

(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2006-104154

(P2006-104154A)

(43) 公開日 平成18年4月20日(2006.4.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/12 (2006.01)	CO7K 16/12	4B024
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4B064
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 521	4B065
GO1N 33/569 (2006.01)	GO1N 33/569 F	4H045
審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-295072 (P2004-295072)

(22) 出願日 平成16年10月7日 (2004.10.7)

特許法第30条第1項適用申請有り 2004年5月 American Society for Microbiology発行の「CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, Vol. 11, No. 3, May 2004, pages 446-451, "Use of Monoclonal Antibodies That Recognize p60 for Identification of Listeria monocytogenes"」に発表

(71) 出願人 504376599

コメッド コーポレーション リミテッド
KOMED CO., LTD.
大韓民国 463-760 ギョンギド
ウ ソングナム-シティ バンダング-グ
ヤタブ-ドング 150 バンダング
テクノパーク エ-ドング #404
#404, A-dong, Bundan
g Technopark, 150,
Yatab-dong, Bundan
g-gu, Seongnam-city
, Gyeonggi-do 463-7
60, Republic of Kor
ea

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リステリアモノサイトゲネスを選別的に認知するモノクローナル抗体、これを生産するハイブリドーマ、これを含む試験キット及びこれを使用した検出方法

(57) 【要約】

【課題】

本発明はリステリアモノサイトゲネスのp60タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体、これを生産するハイブリドーマ細胞、このようなモノクローナル抗体を含む試験キット及びこのようなモノクローナル抗体を使用してリステリアモノサイトゲネスを検出する方法に関する。

【解決手段】

本発明のモノクローナル抗体はリステリアモノサイトゲネスだけを選別的に認知することによりこのような抗体を使用して人間に病原性である菌により汚染された食品の汚染有無を迅速に検定しうる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受託番号 K C T C - 1 0 4 3 1 B P のハイブリドーマ細胞を用いて生産される、リステリアモノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) の p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

受託番号 K C T C 1 0 4 3 2 B P のハイブリドーマ細胞を用いて生産される、リステリア種 (*Listeria spp.*) の p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 3】

請求項 1 のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 K C T C 1 0 4 3 1 B P 。 10

【請求項 4】

請求項 2 のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 K C T C 1 0 4 3 2 B P 。

【請求項 5】

請求項 1 のモノクローナル抗体を試料サンプルと接触させリステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質とモノクローナル抗体の抗原-抗体複合体存在を調べることを特徴として、リステリアモノサイトゲネス汚染を検出する方法。

【請求項 6】

抗原-抗体複合体を R I A 、 E L I S A 、 免疫蛍光法、色彩粒子結合法、または化学発光物質結合法で検出する請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 のモノクローナル抗体に捕獲された抗原に結合する第 2 抗体として請求項 2 のモノクローナル抗体を使って検出する請求項 5 または 6 に記載の方法。 20

【請求項 8】

請求項 1 のモノクローナル抗体を含むことを特徴とするリステリアモノサイトゲネス汚染を検出するためのキット。

【請求項 9】

キットは E L I S A (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用いる請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

キットは免疫クロマトグラフィ法を用いる請求項 8 に記載のディップスティックキット。 30

【請求項 11】

請求項 1 のモノクローナル抗体に捕獲された抗原に結合する第 2 抗体として請求項 2 のモノクローナル抗体を使用する請求項 8 ないし 10 のうちいずれか 1 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はリステリアモノサイトゲネスによる感染有無及び食品における汚染有無を迅速に確認するためのもので、リステリアモノサイトゲネス p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体、これを生産するハイブリドーマ細胞、このようなモノクローナル抗体を含む試験キット及びこのようなモノクローナル抗体を使ってリステリアモノサイトゲネスを検出する方法に関する。 40

【背景技術】

【0002】

リステリア (*Listeria*) の菌種はグラム陽性の通性嫌気性桿菌として自然界に幅広く分布している。リステリア種 (*Listeria spp.*) にはリステリアモノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、*Listeria ivanovii*、*Listeria innocua*、*Listeria seeligeri*、*Listeria welshimeri* 及びリステリアグライイ (*Listeria grayi*) などの多数の種があり、このうちリステリアモノサイトゲネスだけがヒトに病原性があり、動物に病原性のある菌株はリステリアモノサイトゲネスと *Listeria ivanovii* である。

【0003】

特に、リステリアモノサイトゲネスは冷蔵保存を要する食品に汚染される場合低温保存過程で長い間生存及び増殖が可能なので、冷蔵保存食品を媒介にした食中毒発生の主な原因菌になっている。さらに、この細菌によるリステリア感染症(Listeriosis)は重症に進む場合敗血症及び脳髄膜炎を引き起こし妊産婦の流産を引き起こす。新生児、高齢者、妊産婦及び免疫欠乏患者が特に危険であり、感染症を引き起こした患者では30%に至る高い死亡率を示す。このようなリステリア感染症の発生は食肉及び食肉加工品、野菜、乳化工品などのような食品が主要感染経路であると知られている。従って、リステリア症を予防するためにリステリアモノサイトゲネスによる食品の汚染有無を迅速に診断する必要がある。

【0004】

現在、病院及び産業体(食品会社、食肉会社及び乳加工会社)などで使用できるリステリア同定方法としては色々の生化学的検査法を使用する伝統的な方法があるが、長時間と手間がかかる非効率的な方法である。

【0005】

リステリアモノサイトゲネスによる感染有無及び食品における汚染有無を迅速に確認するための診断方法として重合酵素連鎖反応(PCR)法のような分子生物学的方法が用いられているが、技術力と精度が求められるため、実際臨床及び産業的に適用し難い方法である。また、酵素免疫法(EIA:Enzyme immunoassay)のような免疫学的方法が多用されているが、非特異性が現れるので不正確な検査結果が得られたり、追加確認試験が必要な場合が発生する。

【0006】

リステリア菌を迅速に検出するためのキットとしては、PCR技法、核酸ハイブリッド化分析法を用いた非放射活性DNAプローブキット、免疫検定法を用いたキットなどが知られており、また免疫クロマトグラフィ法を用いたディップスティック(dip-stick)方法で開発された製品もあるが、これらキットの全てはリステリアモノサイトゲネスだけを特異的に検出できないか、全てのリステリア種が検出される短所を持っている。

【0007】

リステリアモノサイトゲネスに対するモノクローナル抗体の生産が困難だったので、前記菌株を選択的に認知するモノクローナル抗体を使用したELISAまたはディップスティック検出キットが開発できなかった。これは、リステリアモノサイトゲネス菌株全体を抗原として使用したり一部特定抗原を使用した場合もリステリアモノサイトゲネスについてだけ特異なモノクローナル抗体が生産されなかったためである。

【0008】

リステリア種(*Listeria* spp.)に共通に存在するmurein hydrolases酵素であるp60はリステリアが細胞分裂のために分泌するエッキソ(exo)酵素であって、本発明の前、p60の特定ペプチド、例えばpepA及びpepD(非特許文献1)を使ってポリクローナル抗体を製造したことがある。しかし、これは使用可能なポリクローナル抗体の低い力価とサンドイッチELISAシステムの不適切な適用によりその効果が微弱なので商用化するには足りない点があった。本発明者は前記pepA及びpepDペプチド部位と他の部位に特異的に結合して(実施例4、図4a)リステリアモノサイトゲネスだけを選別的に認知できる新規なモノクローナル抗体を製造した。

【0009】

このような背景下で、本発明者はリステリア属(genus)に共通に存在するmurein hydrolases酵素p60のうちリステリアモノサイトゲネスのp60の特異的抗原決定基を認知するモノクローナル抗体を製造した。

【非特許文献1】Bubert A. et al., Appl. Environ Microbiol, 60(9)、3120-7、1994

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

10

20

30

40

50

本発明は受託番号 K C T C 1 0 4 3 1 B P のハイブリドーマ細胞により生産される、リステリアモノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) の p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体及び受託番号 K C T C 1 0 4 3 2 B P のハイブリドーマ細胞により生産される、リステリア種 (*Listeria spp.*) の p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明の他の目的は前記モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞を提供する。

【 0 0 1 2 】

本発明のさらに他の目的は、前述したようなリステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を含む、リステリアモノサイトゲネス汚染を検出するための試験キットを提供する。

10

【 0 0 1 3 】

本発明のさらに他の目的は、前述したようなリステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体を試料サンプルと接触させリステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質とモノクローナル抗体の抗原-抗体複合体の存在を調べることの特徴として、リステリアモノサイトゲネス汚染を検出する方法を提供する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 4 】

本発明の試験キットは、望ましくは E L I S A 用キットまたは免疫クロマトグラフィを用いたディップスティックである。

20

【 0 0 1 5 】

前記試験キットにおいて、リステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体に捕獲された抗原に結合する第 2 抗体は望ましくはリステリア種の p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【 0 0 1 6 】

