動物に免疫し、該動物から麻痺性貝毒を認識する抗血清を得ることを含む、麻痺性貝毒に対する抗体の製法。

【請求項2】スルフヒドリル基を有するジチオール化合物が、1,2-エタンジチオール、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、2,3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸からなる群から選択される、請求項1に記載の抗体の製法。

【請求項3】スルフヒドリル基指向性の任意の官能基が、マレイミド、チオフタルイミド、活性ハロゲン基が

らなる群から選択される、請求項1に記載の抗体の製法。

【請求項4】 請求項1に記載の方法により得られる抗体。

【請求項5】 請求項1に記載の製法により得られる抗体を用いるELISA測定キット。

【請求項6】 サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数持つ任意のジチオール化合物を結合させて遊離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、他方、スルフヒドリル基指向性の任意の官能基を導入した標識化合物を調製し、次いで上記サキシトキシンスルフヒドリル誘導体と上記修飾標識化合物とを反応させて得られる、麻痺性貝毒簡易結合測定法に使用するための標識毒標品の製法。

【請求項7】 スルフヒドリル基を有するジチオール化合物が、1,2-エタンジチオール、ジチオスレイトール、2,3-ジメルカプト-1-プロパンスルホン酸からなる群から選択される、請求項6に記載の標識毒標品の製法。

【請求項8】 スルフヒドリル基指向性の任意の官能基が、マレイミド、チオフタルイミド、活性ハロゲン基からなる群から選択される、請求項6に記載の標識毒標品の製法。

【請求項9】 標識化合物が、アガロース、ビオチン、蛍光物質および金コロイドからなる群から選択される、請求項6に記載の標識毒標品の製法。

【請求項10】 請求項6に記載の製法により得られる標識毒標品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、麻痺性貝毒に対する抗体の製法およびその抗体に関する。さらに本発明は、上記抗体を用いるELISA測定キットおよび上記製法により得られる麻痺性貝毒結合測定法用標識毒標品に関する。

【0002】

【従来の技術】麻痺性貝毒中毒は神経麻痺を主徴とする症状を呈し、その原因毒はゴニオトキシン類およびサキシトキシン類であることが判明している[安元健、麻痺性貝毒、食品衛生検査指針(理化学編、厚生省生活衛生局監修)、第300-305頁、日本食品衛生協会、1991年]。これら原因毒は麻痺性貝毒と総称され、現在、イガイ、ハマグリ等の貝類に見出される貝毒としてゴニオトキシン類、サキシトキシン類で20種以上が知られている。

【0003】この貝毒はナトリウムチャンネルをブロックする性質を有する麻痺性毒であり、渦鞭毛藻に属する植物プランクトンの数種類に含まれ、これを餌として食べた貝が毒をため込み毒化する。この貝を食すると死亡率の高い食中毒を引き起こすため、水産および食品衛生上

大きな社会問題になっている。因みに、麻痺性貝毒0.5~1.0mg経口摂取しただけで感覚麻痺、悪心、下痢などの症状がでる。ヒトにおける致死量は1~3mgである。麻痺性貝毒による貝類の汚染地域は世界的に拡大傾向にあり、これらの汚染地域では毒化員による食中毒防除のため出荷する貝の毒性をマウス試験法あるいはHPLC法により検査している。しかしこれらの測定法は精度、測定にかかる費用や労力の点で多くの問題があり、毒の簡易測定法の開発が望まれている。

【0004】このため麻痺性貝毒を定量する方法が種々開発されている。たとえば公定法であるマウスを用いた致死活性測定法[安元健、前掲; J.F. Jellett等、Toxicol. 30(10):1143-1156(1992); W. Horwitz, Paralytic shellfish poison. In "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists" (Assoc. Official Anal. chem., Washington D.C.) pp. 881-882(1990)], 高速液体クロマトグラフィー法[Y. Oshima等、Mycotoxins and Phycotoxins'88 (S. Natori等編), pp.319-326, Elsevier, Amsterdam (1989)]; 特開平9-133669号公報]、神経芽細胞を用いる方法[K. Kogure等、Toxicol., 26:191-197(1989)], 抗体を用いる方法[F.S. Chu等, J. Agri. Food Chem., 44:4043-4047 (1996)]などが知られている。致死活性による測定法は、マウス試験原液を腹腔内に注射し、注射の終了した瞬間からマウスが典型的な麻痺性貝毒による症状を示して死亡する際の最後のあえぎまでの時間(致死時間)を秒単位で記録し、標準毒で作製した用量一致時間曲線から毒量を推定する方法である。高速液体クロマトグラフィー法は、麻痺性貝毒を含む試料を高速液体クロマトグラフィーにかけて麻痺性貝毒を分離し、溶出液に酸化剤を加えてアルカリ中で反応させた後、生じた蛍光性物質の蛍光を測定する方法である。神経芽細胞を用いる方法は、神経芽細胞の培養系において、Na<sup>+</sup>を細胞外に排出する酵素Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPaseの活性をウアバインで阻害した系にNa<sup>+</sup>流入を促進するベラトリジンとNa<sup>+</sup>の流入を阻止する毒を持抗させ、ベラトリジンにより起こる細胞の膨潤死を阻止する毒の活性からその量を推定するもので、このアッセイ系に麻痺性貝毒を含む試料を添加したときには細胞の丸まりと細胞死が毒量に比例して抑制されることを利用した方法である。さらに、免疫学的方法は、麻痺性貝毒に対する抗体を用いて、毒に結合する抗体量を、たとえば酵素免疫測定法(たとえばELISA)等の方法で直接測定し、その抗体量から試料中の麻痺性貝毒を定量する方法である。

【0005】特に、F.S. Chu等(前掲)は抗サキシトキシン抗体/サキシトキシン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体または抗ネオサキシトキシン抗体/ネオサキシトキシン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を用いるELISAによって麻痺性貝毒の全量を測定するアッセイ方法を開示している。抗体の調製は、F.S. ChuとX. Fan,

