

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4054195号
(P4054195)

(45) 発行日 平成20年2月27日(2008.2.27)

(24) 登録日 平成19年12月14日(2007.12.14)

| | | | |
|-------------------------|--|---------------|---|
| (51) Int.Cl. | | F I | |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | | GO 1 N 33/53 | S |
| GO 1 N 33/577 (2006.01) | | GO 1 N 33/577 | B |
| CO 7 K 16/18 (2006.01) | | CO 7 K 16/18 | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | | C 1 2 P 21/08 | |
| C 1 2 N 15/02 (2006.01) | | C 1 2 N 15/00 | C |

請求項の数 1 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-8300 (P2002-8300)
 (22) 出願日 平成14年1月17日(2002.1.17)
 (65) 公開番号 特開2003-212899 (P2003-212899A)
 (43) 公開日 平成15年7月30日(2003.7.30)
 審査請求日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(73) 特許権者 597112391
 広石 伸互
 福井県小浜市福谷25号13-2
 (73) 特許権者 591151808
 株式会社環境総合テクノス
 大阪府大阪市中央区安土町1丁目3番5号
 (74) 代理人 100087882
 弁理士 大石 征郎
 (72) 発明者 広石 伸互
 福井県小浜市福谷25号13-2
 (72) 発明者 幸 保孝
 福井県小浜市堀屋敷2-2
 (72) 発明者 池田 知司
 奈良県奈良市帝塚山6-4-134

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ズワイガニ属に属する種のうちのズワイガニの幼生とベニズワイガニの幼生とを判別する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ズワイガニ属(*Chionoecetes*)に属する種のうち、ズワイガニ(*C. opilio*)の幼生およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生がほぼ同時期に出現するがこれら以外の種の幼生は出現しない海域の海水表層において採取したズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生が、ズワイガニ(*C. opilio*)の幼生およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生のいずれであるかを判別する方法であって、

完全個体の状態にあるズワイガニ(*C. opilio*)の幼生を認識しかつ完全個体の状態にあるベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生を認識しないモノまたはポリクローナル抗体を用いて、採取した完全個体の状態にある検体ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生と反応させると共に、その検体ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生と前記抗体との間に結合反応が起こっているかどうかを免疫組織染色法または蛍光抗体法により確認すること、そしてその確認の結果、その検体ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生と前記抗体との間に前記の結合反応が起こっていることが判明したとき(つまり陽性であるとき)はその幼生はズワイガニ(*C. opilio*)の幼生であると判定し、その検体ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生と前記抗体との間に前記の結合反応が起こっていないことが判明したとき(つまり陰性であるとき)はその幼生はベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生であると判定すること、

ここで、前記のモノクローナル抗体は、免疫源であるズワイガニ(*C. opilio*)の幼生の完全個体を抗原として用いて哺乳動物を免疫した後、その哺乳動物の脾臓からB細胞を含んだ細胞懸濁液を採取し、そのB細胞とミエローマ細胞とをミエローマ細胞用培地に懸濁

させて両細胞を融合させることによりハイブリドームを得ると共に培養し、選択培地を用いてハイブリドーム以外の細胞を死滅させ、さらにズワイガニ(*C. opilio*)の幼生の完全個体およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の完全個体を用いてハイブリドームのスクリーニングを行うことによりズワイガニ(*C. opilio*)の幼生に対するモノクローナル抗体を得、これをクローン化して目的とするハイブリドームを得、このハイブリドームを *in viro* または *in vivo* で培養すること、により製造したものであること、

前記のポリクローナル抗体は、

(イ) 免疫源であるズワイガニ(*C. opilio*)の幼生の完全個体を抗原として用いて哺乳動物を免疫した後、その哺乳動物の採血を行って抗血清を得ること、

(ロ) さらに、そのようにして得た抗血清とベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の完全個体とを混合して反応させることにより、ズワイガニ(*C. opilio*)の幼生の体表面とベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の体表面とに共通して存在する抗原に結合する抗体を前記の抗血清から除去して、ズワイガニ(*C. opilio*)の幼生およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生のうち前者のズワイガニ(*C. opilio*)の幼生のみ に特異的に結合する抗体である抗ズワイガニ幼生ポリクローナル抗体を作製すること、

により製造したものであること、

を特徴とする、ズワイガニ属(*Chionoecetes*)に属する種の中のズワイガニ(*C. opilio*)の幼生とベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生とを判別する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、海水中に浮遊する甲殻類幼生であるズワイガニ属(*Chionoecetes*)に属する種の中のズワイガニ(*C. opilio*)の幼生とベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生とを判別する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

日本海の代表的な重要水産資源生物となっているズワイガニ(*C. opilio*)は、昭和40年代を境にその漁獲高が減少の一途を辿っている。これは、底引き網漁法による過剰な漁獲が原因となって、生息海域の個体数が減少してきたためであると考えられる。数値をあげてもう少し説明すると、ズワイガニ(*C. opilio*)の漁獲量は、1985年の3500トン強から減少を続け、1992年には1950トン进行を切り、その後はやや回復して2700~2900トン台で推移していると報告されている。

【0003】

ベニズワイガニ(*C. japonicus*)も主に日本海で漁獲されているが、日本海におけるベニズワイガニ(*C. japonicus*)の漁獲量は、1983~1984年に53000トンのピークに達したものの、それ以降は減少し、1991年以降には22000~28000トン台で推移していると報告されている。

