

(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 - 267979

(P2003 - 267979A)

(43)公開日 平成15年9月25日 (2003.9.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 D493/22		C 0 7 D493/22	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/53	J 4 B 0 6 5
15/02		33/543	555 D 4 C 0 7 1
G 0 1 N 33/53		33/577	B 4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 15数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 66755(P2002 - 66755)

(22)出願日 平成14年3月12日(2002.3.12)

(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 平間 正博

宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘5 - 43 - 30 - 2
05

(72)発明者 大栗 博毅

宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉417コーポ
らんし105

(72)発明者 藤井 郁雄

大阪府吹田市五月が丘東10 - 8 - 201

(74)代理人 100110168

弁理士 宮本 晴視

最終頁に続く

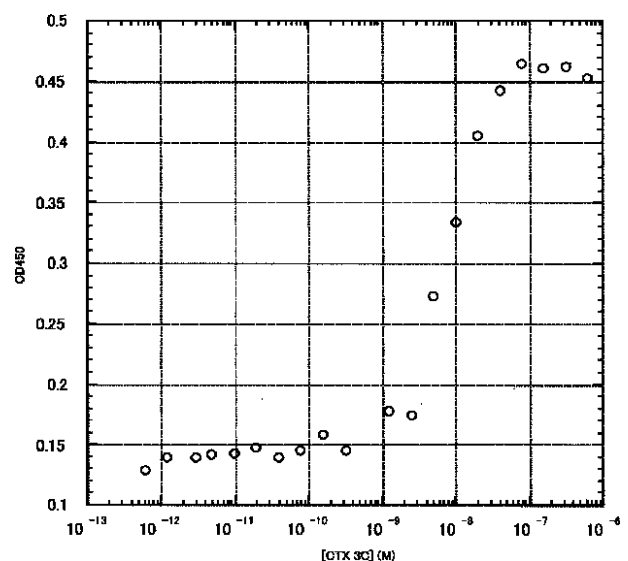
(54)【発明の名称】 シガトキシン C T X 3 C を検出するサンドイッチ測定キット類

(57)【要約】

【課題】シガトキシンを構成する環の一部である A - E 環部、および I - M環部を含む合成ハプテンを用いて得られた2種のモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ法の提供

【解決手段】 受託番号 F E R M P - 1 8 7 5 0 のハイブリドーマ3 D 1 1により産生されるシガトキシン C T X 3 C と特異的に反応するモノクローナル抗体および受託番号 F E R M P - 1 8 7 4 9 のハイブリドーマ1 0 C 9により産生されるシガトキシン C T X 3 C と特異的に反応するモノクローナル抗体を組み合わせた、特にいずれか一方を標識化合物と結合して標識モノクローナル抗体とし、前記標識化された標識モノクローナル抗体と標識化されない前記いずれかのモノクローナル抗体との組み合わせからなるシガトキシン類検出サンドイッチ測定キット。

サンドイッチ ELISA



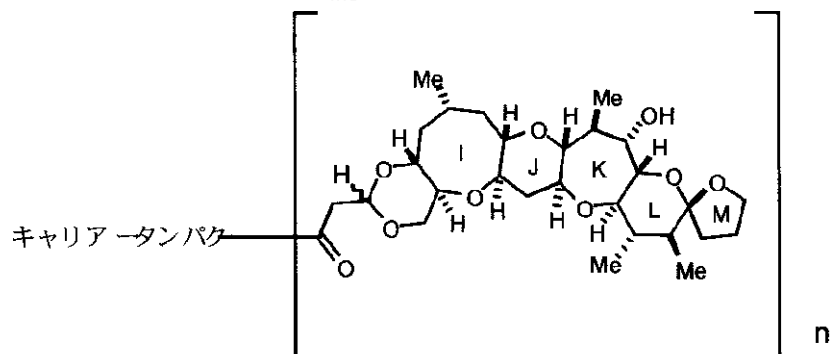
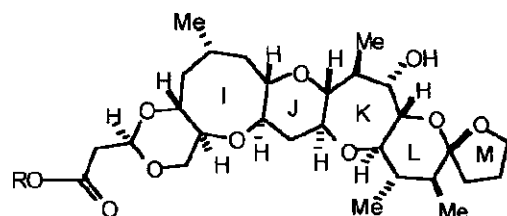
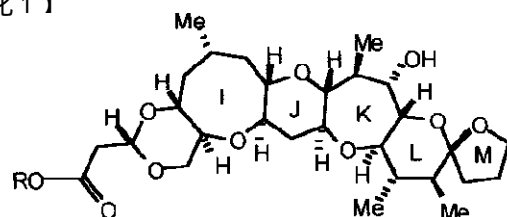
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検出非タンパク化合物を構成する分子内の部分構造から誘導される複数の合成ハプテンを利用して得られる前記被検出非タンパク化合物に特異的に結合する複数のモノクローナル抗体を組み合わせた前記被検出非タンパク化合物検出サンドイッチ測定キット。

【請求項 2】 被検出非タンパク化合物がシガトキシン類であり、前記分子内の部分構造から誘導される合成ハプテンがシガトキシン類分子両端の部分構造を含むものであることを特徴とするシガトキシン類検出サンドイッチ測定キット。

【請求項 3】 式 1 の合成ハプテンを用いて得られた受託番号 F E R M P - 18750 のハイブリドーマ 3 D 1 1 により産生されるモノクローナル抗体と式 2 の合成ハプテンを用いて得られた受託番号 F E R M P - 18749 のハイブリドーマ 10 C 9 により産生されるモノクローナル抗体とを組み合わせるものからなることを特徴とする請求項 2 に記載のシガトキシン類検出サンドイッチ測定キット。

【化 1】

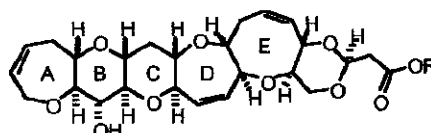
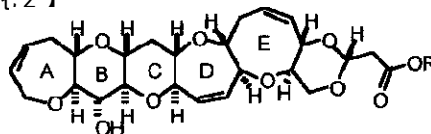


式 3

式 3 中、n は 1 以上の整数である

【請求項 9】 合成ハプテンとキャリアータンパクとの反応生成物におけるキャリアータンパクが牛血清アルブミン (B S A)、キーホールリムペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanine, K L M) またはオボアルブミン (egg albumin, O V A) であることを特徴とする請求項 6 のモノクローナル抗体。

*【化 2】



式 2

R は H またはメチル基である。

【請求項 4】 組み合わせるモノクローナル抗体の一方のモノクローナル抗体が標識化したものであることを特徴とする請求項 3 に記載のシガトキシン類検出サンドイッチ測定キット。

【請求項 5】 標識化合物が酵素標識体であることを特徴とする請求項 4 に記載のサンドイッチ測定キット。

【請求項 6】 前記式 1 で表される新規化合物。

【請求項 7】 前記式 1 で表される新規化合物のシガトキシン類を認識するモノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマを得るための合成ハプテンとしての使用。

【請求項 8】 式 3 で表される合成ハプテンとキャリアータンパクとの反応生成物で免疫して得られるシガトキシン類と特異的に反応するモノクローナル抗体。

【化 3】

【請求項 10】 受託番号 F E R M P - 18750 として受託されたシガトキシン類と特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 3 D 1 1。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、被検出非タンパク高分子化合物を構成する分子内の部分構造から誘導され

る複数の合成ハプテンを利用して得られる前記被検出非タンパク高分子化合物に特異的に結合する複数のモノクローナル抗体、特にシガトキシン類と特異的に反応するモノクローナル抗体、に標識化合物、例えば酵素標識化合物を結合した標識モノクローナル抗体とシガトキシン類と特異的に反応する前記モノクローナル抗体とは別のモノクローナル抗体である非標識モノクローナル抗体とを組み合わせたシガトキシン類、特にシガトキシンCTX3Cの検出に有用なサンドイッチ測定キットに関する。また、前記標識モノクローナル抗体を得るモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該ハイブリドーマを作製するのに用いられる合成ハプテンおよび当該合成ハプテンとキャリアタンパク質とから得られた当該ハイブリドーマを作製するのに用いられる免疫用化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】免疫的手法を用いて、海毒、特にシガトキシン類(CTX)を調査する研究は、ラジオイムノアッセイの発展に伴って1977年頃から始まった。シガテラ毒は、天然からごく微量しか採集されず(850匹、4tの毒ウツボから毒本体のシガトキシンは僅か0.35mg)、培養による生産も困難なことが抗体調製の障害となっている。ハワイ大学ホカマらは、貴重な毒本体シガトキシン(1μg)をヒト血清アルブミンにカルボジイミド法で連結したコンジュゲートを作製、これを抗原としてマウスに免疫、モノクローナル抗体を調製した(Toxicon第15巻、(1977年)、第317頁)。この抗体は、シガトキシンに結合するが、オカダ酸とも強い交差活性を示し、その親和性の差は5倍程度しかない(Journal of Clinical Laboratory Analysis 第6巻、(1992年)、第54頁)。また、プレベトキシン、マイトトキシン、パリトキシン等にも交差活性を示すことが分かっているが(Journal of AOAC International 第81巻、(1998年)、第727頁)、詳しいデータは発表されていない。このホカマらの抗体を用いて、シガトキシン類に汚染された魚類を免疫的手法により検出するため試薬、キット(Cigua Check TM)などが開発されている。

