

(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2009-288065

(P2009-288065A)

(43) 公開日 平成21年12月10日(2009.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
	GO 1 N 33/569 F	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2008-140833 (P2008-140833)	(71) 出願人	899000079
(22) 出願日	平成20年5月29日 (2008.5.29)		学校法人慶應義塾
			東京都港区三田2丁目15番45号
		(71) 出願人	593022021
			山形県
			山形県山形市松波2丁目8番1号
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Shiga toxin 2e 及び Shiga toxin 2e に対する抗体の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 Shiga toxin 2e (Stx2e) に対するグロボテトラオシルセラミド (Globotetraosylceramide: Gb4) の選択的結合性を利用して、動物検体中の Shiga toxin 2e (Stx2e) 又は Stx2e に対する抗体を検出する方法の提供。

【解決手段】 検体中の Shiga toxin 2e (Stx2e) を検出する方法であって、グロボテトラオシルセラミド (Gb4) を固相化した担体に検体を接触させ、該接触により担体上に形成された Gb4 と検体中の Stx2e との複合体の存在を、標識した抗 Stx2e 抗体あるいは抗 Stx2e 抗体とそれに結合する標識した抗イムノグロブリン抗体を用いて検出することを含む検体中の Shiga toxin 2e (Stx2e) を検出する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出する方法であって、グロボテトラオシルセラミド (Gb4)を固相化した担体に検体を接触させ、該接触により担体上に形成されたGb4と検体中のStx2eとの複合体の存在を、標識した抗Stx2e抗体あるいは抗Stx2e抗体とそれに結合する標識した抗イムノグロブリン抗体を用いて検出することを含む検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出する方法。

【請求項 2】

酵素免疫測定法である請求項 1 記載の検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出する方法。

10

【請求項 3】

検体中のShiga toxin2e(Stx2e)に対する抗体を検出する方法であって、グロボテトラオシルセラミド (Gb4)とStx2eの複合体を固相化した担体に検体を接触させ、該接触により担体上に形成されたGb4とStx2eと抗Stx2e抗体との複合体の存在を、標識した抗イムノグロブリン抗体を用いて検出することを含む検体中のShiga toxin2e(Stx2e)に対する抗体を検出する方法。

【請求項 4】

酵素免疫測定法である請求項 3 記載の検体中のShiga toxin2e(Stx2e)に対する抗体を検出する方法。

【請求項 5】

請求項 1 又は 2 に記載の方法により動物検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出し、動物の毒素産生大腸菌の感染の有無を検出する方法。

20

【請求項 6】

請求項 3 又は 4 に記載の方法により動物検体中のShiga toxin2e (Stx2e)に対する抗体を検出し、動物の毒素産生大腸菌の感染の有無を検出する方法。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載の方法によりブタ検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出し、ブタ浮腫病を診断する方法。

【請求項 8】

請求項 3 又は 4 に記載の方法によりブタ検体中のShiga toxin2e (Stx2e)に対する抗体を検出し、ブタ浮腫病を診断する方法。

30

【請求項 9】

少なくともグロボテトラオシルセラミド (Gb4)を固相化した担体及び標識した抗体を含む、検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出するキット。

【請求項 10】

少なくともグロボテトラオシルセラミド (Gb4)を固相化した担体、Shiga toxin2e (Stx2e)及び標識した抗体を含む検体中のShiga toxin2e (Stx2e)に対する抗体を検出するキット。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 に記載のキットである、動物の毒素産生大腸菌感染検出用キット。

40

【請求項 12】

請求項 9 又は 10 に記載のキットである、ブタ浮腫病診断キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、Shiga toxin2e(Stx2e) に対するグロボテトラオシルセラミド(Globotetraosylceramido: Gb4) の選択的結合性を利用して、ブタ検体中のStx2e又はStx2eに対する抗体を検出することにより、動物の毒素産生大腸菌の感染の有無及びブタの浮腫病の検出を行う技術に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

Shiga toxin 2e (Stx2e) は、毒素産生大腸菌が産生する毒素で、豚浮腫病を引き起こす重要な毒素である。Stx2eは、Shiga toxin 2 (Stx2) の変異型であり、本病の診断にあたり、Stx2と区別することが極めて重要となる。