前記検出方法において、抗原-抗体複合体は、望ましくは R I A 、 E L I S A 、 免疫蛍光法、色彩粒子結合法または化学発光物質結合法で検出する。

【 0 0 1 7 】

前述した検出方法において、リステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体に捕獲された抗原に結合する第 2 抗体は望ましくはリステリア種の p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体である。

30

【 発明の効果 】

【 0 0 1 8 】

本発明はリステリアモノサイトゲネスだけを選別的に認知することにより、抗体を使用して人間に病原性である菌により汚染された食品の汚染有無を迅速に検定しうる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 9 】

本発明はリステリアモノサイトゲネスを特異的に検出するモノクローナル抗体に関する。

40

【 0 0 2 0 】

具体的に、一つの形態として本発明は受託番号 K C T C 1 0 4 3 1 B P のハイブリドーマ細胞により生産される、リステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体に関する。

【 0 0 2 1 】

また、本発明は受託番号 K C T C 1 0 4 3 2 B P のハイブリドーマ細胞により生産される、リステリア種 (*Listeria spp.*) の p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体に関する。

【 0 0 2 2 】

50

本願において使用された用語"モノクローナル抗体"とは、当該分野に公知の用語であって、単一抗原性部位について指示される高度の特異的な抗体を意味する。通常、相異なる決定基(エピトープ)について指示される相異なる抗体を含むポリクローナル抗体とは違って、モノクローナル抗体は抗原状の単一決定基について指示される。モノクローナル抗体は抗原-抗体結合を用いる診断及び分析学的分析法の選択性と特異性を改善させる長所があり、またハイブリドーマ培養により合成されるため、他の免疫グロブリンにより汚染されない他の長所を有する。

【0023】

本発明のモノクローナル抗体は p 6 0 を免疫原にして動物を免疫化した後、免疫化された動物の脾臓細胞を骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマを生成し、リステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質と特異的に結合するハイブリドーマを選別してこれより製造した抗体である。

10

【0024】

具体的に、本発明ではモノクローナル抗体製造に組換え p 6 0 タンパク質を免疫原として使用したし、これは公知の塩基配列 (Andreas B.、 et al.、 J. Bacteriol.、 174 : 8166-8171、 1992) を用いて当分野の通常の方法において P C R 増幅産物を p E T - 2 1 a ベクトルに挿入し、このベクトルを Escherichia coli で発現させ精製して製造した。精製された組換え p 6 0 タンパク質を免疫原としてマウスを免疫化させ、これより脾臓細胞を分離した後骨髄腫細胞 P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 と融合させた後 E L I S A 及びウェスタンブロット試験で p 6 0 タンパク質について抗体活性が高いハイブリドーマを選別した後、これを再び培養して再び E L I S A 及びウェスタンブロット試験で陽性ハイブリドーマ p 6 0 0 7 及び 6 0 1 7 を選別した。前記ハイブリドーマの培養上澄液を使用した E L I S A 及びウェスタンブロット試験結果、ハイブリドーマ p 6 0 0 7 だけがリステリアモノサイトゲネスを選別的に認知した。前記選別したハイブリドーマを動物腹腔内に注入し、注入後一定期間が経過した後回収した動物の腹水からモノクローナル抗体を分離した。

20

【0025】

精製されたモノクローナル抗体を使ってサンドイッチ及び直接的 E L I S A、ウェスタンブロット試験を通してそれぞれのモノクローナル抗体を糾明した。本願において使用された用語"モノクローナル抗体 p 6 0 0 7"はハイブリドーマ p 6 0 0 7 により分泌されるモノクローナル抗体であり、用語"モノクローナル抗体 p 6 0 0 1 7"はハイブリドーマ p 6 0 1 7 により分泌されるモノクローナル抗体である。

30

【0026】

サンドイッチ E L I S A 及びウェスタンブロット試験結果、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 がリステリアモノサイトゲネスだけを選別的に認知するモノクローナル抗体と判明されたし、モノクローナル抗体 p 6 0 1 7 はリステリア種を選別的に認知するモノクローナル抗体として判明された(図 1)。

【0027】

前述したようにリステリアモノサイトゲネスだけを選別的に認知することと確認されたモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 及びリステリア種を選別的に認知することと確認されたモノクローナル抗体 p 6 0 1 7 は食品から分離された 3 3 個のリステリアモノサイトゲネス菌株の全てを選別的に認知した(図 2 b 及び図 2 c)。

40

【0028】

また、本発明のモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 及び p 6 0 1 7 が p e p A 及び p e p D ペプチドを認知するか否かを直接的 E L I S A で試験した。本発明のモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 及び p 6 0 1 7 は p e p A 及び p e p D と結合しなかったし、これより本発明のモノクローナル抗体は p e p A 及び p e p D のエピトープを用いないことと確認された(図 4 a)。p e p A / p e p D の競争(competition)をサンドイッチ E L I S A で検証した場合も、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 が p e p A と p e p D のエピトープを用いるとすれば p e p A と p e p D の添加量変化により O D 値が変わるべきであるが、ペプチド添加

50

量の変化について差がなく飽和されたOD値を示したため、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 は p e p A と p e p D のエピトープを利用しないことと確認された(図 4 b 及び図 4 c)。

【 0 0 2 9 】

本発明のリステリアモノサイトゲネスを選別的に認知するモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 を生産するハイブリドーマ p 6 0 0 7 は K C T C (Korean Culture for Type Cultures) に 2 0 0 3 年 2 月 2 1 日付けにて受託番号 K C T C 1 0 4 3 1 B P として寄託され、リステリア種を選別的に認知するモノクローナル抗体 p 6 0 1 7 を分泌するハイブリドーマ p 6 0 1 7 は K C T C に 2 0 0 3 年 2 月 2 1 日付けにて受託番号 K C T C 1 0 4 3 2 B P として寄託された。

10

【 0 0 3 0 】

従って、他の様態として本発明はモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 を生産するハイブリドーマ p 6 0 0 7 (K C T C 1 0 4 3 1 B P) に関する。また、本発明はモノクローナル抗体 p 6 0 1 7 を生産するハイブリドーマ p 6 0 1 7 (K C T C 1 0 4 3 2 B P) に関する。

【 0 0 3 1 】

本発明に係るモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 は、標準菌株の免疫学的検定で接近可能な抗原決定因子との反応性に加えて、食品から分離されたリステリアモノサイトゲネスについても高い特異性と感度を有するのでリステリアモノサイトゲネスを特異的に検出するのに適している。

【 0 0 3 2 】

従って、さらに他の様態として本発明はリステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 を試料サンプルと接触させリステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質とモノクローナル抗体の抗原-抗体複合体存在を調べることにより、リステリアモノサイトゲネスの汚染を検出する方法に関する。

20

【 0 0 3 3 】

本願において使用された用語 "抗原-抗体複合体" は試料中のリステリアモノサイトゲネスの存否を確認するための p 6 0 タンパク質抗原とこれを認知するモノクローナル抗体の結合物を意味する。

【 0 0 3 4 】

本発明の検出方法では試料サンプルとして 5 ないし 1 5 分間加熱した培養上澄液を使用する。

30

【 0 0 3 5 】

本発明のモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 とリステリアモノサイトゲネスの p 6 0 タンパク質との抗原-抗体複合体の検出は当業界において公知の方法、例えば分光学的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、電気的、吸光的、化学的、その他の方法を用いられる。

【 0 0 3 6 】

本発明の目的上、抗原-抗体複合体の検出方法としては、放射能免疫分析法 (R I A)、酵素免疫分析法 (E L I S A)、免疫蛍光法、色彩粒子結合法、化学発光物質結合法などが望ましく用いられる。

【 0 0 3 7 】

抗原-抗体複合体の検出は直接的または間接的に標識された抗体の使用を伴い、使用可能な検出標識としては、例えばバイオチン-ストレプトアビジン結合体、蛍光染料(例:フルオレセイン、テキサスレッド、ロダミン、グリーン蛍光タンパク質など)、放射性標識物(例:³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴Cまたは³²P)、酵素(例:HRP、アルカリ性フォスファターゼ及びその他 E L I S A で一般に使われるもの)、及び色彩標識物、例えばコロイド状金またはカラーガラスまたはプラスチック(例:ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)ビーズを含む。このような標識物の使用を記述している文献[U. S. Pat. Nos. 3, 817, 837; 3, 850, 752; 3, 939, 350; 3, 996, 345; 4, 277, 437; 4, 275, 149; and 4, 366, 241; Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Euge

40

50

ne Oreg.)]を参照する。

【0038】

本発明において抗原-抗体複合体の検出に特に望ましい方法はE L I S Aである。E L I S A検出方法により、試料サンプルは固体支持体、例えばマイクロタイタプレート、メンブレイン、テストストリップなどにコーティングされた本発明のモノクローナル抗体と接触される。具体的な一例として、マイクロタイタプレートのウェルを本発明のモノクローナル抗体でコーティングし、占有されない(nonoccupied)結合部位を例えばB S Aで遮断した後、コーティングされたプレートのウェルを試料サンプルとインキュベーションし、次いで抗原-抗体複合体の存在を決定できる。抗原-抗体複合体の存在は抗原-抗体複合体の抗原について特異的な抗体、例えばリステリアモノサイトゲネスのp 6 0タンパク質に特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用したり、リステリア種のp 6 0タンパク質に特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使って確認できる。前記モノクローナルまたはポリクローナル抗体は検出標識を有することができ、検出標識を有しない場合これらモノクローナルまたはポリクローナル抗体を検出できるもう一つの抗体を処理して確認できる。