【0004】

ズワイガニ(*C. opilio*)およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の資源量は、採集器具による漁獲結果から推定されているが、より迅速な生育状態に関する情報が必要である。このような観点から、曳航式深海用ビデオカメラを用いてズワイガニ(*C. opilio*)およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の漁場における分布を直接に計測する実験についての報告もなされている。

【0005】

上記の方法はすでに成長したズワイガニ(*C. opilio*)およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の成体を追跡するものであるが、本出願人は、資源管理としては、幼生の段階でのズワイガニ(*C. opilio*)およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)に着目して資源量の予測を行うことの方がより重要であると考えている。このときには、海水中に浮遊している甲殻類幼生を採取して、ズワイガニ(*C. opilio*)およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生(殊に商品価値の高いズワイガニ(*C. opilio*)の幼生)の同定および定量を行うことになる

10

20

30

40

50

。

【 0 0 0 6 】

海水中に浮遊する甲殻類幼生がズワイガニ(C. opilio) 幼生であるかベニズワイガニ(C. japonicus) 幼生であるかどうかを判別する方法については、現在のところ、そのような検討自体がなされていないものと信じられる。もし幼生の段階で判別しようとするれば、その方法としては、たとえば、(イ) 甲殻類の幼生の外部形態を観察して判別する方法、(ロ) 甲殻類の幼生をDNA分析により判別する方法、が考えられる。なお、前者の(イ)の判別方法については、「日本水産学会誌、Vol. 42, No. 5, p. 533-542」に報告があることが判明した。

【 0 0 0 7 】

【 発明が解決しようとする課題 】

上述のように、海洋生物資源として重要な生物であるズワイガニ(C. opilio) およびベニズワイガニ(C. japonicus) (殊にズワイガニ(C. opilio)) の乱獲による資源量の減少が懸念されている状況下においては、これらの資源量推定、産卵場の推定および保護海域の設定のため、ズワイガニ(C. opilio) 幼生およびベニズワイガニ(C. japonicus) 幼生の識別判定技術を確立することが必要となるであろう。

【 0 0 0 8 】

甲殻類を幼生の段階で判別する方法のうち、上記(イ)の外部形態を観察して判別する方法については、ズワイガニ(C. opilio) 幼生は、ズワイガニ(C. opilio) と比べて商品価値が劣るベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生と非常に類似した形態を有しているため、両種の識別を光学あるいは電子顕微鏡を用いて形態に基いて行うことは極めて困難である。しかも、両種は生息域が重複している上、産卵時期および孵化時期もほぼ同時期にあたるため、両種が混在する野外サンプルからズワイガニ(C. opilio) 幼生のみを識別する方法が必要であるが、そのような識別を可能にする方法は難しいと言わざるをえない。

【 0 0 0 9 】

甲殻類を幼生の段階で判別する方法のうち、上記(ロ)のDNA分析による種の識別については、識別自体は可能であると思われるが、

- ・DNA分析にあたっては、1個体ずつ検体をすり潰し、別々に塩基配列や電気泳動を分析する必要があるため、分析に多大の時間と高価な分析装置を要すること、

- ・上記のように個々の検体をすり潰して破壊するため、成長段階、大きさなどの付帯情報の入手が困難となること、

- ・保存のためにホルマリン固定した試料では、時間と共にDNAが分解されるため、長期保存が困難であること、つまり、長く保存したサンプルの分析が困難となること、などの問題点がある。そのため、DNA分析による種の識別法は、たとえ可能であっても、実用的な手法とは言いがたい。

【 0 0 1 0 】

本発明は、このような背景下において、海水中に浮遊する甲殻類幼生であるズワイガニ属(Chionoecetes)に属する種の中のズワイガニ(C. opilio)の幼生とベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生とを、簡便、迅速、正確、客観的に、しかも完全個体の状態で(破壊しないで)判別し、かつホルマリン等で固定した後でも判別することのできる方法を提供すること、を目的とするものである。

【 0 0 1 1 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明の判別方法(ズワイガニ属(Chionoecetes)に属する種の中のズワイガニ(C. opilio)の幼生とベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生とを判別する方法)は、

ズワイガニ属(Chionoecetes)に属する種のうち、ズワイガニ(C. opilio)の幼生およびベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生がほぼ同時期に出現するがこれら以外の種の幼生は出現しない海域の海水表層において採取したズワイガニ属(Chionoecetes)の幼生が、ズワイガニ(C. opilio)の幼生およびベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生のいずれであるかを判別する方法であって、

10

20

30

40

50

完全個体の状態にあるズワイガニ(*C. opilio*)の幼生を認識しかつ完全個体の状態にあるベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生を認識しないモノまたはポリクローナル抗体を用いて、採取した完全個体の状態にある検体ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生と反応させると共に、その検体ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生と前記抗体との間に結合反応が起こっているかどうかを免疫組織染色法または蛍光抗体法により確認すること、そしてその確認の結果、その検体ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生と前記抗体との間に前記の結合反応が起こっていることが判明したとき(つまり陽性であるとき)はその幼生はズワイガニ(*C. opilio*)の幼生であると判定し、その検体ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生と前記抗体との間に前記の結合反応が起こっていないことが判明したとき(つまり陰性であるとき)はその幼生はベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生であると判定すること、