【 0 0 0 3 】

PCR法による遺伝子検索の方法が主流として行われているが、本病の診断においては、遺伝子検索により間接的にStx2eの存在を証明するよりも、Stx2eを検出して直接的に証明するほうがより確実に応用範囲も広い。

【 0 0 0 4 】

従来は、Shiga toxin 2eのベロ細胞に対する毒性を中和する抗体の存在を、細胞変性の有無で判定していた（非特許文献 1 ～ 3 を参照）。しかしながら、従来法は細胞を使用するため、準備および結果判定までに1週間以上を要していた。また、細胞変性の有無を目視で確認し、結果判定を行うため、客観的に信頼性がある判定を行うためには経験が必要であった。また、作業が煩雑なため一度に多検体を検査することが困難であった。さらに、毒素の中和には抗体以外の物質が作用する可能性もあり、得られた結果が必ずしも妥当とはいえなかった。

10

【 0 0 0 5 】

Stx2eは、Stx2と高いアミノ酸相同性を有しているため、抗体の特異性に依存した従来のイムノアッセイ系では区別して検出することは、極めて困難であった。

【 0 0 0 6 】

一方、Stx2e感染抗体の検出もまた、ブタ浮腫病の診断および疫学的調査に不可欠である。現在使われている検出法は、ベロ細胞を用いたバイオアッセイ法しかない。しかし、バイオアッセイ法は、作業が煩雑で判定までに数日を要し、また、再現性のある信頼にあたる判定を行うには相当の熟練を要する等の問題がある。

20

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 1】J.KONOWALCHUK et al., INFECTION AND IMMUNITY, Dec. 1977, p.775-779

【非特許文献 2】Mohamad A, et al, The journal of Infectious Diseases, Vol.151, No.5, May 1985, p.775-782

【非特許文献 3】Mohamad A. Karmali et al., THE LANCET, MARCH 19, 1983, p.619-620

30

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、Shiga toxin2e(Stx2e) に対するグロボテトラオシルセラミド(Globotetraosylceramido: Gb4) の選択的結合性を利用して、動物検体中のShiga toxin2e(Stx2e) 又はStx2eに対する抗体を検出する方法の提供を目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、Stx2eが生体内においてGlobotetraosylceramide (グロボテトラオシルセラミド: Gb4) と選択的に結合することを応用し、Stx2eを簡便かつ特異的に検出する方法について鋭意検討を行った。本発明者らは、Gb4をマイクロプレートにコーティングし、このGb4に結合したStx2eを、抗Stx2eポリクローナル抗体で検出するサンドイッチELISA法 (Gb4ELISA) により、Stx2eを極めて高い特異性で検出できることを見出した。

40

【 0 0 1 0 】

さらに、本発明者らは、前述のGb4ELISAを応用し、感染抗体を検出する方法についても検討した。Gb4をコーティングしたプレートにて、一定量のStx2eを反応させ、その後、検査材料の豚血清を感作させ、感染抗体を検出する方法を試みた結果、本法が感染抗体を迅速かつ的確に検出することを見出した。

【 0 0 1 1 】

本発明のStx2eを検出する方法及びStx2eに対する抗体を検出する方法は、その簡便性と

50

高い特異性から、動物の毒素産生大腸菌の感染の有無及び豚浮腫病の優れた検査方法となり得ると考えられる。

【 0 0 1 2 】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出する方法であって、グロボテトラオシルセラミド (Gb4)を固相化した担体に検体を接触させ、該接触により担体上に形成されたGb4と検体中のStx2eとの複合体の存在を、標識した抗Stx2e抗体あるいは抗Stx2e抗体とそれに結合する標識した抗イムノグロブリン抗体を用いて検出することを含む検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出する方法。

[2] 酵素免疫測定法である[1]の検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出する方法。

10

【 0 0 1 3 】

[3] 検体中のShiga toxin2e(Stx2e)に対する抗体を検出する方法であって、グロボテトラオシルセラミド (Gb4)とStx2eの複合体を固相化した担体に検体を接触させ、該接触により担体上に形成されたGb4とStx2eと抗Stx2e抗体との複合体の存在を、標識した抗イムノグロブリン抗体を用いて検出することを含む検体中のShiga toxin2e(Stx2e)に対する抗体を検出する方法。