【0003】本発明者らは、初期にはシガトキシンの左側ABC環部を化学合成し、これを合成ハプテンとしたタンパクコンジュゲートを用いて、三種のモノクローナル抗体を調製しているが、これらはいずれもシガトキシンに非常に弱いアフィニティーしか示さなかった(Synthesis (1999年)、第1431頁)。また、他のグループも、合成ハプテン(JKLM環部)のコンジュゲートの免疫を試みているが、モノクローナル抗体の調製には至っていないようである[Toxicon第38巻(2000年)第669頁]。このような状況の中で、本発明者らは、更に、シガトキシン類の右末端の部分構造であるIJKLM環部を含む合成ハプテンを設計、合成し、この合成ハプテンのタンパクコンジュゲートでマウスを免疫する工程を

含む方法により前記受託番号FERM P-18750のハイブリドーマを作りだし、当該ハイブリドーマを用いてシガトキシン類に特異性の高いモノクローナル抗体を調製することに成功した。そして、該モノクローナル抗体を3D11(独立行政法人産業技術総合研究所 特許性物寄託センターの受託日、平成14年3月5日)と命名した。該モノクローナル抗体のシガトキシンCTX3Cに対しての結合解離定数(Kd)は、122nMであった。また、シガトキシンに構造の類似した海産ポリエーテル系毒素と前記抗体の交差活性を測定したところ、赤潮毒プレベトキシン類と交差活性が確認されたが、この交差活性は、シガトキシン類との結合と比べると350分の1以下の非常に弱いものであることを見出した。

【0004】また、シガトキシン類のモノクローナル抗体を得ることを目的とする合成ハプテンとして、シガトキシンのABC環部のC₁₆位にカルボン酸リンカーを導入した誘導体とキャリアプロテインであるBSAまたはKLHとからコンジュゲート化合物を合成し、これをRIEIAジュバント中に乳化し、5匹のBalb/cマウスに3週間間隔で4回注射して免疫し、該マウスから脾臓を取り出し、該脾臓細胞をミエローマ細胞(P3X63-Ag8.653)と融合し、前記抗体を得、前記抗体の前記合成ハプテンに対する反応特異性を評価している[Synthesis 1999, No. SI.1431-1436 ISSN 0039-7881,]。すなわち、シガトキシン類、特にシガトキシンCTX3Cの部分構造を用いて、免疫化学的な手法でシガトキシン類(CTX)を調査するのに有用なモノクローナル抗体を製造するのに有用な合成シガトキシン類の環部の一部を用いた合成ハプテンの検討がなされている。

【0005】本発明者らは、前記検討に対し更にシガトキシン類に対しての親和性を更に向上させたモノクローナル抗体を得ることができる合成ハプテンを設計してシガトキシンCTX3Cの左末端の部分構造であるABCDE環部を含む化合物をハプテンとして設計、合成し、この合成ハプテンのタンパクコンジュゲートでマウスを免疫する工程を含む方法により前記受託番号FERM P-18749のハイブリドーマ10C9(独立行政法人産業技術総合研究所 特許性物寄託センターの受託日、平成14年3月5日)を作りだし、当該ハイブリドーマを用いてシガトキシン類に特異性の高いモノクローナル抗体を調製することに成功した。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、基本的には、前記本発明者らが開発した前記2つのモノクローナル抗体を組み合わせ、検出特性をより改善したサンドイッチ法によりシガトキシン類を検出するキットを提供することである。また、前記キットを得るためのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該ハイブリドーマを得るために有用な合成ハプテン、該合成ハプ

テンとキャリアタンパクとを結合させた前記モノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマを得るのに有用な合成ハプテン-タンパクコンジュゲートを提供することである。特に、前記2つのモノクローナル抗体の一方にサンドイッチ法に有用な標識体を結合して有用なサンドイッチ法キットを得るべく検討し、シガトキシンCTX3Cを構成するIJKLM環を持つ合成ハプテンを用いて得られたモノクローナル抗体に酵素標識体を結合することによりサンドイッチ法に有用なキットが得られることを発見し、前記課題を解決することができた。更に、前記検討の中で、被検出化合物を、該被検出化合物構成する分子内の部分構造から誘導される複数の合成ハプテンを利用して得られる前記被検出非タンパク化合物に特異的に結合する複数のモノクローナル抗体を組み合わせさせたサンドイッチ測定キットとすることにより、擬陽性を顕著に減少できることを確認し、前記サンドイッチ測定キットの技術思想を確立するに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の第1は、被検出非タンパク化合物を構成する分子内の部分構造から誘導される複数の合成ハプテンを利用して得られる前記被検出非タンパク化合物に特異的に結合する複数のモノクローナル抗体を組み合わせさせた前記被検出非タンパク化合物検出サンドイッチ測定キットである。本発明の第2は、被検出非タンパク化合物がシガトキシン類であり、前記分子内の部分構造から誘導される合成ハプテンがシガトキシン類を構成する分子両端の2種部分構造であることを特徴とするシガトキシン類検出サンドイッチ測定キットである。好ましくは、前記式1の合成ハプテンを用いて得られた受託番号FERM P-18750のハイブリドーマ3D11により産生されるモノクローナル抗体と式2の合成ハプテンを用いて得られた受託番号FERM P-18749のハイブリドーマ10C9により産生されるモノクローナル抗体とを組み合わせたものからなることを特徴とする前記シガトキシン類検出サンドイッチ測定キットであり、より好ましくは、前記組み合わせるモノクローナル抗体の一方のモノクローナル抗体が標識化したものであることを特徴とするシガトキシン類検出サンドイッチ測定キットであり、更に好ましくは、標識化合物が酵素標識体であることを特徴とする前記サンドイッチ測定キットである。また、非標識モノクローナル抗体がプレートに吸着されていることを特徴とする前記サンドイッチ測定キットである。

【0008】本発明の第3は、前記式1で表される新規化合物であり、本発明の第4は、前記式1で表される新規化合物のシガトキシン類を認識するモノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマを得るための合成ハプテンとしての使用である。

【0009】本発明の第6は、前記式3の合成ハプテン

とキャリアタンパクとの反応生成物で免疫して得られるシガトキシン類と特異的に反応するモノクローナル抗体であり、好ましくは、前記合成ハプテンとキャリアタンパクとの反応生成物におけるキャリアタンパクが牛血清アルブミン(BSA)、キーホールリムペットヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanine, KLM)またはオボアルブミン(egg albumin, OVA)であることを特徴とする前記モノクローナル抗体である。

【0010】本発明の第7は、受託番号FERM P-18750として受託されたシガトキシン類と特異的に反応する前記各モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。

【0011】

【本発明の実施の態様】本発明をより詳細に説明する。
A. 環境、食物などに微量に存在化合物の検出、特に精度の良い検出手法の確立は安全な社会生活に強く要求されている。本発明の被検出非タンパク化合物を構成する分子内の部分構造から誘導される複数の合成ハプテンを利用して得られる前記被検出非タンパク化合物に特異的に結合する複数のモノクローナル抗体を組み合わせる前記被検出非タンパク化合物検出するサンドイッチ測定方法の確立は、高精度の検出を提供するものである点で革新的な技術である。

B. 本発明の式1の合成ハプテンに含まれる化合物3は下記の反応式1によって得られる。反応式1の出発化合物1は公知である〔文献；Chem. Comm. 2001, 381-382.〕。化合物2は、20 mL ナス型フラスコに化合物1 (7.8 mg, 11 μ mol), 酢酸エチル(EtOAc) (100 μ L), メタノール(300 μ L), Pd(OH)₂ (20%, カーボン上: 1.1 mg, 11 μ mol)を加えた。水素雰囲気下(肉厚風船を使用)、室温で3時間攪拌した。酢酸エチルで希釈してから、セライトで濾過した。濾液を濃縮し、化合物2 (6.2 mg, 13 μ mol)を定量的に得た。

【0012】化合物3および3'の混合物は、20 mL ナス型フラスコに化合物2 (4.2 mg, 9.0 μ mol), CH₂Cl₂ (300 μ L), (MeO)₂CHCH₂CO₂Me (25 μ L, 180 μ mol), TsOH·H₂O (0.5 mg, 3 μ mol)を加えた。室温で1.5時間攪拌した後、トルエン(1 mL)を加えて、ロータリーエバポレーターで減圧(120 mbar/hPa)し、1時間後に大気圧に戻した。酢酸エチルで希釈してから、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗い、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、アセタール位についてのジアステロマー混合物(3:3'=3:1)を(4.7 mg, 8.5 μ mol, 94%)得た。化合物3および3'混合物の物性を表1に示す。

