

(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2004-107219**(P2004-107219A)**(43) 公開日 **平成16年4月8日(2004.4.8)**

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/10	C O 7 K 16/10	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53 D	
G O 1 N 33/569	G O 1 N 33/53 N	
	G O 1 N 33/569 L	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 19 頁)		

(21) 出願番号	特願2002-268987 (P2002-268987)	(71) 出願人	000006792
(22) 出願日	平成14年9月13日 (2002.9.13)		理化学研究所
			埼玉県和光市広沢2番1号
		(71) 出願人	000002071
			チッソ株式会社
			大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号
		(74) 代理人	100090941
			弁理士 藤野 清也
		(74) 代理人	100113837
			弁理士 吉見 京子
		(74) 代理人	100076244
			弁理士 藤野 清規
		(72) 発明者	間 陽子
			埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体およびその利用方法

(57) 【要約】

【課題】牛白血病ウイルスに共通して存在する構造糖蛋白に特異的に結合するモノクローナル抗体を開発すること。これにより、従来のモノクローナル抗体では検出不能であったウエスタンブロット法により牛白血病ウイルスを検出可能とすること。さらに迅速簡便かつ正確に牛血清中の抗牛白血病抗体を検出する方法を提供すること。

【解決手段】牛白血病ウイルス (B o v i n e L e u k e m i a V i r u s) のエンベロープ主要糖タンパクであって、還元性条件下、SDSで変性され、且つ電気泳動で測定された分子量が51kDaである抗原 (g p 5 1) に特異的に結合するモノクローナル抗体によって、課題が解決できた。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

牛白血病ウイルス (Bovine Leukemia Virus) のエンベロープ主要糖タンパクであって、還元性条件下、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で変性され、且つ電気泳動で測定された分子量が 51 kDa である抗原 (gp51) に特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項2】

寄託番号 FERM P-19010 の細胞の結合特異性の特徴を持つハイブリドーマ細胞系によって産生され得る、請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】

牛白血病ウイルス (Bovine Leukemia Virus) のエンベロープ主要糖タンパクであって、還元性条件下、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で変性され、且つ電気泳動で測定された分子量が 51 kDa である抗原 (gp51) を、ウエスタンブロット法により転写した抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1または2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

寄託番号 FERM P-19010 の細胞の結合特異性の特徴を持つハイブリドーマ細胞系によって産生することを特徴とする、請求項1記載のモノクローナル抗体の産生方法。

【請求項5】

請求項1～3のいずれかに記載されるモノクローナル抗体を用いて、牛白血病ウイルス (Bovine Leukemia Virus) 抗原をウエスタンブロット法により検出する方法。

【請求項6】

請求項1～3のいずれかに記載されるモノクローナル抗体で酵素免疫測定法 (ELISA) を行うことによって、血清中の抗牛白血病抗体を特異的に検出する方法。

【請求項7】

請求項1～3のいずれかに記載されるモノクローナル抗体を含む、血清中の抗牛白血病抗体を特異的に検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、牛白血病ウイルス抗原の検出あるいは牛白血病ウイルスに対する抗体量を免疫学的に測定するための方法及び該方法に用いる抗体に関する。特に本発明は、新規なハイブリドーマ細胞系 (寄託番号 FERM P-19010) が産生するモノクローナル抗体、及び該モノクローナル抗体を用いる牛白血病ウイルスの検出に関する。

【0002】

【従来技術】

牛白血病 (bovine leukosis) はリンパ細網組織由来のリンパ系細胞が全身性に悪性腫瘍性増殖したもので、同意の病名として bovine leukemia や lymphosarcoma が用いられる。現在、本病は疫学的、臨床病理学的所見から、▲1▼地方病型 (地方病性牛白血病 enzootic bovine leukosis) と散発型 (散発性牛白血病 sporadic bovine leukosis) に大別される。