10

【0039】

本発明の検出方法において、リステリアモノサイトゲネスを選別的に認知するモノクローナル抗体p 6 0 0 7と結合された抗原に結合する第2抗体としては望ましくはリステリア種を選別的に認知するモノクローナル抗体が使用でき、特にp 6 0 1 7が望ましい。

【0040】

一つの例として、モノクローナル抗体p 6 0 0 7と試料を反応させ、次いでリステリア種のp 6 0タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体p 6 0 1 7を結合させこれより検出標識信号を測定したり、これら複合体に検出可能な信号を生成できる標識を有する抗体を添加してこれより検出標識信号を測定してリステリアモノサイトゲネスを検出できる。

20

【0041】

また、本発明において抗原-抗体複合体の検出に特に望ましい他の方法としてはモノクローナル抗体をコロイド状金粒子と結合させる金粒子結合法が挙げられる。

【0042】

他の様態として、本発明は前述したようなリステリアモノサイトゲネスのp 6 0タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体p 6 0 0 7を含む、リステリアモノサイトゲネスの汚染を検出するための試験キットに関する。

30

【0043】

本発明のリステリアモノサイトゲネスの検出試験キットに使用されるモノクローナル抗体は、この抗体がリステリアモノサイトゲネスを選別的に認知できる限り、モノクローナル抗体の断片も使用できる。このような抗体断片はF(ab')₂、Fab、Fab'、Fv断片などを含める。

【0044】

本発明のリステリアモノサイトゲネス検出試験キットにはリステリアモノサイトゲネスを選別的に認知するモノクローナル抗体p 6 0 0 7またはその断片及び免疫学的分析に使用される道具/試薬が含まれる。

40

【0045】

免疫学的分析に使われる道具/試薬としては適した担体、検出可能な信号を生成できる標識、溶解剤、洗浄剤などが含まれる。また、標識物質が酵素の場合は酵素活性を測定できる基質及び反応停止剤を含める。

【0046】

適した担体としては、これに限られないが、可溶性担体、例えば当分野において公知の生理学的に許容される緩衝液、例えばP B S、不溶性担体、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサカライド、ラテックスに金属をメッキした磁性微粒子のような高分子、

50

その他紙、ガラス、金属、アガロース及びこれらの組合わせでありうる。

【0047】

本発明の検出方法及びキットに使用するための検定システムはこれに限られないが、ELISAプレート、ディップスティックデバイス、免疫クロマトグラフィ試験ストリップ及び放射分割免疫検定デバイス、及びフロー-スロー(flow-through)デバイスなどを含む。

【0048】

本発明のリステリアモノサイトゲネス検出のための試験キットは望ましくはELISAキットまたは免疫クロマトグラフィを用いたディップスティックである。

【0049】

本発明の試験キットで、リステリアモノサイトゲネスを選別的に認知するモノクローナル抗体p6007と結合された抗原に結合する第2抗体としては、望ましくはリステリア種を選別的に認知するモノクローナル抗体が使用でき、特にモノクローナル抗体p6017が使用できる。

【0050】

本発明は下記の実施例に基づきさらに具体的に説明する。しかし、例示された実施例はただ本発明を説明するためのものであり、本発明はこれに限られない。

【実施例1】

【0051】

: PCR及びクローニング

リステリアモノサイトゲネスのp60タンパク質のiap(invasion-associated protein)遺伝子(Andreas, B. et al., J. Bacteriol., 174:8166-8171, 1992)をクローニングするために先にこの遺伝子をPCTを通して増幅した。

【0052】

プライマー、すなわちiap-F-pET(5'-GGG AAT TCC ATA TGA GCA CTG TAG TAG TCG AAG CT-3')(配列1)及びiap-R-pET(5'-GCC GCT CGA GTA CGC GAC CGA AGC CAA C-3')(配列2)をシグナル配列を除いた全ての部分が含まれるようにデザインしたし、pET-21aベクトルの特性によりストップコドンも除外した。また、クローニングのために順方向プライマーにはNdeI、逆方向プライマーにはXhoI制限酵素部位を添加した。PCRは全体ボリュームを50µlにしたし、リステリアモノサイトゲネスの染色体DNA10ng、10×fu緩衝液(Stratagene)5µl、クローニングされたPfuポリマラーゼ1U、0.2mM dNTP、それぞれ10pmolのプライマーを配合してPCRした。さらに高い信頼度(fidelity)のため、Pfuポリマラーゼ(Stratagene)を使用した。PCRはPTC-150(MJ Research)を使って30サイクル間94 1分、55 1分、72 2分の条件にした。

【0053】

PCR完了後、PCR産物をQIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した。精製されたDNAはクローニングのためにNEB緩衝液4(New England Biolabs)で制限酵素NdeIとXhoI(New England Biolabs)を処理した。制限酵素処理後、1%アガロースゲルで電気泳動しGenecleanスピキット(Q-bio gene)を用いてDNAを精製した。精製された挿入DNAをNdeIとXhoIで処理したpET-21aベクトルとT4DNA結合緩衝液でT4DNAリガーゼ(NEB)で結合してイー・コライ(E. Coli)DHObにエレクトロポレーションした。クローニング有無はプラスミドスピキット(Genemid)でミニプレップして確認した。

【0054】

pETシステムの発現のためにクローニングされたベクトルを発現菌株イー・コライBL21で形質転換し再びミニプレップを介して確認した。クローニングされたイー・コライをプレートで一晩中大きくした後、一つのクローニーを5ml LBamp肉汁培地に接種して約OD600が1.0日まで培養した。この培養液5mlを新たな500ml LBamp肉汁培地に加え2ないし3時間培養してOD600が0.5ないし1.0にな

10

20

30

40

50

ればIPTGを1mMされるよう加えてタンパク質の発現を誘導した。20で一晩中誘導した後、培養液を遠心分離して上澄液を捨て、イー・コライだけを得た。以後のタンパク質精製はHis・Bind精製キット(Novagen)を使って行なった。細胞パレットを1/25体積の緩衝液(0.1% Triton X-100、50mM pH8.0 Tris-HCl)に浮遊させた後、リソザイム0.1mg/ml(Sigma)を入れ超音波処理してイー・コライを壊した。再び27000xgで30分間遠心分離した後、充填緩衝液でNiイオンを充填させ予め用意されたNTA-キレート化アガロースCL-6B(Peptron)カラムにこの上澄液を通過させた。タンパク質が吸着されたカラムを10倍カラム体積の結合緩衝液(5mM イミダゾール、0.5M NaCl、20mM pH7.9 Tris-HCl)と6倍体積の洗浄緩衝液(60mM イミダゾール、0.5M NaCl、20mM pH7.9 Tris-HCl)で非特異的に吸着されているタンパク質を除去した。最後に、溶出緩衝液(1mM イミダゾール、0.5M NaCl、20mM pH7.9 Tris-HCl)でカラムに結合されたp60を分離した。得られたp60をSDS-PAGEゲルを通して確認した。

【実施例2】

【0055】

：ハイブリドーマ細胞製造

2-1：抗体生成細胞

実施例1で製造したp60タンパク質をSDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)が含まれたゲルで電気電気泳動し(100µg)、ゲルの断片を切った後同じ体積の完全フロイントアジュバントが配合されたエマルジョンを製造した。前記エマルジョンを生後7週齢雌BALB/Cマウス5匹の腹腔内に注射した。1匹当たり20µgの抗原を注射し、総体積は400µlにした。2週後に不完全フロイントアジュバントと抗原を混合したエマルジョンを前記マウスの腹腔に注入した後、2週間後PBSに溶かした抗原を(10µg/mouse)腹腔内に注射して抗体生成を誘導した。抗体生成有無を確認するためにELISA及びウェスタンブロット検定を施して抗体を確認した後、細胞融合に入る3日前にマウスの尻尾静脈にPBSに溶かした抗原を再度注射した。汚染を防止するために全てのマウスを選択した領域で飼育した。

2-2：抗体生成細胞の確認及び選別

前記方法により免疫化されたマウスで血液試料を目(eye ball)から取得して1.5ml遠心分離チューブに入れて血清を遠心分離して(1800rpm、10分)抗体の生成有無を実験する前まで-20で保管した。