J. Assoc. Off. Anal. Chem, 1985, 68:13-16およびF. S. Chu, J. AOAC Int.1992, 75:341-345に従って調製されているが、その手順は、Johnson等(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 117, 425)の方法に準じ、牛血清アルブミン、polylysineもしくはkeyhole limpet(カサガイ)のヘモシアニンをホルマリンを含む弱酸性水溶液中でサキシトキシンまたはネオサキシトキシンと反応させて得た結合体を、ウサギに皮下注射してポリクローナル抗体を得ることによっている。

【0006】具体的には、これらの抗体の作製に用いられた抗原は、サキシトキシンの分子内に存在する2つのグアニジウム基にホルマリンを介してタンパク質を結合したものの[Johnson等, 上記; ChuとFan, 上記; V. RenzとG. Terplan, Arch, Lebensmittelhyg., 1988, 39, 25-56; A. Cembella等, "Specificity and cross-reactivity of an adsorption-inhibition enzyme-linked immunoassay for the detection of paralytic shellfish toxins. In Toxic Marine Phytoplankton" (E. Graneli等編), Elsevier Science Publishers, New York, pp.339-344, 1989]、サキシトキシンの12位に存在する2つのOH基のうちの一つをはずし、残ったOH基にタンパク質を結合したものの[R. Carlson等, "Development of immunoassays for paralytic shellfish poisoning. A radioimmunoassay for saxitoxin. In Seafood Toxins", (E.P. Rangelis編), ACS Symposium Series 262, American Chemical Society, Washington, D.C., pp.181-192]に大別できる。前者の抗原は、タンパク質の結合部位が2つのグアニジウム基のいずれかあるいは両方が明確でなく、作製された抗体の反応性は発表グループにより異なるが、いずれのグループの抗体もネオサキシトキシンとの反応性は良いもので20%程度(但し、サキシトキシンとの反応性を100%とする。)であり、サキシトキシンとの同様IN-H誘導体であるゴニオトキシン2,3およびデカルバモイルサキシトキシンとの反応性も50%程度と低い。また、カルバモイル-N-スルフェート誘導体であるCトキシンとは全く結合しない。一方、後者の抗体は、ネオサキシトキシンとの反応性が1%以下と報告され、他の毒成分との反応性は調べられてない。さらに、同様の抗原を用いたモノクローナル抗体の作製も試みられているが、これらは反応性、感度とも低い(R. Hack等, Food and Agricultural immunology, 1990, 2, 47-48)。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】致死活性測定法および神経芽細胞法においては、動物や細胞の管理、検出感度、精度、特異性などの点で問題があるし、高速液体クロマトグラフィー法においては、操作は簡単で、精度も高いが、高価な機器を必要とし、麻酔性貝毒の種類によって感度が異なること、精製された外部標準の供給がないことなどの欠点を有している。また、免疫学的方法に

おいては、抗体の反応性がサキシトキシン誘導体の種類によって異なるなどの点で問題がある。したがって、麻酔性貝毒の簡便で精度高く、しかも貝毒の種類によらず感度一定に測定できる方法の開発が望まれてきた。

【0008】さきに、本願発明者らは、麻酔性貝毒-グルタオチン(PSP-GSH)複合体(特願平10-91797号公報)をハプテンとし、これをタンパク質分子に導入した抗原を調製し、ウサギに投与したところ、麻痺性貝毒を全成分に対して反応するポリクローナル抗体を得てこれを開示した(特開2000-344799号公報)。しかし、このGSHとの複合体を用いる方法ではタンパク質分子に対するハプテンの結合量が少なく、得られた抗血清の抗体価も低く、毒をタンパク質等分子に導入するためには結合法の改良が必要であると考えられた。

【0009】本発明の第1目的は、毒をタンパク質等他の分子に導入するための、上記欠点の改良された結合法を用いる、麻痺性貝毒に対する抗体の製法の提供にある。また本発明の第2目的は、本発明による改良結合法を用いて調製した抗体の提供にある。さらに本発明の第3目的は、本発明における抗体を用いる新規ELISAキットの提供にある。また本発明の第4目的は、本発明における改良結合法を用いて調製される、麻痺性貝毒簡易測定法に使用するための標識毒標品の製法およびこの製法により調製した標識毒標品の提供にある。

【0010】この度、発明者らは、スルフヒドリル基を複数(2つ)持つジチオール化合物を用いて遊離スルフヒドリル基を持つ毒誘導体を調製し、この誘導体をスルフヒドリル基指向性官能基をアミノ基に導入したタンパク質と反応させると、毒を効率的にタンパク質に導入でき、より多くのハプテン分子を導入した抗原の作成が可能であることを見いだした。本発明における上記製法は、毒とタンパク質とを別個に修飾し、両者の反応により抗原を得ることに特徴がある。本発明による抗原は、タンパク質分子当りのハプテン量が大きいので、高い抗体価を持つ抗血清が得られ、抗体が高収率で得られることが発明者らにより見いだされた。本発明における改良結合法により調製した抗体を用いると、毒のELISA測定キットの提供が可能になる。

【0011】また本発明における抗体の製法によれば、毒を樹脂または蛍光物質等の担体と効率的に結合させる得ることも発明者らは見いだした。蛍光物質等マーカーを結合させた場合、毒性は若干低減するが、本発明による抗原は毒の活性部位が露出されているので、毒性を残したままでの標識毒標品の調製が可能になる。

【0012】したがって、本発明の第1の態様では、サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数(2つ)持つジチオール化合物を結合させて遊離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、他方、スルフヒドリル基指向性官能基をアミノ基に導入したタンパク質を調製し、次いで上記サキシトキ

シンスルフヒドリル誘導体と上記修飾タンパク質とを反応させて得られる抗原を非ヒト動物に免疫し、該動物から麻痺性貝毒を認識し得る抗血清を得ることを含む、麻痺性貝毒に対する抗体の製法が提供される。