[4] 酵素免疫測定法である[3]の検体中のShiga toxin2e(Stx2e)に対する抗体を検出する方法。

【 0 0 1 4 】

[5] [1]又は[2]の方法により動物検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出し、動物の毒素産生大腸菌の感染の有無を検出する方法。

20

[6] [3]又は[4]の方法により動物検体中のShiga toxin2e (Stx2e)に対する抗体を検出し、動物の毒素産生大腸菌の感染の有無を検出する方法。

[7] [1]又は[2]の方法によりブタ検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出し、ブタ浮腫病を診断する方法。

【 0 0 1 5 】

[8] [3]又は[4]の方法によりブタ検体中のShiga toxin2e (Stx2e)に対する抗体を検出し、ブタ浮腫病を診断する方法。

[9] 少なくともグロボテトラオシルセラミド (Gb4)を固相化した担体及び標識した抗体を含む、検体中のShiga toxin2e (Stx2e)を検出するキット。

30

[1 0] 少なくともグロボテトラオシルセラミド (Gb4)を固相化した担体、Shiga toxin2e (Stx2e)及び標識した抗体を含む検体中のShiga toxin2e (Stx2e)に対する抗体を検出するキット。

[1 1] [9]又は[1 0]のキットである、動物の毒素産生大腸菌感染検出用キット。

[1 2] [9]又は[1 0]のキットである、ブタ浮腫病診断キット。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 6 】

実施例に記載したように、本発明の方法により、Shiga toxin2e(Stx2e) に対するグロボテトラオシルセラミド(Globotetraosylceramido: Gb4) の選択的結合性を利用して、検体中のStx2eの存在又はStx2eに対する抗体の存在を容易にかつ迅速に特異的に検出し、被験動物が毒素産生大腸菌に感染しているかどうかを検出することができる。また、ブタの場合、ブタが浮腫病に罹患しているかどうかを診断することができる。

40

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 7 】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、動物由来検体中のShiga toxin 2e(Stx2e)を検出する方法であり、担体にグロボテトラオシルセラミド (Gb4)を固相化し、該固相化担体にShiga toxin 2e(Stx2e)を含む可能性がある検体を接触させ、固相化担体上でGb4とStx2eの複合体を形成させる。さらにStx2eに対する抗体 (抗Stx2e抗体) を接触させ、固相化担体上のGb4とStx2eの複合体に抗Stx2e抗体を結合させ、該結合した抗Stx2e抗体を検出することにより、検体中のStx2

50

eを検出する方法である。さらに、本発明は、検体中の抗Stx2e抗体を検出する方法であり、担体にグロボテトラオシルセラミド (Gb4)を固相化し、該固相化担体にShiga toxin 2e (Stx2e)を接触させ、固相化担体上でGb4とStx2eの複合体を形成させ、さらに、抗Stx2e抗体を含む可能性のある検体を接触させ、固相化担体上にGb4とStx2eと抗Stx2e抗体の複合体 (Gb4-Stx2e-抗Stx2e抗体)を形成させ、さらに標識した抗Stx2e抗体に結合する抗体を接触させ、該標識抗体を前記複合体に結合させ、結合した標識抗体を測定することにより検体中の抗Stx2e抗体を検出する。

【 0 0 1 8 】

グロボテトラオシルセラミドは、生体中に含まれるグリコスフィンゴ脂質であり、 β 1-3結合galNAc残基 (β 1-3 linked galNAc residue)を含有する。グロボテトラオシルセラミドは、例えばブタ赤血球等の哺乳類赤血球から精製することができる。また、市販の精製品を用いることもできる。

10

【 0 0 1 9 】

担体としては、ELISA用マイクロタイタープレート、スライドガラス、ニトロセルロース膜、樹脂ビーズ、磁性化ビーズ等種々のものを用いることができる。結合は、物理的吸着、官能基を利用した共有結合等、公知の方法で行うことができる。固相化量は、特に限定されないが担体が96ウェルマイクロタイタープレートの場合、1ウェル当たり数ngから数十 μ gが望ましい。固相化は固相化すべきGb4をメタノール等の適切な有機溶媒に溶解し、担体と接触させることにより行うことができる。例えば、マイクロタイタープレートを用いる場合、Gb4溶液をマイクロタイタープレートのウェルに分注し一定時間置くことにより固相化することができる。Gb4を固相化した後は、アッセイ中の非特異的結合を防ぐためにウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、卵白アルブミン等を含んだブロッキング溶液を用いてブロッキングを行うのが好ましい。このようにして作製したGb4固相化担体を用いて検体中のStx2e又は抗Stx2e抗体を検出することができる。