【0056】

p60タンパク質でELISA方法により抗体の生成を確認した後抗体生成細胞に対する融合に着手した。前記イー・コライで発現させたp60タンパク質を0.5µg/ウェルで96-ウェルプレートにコーティングした後一晩中反応させた。PBST(PBS buffer、0.05% Tween20)で3次洗浄した後1%BSAで反応を終了した。再びPBSTで3次洗浄した後血清を1:500ないし2000まで希釈して処理した後1時間反応させた。PBSTで3次洗浄した後、抗マウスIgG結合HRPを処理し1時間反応させた。次いで、PBSTで3次洗浄した後、100µl OPD(Sigma)を処理した後20分間発色させた。15µl反応終了溶液(8N硫酸)を添加した後、492nm波長で吸光度を測定した。

2-3：ハイブリドーマ細胞製造

抗体生成が確認された後マウスを犠牲させ抗体生産脾臓細胞を分離し、これと骨髓腫細胞(myeloma cell)P3X63Ag8.653を融合方法(Cesar Milstein and Georges Kohler's method)から由来した変形された方法(Method in enzymology、vol.73、p3. Academic Press、New York)により融合した。

【0057】

マウスのP3X63Ag8.653細胞を培養トレイに10%FBS RPMI164

0 培地を用いて最適成長期に至るよう維持させた。細胞融合の一日前に P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 細胞を $3 \cdot 10^5$ 細胞/ml で希釈して次の日 50 ml を取って 3 分間 $400 \times g$ で遠心分離した。無血清培地で 2 回洗浄した後、 $1 \cdot 10^7$ 細胞/ml になるよう濃度を合わせた。次いで、マウスを頸椎離脱 (cervical dislocation) により犠牲させ脾臓を取得し、これをメッシュ容器に入れ細胞を一つずつ分離させた。この際、全ての培地は無血清で使用した。完全に分離された抗体生産細胞を 5 分間 $400 \times g$ で遠心分離した後、無血清培地で 2 回洗浄し 10 ml の培地に懸濁させた。リン球を血球計数器 (haemocytometer) で計数して 10^8 のリン球を 1×10^7 P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 細胞 (10:1) と混ぜて 3 分間 $400 \times g$ で遠心分離した。37 で前処理された 50% P E G (Sigma) 1 ml 溶液を 1 分にかけてゆっくり滴下しつつ混ぜた。生成された融合混合液を R P M I 1 6 4 0 培地で 4 ml / 3 分、次いで 5 ml / 4 分、次いで 20 ml / 5 分にかけて希釈し 3 分間 $400 \times g$ で遠心分離した後、H A T 選択培地 35 ml に細胞を懸濁させた。100 μ l の懸濁液を一日前に供給細胞 (feeder cell、マウスの腹腔で P B S で分離した大食球) をコーティングした 96-ウェルプレートに分注して 37、5% C O₂ 培養器で 7 ないし 14 日間培養した。

2-4: ハイブリドーマの選別及び分離

前記実施例で収得した培養上澄液を取って直接的 E L I S A 方法で p 6 0 に対する陽性クローンを選別した後、ウェスタンブロットで陽性クローンであることを再び確認した。多数のハイブリドーマのうち p 6 0 タンパク質について抗体活性が高い (O D 1 . 2 以上) 10 種のハイブリドーマ細胞を得た。

【0058】

このように確認された陽性クローンを一連の過程で希釈して一つの融合細胞を 96-ウェルプレートの 1 ウェル当たり 0 . 5 細胞ずつ分注して 7 日間培養した後、E L I S A とウェスタンブロットで検証した。これより最終陽性クローンを検証して抗体の性質と認知部位により p 6 0 0 7、p 6 0 1 3、p 6 0 1 7、p 6 0 3 0 及び p 6 0 3 3 を分離した。最終的に検証された融合細胞を 24-ウェルに移して規模を少しずつ大きくして T 2 5 フラスコに最終的に移転させ分離培養した。

【0059】

選別された p 6 0 タンパク質抗体を生産するハイブリドーマのうちハイブリドーマ p 6 0 0 7 及び p 6 0 1 7 を K C T C (Korean Collection for Type Cultures、韓国大田広域市儒成区魚隠洞 5 2 番地) に 2003 年 2 月 21 日付けにてそれぞれ K C T C 10431 BP 及び K C T C 10432 BP として寄託した。

【実施例 3】

【0060】

: 抗体生産及び分離

前記実施例 2 で得られた各抗体別陽性クローンをを用いてマウス腹腔培養液を製造し、これより抗体を分離した。各抗体別に生産ハイブリドーマ細胞が違うだけ、腹腔培養液製造及び分離方法は同様に行なった。

【0061】

前記実施例 2 で区別された抗体の腹腔培養液を得るため、E L I S A 方法及びウェスタンブロット方法で確認されたモノクローナル抗体をそれぞれ生成する陽性クローン $3 \cdot 10^6$ 細胞を 1 週間前にプレスチンを予め処理した B A L B / C マウスの腹腔内に注射した。10 ないし 15 日後に 3 ないし 10 ml の腹水を抽出した。モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 及び p 6 0 1 7 の両方同一な方法で製造したし、但し最終検証段階で五つに分かれており、それぞれの抗体を作るために独立的に腹腔培養液を収得したし、各抗体を含む腹腔培養液から抗体の分離を次のような方法で行なった。

【0062】

前記得た腹水をタンパク質 A 親和性カラム (Amersham Bioscience、HiTrap rProtein A FF) を通じて精製した。すなわち、タンパク質 A カラムを 10 倍体積の D P B S で 1 ml

/分の速度で均質化させてから腹水を通過させた。この際速度はA K T A精製器(Amersham Bioscience)により1 m l /分で通過させ、溶出は1 0 0 m Mグリシン(p H 3 . 0)で行なった後、1 / 1 0 倍量の2 M Tris(p H 8 . 0)で中性化させた。この際、溶出速度は1 m l /分にしてそれぞれの抗体を精製及び分離した。

【実施例4】

【0063】

：モノクローナル抗体を使用したE L I S A及びウェスタンブロット試験

前記実施例3において分離されたモノクローナル抗体p 6 0 0 7及びp 6 0 1 7についてE L I S A及びウェスタンブロットを行ない、これら抗体が公知のペプチドp e p A (Ser-Thr-Pro-Val-Ala-Pro-Thr-Gln-Glu-Val-Lys-Lys)(配列3)及びp e p D (Gln-Gln-Gln-Thr-Ala-Pro-Lys-Ala-Pro-Thr-Glu)(配列4)を認知するのかを観測した。 10

【0064】

捕獲抗体としてポリクローナル抗体1 0 0 n gを使用した直接的E L I S A分析結果、総1 9個のリステリア菌のうち一つのリステリアグレイを除いたリステリア菌種の全てを検出するポリクローナル抗体がリステリアモノサイトゲネスを検出するサンドイッチE L I S Aで第2抗体として使用可能であることを確認した(図1 a)。また、ポリクローナル抗体を使ってウェスタンブロット検定した結果、同様にリステリア菌のうちリステリアグライを除いたリステリア菌種の全てを検出することを確認した(図1 a)。

【0065】

捕獲抗体として2 0 0 n gのモノクローナル抗体p 6 0 0 7を使用し、第2抗体として 1 0 0 n gのポリクローナル抗体を使用したサンドイッチE L I S A分析結果、総1 9個のリステリア菌のうちリステリアモノサイトゲネスを除いた6個のリステリア菌はブランクのO D値が0 . 3に似た水準であり、1 3個のリステリアモノサイトゲネスの場合O D値が0 . 9以上水準であった。このような結果からモノクローナル抗体p 6 0 0 7がリステリアモノサイトゲネスを特異的に検出するのに適していることが確認された(図1 b)。また、モノクローナル抗体p 6 0 0 7を使ってウェスタンブロット検定した結果、同様にリステリア菌のうちリステリアモノサイトゲネス菌株だけを検出することを確認した(図1 b)。 20

【0066】

また、捕獲抗体としてリステリア菌種の全てを検出する2 0 0 n gのモノクローナル抗体p 6 0 1 7を使用し、第2抗体として1 0 0 n gのポリクローナル抗体を使用したサンドイッチE L I S A分析結果、p 6 0 1 7のモノクローナル抗体はListeria grayi、Listeria welshimeri、Listeria innocua、Listeria ivanovii、リステリアモノサイトゲネス、Listeria seeligeriの全てを検出した(図1 c)。このような結果はp 6 0 1 7がp 6 0 0 7に対する第2抗体として適していることを示す。また、モノクローナル抗体p 6 0 1 7を使ってウェスタンブロット検定した結果、同様にモノクローナル抗体p 6 0 1 7はリステリアモノサイトゲネスだけではなくListeria ivanoviiまでも検出したので、p 6 0 0 7に対する第2抗体として適していることを確認した(図1 c)。 30

【0067】

また、食品から分離された総3 3個のリステリアモノサイトゲネス菌株について捕獲抗体としてポリクローナル抗体1 0 0 n gを使用した直接的E L I S A分析結果、総3 3個のリステリアモノサイトゲネス菌を全て検出したため、図1 aのようにポリクローナル抗体がリステリアモノサイトゲネスを検出するサンドイッチE L I S Aに第2抗体として使用できることを確認した(図2 a)。また、ポリクローナル抗体を使ってウェスタンブロット検定した結果、同様に全てのリステリアモノサイトゲネス菌の全部を検出することを確認した(図2 a)。 40