牛白血病という名は総称であるが、一般には、牛白血病といえば地方病型を指すほど、牛に最も多発する型の腫瘍で、罹患することによる経済的損失も大きい。本病は 1978 年、ドイツの牛において初めて報告された。1969 年、Miller らによって地方病型発症牛から C 型ウイルス粒子が発見された。このウイルスは Bovine Leukemia Virus (BLV) と呼ばれ、地方病型を発生させる。散発型の病原微生物は不明である。地方病型の発症は散発型よりはるかに多く、感染牛のうちおよそ 1% が発症すると言われている。感染は水平・垂直ともに起こる。これまで発症率が低いことから軽視

10

20

30

40

50

されることが多く、ほとんど摘発淘汰の措置は行われていなかった。近年感染牛の発見が増加し、日本国内における感染牛は全体の50%以上を占めるといわれ、比例して発症牛の数も急増傾向である。このため、近年定期的な抗体検査によって感染牛の摘発を行い、感染牛を繁殖に用いない措置が講じられている。しかし、全国で統一された措置を講ずることはなく、また対策も不十分であることも多く、依然として感染牛の増加が認められ、このまま放置すればいずれはほとんどが感染牛となる恐れもある。感染あるいは発症した牛は有効な治療法がなく、また予防措置としてのワクチンもない。毎年国内で500頭程度の成牛が発症している。発症牛は市場価値がまったくないため、それまでに要した飼養コストがすべて無駄となり、甚大な損害をもたらす。

【0003】

かかる病気の予防措置は、現在ではあくまでも早期発見と蔓延防止である。そのため、感染牛であるか否かの適切な摘発と淘汰が必要であるが、従来汎用されている病理学的診断法として抹消血リンパ球からのウイルス分離やゲル内沈降反応による抗体の検出が行われている。ウイルスの分離には検体の抹消血リンパ球を感受性細胞たとえば羊胎児腎臓細胞に感染させ、シンチウム形成を判定する。またはシンチウム形成細胞を既知抗ウイルス抗体を用いた蛍光抗体法などで証明する。一方、抗体の検出にはゲル内沈降反応による方法が一般的である。しかし検出感度に課題があり、感染牛を発見できない場合もある。一方、中和法は感度は高いものの、操作に熟練を要する。また、活性のある牛白血病ウイルスを用いなければならないため、農場に出入りする獣医師等が検査にあたることは好ましくない。

【0004】

ウイルス検出に用いられる蛍光抗体法は、検体の抹消リンパ球を分離後、7～10時間液体培地中で培養し、蛍光物質（FITC）で標識したポリクローナル抗体を反応させ、蛍光顕微鏡下で観察する。

蛍光発色が認められればウイルスの存在が証明される。しかし、用いるポリクローナル抗体はヒツジやヤギなどの感受性動物にBLVを頻回接種して得られた血清から精製されたもので、非特異的な反応が起こることがある。他に、BLV感受性細胞（ヒツジ胎児腎臓細胞など）にBLVを感染させ、感染細胞を乾燥固定したのち蛍光抗体法でウイルスの確認をする場合がある。この場合でも同様に非特異的な反応のほか、乾燥固定によって一部の抗原エпитープが破壊されている。

【0005】

抗体検出の方法として、ゲル内沈降反応は世界的に汎用されている方法である。一般にAgar gel immunodiffusion（略してAGID）と呼ばれる。方法の詳細は国際獣疫機構（OIE）のマニュアル3. 2. 4章に記載されている。簡単に記すと、0.8～1.2%の寒天平板に直径6.5mmの穴を1つ、その周辺に5個の同径の穴をあける。中心の穴に不活化した牛白血病ウイルスを含む抗原液を加え、周辺の穴に被検血清を加え、室温で72時間まで静置する。検体が牛白血病抗体陽性であれば、中心の穴と被検血清の穴との間に沈降線が現れる。陰性であれば沈降線が現れない。

【0006】

中和法は牛白血病ウイルス感染細胞に被検血清を加えた後、あらかじめイーグルMEM培地中で培養したFLK細胞を加えて培養する。抗牛白血病抗体が検体中に存在しなければウイルスがFLK細胞に感染し、顕微鏡下、細胞は巨核細胞に変化する。抗体があればウイルスの感染が阻止され巨核細胞への変化は見られない。判定までにおよそ1週間程度の時間を要する。