【0013】スルフヒドリル基を有する上記ジチオール化合物は、1, 2 - エタンジチオール、ジチオスレートール、2, 3 - ジメルカプト - 1 - プロパンスルホン酸ジチオエリスリトールからなる群から選択するのが好ましい。スルフヒドリル基指向性官能基を持つ化合物は、マレイミド、チオフタルイミド、活性ハロゲン化合物からなる群から選択するのが好ましい。

【0014】また本発明の第2の態様では、第1態様における製法により得られた抗体が提供される。

【0015】また本発明の第3の態様では、第1態様において得られた抗体を用いる新規ELISAキットが提供される。

【0016】また本発明の第4の態様では、サキシトキシンの11位にスルフヒドリル基を複数(2つ)持つジチオール化合物を結合させて遊離スルフヒドリル基を持つサキシトキシンスルフヒドリル誘導体を調製し、次いでチオール指向性官能基を導入したアガロースまたはビオチン、蛍光物質、金コロイドなどの標識化合物をこの誘導体に反応させることからなる、麻痺性貝毒簡易結合測定に用いるための標識毒標品が提供される。

【0017】さらに本発明は第5の態様においては、上記標識毒標品の製法を用いた標識毒標品が提供される。本発明における毒標品は非アイソトープ系のビオチン標識系および蛍光標識系標品であり、これらの製法を図7に示す。

【0018】本発明における上記製法は、遊離スルフヒドリル基指向性の任意の官能基、特にマレイミド、チオフタルイミド、活性ハロゲン等が中性水溶液中、温和な条件下にチオール基と定量的に反応することを応用したものであり、PSP-GSH複合体もしくはその他のアミド縮合を用いる結合法に比べ、本発明によれば遙かに高収率かつ容易に麻痺性貝毒をタンパク質や標識化合物とを結合させることが可能である。

【0019】以下、ジチオール化合物としてエタンジチオール(EDT)を採用した場合の本発明における抗体の製法を述べる。

【0020】サキシトキシ - EDT複合体は、ゴニオトキシ(ゴニオトキシ2, 3、あるいはこれらの組合せ)とジチオール基を有するEDTとを混合・加熱(約70 )すると、EDTのイオウ分子を介してゴニオトキシ類の11位のOS03-基と置換反応することにより得ることができる。本発明では、この複合体はいわゆるハプテン抗原、すなわち抗体とは結合するが抗体を誘発する能力のない物質である。一般にこのようなハプテン抗原にタンパク質を共有結合させて大分子とすることによって免疫原とし得る場合もあることが知られているが、本

発明におけるタンパク質もまた同様の働きをもつものである。そのようなタンパク質として、たとえばアルブミンやカサガイヘモシアニン(KLH)が例示できる。

【0021】本発明はまた、第2の態様において、麻痺性貝毒成分であるサキシトキシ、ゴニオトキシ2, 3、ネオサキシトキシ、ゴニオトキシ1, 4、ゴニオトキシ5、およびCトキシ1, 2のいずれとも50%以上の相対反応性(但し、サキシトキシとの反応性を100%とする。)を示す、麻痺性貝に対する抗体を提供する。

【0022】本発明の抗体は、麻痺性貝毒であるIN-H誘導体(サキシトキシ、ゴニオトキシ2, 3)、IN-OH誘導体(ネオサキシトキシ、ゴニオトキシ1, 4)、カルパモイル - N - スルフェート誘導体(ゴニオトキシ5、およびCトキシ1, 2)のすべてをほぼ同様に認識することができる。ここで「ゴニオトキシ2, 3」などの表現はゴニオトキシ2とゴニオトキシ3との混合物を意味する。麻痺性貝毒の名称および構造については、たとえば、安元健、麻痺性貝毒、食品衛生検査指針(理化学編、厚生省生活衛生局監修)、第300~305頁、日本食品衛生協会、1901年; Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) Manual and Guides No.33(1995), UNESCO's Workshops, France, pp.81-94などに記載されている。本発明の実施態様により、本発明の抗体は上記方法によって得られたものである。

【0023】

【発明の実施の形態】本発明の抗体の製造において使用される抗原は、サキシトキシ - EDT - タンパク質複合体である。この複合体は以下のようにして製造することができる。サキシトキシ部分の原料としてゴニオトキシ2、ゴニオトキシ3またはそれらの任意割合の混合物を使用することができる。これらの原料成分は、イガイ、ハマグリ、ホタテガイ等の貝類の0.1規定塩酸による加熱抽出物から活性炭処理、ゲル濾過クロマトグラフィー(たとえばBio-GelP-2(バイオラッド社)使用)、イオン交換クロマトグラフィー(たとえばBio-Rex70(バイオラッド社)使用)などの処理を経て精製することができる。

【0024】上記のようにして得られてゴニオトキシにEDT(還元型が好ましい。)を加熱下に反応させると、EDTのSH基がその電子共与性のためにゴニオトキシの11位の炭素原子を求核攻撃し、その結果OS03-基が離脱し、該11位の炭素原子に-S-(EDT)が結合し、これによってサキシトキシ - EDT複合体が生成する。該反応は、中性条件下で反応物質を加熱することによって起こる。一般にpH6.5~7.5、好ましくはpH7.0~7.5の適切な緩衝液、たとえば磷酸アンモニウム緩衝液、酢酸アンモニウム緩衝液等を用いて反応を行うことができる。また、反応温度は、一般に室温から約100、好ましくは50 から80、より好ましくは約70 である。反

応後、目的の生成物を、調製用高速液体クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、逆相配分クロマトグラフィー等の手段を単独で又は組合わせて実施し、精製することができる。生成物の同定は、赤外分光法、質量分析法、NMR法、元素分析、アミノ酸分析などの通常の測定法によって行うことができる。