10

ここで、前記のモノクローナル抗体は、免疫源であるズワイガニ(*C. opilio*)の幼生の完全個体を抗原として用いて哺乳動物を免疫した後、その哺乳動物の脾臓からB細胞を含んだ細胞懸濁液を採取し、そのB細胞とミエローマ細胞とをミエローマ細胞用培地に懸濁させて両細胞を融合させることによりハイブリドーマを得ると共に培養し、選択培地を用いてハイブリドーマ以外の細胞を死滅させ、さらにズワイガニ(*C. opilio*)の幼生の完全個体およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の完全個体を用いてハイブリドーマのスクリーニングを行うことによりズワイガニ(*C. opilio*)の幼生に対するモノクローナル抗体を得、これをクローン化して目的とするハイブリドーマを得、このハイブリドーマを*in vitro*または*in vivo*で培養すること、により製造したものであること、

前記のポリクローナル抗体は、

20

(イ)免疫源であるズワイガニ(*C. opilio*)の幼生の完全個体を抗原として用いて哺乳動物を免疫した後、その哺乳動物の採血を行って抗血清を得ること、

(ロ)さらに、そのようにして得た抗血清とベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の完全個体とを混合して反応させることにより、ズワイガニ(*C. opilio*)の幼生の体表面とベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の体表面とに共通して存在する抗原に結合する抗体を前記の抗血清から除去して、ズワイガニ(*C. opilio*)の幼生およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生のうち前者のズワイガニ(*C. opilio*)の幼生のみ^に特異的に結合する抗体である抗ズワイガニ幼生ポリクローナル抗体を作製すること、

により製造したものであること、

30

を特徴とするものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下本発明を詳細に説明する。

【0013】

《判別の対象物と判別の目的》

ズワイガニ属(*Chionoecetes*)には、ズワイガニ(*Chionoecetes opilio*)、ベニズワイガニ(*Chionoecetes japonicus*)、オオズワイガニ(*Chionoecetes bairdi*)、トゲズワイガニ(*Chionoecetes angulatus*)、和名のない*Chionoecetes tanneri*の5種がある(「続“越前がにの世界、その生活史と生態”、福井県発行、発行日：1998年3月30日」を参照)。ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生は、他の属の甲殻類幼生とは大きさや形態が相違しているため、甲殻類幼生がズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生であるか他の属の幼生であるかは、容易に識別できる。

40

【0014】

そして、ズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生に関しては、ズワイガニ(*C. opilio*)幼生とベニズワイガニ(*C. japonicus*)幼生との鑑別が必要な海域ではそれら以外の種の幼生は出現しないので(オオズワイガニはベーリング海、トゲズワイガニはベーリング海、*Chionoecetes tanneri*はカナダの太平洋側)、採取したズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生が、「ズワイガニ(*C. opilio*)またはベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生」であるか、「それら以外のズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生」であるかについても、特に問題は生じない。問題を生ずるのは、ズワイガニ(*C. opilio*)幼生やベニズワイガニ(*C. japonicus*)

50

幼生が出現する日本海のような海域で採取したズワイガニ属(Chionoecetes)の幼生が、「ズワイガニ(C. opilio) 幼生」であるか、「ベニズワイガニ(C. japonicus) 幼生」であるかの点にある。

【0015】

さて、ズワイガニ(C. opilio) 幼生とベニズワイガニ(C. japonicus) 幼生とは、海水の表層部分にしかも同時期に出現する上(成体の棲息深さは相違するが)、非常に類似した形態を有しているため、形態だけでこれらの幼生の種を識別することは困難である。これらの幼生に関しては、卵から孵化した段階のものをプレゾエア、孵化後40～60分で脱皮した幼生を第I期ゾエア、さらに20～30日後に脱皮した幼生を第II期ゾエア、さらに20～30日後に脱皮した幼生をメガロッパ、さらに20～30日後に脱皮したものを稚ガニと呼ぶ。つまり、孵化してから稚ガニになるまでのプランクトンとしての生活期間は3ヶ月以内であると考えられている。なお、成体の漁期は、県によっても異なるが、11月～3月である。

10

【0016】

本発明において判別の対象に供するものは、ズワイガニ属(Chionoecetes)に属する種のうち、ズワイガニ幼生(C. opilio) およびベニズワイガニ(C. japonicus) 幼生がほぼ同時期に出現するがこれら以外の種の幼生は出現しない海域の海水表層において採取したズワイガニ属(Chionoecetes)の幼生の個体であり、判別の目的は、そのズワイガニ属(Chionoecetes)の幼生がズワイガニ(C. opilio)の幼生およびベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生のいずれであるかを判別することにある。

20

【0017】

《判別、判定の方法》

本発明においては、完全個体の状態にあるズワイガニ(C. opilio)の幼生を認識しかつ完全個体の状態にあるベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生を認識しないモノまたはポリクローナル抗体を用いて、採取した完全個体の状態にある検体ズワイガニ属(Chionoecetes)の幼生と反応させると共に、その検体ズワイガニ属(Chionoecetes)の幼生と前記抗体との間に結合反応が起こっているかどうかを免疫組織染色法または蛍光抗体法により確認する。判別に用いるモノまたはポリクローナル抗体については、後述する。