20

【 0 0 2 0 】

検体中のStx2eを検出する場合は、Gb4を固相化した担体と検体を反応させ、Gb4と検体中のStx2eを結合させ、担体上にGb4とStx2eの複合体を形成させる。洗浄後、酵素等で標識した抗Stx2e抗体又は標識していない抗Stx2e抗体を接触させ、Gb4とStx2eの複合体中のStx2eに結合させる。標識した抗Stx2e抗体を用いる場合は、Gb4とStx2eの複合体に結合した標識した抗Stx2e抗体を測定する。標識しない抗Stx2e抗体を用いる場合は、さらに洗浄後酵素等で標識した前記抗Stx2e抗体に結合する抗体 (免疫グロブリンに対する標識した抗体)を接触させ、Gb4とStx2eと抗Stx2e抗体の複合体中の抗Stx2e抗体に結合させ、該標識抗体を測定する。

30

【 0 0 2 1 】

検体中の抗Stx2e抗体を検出する場合は、Gb4を固相化した担体に既知量のStx2eを接触させ、Gb4とStx2eの複合体を形成させる。この際、例えば、担体に固相化したGb4量に対して、モル比で過剰量のStx2eを接触させ、固相化したGb4のほぼすべてにStx2eを結合させればよい。洗浄後、Gb4とStx2eの複合体を形成した担体と検体を接触させる。検体に抗Stx2e抗体が含まれる場合には、担体上にGb4とStx2eと抗Stx2e抗体の複合体 (Gb4-Stx2e-抗Stx2e抗体)が形成される。次いで、洗浄後、酵素等で標識した前記抗Stx2e抗体に結合する抗体 (免疫グロブリンに対する標識した抗体)を接触させ、Gb4とStx2eと抗Stx2e抗体の複合体中の抗Stx2e抗体に結合させ、該標識抗体を測定する。

40

【 0 0 2 2 】

抗体の標識は β - D - ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼやグルコースオキシダーゼ等の酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性同位元素やその他の発色物質等を用いて行うことができる。測定は、標識が酵素による場合、それぞれの酵素に対する基質を添加し、酵素反応を行わせ、発色を吸光度の測定により測定すればよい。標識が蛍光物質の場合は、蛍光検出機を用いて蛍光を測定すればよい。抗Stx2e抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。抗体は、例えばマウス、ウサ

50

ギ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等を用いて作製することができる。この際、Stx2e抗原として、例えば、Stx2eのBサブユニット又はその部分ペプチドを用いることができる。Stx2eは、Stx2eを産生する腸管出血性大腸菌を培養して、培養物から単離精製することもできるし、Stx2eのアミノ酸配列情報に基づいて化学合成してもよいし、Stx2eをコードする遺伝子の塩基配列情報に基づき遺伝子工学の技術によりリコンビナントタンパク質として作製することもできる。抗Stx2e抗体に結合する抗体としては、抗Stx2e抗体の作製に用いた動物の免疫グロブリンに対する抗体を用いればよい。

【0023】

本発明の方法は、ELISA等の酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、イムノクロマトグラフィー等、Gb4を結合させた担体を用いた抗原抗体反応に基づくいかなる方法も包含する。イムノクロマトグラフィーにおいては、ニトロセルロース膜等の適当な固相担体上にGb4又はGb4とStx2eの複合体を固相化し、該固相化担体に毛管現象を利用して、被検出物質（Stx2e又は抗Stx2e抗体）と結合し得る、金コロイド等の適当な標識物質で標識した抗体と被検出物質の複合体を展開移動させる。この結果、固相化したGb4-Stx2e-標識抗体又は固相化したGb4とStx2eの複合体-抗Stx2e抗体-標識抗体の複合体が固相担体上に形成され、該複合体から発する標識試薬のシグナル（金コロイドの場合は、Gb4を固相化した固相担体の部分が赤くなる）を検出することにより、被検出物質を検出することができる。イムノクロマトグラフィー装置の製造およびイムノクロマトグラフィーによる検出は公知の方法で行うことができる。