【0025】サキシトキシンのような低分離化合物はハプテンに属し、それ自体は抗原性をもちないが、抗原性をもちタンパク質を担体として、これと共有結合した複合体はハプテンに対する特異抗体を産生する抗原となる。ハプテン-タンパク質複合体を免疫注射するとハプテン部分は抗原決定基として認識され、抗ハプテン抗体が産生されると考えられている。このとき、余分な抗原決定基ができにくい選択的な結合方法でハプテン抗原を作製する必要がある。ハプテンの部分構造に対する認識は、ハプテンと担体であるタンパク質の結合部位付近では弱く、より離れた部分構造を認識しやすい。したがって、タンパク質と結合する際には、ハプテン中の適切な結合位置を選択することが大切である。本発明者らにより先に見出されたサキシトキシンの11位にEDT基が結合した構造をもつサキシトキシן-EDT複合体(特願平10-91797号)は、免疫抗原として好ましいだけでなく、麻痺性貝毒のほぼ全ての種類を高い反応性で検出可能とする麻痺性貝毒を産出し得る利点をもつ。

【0026】担体となるタンパク質としてはアルブミン、ヘモシアニンなどを使用できるが、これらに限定されず、本発明の抗体を誘発可能とする任意のタンパク質を使用できる。サキシトキシן-EDT複合体に担体タンパク質を結合する際には、該複合体のEDT部分を利用して、(反応性官能基を導入した)担体タンパク質とマレイミド法(T. Kitagawaら, J. Bioshem. 92:585-590, 1982)やカルボジイミド法(D. Exleyら, FEBS Lett., 91:162-165, 1978)などで結合させて、サキシトキシן-GSH-タンパク質複合体を生成することができる。たとえば後述の実施例にはサキシトキシן-EDT-牛血清アルブミン複合体の製造例を示すが、ここでは先ずサキシトキシן-EDT結合体を作り、一方アルブミンをその遊離アミノ基を介してメルカプトサクニル化し、両者を反応させることにより担体タンパク質をサキシトキシן-EDTに結合させる。得られた複合体の精製は、慣用のタンパク質精製法を適宜組合わせて実施できる。そのような方法には、たとえば、塩析、溶媒沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動、クロマトフォーカシング、限外濾過などが含まれる。

【0027】ゴニオトキシן2,3に換えて、ゴニオトキシן1、ゴニオトキシן4又はそれらの混合物を原料としてEDTと反応させる場合には、ネオサキシトキシן-EDT複合体が得られる。さらにこの複合体を上記と同様

に担体タンパク質と反応させることによってネオサキシトキシן-EDT-タンパク質複合体を得ることができ、得られた生成物はサキシトキシן-EDT-タンパク質複合体と同様に麻痺性貝毒に対する抗体の産生に使用することができる(以下参照)。

【0028】本発明のサキシトキシן-EDT-タンパク質複合体を、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、等の動物に免疫することによって該複合体に対する抗体を作製することができる。通常、免疫原溶液を、フロイントの完全アジュバント、不完全アジュバント、リビアジュバントシステム(RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH INC)、ムラミルペプチド(Calzyme社)、水酸化アルミニウム、リボポリリサッカライドなどのアジュバントと乳化混合し、動物に皮下、皮内、または筋肉に注射した後、2~4週間の間隔で同様の操作を行い数回追加免疫し、放血後抗血清(ポリクローナル抗体)を得ることができる。定期的に放血血清をサキシトキシןとの反応性について測定し、高力価が達成されるまで追加免疫を実施する。抗原の量は、抗原刺激を受ける動物の種類によって異なるが、たとえばウサギの場合10 $\mu$ g~数mg、マウスの場合数 $\mu$ g~数10mgである。

【0029】上記のようにして得られた麻痺性貝毒に対する抗血清はさらに、たとえば硫酸分画、ついでイオン交換クロマトグラフィーで処理することによりIgG抗体に精製することができる。あるいはサキシトキシןをデキストランゲルまたはアガロースゲルに化学的に結合させたゲルを用いるアフィニティークロマトグラフィーによって抗体を精製することができる。抗体の作製および精製については、たとえば生物化学実験法15「免疫学入門」(1982)学会出版センターに詳細に記載されており参照可能である。

【0030】本発明の方法では、免疫後1ヶ月程度から抗体価の上昇が見られ、サキシトキシןに対する抗血清の場合約4ヶ月後に抗血清1mlあたり0.5nmolのサキシトキシןを結合する力価が得られる。本抗血清はネオサキシトキシןとの反応は幾分低かったが、免疫5ヶ月後の血清では両者の貝毒との反応性はほとんど差がなかった。また、図2に免疫4,5ヶ月目の血清の麻痺性貝毒の各種成分との反応性を示すが、4ヶ月目の血清はネオサキシトキシןおよびゴニオトキシן1,4との反応性が幾分劣るが、5ヶ月目の血清は各成分との反応に大きな差が認められなかった。このように、本発明の抗体は麻痺性貝毒のほぼすべての成分と免疫学的に反応し、特に麻痺性貝毒成分であるサキシトキシן、ゴニオトキシן2,3、ネオサキシトキシן、ゴニオトキシן1,4、ゴニオトキシן5、およびCトキシן(C1, C2)のいずれとも50%以上、好ましくは60%以上の相対反応性(但し、サキシトキシןとの反応性を100%とする。)を示す。これに対して従来公知の抗体の多くは、麻痺性貝毒の全成分に共通のグアニジウム基にタンパク

質を結合させたものを抗原としているため、一部の麻痺性貝毒成分に強い特異性を示す反面、ほとんど結合しない成分も存在する。貝毒の検出の信頼度を上げるためには、抗体はほとんどすべての貝毒成分と同程度に反応するのが望ましい。