【0068】

そして、捕獲抗体として2 0 0 n gのp 6 0 0 7とp 6 0 1 7及び第2抗体として1 0 0 n gのポリクローナル抗体を使用し、食品から分離された総3 3個のリステリアモノサイトゲネス菌株をB H I肉汁培地で3 7 で一晩中培養した後遠心分離(3 0 0 0 r p m 50

、15 min)し、その上澄液をお湯に10分間処理した菌液を100 µl/wellずつ接種して行なったサンドイッチELISA分析した結果、食品菌株の全てについて陽性であり、100%の感度と特異性を示した(図2b及び図2c)。このようなデータはp6007とp6017の特徴的な能力をもう一度確認している。

【0069】

また、p6007とp6017との間に存在する親和力または相違点を調べるためにウェスタンブロットとイメージ分析による結合動力学定量法を行なった。図6aに示したように、p6007はリステリアモノサイトゲネスp60の少量、5 ngであっても容易く検出したが、*Listeria innocua* p60については5 ngの10倍になる50 ngを添加してこそやっと検出できた。50 ngが添加された後リステリアモノサイトゲネスと *Listeria innocua* p60が結合された濃度結果を比較してみると、100倍の差異があることが分かる。一方、図6bにおいてp6017はリステリアモノサイトゲネスと *Listeria innocua* p60との間にその効果の差異が大きい。このようなデータは培地上澄液の典型的な濃度でp6007がリステリアモノサイトゲネスp60と他のリステリア種p60を区別できることを示す。

10

【0070】

一方、モノクローナル抗体p6007とp6017がpepA及びpepDを認知するか否かを直接的ELISA方法で調べた。コーティング抗原としては100 ngのリステリアモノサイトゲネスの組換えp60、100 ngの*Listeria innocua*の組換えp60、500 ngのpepA、500 ngのpepD、500 ngの陰性対照群ペプチドを使用し、捕獲抗体としては500 ngのポリクローナル抗体、500 ngのモノクローナル抗体p6007、500 ngのp6017を使用した。その結果、図4aに示したように、ポリクローナル抗体だけがpepAと結合したし、モノクローナル抗体p6007とp6017の全てがpepA及びpepDと結合しないので、クローン抗体p6007とp6017はpepAとpepDのエピトープを用いないことと確認された。

20

【0071】

また、捕獲抗体として200 ngのモノクローナル抗体p6007を使用し、サンプルとして100 ngのリステリアモノサイトゲネスの組換えp60を使用し、第2抗体として、図4bの場合ポリクローナル抗体を使用しつつそれぞれ1 µgないし1 ngのpepA及びpepDを陰性調節ペプチドを添加しペプチドGly Asn Thr Phe Ser Leu Glu Glu Val Asp Lys Leu Gly Cys Arg Asp Thr Arg Leu Leu(配列5)を対照ペプチドとして使用し、図4cの場合、ピオチニル化したモノクローナル抗体p6017にそれぞれ1 µgないし1 ngのpepA及びpepDを陰性調節ペプチドとして添加しペプチドGly Asn Thr Phe Ser Leu Glu Glu Val Asp Lys Leu Gly Cys Arg Asp Thr Arg Leu Leu(配列5)を対照ペプチドとして使用して、pepA/pepDの競争(competition)をサンドイッチELISAで検証した。その結果、モノクローナル抗体p6007がpepAとpepDのエピトープを用いるとpepAとpepDの添加量変化によりOD値が変るべきであるが、図4b及び図4cに示したようにペプチド添加量の変化について差異がなくて飽和されたOD値を示したので、図4aのようにモノクローナル抗体p6007はpepAとpepDのエピトープを用いないことと確認された。従って、サンドイッチELISAキットに適用時モノクローナル抗体p6007及びp6017及びポリクローナル抗体はpepAとpepDをエピトープとして使用しないことと見られる。

30

40

【実施例5】

【0072】

: リステリアモノサイトゲネス検出ELISAキット

リステリアモノサイトゲネスを検出するためのELISA検定キットを製造するためにリステリアモノサイトゲネスに特異的なp6007モノクローナル抗体とリステリア種に特異的なp6017モノクローナル抗体を用いた。

【0073】

具体的に次のように行なった。

50

【0074】

捕獲抗体として精製したp6007モノクローナル抗体を50mM炭酸塩緩衝溶液(pH9.6)に5 μ g/mlで稀釈して100 μ lずつ96ウェルプレート(0.5 μ g/well)に分注し一晩中4℃で反応させた。反応液を捨てて0.05%Tween20が含まれたPBSで3回洗浄した。

【0075】

プレートの空いた空間を遮断するために0.05%Tween20と1%BSAが含まれたPBS200 μ lを各ウェルに入れ37℃で1時間反応させた後、再び3回洗浄した。

【0076】

サンプルはリステリア増菌培地で一晩中増菌して1mlを3000rpmで10分間遠心分離した後、上澄液を10分間沸したものを使用した。遮断したプレートに用意されたサンプルを各ウェルに100 μ lずつ加えた。この際実験の有効性を評価するために陽性対照群と陰性対照群をとともに施した。プレートを37℃で1時間反応させた。反応液を捨てて、3回洗浄した。

10

【0077】

2次抗体としてモノクローナル抗体p6017を0.1%BSAが含まれたPBSに1 μ g/mlで稀釈して各ウェルに100 μ lずつ入れて37℃で1時間反応させた。反応が終わった後、3回洗浄した。

【0078】

吸光度を測定して、陽性対照群が1.5ないし2.0になり陰性対照群が0.1以下になれば正常的な反応と見做した。サンプルの値が1.5以上ならば陽性で見做し、リステリアモノサイトゲネスの菌を分離及び同定し、0.1以下になると陰性で見做してサンプルにリステリアモノサイトゲネスが汚染されないことと見なした。

20

【0079】

捕獲モノクローナル抗体の量を相違にしてサンドイッチELISAを行なった結果が図3aに示されている。具体的には、図3aは捕獲抗体としてモノクローナル抗体p6007の量を200ng、500ng、1 μ g、2 μ gに変化させ行なったサンドイッチELISA結果を示す。この際、第2抗体としては100ngのビオチニル化したモノクローナル抗体p6017の反応条件(検出標識物:ストレプトアビジン-HRP)下で使用した。リステリアモノサイトゲネスを選別的に認知するp6007を捕獲抗体として使用したのでリステリアモノサイトゲネスだけを検出したし、モノクローナル抗体p6007量が増加することによりOD値が増加した。その結果によれば、サンドイッチELISAキットに捕獲抗体p6007を500ngないし2 μ gの量として使用した時高いOD値を示した。

30

【0080】

リステリアモノサイトゲネスだけを選別的に認知するものとして確認されたモノクローナル抗体p6007は、前記リステリア菌株以外の他の菌株、すなわちエスケリキア、エンテロコックス、エンテロバクター、クレブシエラ、シュードモナス、スタヒロコッカス、ストレプトコックス、ビブリオ及びサルモネラ菌株は認知できなかった(図3b)。

【実施例6】

40

【0081】

: 免疫クロマトグラフィを用いたリステリアモノサイトゲネスの迅速診断

主要食中毒原因菌であるリステリアモノサイトゲネスを迅速にスクリーニングするための免疫クロマトグラフィを用いたディップスティックを製造するために、モノクローナル抗体p6007をコロイド状金(40nm)と結合させ、モノクローナル抗体p6017を捕獲抗体として使用し、抗マウスIgGを対照抗体として使用した。対照線にバンドが発生すれば有効な実験として見なし、二つのバンド、すなわち捕獲線と対照線にバンドが生ずると陽性で見なし、リステリアモノサイトゲネス菌を分離及び同定し、対照線だけでバンドが発生すれば陰性で見なししてリステリアモノサイトゲネスがないことと判断した。

【0082】

50

具体的に、リステリアモノサイトゲネスの組換え p 6 0 を試料として適用させた結果が図 5 a に示されている。ストリップ 1 ないし 7 はそれぞれ p 6 0 を 1 0 0 0 n g、5 0 0 n g、2 5 0 n g、1 2 5 n g、6 0 n g、3 0 n g、1 5 n g 使用した結果であり、ストリップ 8 は陰性対照群である。一方、陰性対照物として p 6 0 の代わりにリステリアモノサイトゲネス(ストリップ 0)及び多様な菌株(ストリップ 1 ないし 1 2)の培養上澄液を試料で適用させた結果が図 5 b に示されている。ストリップ 1 ないし 1 2 はそれぞれストレプトコックスピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)、*Shigella flexneri*、スタヒロコッカスオーリアス(*Staphylococcus aureus*)、*Pseudomonas aeruginosa*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterococcus faecalis*、エシェリキアコライ(*Escherichia coli*)、エンテロバクターアエロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、*Vibrio parahaemolyticus*、*Vibrio cholerae*、スタヒロコッカスエピデルミディス(*Staphylococcus epidermidis*)、*Salmonella typhi*)を使用した。