【0018】

そしてその確認の結果、その検体ズワイガニ属(Chionoecetes)の幼生と前記抗体との間に前記の結合反応が起こっていることが判明したとき(つまり陽性であるとき)はその幼生はズワイガニ(C. opilio)の幼生であると判定し、その検体ズワイガニ属(Chionoecetes)の幼生と前記抗体との間に前記の結合反応が起こっていないことが判明したとき(つまり陰性であるとき)はその幼生はベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生であると判定する。

30

【0019】

《ポリクローナル抗体の作製》

上記のズワイガニ(C. opilio) 幼生のポリクローナル抗体は、

(イ) 免疫源であるズワイガニ(C. opilio)の幼生の完全個体を抗原として用いて哺乳動物を免疫した後、その哺乳動物の採血を行って抗血清を得ること、

40

(ロ) さらに、そのようにして得た抗血清とベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生の完全個体とを混合して反応させることにより、ズワイガニ(C. opilio)の幼生の体表面とベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生の体表面とに共通して存在する抗原に結合する抗体を前記の抗血清から除去して、ズワイガニ(C. opilio)の幼生およびベニズワイガニ(C. japonicus)の幼生のうち前者のズワイガニ(C. opilio)の幼生のみ^に特異的に結合する抗体である抗ズワイガニ幼生ポリクローナル抗体を作製すること、により製造される。以下、さらに詳細に説明する。

【0020】

免疫工程

マウス、ラットなどの哺乳動物を、予め種の知られているズワイガニ(C. opilio) 幼生

50

の完全個体そのものを抗原として用いて免疫する。ホルマリン固定された幼生の場合は、予め生理食塩水で洗浄してホルマリンを除去する。投与手段としては、腹腔内注射、静脈注射、皮下注射などが採用され、場合により皮内注射も採用される。最終免疫後3～10日目に哺乳動物の採血を行い、抗血清（ポリクローナル抗体）を得る。

【0021】

抗体の作製

そして、上記のように免疫源であるズワイガニ(*C. opilio*) 幼生個体を用いて抗血清を得た後、その抗血清とベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の完全個体とを混合して反応させることにより、ズワイガニ(*C. opilio*) の幼生の体表面とベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の体表面とに共通して存在する抗原に結合する抗体を前記の抗血清から除去する。これにより、ズワイガニ(*C. opilio*) の幼生およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生のうち前者のズワイガニ(*C. opilio*) の幼生のみ¹⁰に特異的に結合する抗体である抗ズワイガニ幼生ポリクローナル抗体が得られる。

【0022】

《モノクローナル抗体の作製》

上記のズワイガニ(*C. opilio*) 幼生のモノクローナル抗体は、以下に述べるB細胞調製工程、細胞融合工程、スクリーニング工程、クローニング工程、ハイブリドーマ培養工程、さらに必要に応じて分離精製工程の各工程を順に実施することにより得られる。すなわち、免疫源であるズワイガニ(*C. opilio*) の幼生の完全個体を抗原として用いて哺乳動物を免疫した後、その哺乳動物の脾臓からB細胞を含んだ細胞懸濁液を採取し、そのB細胞とミエローマ細胞とをミエローマ細胞用培地に懸濁させて両細胞を融合させることによりハイブリドーマを得ると共に培養し、選択培地を用いてハイブリドーマ以外の細胞を死滅させ、さらにズワイガニ(*C. opilio*) の幼生の完全個体およびベニズワイガニ(*C. japonicus*)の幼生の完全個体を用いてハイブリドーマのスクリーニングを行うことによりズワイガニ(*C. opilio*) の幼生に対するモノクローナル抗体を得、これをクローン化して目的とするハイブリドーマを得、このハイブリドーマをin viro またはin vivo で培養することにより製造される。以下、さらに詳細に説明する。²⁰

【0023】

B細胞調製工程

マウス、ラットなどの哺乳動物を、予め種の知られているズワイガニ(*C. opilio*) 幼生を抗原として用いて免疫する。ホルマリン固定された幼生の場合は、予め生理食塩水で洗浄してホルマリンを除去する。投与手段としては、腹腔内注射、静脈注射、皮下注射などが採用され、場合により皮内注射も採用される。最終免疫後3～10日目に、哺乳動物の脾臓からB細胞を含んだ細胞懸濁液を採取する。³⁰

【0024】

細胞融合工程

前工程で採取したB細胞とミエローマ細胞（骨髄腫細胞）とをそれぞれ公知のミエローマ細胞用培地に懸濁する。ついで両者を混合し、適当な融合促進剤の存在下に融合させる。B細胞とミエローマ細胞の混合比は、1：1～20：1とすることが多いが、必ずしもこの範囲内に限られない。細胞融合促進剤としては、たとえば分子量1000～7500のポリエチレングリコールが用いられる。⁴⁰

【0025】

ここでミエローマ細胞としては、上述のB細胞調製工程で用いた被免疫動物と同種の動物由来のもので、かつハイブリドーマ選択培地で生育できず、しかもそれ自身が抗体を分泌しないものを用いることが好ましい。このようなミエローマ細胞はすでに市販されているので（たとえばマウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-653 など）、これを用いるのが簡便である。

【0026】

B細胞とミエローマ細胞との細胞融合はランダムに起きるので、目的のハイブリドーマを選別する必要がある。そこで上記操作の後、融合促進剤を洗浄除去し、ミエローマ細胞⁵⁰