【0031】本発明のサキシトキシン - EDT - タンパク質複合体を抗原として用いることによって定法によりモノクローナル抗体を作製することも可能である。具体的には、マウスやラットなどのげっ歯類に該複合体を免疫後に脾臓を無菌的に取り出し、脾臓細胞を調製した後、ミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマをHAT培地等の選別用培地で選別し、動物細胞培養用培地中で継代培養するか、または該げっ歯類の腹腔内に移植培養し腹水からモノクローナル抗体を採取することができる。モノクローナル抗体の作製については、MilsteinとKholer, Nature256: 495(1976); 属性化学実験講座, 免疫生化学研究法(日本生化学会編)等に記載される方法を使用できる。

【0032】上記のようにして得られた抗体は、麻痺性貝毒を含む疑いのある食品等の検体中の貝毒の測定に使用することができる。測定は慣用の抗原抗体反応を用いて行うことができ、固相法もしくは均質法、競合法もしくは非競合法、サンドイッチ法などの方法を使用することができる。たとえば、サンドイッチ法を用いる場合には、過剰量の標識化第二抗体を用いるが、標識としてペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、<sup>125</sup>I、<sup>82</sup>P等の放射性同位体、FITC等の蛍光物質、アクリジニウムなどの化学発光物質を用いることができる。標識の種類に依存して、ELISAなどの酵素抗体法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法の使用が可能である。さらに、本発明の抗体は、臭化シアン等で活性化されたデキストラン樹脂(たとえばSephadex<sup>TM</sup>類)、アガロース\*

\*樹脂(たとえばBio-Gel<sup>TM</sup>類)、等の樹脂に結合するときには問題の貝毒を分離除去するためのアフィニティークラム担体とすることができる。

【0033】ジチオール化合物としてエタンジチオール(EDT)以外の化合物を採用した場合の実施形態も、上記とほぼ同じである。

【0034】本発明に係わる他の関連文献は次のようである:

Hollingworth T. Wekell MM(1990): Paralytic shellfish poison. In: Official Methods of Analysis, 15th edition, K. Hellrich ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, pp.881-882.

Oshima Y (1995): Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. In: Manual on Harmful Marine Algae, 10C Manuals and Guides No.33, Hallegraef GM, Anderson DM, Cembella AD eds., Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp.81-94.

Sato S, Sakai R, Kodama M (2000): Identification of thioether intermediates in the reductive transformation of gonyautoxins into saxitoxins by thios. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:1787-1789.

Sommer H. Meyer KF (1937): Paralytic shellfish poisoning. Arch. Pathol.24: 560-568.

【0035】

【実施例】以下の実施例によって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0036】本発明の記載に関連する略号は次のようである:

試料および試薬類  
 アジュバント: Complete Adjuvant Freund's  
 Wako  
 Bio-Gel P-2 ゲル濾過樹脂, mesh size: fine  
 Bio-Rad  
 Biotin-PE(AC5)2 -Maleimide ビオチンラベル試薬  
 Dojindo  
 PAEM N-[2-(2-Pyridyamino)ethyl]maleimide Wako  
 BSA: 牛血清アルブミン Wako,  
 IRA grade  
 DMSO: ジメチルスルフォキシド Wako,  
 特級  
 EDT: 1,2-エタンジチオール Wak  
 o, 特級  
 EDTA: エチレンジアミン4酢酸 Wako  
 , 特級  
 GMBS: -メイルミド' 酪酸N-ヒド' ロキシコル酸イミ  
 ト' イステル Dojindo  
 反応プレート: ELISA plate 96-well  
 Iwaki

THF :                   テトラヒドロフラン                   Wako, 特級

【0037】実施例1 ウサギ：                   ニュージーランドホウライの回流水洗し体重約1kgに対して、1000倍希釈したHRP標識二次抗体を、100 $\mu$ Lずつ添加した。37 $^{\circ}$ Cで1時間振とう後、PBSTで4回洗浄し、発色基質溶液(OPD-H2O2)を100 $\mu$ L添加した。37 $^{\circ}$ Cで30分振とうした後、0.5N硫酸100 $\mu$ Lを添加して反応を停止し、マイクロプレートリーダーで492nmの吸収(OD)を測定した。

麻痺性貝毒(PSP)精製毒およびEDT-PSP複合体の調製  
大船渡湾産毒化ホタテガイから常法により、gonyautoxin(GTX)群、saxitoxin群およびC-toxin群PSP成分(図1)を単離した。精製した成分のうちGTX1とGTX4、GTX2とGTX3およびC1とC2はそれぞれモル比約3:1の平衡混合物(それぞれGTX1+4, GTX2+3, C1+2と略記)として使用した。50 $\mu$ molのGTX1+4を20%のTHFを含む50mM EDT-10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)50mLに溶解し、室温で2日間静置した。ジエチルエーテルで3回抽出してEDTを除去し、水相に残存するエーテルを30%で減圧下留去して、EDT-neoSTXを含む反応混合液を得た。これをBio-Gel P-2のカラム(1.5x15cm)に添加し、水200mLでカラムを洗浄後0.1M酢酸で吸着成分を溶出した。10mLずつ分取し、各画分中のGTX1,4, neoSTXならびにEDT-neoSTX濃度をHPLC蛍光法で定量しつつEDT-neoSTX複合体を単離した。50 $\mu$ molのGTX2+3を出発物質として同様に処理し、EDT-STXを調製し分離した。

【0038】実施例2  
PSPに対する特異抗体作成用抗原の作成  
BSA20mgを2mLのPBS(-)に溶解し、これに5mgのGMBS100 $\mu$ LのDMSOに溶解したものを混合して室温で1時間静置した。これを1mMEDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で充填したSephadex G-25のカラム(1.5x20cm)に添加し、同溶液で溶出した。得た高分子画分を合一し、炭酸ナトリウム溶液でpHを7.4に調整した後、遠心限外濾過キット(UFV4BCG25, NMWL 10,000, Millipore)で4mLに濃縮した。この2mLに5 $\mu$ molのEDT-neoSTXを溶解し、5 $^{\circ}$ Cで2日間静置した。次に同混合物をPBS(-)に対して4回透析し、内液をneoSTX-BSA結合体溶液として回収した。STX-BSA結合体も同様の手順で調製した。抗原溶液中のBSA濃度は280nmの吸収により、結合PSP濃度はHPLC蛍光法により算出した。