【 0 0 8 3 】

組換え p 6 0 及びリステリアモノサイトゲネスの培養上澄液の場合捕獲線にバンドが発生したが、陰性対照群の上澄液の場合は捕獲線にいずれのバンドが発生しなかった。従って、前記製造されたディップスティックが p 6 0 だけを選別的に認知できることを確認した。

【 0 0 8 4 】

前述した結果から、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 と p 6 0 1 7 の対がリステリアサイトゲネスの p 6 0 を選別的に認知するディップスティックに望ましく適用できる。

【 0 0 8 5 】

また、図 1 a において使用されたポリクローナル抗体(ラビット)も 2 次抗体として使用できる。

本実施例に用られた試験方法は次の通りである。

【 試験例 1 】

【 0 0 8 6 】

： サンドイッチ E L I S A 試験

- 1 . リステリアモノサイトゲネスを選別的に認知するモノクローナル抗体 (p 6 0 0 7 または p 6 0 1 7) を各ウェルに 1 0 0 n g / 1 0 0 μ l に分注し 3 7 で 2 時間 3 0 分間インキュベーションした。
- 2 . 0 . 0 5 % Tween 2 0 の P B S 溶液で各ウェルを 3 回ずつ洗浄した。
- 3 . 1 % B S A を 1 0 0 μ l ずつ分注し 3 7 で 1 時間インキュベーションして遮断した。
- 4 . 0 . 0 5 % Tween 2 0 の P B S 溶液で各ウェルを 3 回ずつ洗浄した。
- 5 . 抗原を各ウェルに 1 0 0 μ l ずつ分注し 3 7 で 1 時間インキュベーションした。具体的に、ブランクの場合 0 . 1 % B S A を分注し、陽性対照群の場合リステリアモノサイトゲネスから組換え p 6 0 を 1 0 0 n g / ウェルになるよう分注し、試験菌株の場合 5 m l の B H I (brain hert infusion; DIFCO 社) 肉汁培地で 1 8 時間 3 7 で培養した後 B H I 肉汁培地を遠心分離 (3 0 0 0 r p m、1 5 分) してその上澄液を各ウェルに分注した。
- 6 . 0 . 0 5 % Tween 2 0 の P B S 溶液で各ウェルを 3 回ずつ洗浄した。
- 7 . ポリクローナル抗体 (ラビット) またはモノクローナル抗体を各ウェルに 1 0 0 n g / 1 0 0 μ l ずつ分注し 3 7 で 1 時間インキュベーションした。
- 8 . H R P (horse radish peroxidase) - 結合抗ラビット抗体 (P B S T で 1 : 1 0 0 0 に希釈) を各ウェルに 1 0 0 n g / 1 0 0 μ l ずつ分注し、 3 7 で 1 時間インキュベーションした。
- 9 . 0 . 0 5 % Tween 2 0 の P B S 溶液で各ウェルを 5 回ずつ洗浄した。
- 1 0 . 発色試薬緩衝溶液 9 . 4 5 m l と 4 % O P D (o - フェニレンジアミン) 0 . 5 m l と H ₂ O ₂ 0 . 0 5 m l を混合した発色試薬を製造して各ウェルに 1 0 0 μ l ずつ分注し常温で 2 0 分間インキュベーションした。

【 0 0 8 7 】

【 表 1 】

発色試薬緩衝溶液	
試薬名	添加量
クエン酸(一水和物)	3.66 g
燐酸カリウム(K_2PO_4)	11.35 g
D. W	1000 ml

10

【 0 0 8 8 】

11. 停止溶液 8 N H_2SO_4 を各ウェルに 15 μ l ずつ分注した。

12. 492 nm で OD 値を測定した。

【 試験例 2 】

【 0 0 8 9 】

: 直接的 E L I S A 試験

1. 抗原を各ウェルに 100 μ l ずつ分注し、37 で 2 時間 30 分間インキュベーションした。

2. 0.05% Tween20 の P B S 溶液で各ウェルを 3 回ずつ洗浄した。

3. 1% B S A を 100 μ l 分注し 37 で 1 時間インキュベーションして遮断した。

4. 0.05% Tween20 の P B S 溶液で各ウェルを 3 回ずつ洗浄した。

5. 抗体または 1% B S A (ブラック) を各ウェルに 100 μ l ずつ分注し 37 で 1 時間インキュベーションした。6. H R P - 結合抗マウス抗体または H R P - 結合抗ラビット抗体 (P B S T で 10、000 で希釈) を 100 μ l ずつ分注し 37 で 1 時間インキュベーションした。7. 発色試薬緩衝溶液 9.45 ml と 4% O P D (o-フェニリンジアミン) 0.5 ml と H_2O_2 0.05 ml を混合した発色試薬を各ウェルに 100 μ l ずつ分注し常温で 20 分間インキュベーションした。

30

【 0 0 9 0 】

【 表 2 】

発色試薬緩衝溶液	
試薬名	添加量
クエン酸(一水和物)	3.66 g
燐酸カリウム(K_2PO_4)	11.35 g
D. W	1000 ml

40

【 0 0 9 1 】

8. 停止溶液 8 N H_2SO_4 を各ウェルに 15 μ l ずつ分注した。

9. 492 nm で OD 値を測定した。

【 試験例 3 】

【 0 0 9 2 】

: ウェスタンブロット試験

50

1. リステリア種を B H I 肉汁培地で一晩中 37 で培養して得た上澄液 250 μ l とブリリアントブルー R (brilliant blue R) を染料として使用したサンプル緩衝液 (X 6) 50 μ l をよく混合してお湯に 5 分間浸した後そのうち 20 μ l を取って 12% スルフェイト-ポリアクリレートゲル電気泳動 (SDS-PAGE) ゲルにローディングした。
2. 電気泳動が完了された後 4 で一晩中 N C (ニトロセルロース) 膜に移動させた。
3. P B S に 0.05% Tween 20 を添加した溶液で洗浄した。
4. 常温で 1 時間 5% 脱脂牛乳で遮断した。
5. P B S に 0.05% Tween 20 を添加した溶液で洗浄した。
6. ニトロセルロース膜を常温で 1 時間 10 ml の 5% 脱脂牛乳に抗体 10 μ l を混合した溶液に浸漬した。
7. P B S に 0.05% Tween 20 を添加した溶液で洗浄した。
8. ニトロセルロース膜を常温で 1 時間 HRP-結合された抗-マウス抗体または H R P -結合された抗ラビット抗体 (5% 脱脂牛乳で 1:10、000 で希釈) 10 ml に浸漬した。
9. SuperSignal (登録商標) WestPico Chemiluminescent Substrate (PIERCE キット) を使って発光させ化学発光計で発光を測定した。

10

【試験例 4】

【0093】

：ディップスティック試験

1. 金粒子 (gold particle; 40 nm) に結合させる p 6 0 0 7 モノクローナル抗体の最適濃度を決定してからコロイド状金に適した濃度の抗体を入れ 30 分間室温で回転させながら反応させた。30 分後、B S A を入れ 4 で一晩中反応させた。4 で 10000 rpm で 1 時間遠心分離した後、上澄液を用心深く捨てて金パレットを最初体積の 10 分の 1 程度に浮遊させた。このように p 6 0 0 7 モノクローナル抗体が結合された金粒子を 420 nm で吸光度が 1 になるよう調節して接合パッドに噴射した後、接合パッドを 60 で真空状態で 1 時間乾燥させた。乾燥してから使用前までは絶対湿度 (R H) 30% 以下で保管した
2. ニトロセルロース膜に捕獲抗体及び対照抗体処理を施した。捕獲抗体としてリステリア種に特異的なモノクローナル抗体 p 6 0 1 7 をニトロセルロース膜 1 cm 当り 1 μ g を分注し、対照抗体として濃度が 1 ml 当り 1 mg である抗-マウス I g G をニトロセルロース膜 1 cm 当り 1 μ g になるよう分注した。処理された膜を 37 で一晩中乾燥させた後、使用前まで絶対湿度 (R H) 30% 以下で保管した。
3. サンプルの適用に適した条件のためサンプルパッドに適した緩衝溶液で遮断した。60 で 1 時間乾燥させてから、使用前まで絶対湿度 30% 以下に保管した。
4. 前記で用意されたパッドを接合パッドに連結させた後サンプルスクリーニングに使用した。
5. リステリア増菌培地で一晩中増菌し 1 ml を取って 3000 rpm で 10 分間遠心分離した後上澄液を 10 分間沸してサンプルとして使用した。
6. 前記で用意されたサンプル 100 μ l をサンプルパッドに滴下した後 5 分後に判読した。

20

30

【産業上の利用可能性】

40

【0094】

本発明のモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 はリステリアモノサイトゲネスだけを選別的に認知することによりこのような抗体を使って人間に病原性である菌により汚染された食品の汚染有無を迅速に判断することができる。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図 1 a】図 1 a は、ポリクローナル抗体 (ラビット) を使って多様なリステリア種について直接的 E L I S A 及びウェスタンブロット試験したグラフである。