【0024】

本発明は動物を対象とし、例えば、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ヒト、イヌ、ネコ等が挙げられる。検体としては、これらの動物より採取した全血、血清、血漿、糞便を用いることができる。また、死亡したこれらの動物の臓器を用いることもできる。ブタの場合は、Stx2e又は抗Stx2e抗体の検出によりブタ浮腫病の診断が可能になる。

【0025】

検体中にStx2e又は抗Stx2e抗体が検出された場合、被験動物は毒素産生大腸菌に感染していると検出又は診断することができる。あるいは、過去に毒素産生大腸菌に感染したことがあると判断することができる。さらに、被験動物がブタの場合、その被験ブタは浮腫病に罹患していると検出又は診断することができ、あるいは過去に浮腫病に罹患したことがあると判断することができる。本発明において、動物が毒素産生大腸菌に感染していること、動物が毒素産生大腸菌に感染したことがあることを検出、診断又は判断することを動物の毒素産生大腸菌感染有無の検出又は診断という。また、ブタが浮腫病に罹患していること、ブタが浮腫病に罹患した病歴を有することを検出、診断又は判断することを、ブタの浮腫病の検出又は診断という。

【0026】

本発明はさらに、少なくともGb4を固相化した担体を含む、動物検体中のStx2e又は抗Stx2e抗体を検出するためのキットを包含する。該キットにより、被験動物が毒素産生大腸菌に感染していると検出又は診断することができる。あるいは、過去に毒素産生大腸菌に感染したことがあると判断することができる。本発明はまた、少なくともGb4を固相化した担体を含む、検体中のブタの浮腫病を診断するためのキットを包含する。該キットにより、ブタ検体中のStx2eを検出することにより浮腫病を診断することができる。

【0027】

本発明はさらに、少なくともGb4とStx2eの複合体を固相化した担体を含む、動物検体中のStx2e又は抗Stx2e抗体を検出するためのキットを包含する。該キットにより、被験動物が毒素産生大腸菌に感染していると検出又は診断することができる。本発明はまた、少なくともGb4とStx2eの複合体を固相化した担体を含む、ブタの浮腫病を診断するためのキットを包含する。該キットにより、ブタ検体中の抗Stx2e抗体を検出することにより浮腫病を診断することができる。動物検体中の抗Stx2e抗体を検出することにより浮腫病を診断するためのキット及びブタ検体中の抗Stx2e抗体を検出することにより浮腫病を診断するためのキットは、少なくともGb4を固相化した担体及びStx2eを独立に含んでいてもよい。

この場合、使用時に担体に固相化したGb4にStx2eを結合させればよい。または、Gb4とStx2eの複合体を固相化した担体を含んでいてもよい。

【実施例】

【0028】

本発明を以下の実施例によって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。

【0029】

本実施例において、精製Gb4として、Globotetraosylceramide (Globoside from human erythrocytes, sigma)を用いた。ELISAプレートとして、96穴マイクロプレート(Nunc Polysorp)を用いた。また、2次血清としては抗ウサギIgG HRP標識抗体(Upstate)と抗豚IgGウサギHRP標識抗体(DaKoCytomation)を用いた。さらに、Stx2eBとしては、Shiga toxin type 2eのBサブユニットの遺伝子で組み換えした、大腸菌によるリコンビナントタンパク質を用い、抗Stx2eBウサギポリクローナル抗体としては、Stx2eBを抗原として作製したウサギポリクローナル抗体を用いた。さらに、発色基質はテトラメチルベンチジン(TMB, DaKoCytomation)を、反応停止液は2N硫酸を用いた。

10

【0030】

Stx2e検出系の検査材料には、豚由来大腸菌26株、シカ由来大腸菌1株、ATCC標準大腸菌3株を用いた。感染抗体検出系の検査材料には、発症農場由来豚血清25検体(33、63、90、122、180日齢：各5検体)、未発症農場由来豚血清20検体(40、90、140、180日齢：各5検体)を使用した。陽性コントロール血清および陰性コントロール血清は、中和抗体陽性豚血清および中和抗体陰性豚血清各1検体とした。