【0039】実施例3  
ウサギへの免疫および抗体価の測定  
BSA-STX結合体を500 $\mu$ g/mLの濃度にPBSで希釈した。等量のアジュバントと混合したエマルジョンを2ヶ月に1、2回の頻度で1mLずつ、2羽のウサギ(STX-BSA-1, STX-BSA-2)に皮内注射した。BSA-neoSTX結合体も同様に2羽のウサギ(neoSTX-BSA-1, neoSTX-BSA-2)に免疫した。免疫中ウサギより随時採血して得た血清の抗体価を下記の手順で求めた。96wellの反応プレートの各wellに、PBS(-)に対して50 $\mu$ Mの濃度に調製したSTX溶液を50 $\mu$ Lずつ分注し37 $^{\circ}$ Cで2時間振とうした。プレートをPBSTで2回洗浄後、0.3%ゼラチンを含むPBS(-)300 $\mu$ Lを添加して37 $^{\circ}$ Cで1時間振とうした。PBSTで2回洗浄後、PBSBに対して、100倍希釈した抗血清を、50 $\mu$ Lずつ分注し、PBSTで3回洗浄した。37 $^{\circ}$ Cで1時間振とう後、PBST

【0040】実施例4  
抗血清によるPSPの吸収試験  
STX BSA-1およびneoSTX-BSA-1から得た血清および無免疫のウサギから得た血清(正常血清)それぞれ50 $\mu$ Lに1 $\mu$ MのPSP各成分(C1+2, GTX1+4, GTX2+3, GTX5, STX, neoSTX)の標準溶液を等量混合し、5 $^{\circ}$ Cで15時間静置した。限外遠心濾過過キット(Ultrafree-MC, NMWL 5000, Millipore)で得たる液をHPLC蛍光法で分析した。

【0041】実施例5  
ポリクローナル抗体を用いるPSPのELISA分析法の開発  
96wellの反応プレートの各wellに、PBS(-)に対して50 $\mu$ Mの濃度に調製したSTX溶液を50 $\mu$ Lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで2時間振とうした。プレートをPBSTで2回洗浄後、0.3%ゼラチンを含むPBS(-)300 $\mu$ Lを添加して37 $^{\circ}$ Cで1時間振とうした。PBSTで2回洗浄後、PSP各成分のPBSすなわちC1+2, GTX1+4, GTX2+3, GTX5, GTX6, neoSTX, dcSTX, STXをPBS(-)で0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 nMに希釈した溶液をそれぞれ50 $\mu$ L添加した。次いでPBSBで200倍に希釈した抗血清(BSA-STX-1)を50 $\mu$ Lずつ添加して37 $^{\circ}$ Cで1時間振とうした。同一プレート上にPSPと抗血清溶液を添加しないwellを用意してゼロブランク(Bo)とした。37 $^{\circ}$ Cで1時間振とう後、PBSTで3回洗浄し、PBS(-)に対して、1000倍希釈したHRP標識二次抗体を、100 $\mu$ Lずつ添加した。37 $^{\circ}$ Cで1時間振とう後、PBSTで4回洗浄し、発色基質溶液を100 $\mu$ L添加した。37 $^{\circ}$ Cで30分振とうした後、0.5N硫酸100 $\mu$ Lを添加して反応を停止し、マイクロプレートリーダーで492nmの吸収(OD)を測定した。試験は3連で行った。

【0042】実施例6  
ビオチン標識STXの作成  
凍結乾燥状態の精製EDT-STX複合体(15 $\mu$ mol)を、1.4mLの10mMリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解し、これに6mg(10 $\mu$ mol)のBiotin-PE(AC5)2-maleimideを600 $\mu$ LのDMSOに溶解したものを混合した。5 $^{\circ}$ Cで一晩静置後、0.05M酢酸で5mLに定容し、3連のSepPak C18 plusカートリッジを0.05M酢酸15mLで洗浄後、0.05M酢酸-メタノール(1:1 v/v)10mLで吸着成分を溶出した。含水酸性メタノール溶出液に含まれるビオチン標識STXの濃度をHPLC蛍光法で定量するとともに、同画分の毒性をマウス試験法で調べた。

【0043】実施例7  
蛍光標識STXの作成

6mgのPAEM-2塩酸塩 (Mw253.69) を精製EDT-STX複合体 (23  $\mu$ mol) とともに2.3mLの50mMリン酸緩衝液中、室温で2日間静置した。反応混合物をBio-GEL P-2のカラム (1.5 x 20cm) に添加し、200mLでカラムを洗浄後0.1M酢酸、次いで0.5M酢酸で吸着成分を溶出した。希酢酸溶出液は10mLずつ分取し、各画分をHPLC蛍光法で調べPEAE-EDT-STX結合体 (蛍光標識STX) の溶出をモニターした。単離したPAEM-EDT-STX結合体の毒性をマウス試験法で調べた。

#### 【0044】実施例8

PSPならびにPSP - ナオール複合体の定量

供試溶液中のPSPはHPLCの蛍光法(Oshima, 1995)で定量した。溶液中の結合型PSPすなわちEDT-STX等のチオール - PSP複合体およびタンパクに結合したPSP等の量は、溶液の一部を、10%メルカプトエタノールを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で希釈し、5分間煮沸した後HPLC蛍光法で分析して得られたSTX群と、メルカプトエタノール処理前のGTX群とSTX群の和を比較することにより算出した。

抗原溶液中のBSA濃度およびBSAに結合したPSP量

抗原	抗原溶液のタンパク濃度 ( $\mu$ g/ml)	PSP : BSA	
		モル比	重量比 (%)
BSA-EDT-STX (新規抗原)	1497	5.4	2.3
BSA-EDT-neoSTX	607	8.9	4.1
BSA-GS-STX	684	1.0	0.4
BSA-GS-neoSTX	788	0.1	-