【0013】

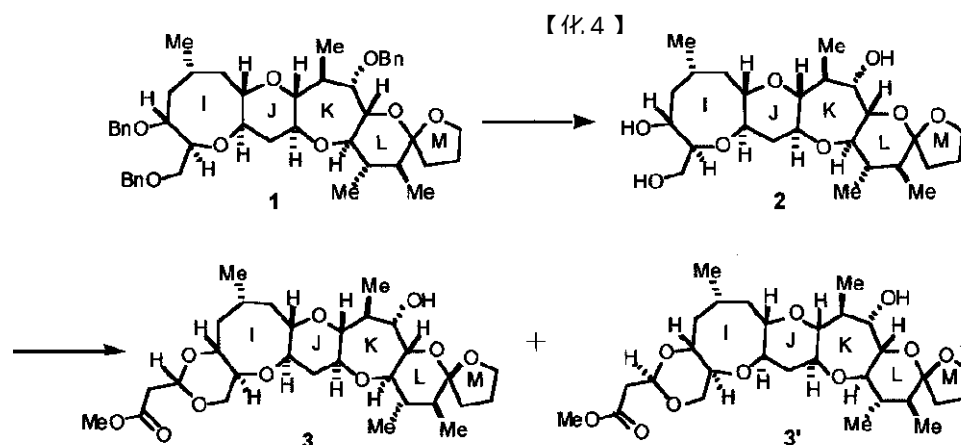
【表1】

化合物 3 ;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (3H, d, $J=6.5\text{Hz}$, Me17), 1.03 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$, Me16), 1.06 (3H, d, $J=7.0\text{Hz}$, Me5), 1.15 (3H, d, $J=7.5\text{Hz}$, Me12), 1.39 (1H, brq, $J=11.5\text{Hz}$, H9ax), 1.50~1.62 (4H, m, H17, H6, H4, H16), 1.77~1.88 (4H, m, H20, H19, H5, H4, H6), 1.92~1.97 (2H, m, H19, H20), 2.02 (1H, qdd, $J=7.5, 5.0, 3.0\text{Hz}$, H12), 2.21 (brdt, $J=11.5, 5.0\text{Hz}$, H9eq), 2.62 (2H, $J=5.0\text{Hz}$, $\text{O}_2\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$) 2.85(1H, dd, $J=9.5, 5.0\text{Hz}$, H11), 2.96 (1H, brtd, $J=9.5, 3.0\text{Hz}$, H7), 3.13 (1H, brddd, $J=11.5, 9.5, 5.0\text{Hz}$, H8), 3.24 (1H, t, $J=9.5\text{Hz}$, H15), 3.29 (1H, brtd, $J=9.5, 4.5\text{Hz}$, H2), 3.32 (1H, t, $J=9.5\text{Hz}$, H1), 3.41 (1H, brtd, $J=9.5, 3.0\text{Hz}$, H3), 3.64 (1H, dd, $J=9.5, 1.5\text{Hz}$, H14), 3.69 (3H, s, OMe), 3.68~3.72 (2H, m, H10, H13), 3.78 (1H, brq, $J=7.5\text{Hz}$, H21), 3.88 (1H, m, H21), 4.01 (1H, dd, $J=9.5, 4.5\text{Hz}$, H1), 4.87 (1H, t, $J=5.0\text{Hz}$, $\text{O}_2\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$).

MALDI-TOF MS: 計算値; $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_{10}\text{Na}$ 577.299 ($\text{M}+\text{Na}^+$); 実験値; 577.244.

【0014】



反応式 1

【0015】C、タンパク質コンジュゲートの調製までを反応式2に示す。

化合物 3, 3' ~ 化合物 4, 4' の合成; 20 mL ナス型フラスコに化合物 3, 3' (4.7 mg, 8.5 μmol)、t-BuOH (0.5 mL)、水 (125 μL)、LiOH $\cdot$ H₂O (2.8 mg, 68 μmol) を加えて、室温で1時間撹拌した。KHSO₄ (18.6 mg, 136 μmol) を加え、溶液のpH (3-4程度)を確認した後、酢酸エチル (10 mL) で希釈した。無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、濃縮し、粗化合物 4, 4' を得た。これにDMF (200 μL)、N-ヒドロキシスクシンイミド (9.7 mg, 85 μmol)、EDC $\cdot$ HCl (8.1 mg, 43 μmol) を加えて、室温で12時間撹拌した。反応溶液を酢酸エチル (10 mL) で希釈し、有機層を水で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濃縮し、活性化エステルである化合物 6, 6' を得た。これにDMF (100 μL) を加えた溶液を作製し、コンジュゲートの調製に使用した。

【0016】KLHコンジュゲートの調製

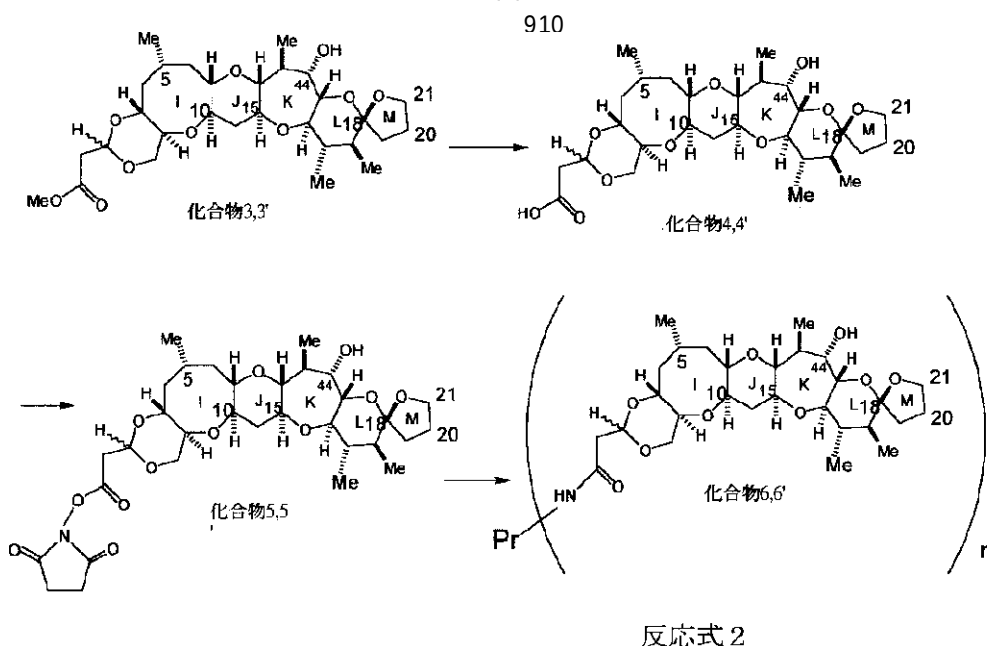
KLH (7.0 mg) のPBS buffer 溶液 (2.0 mL) に活性化エステルである化合物 6, 6' (約4.2 μmol) のDMF 溶液 (50 μL) を加えて10分間撹拌した。一日静置した後、4 で透析した。この後、14、19時間後にPBSバッファー (700 mL) を交換し、28時間後に透析膜からエッペンドルフチューブに移し換えて、-78 で保存した。

【0017】BSAコンジュゲートの調製

BSA (7.0 mg) のPBSバッファー溶液 (2.0 mL) に活性化エステルである化合物 6, 6' (約4.2 μmol) のDMF 溶液 (50 μL) を加えて10分間撹拌した。一日静置した後、4 で透析した。この後、14、19時間後にPBSバッファー (700 mL) を交換し、28時間後に透析膜からエッペンドルフチューブに移し換えて、-78 で保存した。

【0018】

【化5】



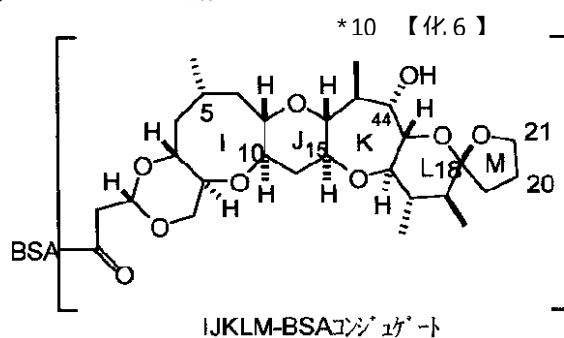
【0019】(Prはキャリアタンパク。nは1以上の整数)

【0020】ハプテン価の解析

透析して得た BSAコンジュゲートを、MALDI-TOF-MSで質量分析した。BSAコンジュゲートの平均分子量は約71800であった(BSAの分子量約66400)。ハプテンの分子量が(540)であるので、BSAコンジュゲートには平均10個(化合物6,6'においてnの平均値)のハプテンが連結されていることが分かった。