【0007】

かかる現状を打破すべく、各方面でBLVに対するモノクローナル抗体が開発されている。これまでBLV遺伝子の全配列が判明している。ウイルス表面構造タンパクもいくつか定義されており、gp51, p24, p12, gp30などが知られている。これらの遺伝子配列も既知である（非特許文献1参照）。これらのうち、特にgp51がBLVの宿主細胞への感染に関与する主要な構造糖タンパクであることが知られ、gp51に対す

10

20

30

40

50

るモノクローナル抗体の研究が行われた。中でも、DANIEL PORTELLEらがgp51に対するモノクローナル抗体8種を開発した（非特許文献2参照）。これらはA～Hまで8種のエピトープを認識し、内、3種が中和エピトープを認識するものであった。

【0008】

しかしながら、これら8種のモノクローナル抗体はタンパクの可溶化に用いられる界面活性剤であるSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）及び、たんぱく質構造中のS-S結合を還元して切断する作用のある2Me（2-メルカプトエタノール）で処理されたgp51とは反応しない。一般に、モノクローナル抗体が開発された場合、評価手段の一つにウエスタンブロット法がある。これは標的抗原を含むウイルス、細胞、菌体など、不純物を多く含む物質でも、電気泳動で分離し、これをニトロセルロース膜などに転写し、該膜を免疫染色してモノクローナル抗体が抗原のどの分子量の位置と特異的に反応するかを観察する手法で、現在広く用いられている。しかしながら、標的抗原を電気泳動により純粋に分子量的に分割するためには、タンパクを可溶化し、立体構造を破壊して直鎖状することが必要である。そこで賞用されている手法は2Meを含むSDSで抗原を処理したのち、SDSを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動である。さらに泳動後、脆弱なゲルでは免疫染色が困難なため、ニトロセルロース膜などに電氣的に転写する。膜に転写された抗原にモノクローナル抗体を接触、反応させると、結合部位にモノクローナル抗体は結合する。さらに市販の酵素標識抗マウス抗体を反応させ、酵素と反応して発色する基質を加えて特異的なバンドの有無を観察する。

ここで前提となるのは、SDSや2Meの処理により、変性や分解が起こるが、こうして変化させてもなおかつ認識するエピトープのみが本方法で検出されていることである。すなわち、上述の8種のモノクローナル抗体はいずれも2Me及びSDS処理によって変性したBLV抗原のいずれのエピトープも認識できないことを意味する。

【0009】

そこでPORTOTELLEらは、ラジオイムノプレシピテーション法により、該モノクローナル抗体群がBLVのgp51を認識していることを確認した。すなわち、放射線標識したBLVを極温和な界面活性剤で可溶化し、これにモノクローナル抗体を加えると、抗原抗体反応により生じた抗原抗体複合体の沈殿が生じる。この沈殿を集め、通常の電気泳動を行う。抗体と抗原は同時に電気泳動に供されることになるが、抗体に認識された放射線標識抗原がX線写真により分子量51kDaの位置に明確にバンドとして示されていた。この方法では放射性物質を取り扱うための特殊な施設と資格が必要で、一般的な研究者が簡単にできるものではなく、危険性も高い。

【0010】

一方、ウエスタンブロット法において、モノクローナル抗体を用いず、ポリクローナル抗体であれば、特異的なバンドを確認することは可能である。ポリクローナル抗体はBLVに感受性の動物（ヒツジ、ヤギ、ウシなど）にBLVを感染させることにより得られる。ポリクローナル抗体の場合はウエスタンブロットに先立つSDSや2Me処理による変性によっても認識可能な抗体を含んでいればバンドとして検出可能である。しかし、ポリクローナル抗体は再現性が乏しいため、抗血清のロットごとに抗原への反応性が異なることがある。また、非特異的な吸着によるバンドの出現は珍しくない。このことは特異的な抗原の検出の妨げになることがある。