【図 1 b】図 1 b は、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 を使って多様なリステリア種についてサンドイッチ E L I S A 及びウェスタンブロット試験したグラフである。

50

【図 1 c】図 1 c は、モノクローナル抗体 p 6 0 1 7 を使って多様なリステリア種についてサンドイッチ E L I S A 及びウェスタンブロット試験したグラフである。

【図 2 a】図 2 a は、食品から分離された 3 3 個のリステリアモノサイトゲネスについてポリクローナル抗体(ラビット)を使って直接的 E L I S A 試験及びウェスタンブロット試験したグラフである。

【図 2 b】図 2 b は、食品から分離された 3 3 個のリステリアモノサイトゲネスについてモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 を使ってサンドイッチ E L I S A 試験及びウェスタンブロット試験したグラフである。

【図 2 c】図 2 c は、食品から分離された 3 3 個のリステリアモノサイトゲネスについてモノクローナル抗体 p 6 0 1 7 を使ってサンドイッチ E L I S A 試験及びウェスタンブロット試験したグラフである。

【図 3 a】図 3 a は、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 の量を変化させながらリステリア種についてサンドイッチ E L I S A 試験したグラフである。

【図 3 b】図 3 b は、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 を使ってリステリア菌株以外の他の菌株についてサンドイッチ E L I S A 試験したグラフである。

【図 4 a】図 4 a は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 及びモノクローナル抗体 p 6 0 1 7 による p e p A 及び p e p D ペプチド認知有無を直接的 E L I S A 試験したグラフである。

【図 4 b】図 4 b は、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 を捕獲抗体として使用し、第 2 抗体としてポリクローナル抗体を使って p e p A / p e p D の競争をサンドイッチ E L I S A で検証したグラフである。

【図 4 c】図 4 c は、モノクローナル抗体 p 6 0 0 7 を捕獲抗体として使用し、第 2 抗体としてモノクローナル抗体 p 6 0 1 7 を使って p e p A / p e p D の競争をサンドイッチ E L I S A で検証したグラフである。

【図 5 a】図 5 a は、組換え p 6 0 を試料として適用させたリステリアディップスティックの展開を示す写真である。

【図 5 b】図 5 b は、陰性対照物として p 6 0 の代りにリステリアモノサイトゲネス(ストリップ 0)及び多様な菌株(ストリップ 1 ないし 1 2)の培養上澄液を試料として適用させたリステリアディップスティックの展開を示す写真である。

【図 6 a】図 6 a は、リステリアモノサイトゲネス p 6 0 および *Listeria innocua* p 6 0 に対するモノクローナル抗体 p 6 0 0 7 の親和力についてのウェスタンブロットとイメージ分析による結合動力学定量法の結果を示す。

【図 6 b】図 6 b は、リステリアモノサイトゲネス p 6 0 および *Listeria innocua* p 6 0 に対するモノクローナル抗体 p 6 0 1 7 の親和力についてのウェスタンブロットとイメージ分析による結合動力学定量法の結果を示す。