*【0021】D、モノクローナル抗体調製；前項で得た I J K L M - K L H (100μg) に R I B I アジュバンド (R I B I Immunol. Res. Inst. 社製) を加え、良く攪拌してエマルジョンとしたのち、これを B a l b / c マウス (5匹) に二週間毎に三回、腹腔内投与した。初回免疫から35日目にマウスの血清を採取し、I J K L M - B S A (式4) を用い、E L I S A 法で血清の抗体価を滴定した。

【0022】



【0023】E、E L I S A 法による抗体価の測定；96 ウェル E L I S A 用プレート (ファルコン社製、3910) の各ウェルに50 μL の I J K L M - B S A 溶液を入れ、室温で2時間放置後、4℃で一晩放置して、プレートにコンジュゲートを吸着させた。プレートを P B S - T w e e n [P B S バッファーに5% Tween 20 (和光純薬製 ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (Sorbitan Monolaurate)、ICI社、商標 Tween 20 相当品 No. 167-11515、を含むもの) で3回洗浄後、M I L L I - Q 水で一度洗浄し、吸着しなかったコンジュゲートを除去した。ハイブリドーマ培養上清 (もしくは抗血清、精製抗体溶液) を加え、室温で1時間放置後、P B S - T w e e n と、M I L L I - Q 水で順次洗浄した。50 μL の 酵素標識二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG

20 - 西洋わさびペルオキシダーゼ：H R P) (Z Y M E D 社製、62-6520 1000倍希釈) を各ウェルに入れ、室温で1時間放置後、P B S - T w e e n と、M I L L I - Q 水で順次洗浄した。100 μL の基質溶液 [基質溶液の組成：1, 2 - フェニレンジアミン (1,2-phenylenediamine) 4.0 mg、過酸化水素水 10 μL、0.1M クエン酸バッファー (pH 5.0) 10 ml] を加え、5分間呈色反応を進行させた後、2規定 硫酸 (50 μL) で反応を停止した。マイクロプレート吸光度測定装置 (B I O - R A D, Benchmark 170-6850) を用いて、450 nm の吸光度を測定し、陽性のクローンを判別した。

【0024】血清中の抗体価の測定；I J K L M - B S A 溶液を吸着した96 ウェル E L I S A 用プレートの最上段に、50 μL の P B S バッファーを入れた。200

倍に希釈したマウスの抗血清(50 μ L)を最上段のウエル(A1)に加え、この溶液を順次2倍希釈した(縦列A1-A8に400倍から51,200倍の希釈系列を作製)。プレートを室温で1時間放置後、上述の方法で450nmの吸光度を測定した。血清希釈率の対数(横軸)と吸光度をプロット(OD、縦軸)すると、シグモイド状の滴定曲線となり、血清濃度依存的に、血清中の抗体がIJKLM-BSAコンジュゲートと結合することが分かった。また、ABC-BSAとはほとんど結合しないことを確認した。

【0025】5匹の中で、最も高い抗体価を示したマウスに、腹腔内にIJKLM-KLH(100 μ g)を追加免疫し、3日後に脾臓を摘出した。脾臓に付着している組織や臓器の断片をピンセットで取り除いた後、基本培地[RPMI Medium 1640 (GIBCO社製、一袋)、炭酸水素ナトリウム2g、ペニシリン-ストレプトマイシン(GIBCO社製)20mg、200mM-グルタミン20mLを蒸留水に溶かして1000mLとしてpHを7.2に調製したもの]入りのシャーレに移し、ピンセットで脾臓内の細胞を浮遊させた。脾細胞浮遊液を濾過後、50mL遠心管に移した。さらに、基本培地15mLを加え、良くピペティングして濾過し、全量を30mLとした。800回転/分で5分間、室温で遠心分離し、上清を除去、タッピングした。HT・BC培地[牛胎児血清(FCS)20mL, HT(コスモバイオ社製HT液(50倍濃縮))20mL, BC(Bioresearch island社製BriClone)50mL, 基本培地730mLを混合したもの)を30mL加え、細胞を浮遊させた。

【0026】ハイブリドーマの調製; 冷凍庫から(-130 $^{\circ}$ C)からミエローマ細胞[P3X63-Ag8.563(大日本製薬社製)]の凍結したチューブを取り出し、37 $^{\circ}$ C恒温槽中で速やかに解凍した。チューブをアルコール綿でよく消毒したのち、チューブ内の細胞浮遊液を基本培地30mLに移した。800回転/分で5分間、室温で遠心分離し、上清を除去した。タッピング後、10FCS培地(基本培地に10%のFCSを添加)を10mL加え、細胞を浮遊させ、50mL培養フラスコに移した。フラスコの栓をゆるめ、炭酸ガス培養装置にいった。1?2日毎に継代し、250mLフラスコ2本分(90-100mL)にした。

【0027】マウスから取り出した脾細胞(2×10^8 個)とミエローマ細胞(5×10^7 個)を混合し、遠心(800回転/分、5分間、室温)し、上清を除去、タッピングした。この後、ECFバッファー[マンニトール45.5g, 10mM塩化カルシウム(10mL), 10mM塩化マグネシウム(10mL), 20mMトリスバッファー[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン]pH7.2を蒸留水で溶かして、1000mLにしたもの)を30mLを加え、遠心(800回転/分、5分間、室温)、上清除去、タッピングする操作を2回繰り返した

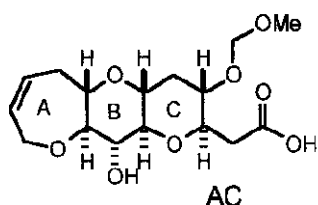
後、ECFバッファー(4.8mL)を加えた。これを6ウエルプレート(SUMIRON製)に、1.2mLずつ分注し、島津社製SSH-10細胞融合装置を用い、以下の条件で細胞融合した[電極間距離:1.0mm; 交流周波数:1MHz; 交流初期印加電圧:80V; 交流初期印加時間:10s; パルス幅:40 μ s; パルス電圧:920V; パルス電界強度:2.30kV/cm; 交流2次印加電圧:80V; パルス印加間隔:1.0s; 印加パルス数:1; パルス電圧変化:+0V; 交流最終印加時間:10s; 交流電圧減衰率:0%; 接触強化:off]。

【0028】前記調製したハイブリドーマ細胞を、各ウエルにHAT培地(選択培地)[基本培地110mL, FCS30mL, BC7.5mL, HAT(コスモバイオ社製HAT液(50倍濃縮))を混合したもの]100 μ Lを加えた96ウエルプレート10枚に移した。2週間後、ハブテンとしたIJKLM環部に結合する抗体を産生するハイブリドーマをIJKLM-BSAを用い、ELISA法でスクリーニングした。陽性のウエルを選択し、2回クローニング後に、再度ELISA陽性となった抗体を産生するクローンを順次培養し、それぞれ約200mLまで増殖させた。この結果、IJKLM-KLMを免疫原として、3種のモノクローナル抗体、すなわち、IM(IからMの環を持つことを意味する)-3D11(受託番号FERM P-18750として独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託されたハイブリドーマにより産生された抗体。抗体名を前記受託ハイブリドーマを識別する表示と同一にした。)、IM-2C7およびIM-8B12を調製することができた。得られたモノクローナル抗体の結合試験をELISA法で検討した。抗原として、シガトキシン類の部分構造、すなわちABC、ABCD、A*BC(A環部がシガトキシン型のもを意味する)、およびIJKLM環構造を連結したBSAコンジュゲートを用いた。その結果、IJKLM環部親和性の高い抗体として、IgG抗体IM-3D11を選別した。IJKLMに対する解離定数Kdは8.6nMであった(測定法については後述する。)

【0029】抗体の精製及びサブクラスの決定
上清を抗マウスIgG、IgMアフィニティークラム(NGF Industries, Ltd.社製)で精製した(結合用リン酸バッファー(pH7.0)、溶出用バッファー(0.2M Glycine-HCl, pH2.5)。精製した抗体をSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で分析し、>95%の純度であることを確認した。PIERCE社製タイピングキット(37501)を用いて、それぞれの抗体のサブクラスを決定した。

【0030】抗体の親和性解析(競争阻害実験)
次に、前記選別した3種のモノクローナル抗体を精製し、ハブテンとの解離定数(Kd)を求めた。ELISA用プレート(A1からA12ウエル)に順次2倍希釈し

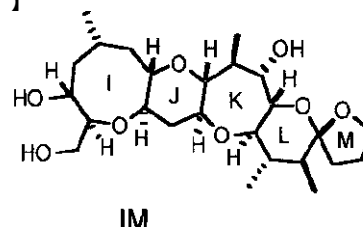
た競合阻害剤 (PBS 溶液 各30 μ L) の溶液を調製した。これに抗体溶液 (30 μ L) を加え、室温で2時間放置した。抗体と阻害剤の混合溶液 50 μ L を、ハプテン-BSA 溶液を吸着した 96 ウエル ELISA 用プレート (抗体の親和性解析参照) に加え、室温で20分間放置した。プレートを洗浄後、吸光度を測定し、滴定曲線を得た。Friguet らの方法 [Journal of Immunol*