用培地に懸濁したハイブリドーマの 0.1 ~ 0.5ml ずつをたとえば 96 ウェルプレートに撒き、培養する。培養中、HAT 培地などの公知の選択培地を添加し、その割合を徐々に高める。最終的には同様にして、さらに選択培地をハイブリドーマ培地と交換する。このような培地交換により、ハイブリドーマ以外の細胞は死滅する。

【0027】

スクリーニング工程、クローニング工程

ハイブリドーマのスクリーニングは、培養液中の抗体のズワイガニ(C. opilio) 幼生またはベニズワイガニ(C. japonicus) 幼生との反応性を調べることにより行うことができる。

【0028】

反応性の確認は、免疫組織染色法または蛍光抗体法による。免疫組織染色法は、後に実施例の個所で具体例を述べる。蛍光抗体法によるときは、培養液の一部をズワイガニ(C. opilio) 幼生またはベニズワイガニ(C. japonicus) 幼生に加えてインキュベートし、洗浄し、ついで蛍光ラベルを付した二次抗体を加えてインキュベートしたものを、蛍光顕微鏡にて検鏡することにより判断する。

【0029】

これにより、ズワイガニ(C. opilio) 幼生に対するモノクローナル抗体を産生する複数種のハイブリドーマを同時にスクリーニングすることができる。

【0030】

スクリーニングしたハイブリドーマは、限界希釈法によりクローン化する。これにより、目的とするハイブリドーマが作製できる。

【0031】

ハイブリドーマ培養工程

前工程で作製したハイブリドーマを *in vitro* または *in vivo* で培養すれば、目的のモノクローナル抗体を生産することができる。

【0032】

in vitro での培養は、たとえば、数個のハイブリドーマの 96 ウェルプレートでの培養からはじめ、しだいに培養規模を上げることにより行うことができ、これにより培養液中にモノクローナル抗体が分泌、蓄積される。

【0033】

また、*in vivo* での培養は、予めプリスタン(2, 6, 10, 14 - テトラメチルペンタデカン) 処理した BALB/c マウスまたはヌードマウスの腹腔内にハイブリドーマを接種することにより実施でき、これにより 10 ~ 20 日後にはモノクローナル抗体を含む腹水が蓄積される。

【0034】

分離精製工程

培養物または腹水からのモノクローナル抗体の分離精製は、通常の物理化学的手段によって行うことができるが、分離精製を省略して培養物または腹水のままであるいはそれを適当に希釈して用いることもでき、また簡単な分離精製により得た粗モノクローナル抗体を用いることもできる。

【0035】

《作用》

上記のモノまたはポリクローナル抗体を含む培養液、腹水または血清をズワイガニ属(Chionoecetes) の幼生(ズワイガニ(C. opilio) 幼生またはベニズワイガニ(C. japonicus) 幼生)に加えてインキュベートし、さらに試薬を加えて免疫組織染色法または蛍光抗体法にて確認することにより、そのズワイガニ属(Chionoecetes) の幼生がモノまたはポリクローナル抗体に反応するかどうか(幼生と抗体との間に結合反応が起こっているかどうか)が正確に判定される。すなわち、採取したズワイガニ属(Chionoecetes) の幼生が陽性であるとき(幼生と抗体との間に結合反応が起こっていることが判明したとき)はその幼生はズワイガニ(C. opilio) 幼生であると判定でき、一方陰性であるとき(幼生と抗体との間

10

20

30

40

50

に結合反応が起こっていないことが判明したとき)はその幼生はベニズワイガニ(*C. japonicus*)幼生であると判定できる。

【0036】

この場合、ホルマリン固定したズワイガニ属(*Chionoecetes*)の幼生試料を用いても、種の判別が可能である。特に免疫組織染色法を採用するときは、経時的变化のない比較対照用の標本作製しておくことができるので有利である。

【0037】

【実施例】

次に実施例をあげて本発明をさらに説明する。以下においては、幼生と抗体との間に結合反応が起こっていることが確認された場合を「陽性」とし、そうでない場合を「陰性」とした。

【0038】

実施例1

《ズワイガニ属の幼生サンプルの採取と固定》

日本栽培漁業協会小浜事業所において1999年(平成11年)3月10日に孵化し、ゾエアI期に変態したズワイガニ第I期ゾエア幼生と、富山水産試験場において2000年(平成12年)2月14日に孵化し、ゾエアI期に変態したベニズワイガニ第I期ゾエア幼生とを使用した。いずれも、採取直後に直ちに5重量%濃度のホルマリン水溶液で固定し、保存したものをサンプルとした。

【0039】

《ポリクローナル抗体の作製》

(抗ズワイガニ血清の調製)

免疫原であるズワイガニ幼生200個体を0.25mlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁させ、これに等量のコンブリートアジュバント(半井化学株式会社製)を混合し、乳化させた。

【0040】

本実験では、実験動物として4週齢のBALB/cマウス(雌)(静岡実験動物協同組合)を用い、作製した乳化物を2週間ごとにマウスの皮下に0.5ml/個体の割合で投与した。2ヶ月間かけて計4回免疫を行った後、尾部より採血を行った。マウス血液は1000rpmで10分間遠心分離を行った。これにより、抗血清を得た(「PZ-1」と名付けた)。

【0041】

(免疫染色キットを用いたズワイガニ幼生に対する抗血清の反応)