20

【0031】

Gb4ELISAプレートの作製

Gb4のプレートへの固相化は、100%メタノールで10μg/mlに調整したGb4を96穴マイクロプレートに各穴10μlずつ添加し、室温にて1時間静置して行った。ブロッキングは、PBS(リン酸緩衝液、pH7.4)で1%に調整した牛血清アルブミンを各穴に200μlずつ添加し、室温で1時間静置して行った。

【0032】

Stx2eの検出

はじめに、Gb4ELISAプレートにて検査材料を感作し、次に抗Stx2eBウサギポリクローナル抗体を感作した後に、抗ウサギIgG HRP標識抗体により検出した。判定は、反応停止後、マイクロプレートリーダー(450nm)にて吸光度値(OD値)を測定して行った。検査材料には、検査対象となる大腸菌をポリミキシンB液で処理し、その上清を使用した。(表1)

30

【0033】

Stx2e 検出手順

【 表 1 】

手 順	濃度または希釈	希釈液	量(μl/well)	反応条件	
				温度	時間
1. Gb4 の固相化	10 μg/ml	100%メタノール	10	室温	1 時間
2. 洗浄		PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
3. ブロッキング (BSA)	1%	BSA 添加 PBS	200	室温	1 時間
4. 洗浄		PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
5. 検体添加			50	37℃	30 分
6. 洗浄		Tween-PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
7. 抗 Stx2eB ウサギポリクローナル抗体	1: 1,000	0.1% BSA 添加 Tween-PBS	50	室温	1 時間
8. 洗浄		Tween-PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
9. 抗ウサギ IgG-HRP 標識抗体	1: 10,000	0.1% BSA 添加 Tween-PBS	50	室温	1 時間
10. 洗浄		Tween-PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
11. 基質添加 (テトラメチルベンチジン)			100	室温	15 分
12. 反応停止 (2N 硫酸)			100	室温	

BSA: 牛血清アルブミン

Tween-PBS: 0.05% Tween 20 添加 PBS.

IgG: Immunoglobulin G.

Stx2B: Shiga toxin 2e B サブユニット

Stxの検出

Stxの検出は、市販の逆受身ラテックス凝集反応法（VTEC-RPLA 「生研」）により添付文書の操作方法に準じて実施した。

【 0 0 3 5 】

Stx遺伝子検索

大腸菌の遺伝子検索は、参考文献に準じたPCR法により実施し、Stx遺伝子の存在および変異型を検索した。

【 0 0 3 6 】

感染抗体検出

Gb4ELISAプレートにてStx2e粗抽出物を感作し、次に検査材料を感作し、抗豚IgGウサギHRP標識抗体により検出した。判定は、反応停止後、マイクロプレートリーダー（450nm）にてOD値を測定して行った。Stx2e粗抽出物は、Stx2e産生能を有する大腸菌からポリミキシンB液を用いてStx2eを抽出したものを使用した。検査材料には、豚血清を0.1%BSA - TPBS（0.1%牛アルブミン、0.05%Tween20添加リン酸緩衝液、pH7.4）で1:800に希釈したものを使用した。（表2）

10

【 0 0 3 7 】

抗 Stx2e 抗体検出手順

【 表 2 】

手 順	濃度または希釈	希釈液	量(μl/well)	反応条件	
				温度	時間
1. Gb4 の固相化	10 μg/ml	100%メタノール	10	室温	1 時間
2. 洗浄		PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
3. ブロッキング (BSA)	1%	BSA 添加 PBS	200	室温	1 時間
4. 洗浄		PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
5. Stx2e 添加			50	37℃	30 分
6. 洗浄		Tween-PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
7. 血清検体添加	1: 400	0.1% BSA 添加 Tween-PBS	50	室温	1 時間
8. 洗浄		Tween-PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
9. 抗豚 IgG-HRP 標識抗体添加	1: 5,000	0.1% BSA 添加 Tween-PBS	50	室温	1 時間
10. 洗浄		Tween-PBS	400	室温	10 秒 (3 ×)
11. 基質添加 (テトラメチルベンチジン)			100	室温	15 分
12. 反応停止 (2N 硫酸)			100	室温	

BSA: 牛血清アルブミン

Tween-PBS: 0.05% Tween 20 添加 PBS.