*ogical Method, 第77巻 (1985年), 第305 頁] を参考に、Klotz プロットして得られた直線の傾きから阻害剤の K_d 値を求めた。この結果、IM-3D11 は IJKLM 環部 (IM) (式5) にかかなり高い親和性 ($K_d = 8.6$ nM) を示すことが分かった。

【0031】

【化7】



式5

【0032】この結果をふまえ、上述の競争阻害の実験系を利用して毒本体 CTX3C との結合試験を検討した。IM-3D11 は CTX3C に強く結合した ($K_d = 122$ nM)。さらに、IM-3D11 については、20 構造の類似した海産ポリエーテル毒素との結合試験を検討したところ、オカダ酸や、ミトトキシンとはほとんど結合しなかった。赤潮毒プレトキシン類とは交差活性を検出したが、CTX3C との親和性と比べると、350 分の1程度 (BTXA: $K_d = 43$ μ M) の非常に弱いものであることが分かった。

【0033】3D11 抗体の酵素標識法 [3D11-HRP (西洋わさびペルオキシダーゼ); の合成] (サンドイッチ法用)

3D11 抗体の HRP 標識は Pierce 社の EZ-Link (商標 30 名) Plus Activated Peroxidase and Kit を用い、Pierce 社説明書に従って行った。3D11 抗体 (1mg) の carbonate-bicarbonate buffer 溶液 (1 mL) に 1mM の EZ-Link P*

Plus Activated Peroxidase の水溶液 (100 μ L) を加え、室温で1時間反応させた。10 μ L の Reductant solution (NaBH₃CN が主成分) を反応混合液へ加え、15 分間室温で反応させた。20 mL のクエンチバッファー (Quench Buffer) を加え、得られた溶液を室温で15 分間静置した。反応液は 1 L PBS で3回透析後、1 mL のグリセロールを加え、-20 で保存した。標識体としては、周知のものを使用できる。

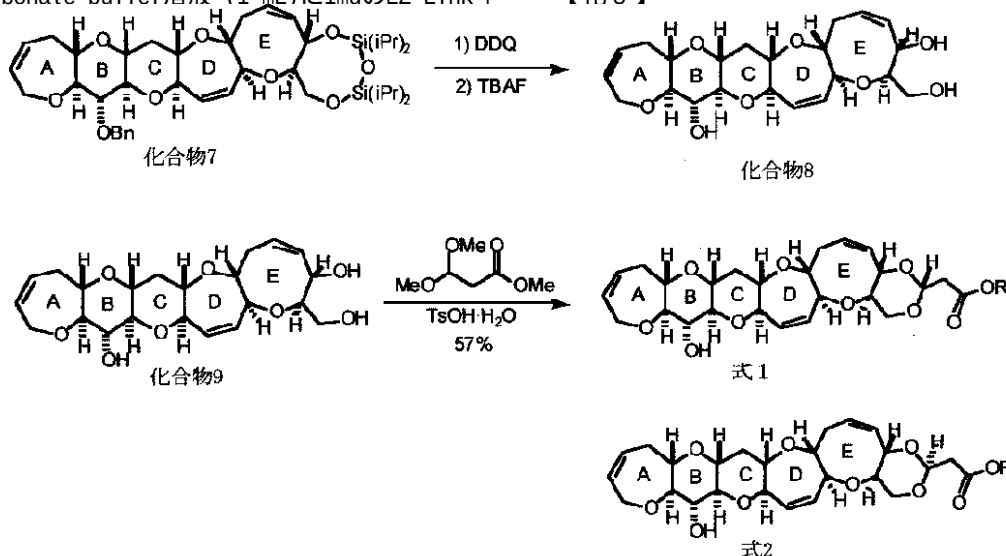
【0034】シガトキシンの A ~ E (AE と略称する場合もある) の環構造をもつ前記標識モノクローナル抗体と組み合わせるモノクローナル抗体の調製 (この技術は、本出願と同日付けにて特許出願した) の説明;

1. 合成ハプテンとなる前記式2 (請求項3) のジアステレオマー混合物の合成。

下記の工程1により得られる。

【0035】

【化8】



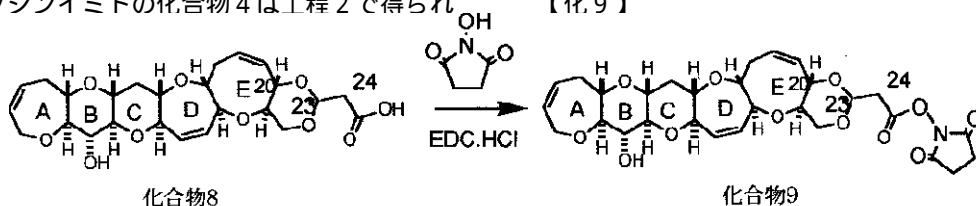
工程1

【0036】化合物7のOHをベンジル基(Bn)保護基で保護した化合物の合成方法は、M.Maruyama et al, Heterocycles, 2001, 54, 93-99,に記載されている。化合物1は前記文献2に記載の化合物のBnをDDQ(2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン)を用いて脱保護することにより得られる。化合物1のアルコール(4.0 mg, 6.0 μ mol)をTHF(テトラヒドロフラン)(2 mL)に溶かし、室温でテトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF, 1M THF溶液: 18 μ L, 18 μ mol)を加えた。30分後、反応溶液を濃縮して、シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、化合物8(2.5 mg, 5.9 μ mol, 98%)を得た。

【0037】20 mL ナス型フラスコに化合物8(2.8 mg, 5.9 μ mol)を溶解し、式2の化合物(混合物)の物性;

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (1H, m, H10ax), 2.28 (1H, dt, J = 12.0, 4.5 Hz, H10eq), 2.32 (1H, m, H17), 2.37 (1H, m, H4), 2.62 (1H, m, H4), 2.64 (1H, m, H17), 2.67 (1H, dd, J = 15.5, 5.5 Hz, H24), 2.69 (1H, dd, J = 15.5, 5.5 Hz, H24), 3.01 (1H, t, J = 9.0 Hz, H8), 3.11 (1H, ddd, J = 11.0, 9.0, 4.5 Hz, H9), 3.22-3.26 (2H, m, H5, H11), 3.34 (1H, m, H21), 3.43 (1H, t, J = 10.5 Hz, H22), 3.58-3.64 (3H, m, H16, H7, H6), 3.70 (3H, s, OMe), 3.80 (1H, ddd, J = 9.0, 4.0, 2.5 Hz, H12), 4.02 (1H, ddt, J = 15.0, 4.0, 2.5 Hz, H1), 4.11 (1H, dd, J = 10.5, 5.5 Hz, H22), 4.12 (1H, m, H15), 4.24 (1H, m, H20), 4.32 (1H, dd, J = 15.0, 6.0 Hz, H1), 4.93 (1H, t, J = 5.5 Hz, H23), 5.63 (1H, brdt, J = 12.5, 2.5 Hz, H14), 5.70 (1H, m, H13), 5.73 (1H, dd, J = 10.5, 5.0 Hz, H19), 5.80 (1H, m, H18), 5.83 (1H, m, H3), 5.92 (1H, m, H2). MALDI-TOF MS: Calcd for C₂₆H₃₄O₁₀Na 529.205 (M+Na⁺); Found 529.185.

【0039】式1及び式2のRをHにした化合物9は、式2の化合物をLiOHで処理して得られる。工程においてLがスクシンイミドの化合物4は工程2で得られ



工程 2

【0041】20 mL ナス型フラスコに式1及び式2の化合物(2.5 mg, 4.9 μ mol)、t-BuOH(0.5 mL)、水(125 μ L)、LiOH $\cdot$ H₂O(2.8 mg, 68 μ mol)を加えて、室温で1時間攪拌した。KH₂SO₄(18.6 mg, 136 μ mol)を加え、溶液のpH(3-4程度)を確認した後、酢酸エチル(40 mL)で希釈した。無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、濃縮し、粗化合物8を得た。これにDMF(DMF = N, N-ジメチルホルムアミド、200 μ L)、N-ヒドロキシスクシンイミド(5.6 mg, 49

50 μ mol), CH₂Cl₂(300 μ L), (MeO)₂CHCH₂COOMe(10 μ L, 70 μ mol), TsOH $\cdot$ H₂O(0.5 mg, 3 μ mol)を加えた。室温で1.5時間攪拌した後、トルエン(1 mL)を加えて、ロータリーエバポレーターで減圧(120 mbar/hPa)し、1時間後に大気圧に戻した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、アセタール位に於けるジアステレオマー混合物(式2の上の化合物: 下の化合物 = 2:1)を(1.9 mg, 3.8 μ mol, 57%)得た。式2の化合物の物性を表2に示す。