市販の免疫染色キットを用い、マウス抗血清の反応特異性およびネガティブコントロールへの非特異的反応の有無を調べ、本キットの反応条件がズワイガニ幼生の免疫染色に適するかどうかを検討した。結果を表1に示す。

【0042】

【表1】

抗血清PZ-1の反応性

| 幼 生 | 反応性 [#] | |
|---------|--------------------|---------|
| | PZ-1 ^{##} | マウス正常血清 |
| ズワイガニ | + | + |
| ベニズワイガニ | + | + |

[#] + : 陽性、- : 陰性

^{##} 100倍に希釈して使用

【0043】

その結果、ネガティブコントロールとしてマウス正常血清を用いたズワイガニ幼生に非特異的反応が観察されたので、本キットの反応条件はズワイガニ幼生の免疫染色には適さないことが明らかとなった。

【0044】

10

20

30

40

50

そこで、このような非特異的反応を抑制するために、ブロッキング溶液および洗浄液の検討を行い、ズワイガニ幼生の免疫染色における最適条件を検討した。さらに、陽性であることを示す茶褐色の呈色はズワイガニ幼生やベニズワイガニ幼生の体色と同色であり、陽性かどうかの判定を困難にしている。そのため、発色溶液についても検討を行い、ズワイガニ幼生を特異的に識別可能な免疫染色法の確立を試みた。

【0045】

(ブロッキングの検討)

ブロッキング剤として、今回キット付属のウマ正常血清とブロックエース(雪印乳業株式会社製)を用い、免疫染色の前段階において、0.5、1、2、3、4%の濃度段階で、4、overnightの条件にて、幼生にブロッキング処理を施した。さらに、ブロッキングの効果を高めるために、ブロッキング操作と同濃度のウマ正常血清およびブロックエースを用いて、抗体やアビジン-ビオチン化酵素複合体を希釈して用いた。結果を表2に示す。

10

【0046】

【表2】

| ブロッキング剤 の濃度(%) | 免疫染色におけるブロッキング剤の検討 [#] 非特異的反応 ^{##} | |
|-------------------|---|--------|
| | ブロックエース | ウマ正常血清 |
| 0 | + | + |
| 0.5 | + | + |
| 1.0 | + | + |
| 2.0 | + | + |
| 3.0 | + | + |
| 4.0 | ± | + |

20

[#] 一次抗体としてマウス正常血清を使用し、ネガティブコントロールへの非特異的反応を抑制するための検討

^{##} 発色の濃さで判断

+ : 非特異的反応、- : 弱い非特異的反応

【0047】

最適のブロッキング溶液、種類、そして濃度について検討を行った結果、本操作のみでは完全に非特異的反応を抑制することは不可能であった。しかしながら、4%のブロックエースを用いた場合にのみ、非特異的反応による発色が若干抑制されたため、以降の検討においては、これをカニ幼生のブロッキングに用いた。

30

【0048】

(洗浄液の検討)

洗浄液の検討では、DAB-過酸化水素混合溶液の添加による発色操作の直前の洗浄時に、洗浄液として0、0.025、0.05%(v/v)のTween20を含む蒸留水を用いて洗浄し、その後の発色を観察した。結果を表3に示す。

【0049】

【表3】

| 添加濃度 (%) | 洗浄液にTween20を添加することによる非特異的反応の抑制 [#] 反応性 ^{##} | | | |
|-------------|--|---------------|-------------|---------------|
| | PZ-1 | | マウス正常血清 | |
| | ズワイガニ 幼生 | ベニズワイ ガニ幼生 | ズワイガニ 幼生 | ベニズワイ ガニ幼生 |
| 0 | + | + | ± | ± |
| 0.025 | + | + | - | - |
| 0.050 | + | + | - | - |

40

[#] 一次抗体として100倍希釈PZ-1を使用

50

発色の濃さで判断 + : 非特異的反応、- : 弱い非特異的反応

【0050】

発色操作直前における洗浄液について検討した結果、ベニズワイガニ幼生に観察された非特異的反応は、0.025%および0.05%のTween20を添加した洗蒸留水で完全に抑制されることが明らかになった。

【0051】

(発色法の検討)

発色液であるDAB-過酸化水素にNiCl₂を加えた場合、発色は青色を呈する。そこで、0.08, 0.16, 0.32% (w/v) のNiCl₂を添加した発色液を用いて、陽性と陰性との明確な区別ができるかを検討した。

【0052】

カニ幼生の体色が茶褐色であるため、観察による陽性の判定が難しいことがある。そこで、NiCl₂を添加した発色液の検討を行った。結果を表4に示す。

【0053】

【表4】

| NiCl ₂ (%) | 発色液にNiCl ₂ を添加することによる免疫染色の明瞭さの検討 | | | |
|--------------------------|---|---------------|-------------|---------------|
| | 反応性 [#] | | | |
| | PZ-1 | | マウス正常血清 | |
| | ズワイガニ 幼生 | ベニズワイ ガニ幼生 | ズワイガニ 幼生 | ベニズワイ ガニ幼生 |
| 0.08 | + | - | - | - |
| 0.16 | ++ | - | - | - |
| 0.32 | +++ | - | ± | - |