#### 【0047】実施例11

ウサギ血清の抗体価の推移

図3にBSA-EDT-STX結合体を免疫したウサギ (STX-EDT-BSA-1およびSTX-EDT-STX-2) の抗体価の推移を示す。2羽のウサギとも免疫開始後3ヶ月目より抗体価の有意な上昇が認められ、4ヶ月目以降の抗体価は増減を繰り返しながら推移した。NeoSTX-EDT-STX結合体を免疫したウサギの抗体価もほぼ同様に推移したが、BSA-EDT-STX結合体を免疫した場合に比べて抗体価の上昇は低かった。いずれのウサギも免疫開始後7ヶ月を過ぎた時点で全採血し、得た血清を以下の試験に用いた。

#### 【0048】実施例12

抗血清によるPSP成分の吸収

図4にBSA-EDT-STX-1から得た血清およびBSA-neoSTX-1から得た血清による各PSP成分の吸収量を示した。無免疫のウサギの血清 (正常血清) は1mL当たりいずれのPSP成分も0.1nmol未満と検出限界未満であった。これに対してBSA-STX-1血清1mLは1~3nmolのPSPを吸収した。BSA-neoSTX-1血清によるPSPの吸収はこれに比べ低かった。

#### 【0049】実施例13

STX固相化プレート上での各PSP成分の競合

PSP成分の顕著な吸収が認められたBSA-STX-1血清を用い

#### \*【0045】実施例9

マウス試験法

供試液のマウス毒性をA.O.A.C.法 (Hollingworth and Wekell, 1990) に従って求めた。ddY系雄マウス (体重  $20 \pm 1$ g) を使用し、1試料につき5尾のマウスを用い致死時間の中間値からPSPの用量致死時間曲線 (Sommer and Meyer, 1937) に従って投与した毒値 (mouse unit = MU) を算出した。1MUは15分で1匹のマウスを殺す毒量に相当する。

#### 【0046】実施例10

PSP - タンパク結合体 (抗原) の作成

図2に示す手順でBSA-EDT-STX結合体および同様の手順で調製したBSA-EDT-neoSTX結合体を調製した。以前我々はグルタチオン-PSP複合体をBSAに導入して抗原を作成しているが、今回新たに作成したEDTを介する結合法により、より多数のPSP分子がタンパクを導入した抗原の作成に成功した (表1)。

#### 【表1】

て、PSPのELISAによる定量法の開発を試みた。種々検討の結果、STXの中性リン酸緩衝液を添加して固相化した反応プレートを用いるindirect two step法により定量的にPSP成分を分析することが可能となった。図5に示すようにIC50値を与える濃度はSTX、GTX2+3で4~7nM, neoSTX, dcSTX, GTX5, GTX1+4で30~100nM, GTX6で約200nMであった。このようにPSPの成分により抗体に対する反応性は若干異なるものの、いずれの成分に対しても同法によりマウス試験法の10~100倍の高感度での検出が可能である。抗体は、プリン骨格を持つアデノシン (Ad) やカフェイン (Caf)、およびグアニジル基を持つアルギニン (Arg) など、PSPと部分的に構造の類似する生体成分には全く反応しなかった (図6)。しかし興味あることにBSA-STX-1抗体に対してPSPと同じ薬理作用を持つフグ毒テトロドトキシン (TTX) は高濃度で交差が認められた。

#### 【0050】実施例14

標識付きPSP誘導体の調製および比毒性

マレイミド基とスルフヒドリル基は中性水溶液中穏和な条件下で反応し結合体を形成する。マレイミド基を持つ種々のラベル化合物が市販されているが、本試験ではこれらの中からビオチンラベル試薬と水溶性の蛍光ラベル試薬を選び、これらを導入して標識付きSTX誘導体を作

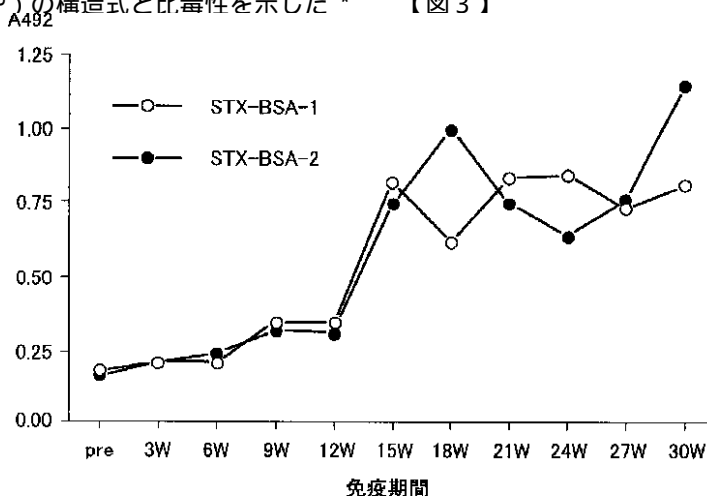
成した(図7)。これら2種の誘導体に加え、スルフヒドリル基のマスク剤であるNEMを同様の手順で導入したNEM-EDT-STX誘導体を調製した。これら標識付き誘導体はBio-Gel P-2等のカラムクロマトグラフィーにより他のPSP成分から分離することが出来た(図8)。精製して得た誘導体を腹腔内投与したマウスはPSPを投与した場合と同じ症状を示して死亡した。グルタチオン - PSP複合体 (Sato et al., 2000) およびEDT-STX誘導体はSTXの100分の1未満の比毒性しか示さなかったのに対し、EDT-STXを出発物質とするこれら標識付きPSP誘導体は、STXの30分の1ないし7分の1と、N-sulfocarbonyl基を持つ天然成分(C1~4, GTX5)のそれに匹敵する比毒性を示した(図9)。