【0038】

【表2】

る。

【0040】

【化9】

μ mol)、EDC-HCl(EDC = 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド、4.8 mg, 25 μ mol)を加えて、室温で12時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル(40 mL)で希釈し、有機層を水で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濃縮し、活性化エステルである化合物9を得た。これにDMF(100 μ L)を加えた溶液を作製し、コンジュゲートの調製に使用した。

【0042】2. タンパクコンジュゲートの製造。

KLHコンジュゲートの調製; KLH(5.0 mg)のPB

Sバッファー溶液 (1.0 mL) に活性化エステルである化合物9 (約2.4 μ mol) の DMF 溶液 (50 μ L) を加えて10分間攪拌した。一日静置した後、4 で透析した。この後、5.9時間後にPBSバッファー (700 mL) を交換し、12時間後に透析膜からエッペンドルフチューブに移し換えて、-78 で保存した。

【0043】BSAコンジュゲートの調製; BSA (7.0 mg) のPBSバッファー溶液 (2.0 mL) に活性化エステルである化合物9 (約2.4 μ mol) のDMF溶液 (50 μ L) を加えて10分間攪拌した。一日静置した 10 後、4 で透析した。この後、5.9時間後にPBSバッファー (700 mL) を交換し、12時間後に透析膜からエッペンドルフチューブに移し換えて、-78 で保存した。

【0044】3. ハプテン価の解析

透析して得た BSAコンジュゲートを、MALDI-TOF-MSで質量分析した。BSAコンジュゲートの平均分子量は約70200であった (BSAの分子量約66400)。ハプテン部分の分子量が (476) であるので、BSAコンジュゲートには平均8個のハプテンが連 20 結されていることが分かった。

【0045】4. モノクローナル抗体 (非標識抗体として用いる) の作製; 前項で得たABCDE-KLH (100 μ g) にRIBIアジュバンド (RIBI Immunol. Res. Inst.社製) を加え、良く攪拌してエマルジョンとしたのち、これをBalb/cマウス (5匹) に二週間毎に3回、腹腔内投与した。初回免疫から39日目にマウスの血清を採取し、ABCDE-BSAを用い、ELISA法で血清の抗体価を滴定した。

【0046】ELISA法; 96ウエルELISA用プ 30 レート (ファルコン社製、3910) の各ウエルに50 μ LのABCDE-BSA溶液を入れ、室温で2時間放置後、4で一晩放置して、プレートにコンジュゲートを吸着させた。プレートをPBS-Tween [PBSバッファーに5% Tween 20 (和光純薬製 ポリオキシエチレン (polyoxyethylene) (20) ソルピタン モノラウレート (Sorbitan Monolaurate) ICI社 商標Tween-20 相当品 No. 167-11515)] を含むもので3回洗浄後、MILLI-Q水 (Millipore 社製の複数段階の樹脂やフィルターを用いて、精製水を脱イオン化 40 もので一度洗浄し、吸着しなかったコンジュゲートを除去した。ハイブリドーマ培養上清 (もしくは抗血清、精製抗体溶液) を加え、室温で1時間放置後、PBS-Tweenと、MILLI-Q水で順次洗浄した。50 μ Lの酵素標識二次抗体 (ヤギ抗マウスIgG-西洋わさびペルオキシダーゼ) (ZYMED社製、62-6520 1000倍希釈) を各ウエルに入れ、室温で1時間放置後、PBS-Tweenと、MILLI-Q水で順次洗浄した。100 μ Lの基質溶液 [基質溶液の組成: 1,2-phenylenediamine 4.0 mg、過酸化水素水 10 μ L、 50

0.1 M クエン酸 バッファー (pH 5.0) 10 ml] を加え、5分間呈色反応を進行させた後、2規定硫酸 (50 μ L) で反応を停止した。マイクロプレート吸光度測定装置 (BIO-RAD, Benchmark 170-6850) を用いて、450 nmの吸光度を測定し、陽性のクロンを判別した。

【0047】血清中の抗体価の測定

ハプテン (ABCDEあるいはIJKLM) - BSA溶液を吸着した96ウエルELISA用プレートの最上段に、50 μ LのPBSバッファーを入れた。200倍に希釈したマウスの抗血清 (50 μ L) を最上段のウエル (A1) に加え、この溶液を順次2倍希釈した (縦列A1-A8に400倍から51,000倍の希釈系列を作製)。プレートを室温で1時間放置後、上述の方法で450 nmの吸光度を測定した (図2参照)。血清希釈率の対数と吸光度をプロットすると、血清濃度依存的に、血清中の抗体がABCDE-BSAコンジュゲートと結合することが分かった。

【0048】5. 抗体価の高いマウスからの脾臓の摘出、培養

5匹の中で、最も高い抗体価を示したマウスに、腹腔内にABCDE-KLH (100 μ g) を追加免疫し、3日後に脾臓を摘出した。脾臓に付着している組織や臓器の断片をピンセットで取り除いた後、基本培地 [RPMI Medium 1640 (GIBCO 社製、一袋、炭酸水素ナトリウム2g、ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO 社製) 20 mg, 200 mM-グルタミン20 mLを蒸留水に溶かして1000 mLとしてpHを7.2に調製したもの) 入りのシャーレに移し、ピンセットで脾臓内の細胞を浮遊させた。脾細胞浮遊液を濾過後、50 mL遠心管に移した。さらに、基本培地15 mLを加え、良くピペティングして濾過し、全量を30 mLとした。800回転/分で5分間、室温で遠心分離し、上清を除去、タッピングした。HT-BC培地 [牛胎児血清 (FCS) 200 mL, HTコスモバイオ社製HT液 (50倍濃縮) 20 mL、BC (Bioresearch island社製 BriClone) 50 mL, 基本培地 730 mLを混合したもの] を30 mL加え、細胞を浮遊させた。

【0049】冷凍庫から (-130) からミエローマ細胞P3X63-Ag8.653 (大日本製薬社製) を凍結したチューブを取り出し、37 恒温槽中で速やかに解凍した。チューブをアルコール綿でよく消毒したのち、チューブ内の細胞浮遊液を基本培地30 mLに移した。800 rpm (回転/分) で5分間、室温で遠心分離し、上清を除去した。タッピング後、10% FCS (基本培地に10%のFCSを添加) を10 mL加え、細胞を浮遊させ、50 mL培養フラスコに移した。フラスコの栓をゆるめ、炭酸ガス培養装置にいたれた。1-2日毎に継代し、250 mLフラスコ2本分 (90-100 mL) にした。

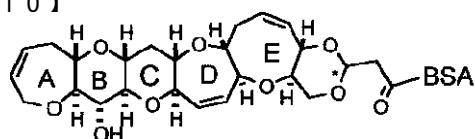
19

【0050】マウスから取り出した脾細胞(2×10^8 個)とミエローマ細胞(5×10^7 個)を混合し、遠心(800回転/分、5分間、室温)し、上清を除去、タッピングした。この後、ECFバッファー〔マンニトール 45.5 g, 10 mM 塩化カルシウム(10 mL)、10 mM 塩化マグネシウム(10 mL)、20 mM Tris バッファー pH7.2を蒸留水で溶かして、1000 mLにしたもの〕を30 mLを加え、遠心(800回転/分、5分間、室温)、上清除去、タッピングする操作を2回繰り返した後、ECFバッファー(4.8 mL)を加えた。これを6ウエルプレート(SUMIRON製)に、1.2 mLずつ分注し、島津社製SSH-10細胞融合装置を用い、以下の条件で細胞融合した〔電極間距離: 1.0 mm; 交流周波数: 1 MHz; 交流初期印加電圧: 80 V; 交流初期印加時間: 10 秒(s); パルス幅: 40 (マイクロ秒(μ s)); パルス電圧: 920 V; パルス電界強度: 2.30 kV/cm; 交流2次印加電圧: 80 V; パルス印加間隔: 1.0 秒; 印加パルス数: 1; パルス電圧変化: +0 V; 交流最終印加時間: 10 秒; 交流電圧減衰率: 0%; 接触強化: off〕。

【0051】調製したハイブリドーマ細胞を、各ウエルにHAT培地〔HAT-RPMI 1640, 20%FCS, 5% Briclone (BioResearch Ireland社製)含有〕100 μ Lを加えた96ウエルプレート10枚に移した。2週間後、ハプテンとしたABCDE環部に結合する抗体を産生するハイブリドーマ10C9(受託番号FERM P-18749とて独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託された。受託日平成14年3月5日)をABCDE-BSAを用い、ELISA法でスクリーニングした。陽性のウエルを選択し、2回クローニング後に、再度ELISA陽性となった抗体を産生するモノクローンを順次培養し、それぞれ約200 mLまで増殖させた。この結果、6種のモノクローナル抗体を調製することができた。得られたモノクローナル抗体の結合試験をELISA法で検討した。抗原として、シガトキシン類の部分構造を連結したBSAコンジュゲートを用いた。その結果(表3)、ABCDE-KLH環部を免疫して得られたIgG抗体は、ABCDE-BSA(化学式AE-BSA)へ強く結合し、IJKLM-BSA(化合物10)とは結合しないことがわかった。