[#] +++ : 極めて明瞭(青黒色)、++ : 明瞭(青色)、
+ : やや明瞭(茶褐色)、± : 不明瞭、- : 陰性反応

【0054】

その結果、NiCl₂を添加することにより陽性であることを示す青色系の呈色が観察され、特に0.32%のNiCl₂添加群ではズワイガニ幼生が鮮明な青黒色(濃い青色)を呈し、ネガティブコントロールでは非特異的反応が観察されなかったため、両者を明確に区別することが可能であった。従って、以降のズワイガニ幼生識別のための免疫染色においては、0.32%のNiCl₂を添加した発色液を使用することとした。

【0055】

なお、0.64%のNiCl₂添加群では陽性であることを示す最も鮮明な呈色が観察されたが、ベニズワイガニ幼生に対してわずかながら非特異的反応が観察された。

【0056】

以上の検討結果から、ブロッキングには4%のブロックエース、洗浄液には0.05%のTween20を添加した蒸留水を使用することにより、ズワイガニ幼生に対して陽性であることを検出する反応系が確立された。

【0057】

(免疫染色法の検討)

免疫染色には、VECTASTAIN Elite ABC MOUSE IgG KIT (VECTASTAIN)を用い、次のようにして検討を行った。

1. まず、ズワイガニ幼生およびベニズワイガニ幼生を96ウエル平板プレートの各ウエルに5個体ずつ入れた。

2. 反応は、まずPBSで100倍に希釈したPZ-1(一次抗体)50μLを幼生の入ったウエルに添加し、抗体をズワイガニ幼生の体表面に反応させた(室温、1時間)。

3. PZ-1を吸引して取り除き、幼生を50μLの蒸留水で5分間洗浄した後、50μLのビオチン化抗マウス抗体(二次抗体)を一次抗体に反応させた(室温、1時間)。

4. 反応後、ビオチン化抗マウス抗体を取り除き、再度蒸留水で幼生を洗浄した(室温、1時間)。前述と同様の洗浄操作を施した後、予め作製したアビジン-ビオチン化西洋

10

20

30

40

50

ワサビペルオキシダーゼ酵素溶液を添加し、二次抗体に結合したアビジンに結合させた（室温、1時間）。

5. 再度、洗浄操作を行った後、ペルオキシダーゼ基質であるジアミノベンチジントラヒドロクロライド（DAB）と過酸化水素水とを混合した発色液を50μL添加し、茶褐色の発色を行った。

6. 陽性かどうかの判定は、目視あるいは実体顕微鏡によって観察を行った。

7. なお、ネガティブコントロールとしては、PZ-1の代わりに、100倍に希釈したマウス正常血清50μLを一次抗体として用いた。

【0058】

免疫染色によるズワイガニ幼生の識別の最適な条件が得られたので、最後に、PZ-1の反応特異性の検討を行った。その結果、PZ-1は免疫原であるズワイガニ幼生に陽性を示すと共に、ベニズワイガニ幼生に対して交差反応を示した。この結果から、PZ-1は特異性が低く、ズワイガニ幼生とベニズワイガニ幼生の体表面に共通して存在する抗原に結合する抗体が含まれると考えられた。そこで、PZ-1とベニズワイガニ幼生とを予め反応させ、PZ-1から抗「共通抗原」抗体を除去したPZ-2を作製し、このPZ-2について反応特異性を再度検討した。

【0059】

（ズワイガニ幼生に特異的な抗体の作製）

抗体作製においては、PBSで100倍希釈した100μLのPZ-1に約200個体のベニズワイガニ幼生を混合し、4、overnightの条件で除去操作を行った。得られた抗体（PZ-2）は、その反応特異性を、上記の検討結果から得られた最適条件に従って免疫染色法によって調べた。結果を表5に示す。

【0060】

【表5】

PZ-2の反応性

| 幼 生 | 反応性 [#] | |
|---------|--------------------|---------------------|
| | PZ-1 ^{##} | PZ-2 ^{###} |
| ズワイガニ | + | + |
| ベニズワイガニ | + | - |

[#] + : 濃い茶褐色に呈色（陽性）、

- : 陰性

^{##} 100倍に希釈して使用

^{###} ベニズワイガニ幼生を用い、4、overnightで抗共通抗原抗体を除去後、100倍希釈にて使用

【0061】

その結果、ズワイガニ幼生にのみ陽性であることが観察され、これらの結果から、抗ズワイガニ幼生ポリクローナル抗体が作製できた。

【0062】

《ズワイガニを特異的に識別可能なモノクローナル抗体の作製》

ハイブリドーマを作製しておけば、均質なモノクローナル抗体を大量かつ半永久的に得ることが可能である。そこで、ズワイガニを特異的に識別可能なモノクローナル抗体と、この抗体を生産するハイブリドーマの作製を試みた。

【0063】

先の「《ポリクローナル抗体の作製》の（抗ズワイガニ血清の調製）」の説明の個所で述べた方法に従い、4週齢のBALB/cマウス（雌）に2ヶ月間免疫を行った後、常法に従ってハイブリドーマを作成した。すなわち、マウスの脾細胞とマウスミエロマ細胞とを10:1の割合で混合し、ポリエチレングリコールにより細胞融合させた後、HAT選択による融合細胞の選択培養とクローニングを経て、モノクローナル抗体MZ-1を生産するハイブリドーマを樹立した。

【0064】

10

20

30

40

50

一次抗体として、ハイブリドーマ上清を反応に供した。免疫染色は、先の「《ポリクローナル抗体の作製》の（免疫染色法の検討）」の説明の個所で述べた検討で得られた条件を用いて行った。なお、ネガティブコントロールとして、ミエローマ培養上清を用いた。