【0051】

【発明の効果】本発明によるBSA-EDT-STXを抗原として調製したポリクローナル抗体は、neoSTXに対する親和性は若干低かったが、他の麻痺性貝毒成分にはほぼ同様の親和性を示した。本抗体を用いて試験的に作成したELISAは、毒成分によって値は若干異なるものの、マウス試験の10~100倍の感度で毒を検出することができた。

【図面の簡単な説明】

【図1】麻痺性貝毒(PSP)の構造式と比毒性を示した\*



BSA-EDT-STX結合体を免疫したウサギの抗体価の推移

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図5

\*図である。

【図2】本発明における抗原(BSA-EDT-PSP結合体)の製法を示した図である。

【図3】本発明におけるBSA-EDT-STX結合体を免疫したウサギの抗体価を推移を示した図である。

【図4】抗血清によるPSPの吸収量を示した図である。

【図5】各PSP成分のSTX固相プレート上での抗STX抗体に対する反応を示した図である。

【図6】PSP以外の成分のSTX固相プレート上での抗STX抗体に対する反応を示した図である。

【図7】本発明における非アイソトープ系標識付きPSP誘導体の構造を示した図である。

【図8】蛍光標識付きSTX(PAEM-EDT-STX)のBio-Gel P-2カラムクロマトグラフィー上での分離を示した図である。

【図9】各PSP成分、PSP - チオール複合体および標識付きPSP誘導体の比毒性を示した図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

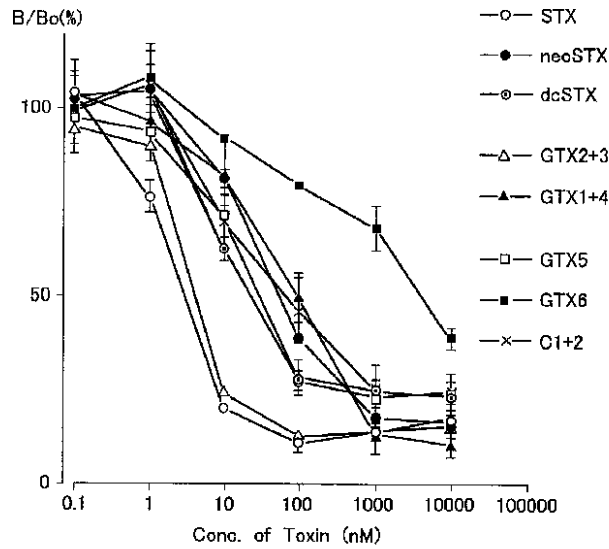
【補正内容】

【図3】

【補正方法】変更

【補正内容】

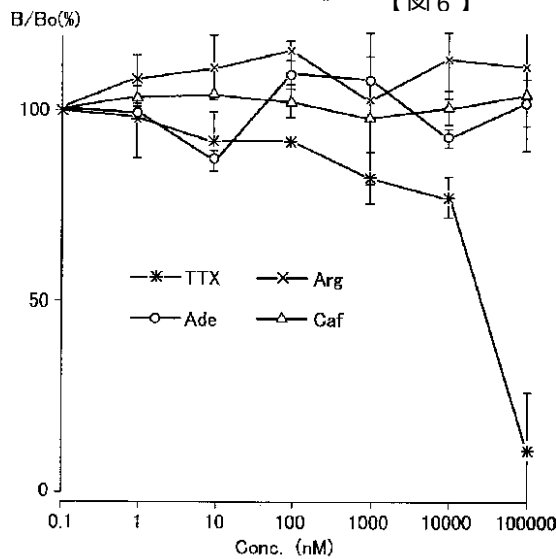
【図5】



各PSP成分のSTX固相プレート上での抗STX抗体に対する反応

【手続補正4】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図6

\*【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 \*【図6】



PSP以外の成分のSTX固相プレート上での抗STX抗体に対する反応

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AG26 CA10 DA10 DA11 DA13  
 4C050 AA01 BB05 CC04 DD02 EE05  
 FF02 GG05 HH01  
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA50 DA75  
 EA50 FA71 GA10

专利名称(译)	产生抗麻醉贝类毒素抗体的方法，新抗体，使用所述抗体的ELISA测定试剂盒，通过所述方法制备的系统标记的毒物制剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003012699A</a>	公开(公告)日	2003-01-15
申请号	JP2001203454	申请日	2001-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
[标]发明人	児玉正昭 佐藤繁 品川邦汎		
发明人	児玉 正昭 佐藤 繁 品川 邦汎		
IPC分类号	G01N33/53 C07D487/14 C07K16/18 C12P21/08		
CPC分类号	C07D487/14 C07K16/18		
FI分类号	C07K16/18 C07D487/14 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/DA10 4B064/DA11 4B064/DA13 4C050/AA01 4C050/BB05 4C050/CC04 4C050/DD02 4C050/EE05 4C050/FF02 4C050/GG05 4C050/HH01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA50 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA10		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：能够简单，高精度地测量麻醉性贝类毒素，并且无论贝类毒素的种类如何，都能以恒定的灵敏度进行测量。解决方案：具有游离巯基的沙毒素毒素巯基衍生物的制备方法是，在沙毒素的11位上结合具有多个巯基的任意二硫醇化合物，同时将巯基定向的任意官能团引入氨基。用使毒素毒素巯基衍生物与修饰的蛋白质反应获得的抗原免疫非人类动物，并从该动物获得识别麻醉性贝类毒素的抗血清。提供了一种针对性贝类毒素的抗体的生产方法，使用该抗体的ELISA测定试剂盒以及使用上述方法制备的标记毒液。

11位に付加した二硫醇化合物の濃度依存性による抗原の反応性

抗原	抗原溶液のタンパク濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	PSP.BSA	
		モル比	重量比(%)
BSA-EDT-STX(新規抗原)	1497	5.4	2.3
BSA-EDT-neoSTX	607	8.9	4.1
BSA-GS-STX	684	1.0	0.4
BSA-GS-neoSTX	788	0.1	-