IgG: Immunoglobulin G.

本実施例において、以下の結果が得られた。

Stx2e検出系

検出感度の検討は、Stx2eBを0.1%BSA加PBS(0.1%牛アルブミン添加リン酸緩衝液、pH 7.4)で2倍階段希釈したものを検査材料として実施した。その結果、最小検出感度は、1ng(20ng/ml)であった(図1)。

【0039】

Stx2e遺伝子保有菌株由来の5検体についてGb4ELISAとVTEC-RPLAを実施した結果、Gb4ELISAの平均OD値は0.46(最低値0.24~最高値1.15)であった。一方VTEC-RPLAは、Gb4ELISAのOD値が高値であった2検体をStx2陽性、低値であった3検体をStx2陰性と判定した。VTEC-RPLAでStx1又は2の存在を確認した菌株由来の3検体について、実施した結果、平均OD値は0.00であった。PCRでStx産生遺伝子が検出されなかった菌株由来の22検体について実施した結果、すべての検体のOD値が0.00であった(表3)。

10

【0040】

【表3】

Stx2e 検出結果

菌 株	Variant (PCR)	Gb4ELISA (A ₄₅₀)	RPLA (Titer)	
			Stx1	Stx2
SH ^a 15-32	Stx2e	0.25	ND ^e	<2 ^f
SH15-10	Stx2e	0.38	ND	4
SH17-30	Stx2e	1.15	ND	32
SH17-50	Stx2e	0.24	ND	<2
SH19-181	Stx2e	0.29	ND	<2
YH ^b 17-31	Stx1,Stx2	0.00	32	64
ATCC35150	Stx1,Stx2	0.00	16	128
ATCC43890	Stx1	0.00	64	ND
ATCC25922	Stx (-) ^c	0.00	ND	ND
SH (n=21)	Stx (-)	0.00 ^d	ND	ND

20

30

^aSH:豚由来大腸菌、^bYH:鹿由来大腸菌、^cStx(-):Stx産生遺伝子なし

^d0.00:21検体のOD値、^eND:未実施、^f<2:陰性、A₄₅₀:OD値450nm

【0041】

上記30検体について、PCRによるStx2e遺伝子検出結果とGb4ELISAの検査結果(OD値0.01以上の検体を陽性と判定)を比較した。その結果、陽性一致率、陰性一致率、陽性的中率、陰性的中率すべて100%であった(表4)。

40

【0042】

【表 4】

Gb4ELISA と PCR 結果比較

Gb4ELISA	PCR	
	陽 性	陰 性
陽 性	5	0
陰 性	0	25

10

Gb4ELISA 陽性: OD 値 0.01 以上

【 0 0 4 3 】

以上の結果から、Gb4ELISAが高感度かつ特異性高くStx2eを検出することが示唆された。

【 0 0 4 4 】

感染抗体検出系

20

陽性コントロール血清および陰性コントロール血清を0.1%BSA - TPBSで2倍階段希釈した血清を用いて実施した結果、陽性コントロール血清は血清希釈倍率を反映しOD値が推移した。陰性コントロール血清は低い値で一定に推移した(図2)。

【 0 0 4 5 】

発症農場および未発症農場において、豚の日齢とOD値の関係について調べた結果、発症農場では、90日齢以降にOD値が有意に上昇する傾向が認められた(90日齢と122日齢および90日齢と180日齢のOD値に統計学的に有意な差が認められた。 $p<0.01$ 、t検定)。一方、未発症農場では、日齢に関係なく、低い値で一定に推移した(図3)。

【 0 0 4 6 】

以上の結果より、Gb4ELISAによる抗体検査の結果は、Stx2e感染抗体量を反映することが示唆された。

30

【産業上の利用可能性】

【 0 0 4 7 】

本発明の方法により、動物の毒素産生大腸菌感染やブタの浮腫病を容易に、正確に検出することができ、医学、獣医学、畜産業の発展に寄与する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 8 】