そこで、ウエスタンブロットに供した検体中のgp51が明確にバンドとして確認しうるモノクローナル抗体の開発が必要となる。還元性条件でSDS変性の影響を受けないエピトープを認識するモノクローナル抗体は、gp51の一次構造を認識するものであることが必要である。そのためには、免疫原として天然の牛白血病ウイルスと大部分一次構造が一致していると考えられる遺伝子組み換えgp51を組み合わせたことが必要と考えられた。

【0011】

【非特許文献1】

10

20

30

40

50

Sagataら、Proceeding of National Academic Science USA 82巻 p 677-p 681 (1985)

【非特許文献2】

DANIEL PORTETELLEら VIROLOGY 122, p 353-362 (1982)

【非特許文献3】

Yeast 4巻、p 47-59 (1988)

【非特許文献4】

Journal of General Virology 73巻 p 2457-p 2461 (1992)

【非特許文献5】

安藤民衛ら 単クローン抗体実験操作入門 p 195~p 197 (1991年)

【非特許文献6】

P. Nakane and A. Kawaoi J. Histochem. Cytochem. 22, p 1084-1091 (1974)

【非特許文献7】

石川栄治ら、酵素免疫測定法 第二版 p 75-100 医学書院 (1982年)

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の従来技術の問題点を解決しようとするものである。すなわち、本発明は牛白血病ウイルスを検出するために用いることが出来るモノクローナル抗体を開発することを第1の課題とする。さらに、本発明は、そのようなモノクローナル抗体を用いて牛白血病ウイルスを特異的に短時間で再現性よく検出するシステムを構築することを課題とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはまず、牛白血病ウイルスに共通して存在し、かつ他の類縁ウイルスに存在しないウイルス表面構造糖蛋白 gp 51 に注目した。天然の牛白血病ウイルスを抗原としてマウスに免疫し、さらに遺伝子組み換えによって得られた、gp 51 を構成するペプチドを最終免疫に用いた。これにより、天然のBLVに存在するgp 51 のうち、立体構造よりも一次構造配列を特異的に認識する抗体も多く産生され、ウエスタンブロット法に使用できるモノクローナル抗体が得られる可能性が高まると仮定した。つまり、該抗原に対するモノクローナル抗体を開発することを第一の課題として鋭意研究した。さらに迅速簡便かつ正確に抹消リンパ球中のウイルス抗原 gp 51 や感受性細胞に接種増殖させたウイルス抗原 gp 51 を、一般に用いられるウエスタンブロット法により、非特異的反応を抑え、正確迅速にスクリーニングし、もって牛白血病の蔓延を効果的に防御するための抗原検査システムあるいは安定な抗原エピトープを用いた酵素免疫測定法により抗体検査システムを構築することをさらなる課題として鋭意研究した。その結果、本発明者らは、牛白血病ウイルスのウエスタンブロットによる抗原検出あるいはELISAによる抗体の迅速、正確な測定に寄与しうるモノクローナル抗体を発明し、本発明を完成させた。

【0014】

すなわち、本発明は下記の構成を有する。

(1) 牛白血病ウイルス (Bovine Leukemia Virus) のエンベロープ主要糖タンパクであって、還元性条件下、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で変性され、且つ電気泳動で測定された分子量が51 kDaである抗原 (gp 51) に特異的に結合するモノクローナル抗体。

(2) 寄託番号FERM P-19010の細胞の結合特異性の特徴を持つハイブリドーマ細胞系によって産生される、上記(1)記載のモノクローナル抗体。

(3) 牛白血病ウイルス (Bovine Leukemia Virus) のエンベロープ主要糖タンパクであって、還元性条件下、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で変性さ

10

20

30

40

50

れ、且つ電気泳動で測定された分子量が51kDaである抗原(gp51)を、ウエスタンブロット法により転写した抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする上記(1)または(2)に記載のモノクローナル抗体。