【0065】

本試験で樹立したハイブリドーマ1株から得られたモノクローナル抗体MZ-1を改変免疫染色法によってズワイガニの体表面に反応させた結果、体表面に青色の発色が観察された。一方でベニズワイガニ幼生あるいはネガティブコントロールには発色は認められず、モノクローナル抗体MZ-1はズワイガニ幼生に特異的であることが確認された。結果を表6に示す。

【0066】

【表6】

| モノクローナル抗体MZ-1の反応性 | | |
|-------------------|--------------------|----------------------------|
| 幼 生 | 反応性 [#] | |
| | MZ-1 ^{##} | ネガティブコントロール ^{###} |
| ズワイガニ | + | - |
| ベニズワイガニ | - | - |

[#] + : 陽性、- : 陰性

^{##} ハイブリドーマ培養上清を使用

^{###} ミエローマ培養上清を一次抗体の代わりに使用

【0067】

【発明の効果】

上記のモノまたはポリクローナル抗体を用いることにより、海水中に浮遊する甲殻類幼生であるズワイガニ属(Chionoecetes)に属する幼生がズワイガニ(C. opilio)幼生およびベニズワイガニ(C. japonicus)幼生のうちのいずれかであるかを、簡便、迅速、正確かつ客観的に、しかも完全個体の状態で（破壊しないで）、かつホルマリン等で固定した後であっても、判別することができる。すなわち、上記抗体を用いた判別方法において、採取したズワイガニ属(Chionoecetes)に属する幼生と抗体との間に結合反応が起こっていることが判明したとき（陽性であるとき）はその幼生がズワイガニ(C. opilio)幼生であると判定でき、一方幼生と抗体との間に結合反応が起こっていないことが判明したとき（陰性であるとき）はその幼生はベニズワイガニ(C. japonicus)幼生であると判定できる。

【0068】

よって、本発明によれば、従来困難であったズワイガニ(C. opilio)幼生とベニズワイガニ(C. japonicus)幼生との判別を行うことが可能となるので、ズワイガニ(C. opilio)またはベニズワイガニ(C. japonicus)（殊にズワイガニ(C. opilio)）の生態系の把握、海洋生物資源の分布や量の把握を行うことができる。

10

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 0 1 K 61/00 (2006.01) A 0 1 K 61/00 J

(72)発明者 小牧 博信
兵庫県川西市大和東4丁目3-52

(72)発明者 大西 庸介
滋賀県大津市下阪本1丁目9-1

(72)発明者 南 卓志
新潟県新潟市青山2丁目13-1

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特開平11-196866(JP,A)
特許第3171391(JP,B2)
日本水産学会誌, vol.42, No.5, p.533-542

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12P 1/00-41/00

C07K 16/00-16/46

G01N 33/48-33/98

PubMed

Science Direct

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDream2)

MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 在雪蟹物种中鉴别雪蟹幼虫和贝尼泽蟹幼虫的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP4054195B2 | 公开(公告)日 | 2008-02-27 |
| 申请号 | JP2002008300 | 申请日 | 2002-01-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 广石 伸互 关西环境中心 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 广石 伸互 有限公司关西环境中心 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 广石 伸互 有限公司综合环境TECHNOS公司 | | |
| [标]发明人 | 广石伸互 幸保孝 池田知司 小牧博信 大西庸介 南卓志 | | |
| 发明人 | 广石 伸互 幸 保孝 池田 知司 小牧 博信 大西 庸介 南 卓志 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/577 C07K16/18 C12P21/08 C12N15/02 A01K61/00 C12N15/09 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.S G01N33/577.B C07K16/18 C12P21/08 C12N15/00.C A01K61/00.J A01K61/59 C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 2B104/GA00 4B024/AA10 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA11 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA05 4H045/EA50 4H045/FA72 | | |
| 其他公开文献 | JP2003212899A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供（1）单克隆抗体和多克隆抗体，使得属于Chionoecetes属的幼虫，即漂浮在海水中的甲壳类动物幼虫，通过物种水平进行区分，以判断该物种是否是幼虫（2）产生具有优异反应特异性的多克隆抗体的方法，和（3）容易，快速准确和客观地区分标本Chionoecetes幼虫种类的方法（判断标本甲壳动物幼虫）是否是雪蟹的幼虫，处于完全独立的状态（没有破碎），通过福尔马林等固定后进行分化。ZOLUTION：这种单克隆抗体或多克隆抗体以完整的个体状态识别属于Chionoecetes属的雪蟹的幼虫，并且不识别属于Chionoecetes属的其他物种的幼虫。将完全个体状态的标本Chionoecetes幼虫进行分化，以便通过使用抗体判断幼虫是否是雪蟹的幼虫。Z

| 添加濃度 (%) | 反心性 ^{***} | | | |
|-------------|--------------------|---------------|-------------|---------------|
| | P Z - 1 | | マウス正常血清 | |
| | ズワイガニ 幼生 | ベニズワイ ガニ幼生 | ズワイガニ 幼生 | ベニズワイ ガニ幼生 |
| 0 | + | + | ± | ± |
| 0.025 | + | + | - | - |
| 0.050 | + | + | - | - |

一次抗体として100倍希釈P Z - 1を使用