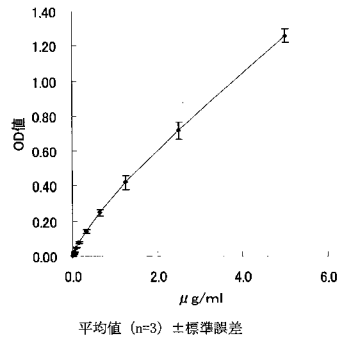
【図1】Stx2e測定ELISAにおける抗原濃度とOD値の関係を示す図である。

【図2】Stx2e測定ELISAにおける血清希釈倍率とOD値の関係を示す図である。

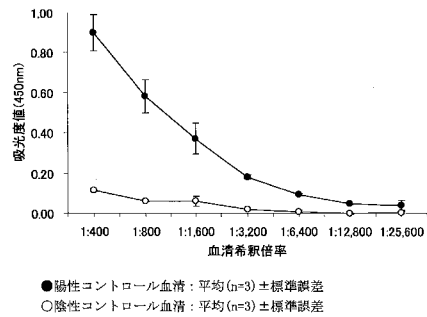
【図3】浮腫病の発症農場および未発症農場における、豚の日齢とStx2e測定ELISAでのOD値の関係を示す図である。

40

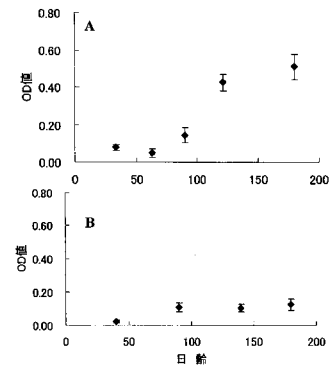
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 富樫 克博
山形県鶴岡市大字大宝寺字日本国403-1 慶應義塾大学 先端生命科学研究室内
- (72)発明者 細川 みえ
山形県酒田市若宮町一丁目28-8
- (72)発明者 守屋 聖一
山形県酒田市安田字大平36番地

专利名称(译)	检测针对Shigatoxin 2e和Shigatoxin 2e的抗体的方法		
公开(公告)号	JP2009288065A	公开(公告)日	2009-12-10
申请号	JP2008140833	申请日	2008-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾 山形县		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾 山形县		
[标]发明人	富樫克博 細川みえ 守屋聖一		
发明人	富樫 克博 細川 みえ 守屋 聖一		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/53.N G01N33/543.545.A G01N33/569.F		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过使用球形四糖神经酰胺（Globotetatosylceramide：Gb 4）与志贺毒素2e（Stx 2e）的选择性结合特性来检测动物标本中针对志贺毒素2e（Stx 2e）或Stx 2e的抗体的方法。一种检测样品中志贺毒素2e（Stx 2e）的方法，包括使样品与其上固定有球形四糖基神经酰胺（Gb 4）的载体接触，并通过接触形成在载体上形成的Gb 4。检测样品中的志贺毒素2e（Stx2e），包括使用标记的抗Stx 2e抗体或抗Stx 2e抗体和与其结合的标记的抗免疫球蛋白抗体检测样品中抗体和Stx 2e之间存在复合物。怎么做 【选择图表】无

表 1

手順	試料の量 (μl)	試料の種類	反応条件	
			温度	時間
1. Gb4固定化	10 μl/ml	100%メタノール	室温	1時間
2. 洗浄		PBS	室温	10分 (3x)
3. カンガク(BSA)	1%	BSA 添加 PBS	室温	1時間
4. 洗浄		PBS	室温	10分 (3x)
5. 検体添加			37℃	30分
6. 洗浄		Tween-PBS	室温	10分 (3x)
7. 抗-Shiga毒素2e抗体(カンガク)添加	1:100	0.1% BSA 添加 Tween-PBS	室温	1時間
8. 洗浄		Tween-PBS	室温	10分 (3x)
9. 抗カンガク IgG-APC 標識抗体	1:1000	0.1% BSA 添加 Tween-PBS	室温	1時間
10. 洗浄		Tween-PBS	室温	10分 (3x)
11. 基質添加 (4-トリウムベンザジン)			室温	15分
12. 反応停止 (4-硝酸)			室温	
BSA 牛血清アルブミン				
Tween-PBS: 0.05% Tween 20 添加 PBS				
IgG: Immunglobulin G				
Shiga Toxin 2e: Shiga Toxin 2e				