【0052】

【化10】



化学式AE-BSA

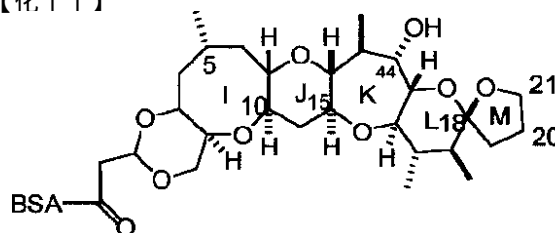
【0053】

【表3】

モノクローナル抗体	20	
	Kd (nM) 対AEハプテン	Kd (nM) 対CTX3C
1C5	3.1	3.1
2G5	7.3	23.2
5E6	10.8	19.8
6D5	10.0	16.2
10C6	10.8	26.7
10C9	0.8	2.8

【0054】

【化11】



【0055】サンドイッチ検定法

Coaster社ELISA Plate (83590)に10C9のPBS溶液(4.3 μ g/mL)を50 μ L/ウエル入れ、4で一晩静置した。溶液を捨て、1%スキムミルク入りPBSを加えて(400 μ L/ウエル)室温で1時間静置した。溶液を廃棄後、PBS-Tweenで3回洗浄した後(200 μ L/ウエル)、CTX3Cの希釈溶液を入れ(50 μ L/ウエル)1時間静置した。溶液を廃棄後、PBS-Tweenで3回洗浄した(200 μ L/ウエル)。3D11-HRPのPBS-Tween溶液(1 μ g/mL, 50 μ L/ウエル)を加え、室温で1時間静置した。溶液を廃棄して、PBS-Tweenで3回洗浄した(200 μ L/ウエル)後、OPD溶液(100 μ L/ウエル、Sigma社FAST(商標名) o-PHENYLENE DIAMINE DIHYDROCHLORIDE TABLET SETSを使用)を加えて、室温にて5-10分発色させた。2規定硫酸水溶液(50 μ L/ウエル)を加えて反応を停止させ、吸光度(450 nm)をBio-Rad社製Microplate Reader Benchmarkにて測定した。測定結果を図1に示す。

【0056】

【発明の効果】以上述べたように、本発明において設計した合成ハプテン(IJKLM環部)、および合成ハプテン(ABCDE環部)を用いて得られたモノクローナル抗体の組み合わせたサンドイッチELISA法を用いることにより、シガトキシンを高感度で検定できることを見出した。従来の、1種の抗体のサンプルへの結合を指標とするシガテラ毒検定キットにおいては、しばしば、陽性となっても夾雑物に結合し陽性となった擬陽性のケースを避けることができなかった。従来技術ではそのことの判別も不可能であったので、本発明の測定キットの提供は、社会生活の向上に資すること顕著である。被検出非タンパク化合物に対する2つの抗体を組み合わせたサンドイッチ式検定法は、本発明により初めて確立したものであり、特に、シガトキシンCTX3Cの特異性の高い検出方法を確立した点において優れた効果をもたらしたものである。

【0057】本明細書で使用の一部の略号表

BSA: bovine serum albumin

CTX: ciguatoxin

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

HRP: Horseradish Peroxidase (西洋わさびペルオキシダーゼ)

O.D.: Optical Density

OPD: o-Phenylene Diamine

PBS: Phosphate Buffered Saline

Bn: benzyl

DDQ: 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

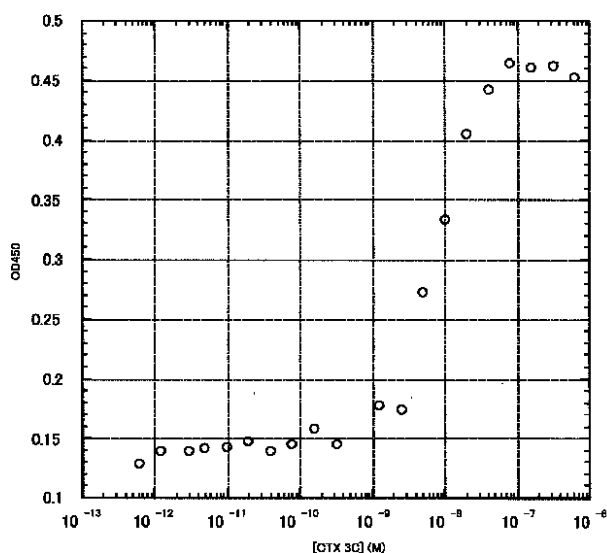
EDC; 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride

FCS: fetal calf serum

*

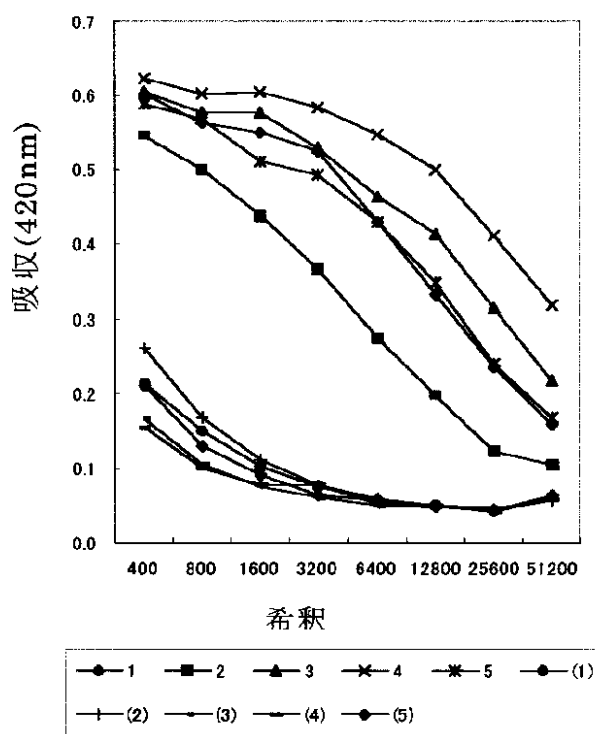
【図1】

サンドイッチ ELISA



【図2】

A-E 免疫マウス



【手続補正書】

【提出日】平成15年2月17日(2003.2.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項3

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項3】 式1の合成ハプテンを用いて得られた受

*Ig: Immunoglobulin

KLH: keyhole limpet hemocyanine

TBAF: tetra-n-butylammonium fluoride

Ts: p-toluenesulfonyl

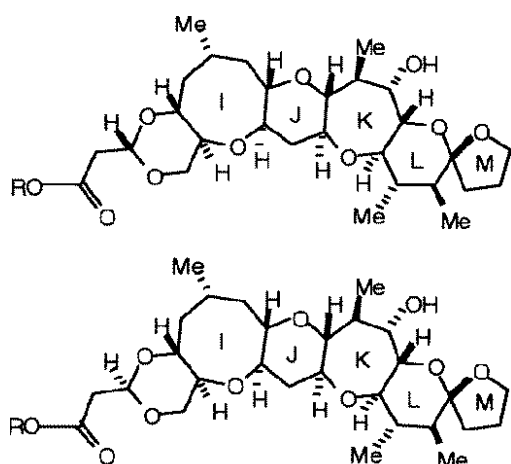
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のサンドイッチ法によるCTX3Cの検出特性

10 【図2】 1-5はシガトキシンのA～E環部を含むBSAとのコンジュゲートA-E-BSAに対する抗体価、(1)-(5)はシガトキシンのI～M環部を含むBSAとのコンジュゲートI-M-BSAに対する抗体価

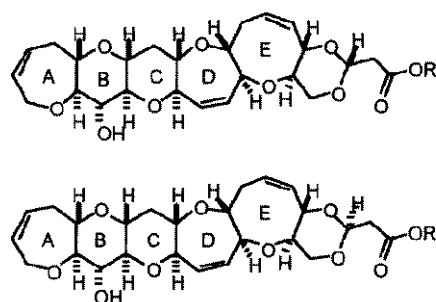
託番号FERM BP-8293のハイブリドーマ3D11により産生されるモノクローナル抗体と式2の合成ハプテンを用いて得られた受託番号FERM BP-8292のハイブリドーマ10C9により産生されるモノクローナル抗体とを組み合わせたものからなることを特徴とする請求項2に記載のシガトキシン類検出サンドイッチ測定キット。

【化1】



式 1

【化2】



式 2

RはHまたメチル基である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項10

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項10】 受託番号FERM PB-8293として受託されたシガトキシン類と特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ3D11。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正内容】