【配列表フリーテキスト】

【 0 0 9 6 】

配列 1 はプライマーである。

【 0 0 9 7 】

配列 2 はプライマーである。

【 0 0 9 8 】

配列 5 は対照ペプチドである。

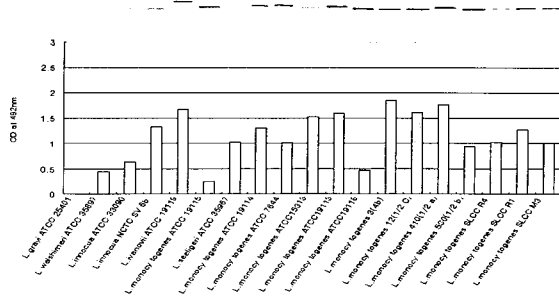
10

20

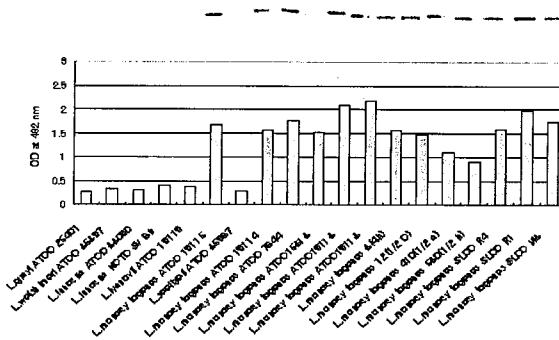
30

40

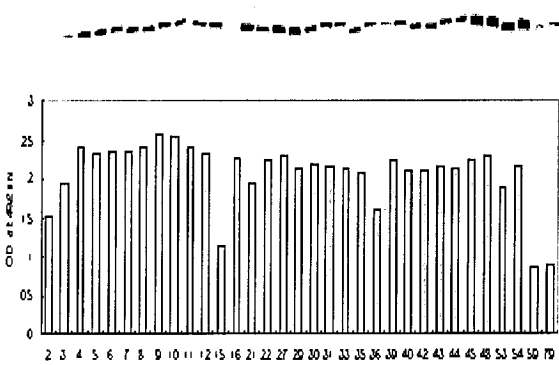
【 図 1 a 】



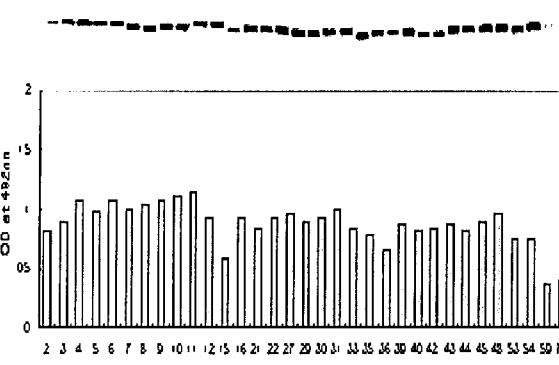
【 図 1 b 】



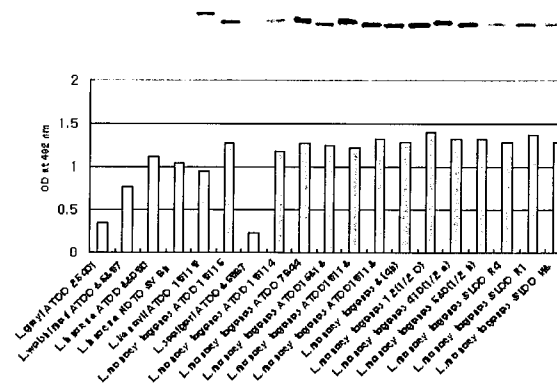
【 図 2 b 】



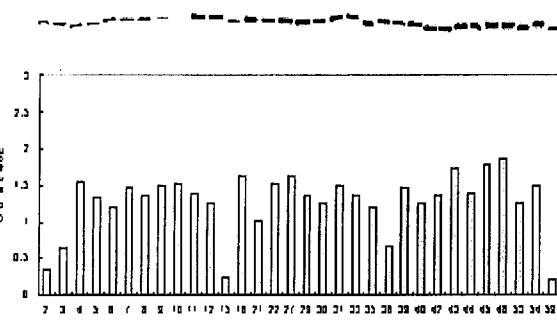
【 図 2 c 】



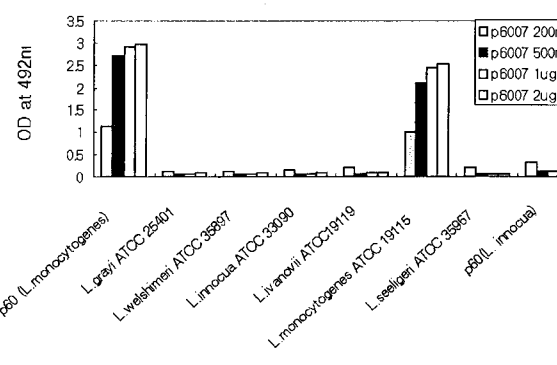
【 図 1 c 】



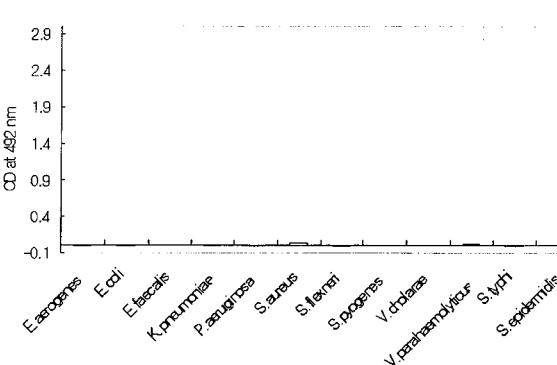
【 図 2 a 】



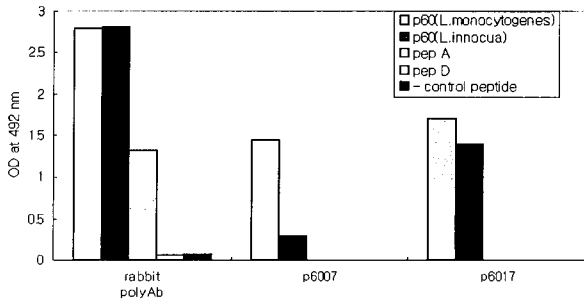
【 図 3 a 】



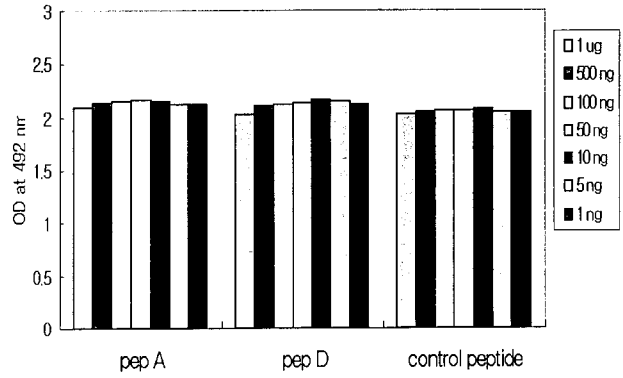
【 図 3 b 】



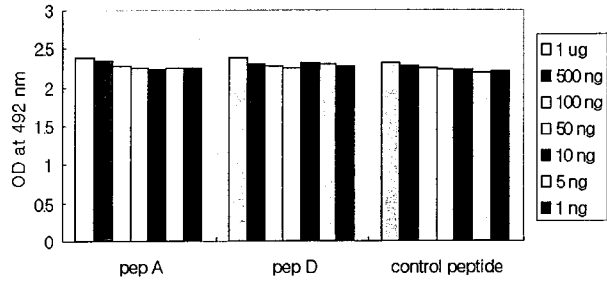
【 4 a 】



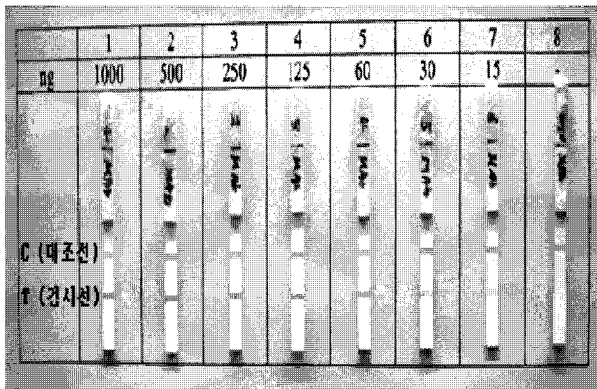
【 4 c 】



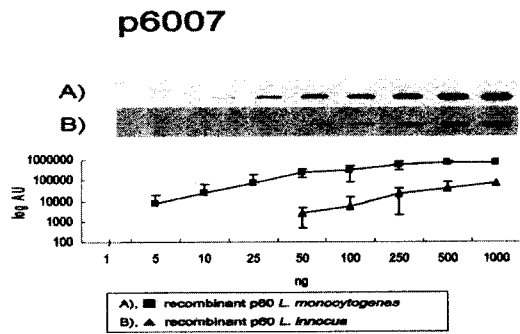
【 4 b 】



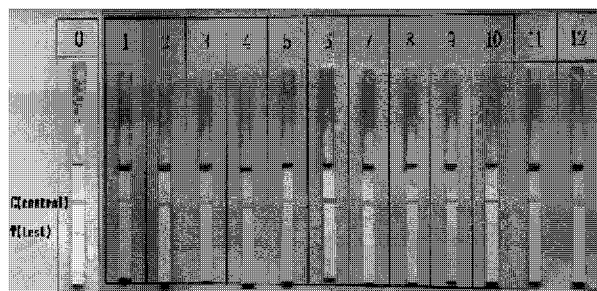
【 5 a 】



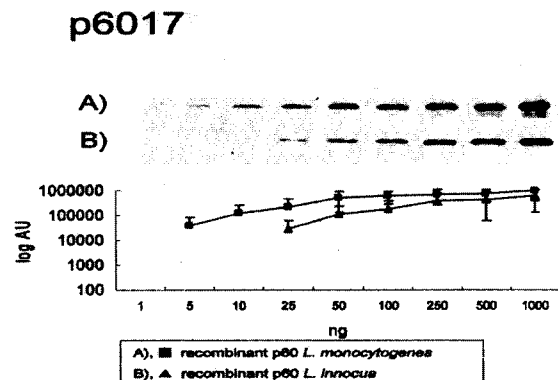
【 6 a 】



【 5 b 】



【 6 b 】



【配列表】

2006104154000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	
(74)代理人 100065215 弁理士 三枝 英二		
(74)代理人 100076510 弁理士 掛樋 悠路		
(74)代理人 100099988 弁理士 斎藤 健治		
(72)発明者 ユン ビュング ソー 大韓民国 139-240 ソウル ノウォン-グ ゴングヌング-ドング 108 ウーバング アパートメント 403-906		
(72)発明者 ヤング ヨング ソー 大韓民国 135-230 ソウル ガングナム-グ イルウォン-ドング ガエボ 4-チャ 614 ヒュンダイ アpartment 506		
(72)発明者 リー ナム ソーク 大韓民国 139-050 ソウル ノウォン-グ ウォルグイエ-ドング 556 ウォルグイ エ ジョーゴング 2 ダンジ アpartment 206-1408		
(72)発明者 ノウ ヨング ソーン 大韓民国 122-011 ソウル ユンブイエオング-グ ユンガム 1-ドング 100-4 4		
(72)発明者 ミン スング シク 大韓民国 139-242 ソウル ノウォン-グ ゴングヌング-2ドング タエガング アパ artment 1015-304		
(72)発明者 ジョング ジャエ ジュン 大韓民国 607-050 プサン ドングナエ-グ スアン-ドング 32-3 チョスング ハイツ 1407		
(72)発明者 ユ カング ヨウル 大韓民国 560-828 ジョールラブック-ドウ ジョンジュ-シ ワンサン-グ ジュングノ ソング-ドング 2ガ 702-6		
(72)発明者 パク ホング ジェ 大韓民国 139-242 ソウル ノウォン-グ ゴングヌング-2ドング タエガング アパ artment 1015-304		
(72)発明者 ヨン ムン ヨン 大韓民国 136-075 ソウル ソウングブック-グ 5-ガ アナム-ドング 110-13 6		
(72)発明者 チュング ミン スブ 大韓民国 151-871 ソウル グワナク-グ シリム 4-ドング 476-1		
F ターム(参考) 4B024 AA13 BA50 CA02 DA06 EA04 GA05 GA11 HA03 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ15 QQ16 QR56 QR84 QS17 QS33 QS36 QX01 QX07 4B064 AG27 CA10 CA20 DA15 4B065 AA01Y AA92X AB05 AC14 BA08 CA46 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA76 DA86 EA52 FA72 FA74		

GA15 GA26

专利名称(译)	选择性识别单核细胞增生李斯特菌的单克隆抗体，产生该单克隆抗体的杂交瘤，含有该单克隆抗体的检测试剂盒及使用其的检测方法		
公开(公告)号	JP2006104154A	公开(公告)日	2006-04-20
申请号	JP2004295072	申请日	2004-10-07
[标]申请(专利权)人(译)	联合医学有限公司 KOMED		
申请(专利权)人(译)	Komeddo股份有限公司		
[标]发明人	ユンビュングソー ヤングヨングソー リーナムソーク ノウヨングソーン ミンスングシク ジョングジャエジュン ユカングヨウル パクホングジェ ヨンムンヨン チュングミンズプ		
发明人	ユン ビュング ソー ヤング ヨング ソー リー ナム ソーク ノウ ヨング ソーン ミン スング シク ジョング ジャエ ジュン ユ カング ヨウル パク ホング ジェ ヨン ムン ヨン チュング ミン スプ		
IPC分类号	C07K16/12 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577 C12N15/09 C12N5/10 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/12 C12Q1/04 G01N33/53.D G01N33/543.521 G01N33/569.F G01N33/577.B C12N15/00.ZNA. A C12N15/00.A C12N5/00.B C12P21/08 C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/BA50 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024 /HA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ15 4B063/QQ16 4B063/QR56 4B063/QR84 4B063/QS17 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064 /CA10 4B064/CA20 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045 /DA86 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	斋藤健治		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供与单核细胞增生李斯特菌的p60蛋白，产生单色抗体的杂交瘤细胞，含有这种单色抗体的检测试剂盒，以及通过使用这种单色抗体检测单核细胞增生李斯特菌的方法单独结合的单色抗体。解决方案：因为本发明的单色抗体仅选择性地识别单核细胞增生李斯特菌，所以可以通过使用这样的抗体快速测定被人类致病的细菌污染的食物污染的存在或不存在。 Z

発色試薬緩衝溶液	
試薬名	添加量
クエン酸(一水和物)	3.66 g
磷酸カリウム(K_2PO_4)	11.35 g
D. W	1000 ml