【0003】本発明者らは、初期にはシガトキシンの左側ABC環部を化学合成し、これを合成ハプテンとしたタンパクコンジュゲートを用いて、三種のモノクローナル抗体を調製しているが、これらはいずれもシガトキシンに非常に弱いアフィニティーしか示さなかった（Syntesis (1999年)、第1431頁）。また、他のグループも、合成ハプテン（JKLM環部）のコンジュゲートの免疫を試みているが、モノクローナル抗体の調製には至っていないようである〔Toxicon第38巻(2000年)第669頁〕。このような状況の中で、本発明者らは、更に、シガトキシン類の右末端の部分構造であるIJKLM環

部を含む合成ハプテンを設計、合成し、この合成ハプテンのタンパクコンジュゲートでマウスを免疫する工程を含む方法により前記受託番号FERM PB-8293のハイブリドーマを作りだし、当該ハイブリドーマを用いてシガトキシン類に特異性の高いモノクローナル抗体を調製することに成功した。そして、該モノクローナル抗体を3D11（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターの受託日、平成14年3月5日、受託番号FERM P-18750。平成15年2月13日に前記原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管申請により受託番号FERM PB-8293として受託された。）と命名した。該モノクローナル抗体のシガトキシンCTX3Cに対しての結合解離定数(Kd)は、122nMであった。また、シガトキシンに構造の類似した海産ポリエーテル系毒素と前記抗体の交差活性を測定したところ、赤潮毒ブレベトキシン類と交差活性が確認されたが、この交差活性は、シガトキシン類との結合と比べると350分の1以下の非常に弱いものであることを見出した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正内容】

【0005】本発明者らは、前記検討に対し更にシガトキシン類に対しての親和性を更に向上させたモノクローナル抗体を得ることができる合成ハプテンを設計してシガトキシンCTX3Cの左末端の部分構造であるABCDE環部を含む化合物をハプテンとして設計、合成し、この合成ハプテンのタンパクコンジュゲートでマウスを免疫する工程を含む方法により前記受託番号FERM BP-8292のハイブリドーマ10C9（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターの受託日、平成14年3月5日、受託番号FERM P-18749。平成15年2月13日に前記原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管申請により受託番号FERM PB-8292として受託された。）を作りだし、当該ハイブリドーマを用いてシガトキシン類に特異性の高いモノクローナル抗体を調製することに成功した。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の第1は、被検出非タンパク化合物を構成する分子内の部分構造から誘導される複数の合成ハプテンを利用して得られる前記被検出非タンパク化合物に特異的に結合する複数のモノクロー

ーナル抗体を組み合わせた前記被検出非タンパク化合物検出サンドイッチ測定キットである。本発明の第2は、被検出非タンパク化合物がシガトキシン類であり、前記分子内の部分構造から誘導される合成ハブテンがシガトキシン類を構成する分子両端の2種部分構造であることを特徴とするシガトキシン類検出サンドイッチ測定キットである。好ましくは、前記式1の合成ハブテンを用いて得られた受託番号FERM BP-8293のハイブリドーマ3D11により産生されるモノクローナル抗体と式2の合成ハブテンを用いて得られた受託番号FERM BP-8292のハイブリドーマ10C9により産生されるモノクローナル抗体とを組み合わせたものからなることを特徴とする前記シガトキシン類検出サンドイッチ測定キットであり、より好ましくは、前記組み合わせるモノクローナル抗体の一方のモノクローナル抗体が標識化したものであることを特徴とするシガトキシン類検出サンドイッチ測定キットであり、更に好ましくは、標識化合物が酵素標識体であることを特徴とする前記サンドイッチ測定キットである。また、非標識モノクローナル抗体がプレートに吸着されていることを特徴とする前記サンドイッチ測定キットである。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】本発明の第7は、受託番号FERM BP-8293として受託されたシガトキシン類と特異的に反応する前記各モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】前記調製したハイブリドーマ細胞を、各ウエルにHAT培地（選択培地）〔基本培地110 ml, FCS 30 ml, BC 7.5 ml, HAT（コスモバイオ社製 HAT液（50倍濃縮）を混合したもの）100 μLを加えた96ウエルプレート10枚に移した。2週間後、ハブテンとしたIJKLM環部に結合する抗体を産生するハイブリドーマをIJKLM-BSAを用い、ELISA法でスクリーニングした。陽性のウエルを選択し、2回クローニング後に、再度ELISA陽性となった抗体を産生するクローンを順次培養し、それぞれ約200 mLまで増殖させた。この結果、IJKLM-KLMを免疫原として、3種のモノクローナル抗体、すなわち、IM（IからMの環を持つことを意味する）-3D11（受託番号FERM P-18750として独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託され、平成15年2

月13日に前記原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管申請により受託番号FERM PB-8293として受託されたハイブリドーマにより産生された抗体。抗体名を前記受託ハイブリドーマを識別する表示と同一にした。）、IM-2C7およびIM-8B12を調製することができた。得られたモノクローナル抗体の結合試験をELISA法で検討した。抗原として、シガトキシン類の部分構造、すなわちABC、ABCD、A*BC（A環部がシガトキシン型のものを意味する）、およびIJKLM環構造を連結したBSAコンジュゲートを用いた。その結果、IJKLM環部親和性の高い抗体として、IgG抗体IM-3D11を選別した。IJKLMに対する解離定数Kdは8.6 nMであった（測定法については後述する。）。)

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正内容】

【0051】調製したハイブリドーマ細胞を、各ウエルにHAT培地〔HAT-RPMI 1640, 20%FCS, 5% Briclone (BioResearch Ireland社製)含有〕100 μLを加えた96ウエルプレート10枚に移した。2週間後、ハブテンとしたABCDE環部に結合する抗体を産生するハイブリドーマ10C9（受託番号FERM P-18749として独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託された。受託日平成14年3月5日。平成15年2月13日に前記原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管申請により受託番号FERM PB-8292として受託された。）をABCDE-BSAを用い、ELISA法でスクリーニングした。陽性のウエルを選択し、2回クローニング後に、再度ELISA陽性となった抗体を産生するモノクローンを順次培養し、それぞれ約200 mLまで増殖させた。この結果、6種のモノクローナル抗体を調製することができた。得られたモノクローナル抗体の結合試験をELISA法で検討した。抗原として、シガトキシン類の部分構造を連結したBSAコンジュゲートを用いた。その結果（表3）、ABCDE-KLM環部を免疫して得られたIgG抗体は、ABCDE-BSA（化学式AE-BSA）へ強く結合し、IJKLM-BSA（化合物10）とは

【書類名】 受託番号変更届
【提出日】 平成15年2月17日

【旧寄託機関の名称】 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

【旧受託番号】 受託番号FERM P-18749

【旧受託番号】 受託番号FERM P-18750

【新寄託機関の名称】 独立行政法人産業技術総合研
究所 特許性物寄託セン
ター
【新受託番号】 受託番号 F E R M B P - 8 2

9 2
【新受託番号】 9 3
受託番号 F E R M B P - 8 2

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/543	5 5 5	C 1 2 P 21/08	
33/577		C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08		15/00	C

(72)発明者 藤井 郁雄	F タ-ム(参考)	4B024 AA11 BA53 GA03 HA15
大阪府吹田市五月が丘東10 - 8 - 201		4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
(72)発明者 円谷 健		4B065 AA92X AB05 AC14 BA08
大阪府千里山西 6 - 14 - 3 - D203		CA25 CA46
		4C071 AA04 BB03 CC15 EE05 FF16
		GG03 HH05 LL01
		4H045 AA11 BA42 BA72 CA40 DA76
		EA50 FA72

专利名称(译)	用于检测雪卡毒素CTX3C的夹心测量试剂盒		
公开(公告)号	JP2003267979A	公开(公告)日	2003-09-25
申请号	JP2002066755	申请日	2002-03-12
[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	平間正博 大栗博毅 藤井郁雄 円谷健		
发明人	平間 正博 大栗 博毅 藤井 郁雄 円谷 健		
IPC分类号	G01N33/53 C07D493/22 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/543 G01N33/577		
FI分类号	C07D493/22 C07K16/44 G01N33/53.J G01N33/543.555.D G01N33/577.B C12P21/08 C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C071/AA04 4C071/BB03 4C071/CC15 4C071/EE05 4C071/FF16 4C071/GG03 4C071/HH05 4C071/LL01 4H045/AA11 4H045/BA42 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
其他公开文献	JP3820519B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种将两种单克隆抗体结合在一起的三明治方法，所述单克隆抗体是通过使用合成的半抗原获得的，该半抗原含有构成环瓜毒素的环的一部分的AE环部分和IM环部分。与由P-18750的杂交瘤3D11产生的西瓜毒素CTX3C特异性反应的单克隆抗体与由保藏号FERM P-18749的杂交瘤10C9产生的西瓜毒素CTX3C特异性反应的组合，特别是任何一种用于检测雪茄毒素的试剂盒，其包含通过将其中一种与标记的化合物结合而获得的标记的单克隆抗体，以及标记的标记的单克隆抗体和上述任何未标记的单克隆抗体的组合。