(4) 寄託番号FERM P-19010の細胞の結合特異性の特徴を持つハイブリドーマ細胞系によって産生することを特徴とする、上記(1)に記載のモノクローナル抗体産生方法。

(5) 上記(1)～(3)のいずれかに記載されるモノクローナル抗体を用いて、牛白血病ウイルス(Bovine Leukemia Virus)抗原をウエスタンブロット法により検出する方法。

(6) 上記(1)～(3)のいずれかに記載されるモノクローナル抗体で酵素免疫測定法(ELISA)を行うことによって、血清中の抗牛白血病抗体を特異的に検出する方法。 10

(7) 上記(1)～(3)のいずれかに記載されるモノクローナル抗体を含む、血清中の抗牛白血病抗体を特異的に検出するためのキット。

【0015】

モノクローナル抗体の作成法はMilsteinらによって1975年頃に開発され、その後急速に発展し、生物学、医学、農学等の幅広い分野で利用されている。特にマウス由来の骨髓腫細胞(ミエローマ細胞)とマウスの抗体産生細胞たとえばBリンパ球との融合によって単一のエピトープを認識する抗体を永続的に産生しうる融合細胞(ハイブリドーマ)の作成が今日最も一般的になっている。

【0016】

20

マウスモノクローナル抗体作製法の概略は以下の通りである。

遺伝的に単一のBALB/cマウスに抗原物質を免疫注射し、抗体を産生させる。抗体産生の有無は酵素免疫測定法(ELISA)やウエスタンブロット、オクタロニー法、免疫拡散法等種々の方法で確認できる。抗体価の上昇が認められたら、マウスから無菌的に脾臓を摘出する。脾臓には抗体産生細胞が約 $1 \sim 2 \times 10^8$ 個程度存在しているが、これらの細胞のマウス体内での半減期は数週間から数ヶ月であり、増殖分化しない。また、各細胞はそれぞれ1つのエピトープを認識する抗体のみを産生しており、全体で種々のエピトープを認識するポリクローナルな抗体を産生している。

【0017】

脾臓から細胞を取り出した後、マウスのミエローマ細胞と融合させる。ミエローマ細胞は抗体産生細胞と異なり、増殖を繰り返す。ミエローマ細胞には現在NS-1、P3、P3U1、MPC-11、SP2等がよく用いられている。細胞融合により、得られたハイブリドーマは、抗体を産生し、かつ永続的に増殖しうるため、大量の抗体を得ることができ、また、後述のクローニングによって単一のエピトープのみを認識するモノクローナルな抗体を永続的に産生しうる。 30

細胞融合は、20重量%～80重量%のポリエチレングリコール溶液を脾細胞とミエローマの混合物に加えることにより、脾細胞とミエローマ細胞の細胞膜が溶けて、当初は二つ以上の核と共に通常の細胞質を取り囲む。細胞膜を融合した後、数日で核が溶け、同調的有糸分裂が可能となる。これらの融合した細胞が分裂すると、両方の融合したパートナーの多くの種類の染色体は、ハイブリッド細胞系が安定するまでに消失する。 40

融合直後は、脾細胞同士およびミエローマ同士の融合細胞が存在する。また、未融合の脾細胞、ミエローマ細胞も存在する。脾細胞とミエローマの融合細胞すなわちハイブリドーマ以外はヒポキサンチンアミノプテリンチミジン(HAT)選択培地により、増殖を防止あるいは死滅させることができる。このようにしてハイブリドーマだけが培養液中で増殖する。

【0018】

ハイブリドーマが生成すると7日～14日のうちに増殖したハイブリドーマの細胞塊が肉眼で確認できるようになる。このときの培養上清には産生された抗体が放出されている。この時点では数種のハイブリドーマが混在している状態であり、培養上清中の抗体も種々のエピトープを認識する抗体の混合物であったり、あるいは不必要な抗体を含んでいる場 50

合が多い。この段階でまず、培養上清中の抗体の中に、必要とする抗体が含まれているかどうかをE L I S A等でスクリーニングする。スクリーニングによって陽性のクローンを選択する。

【0019】

次にクローニングによって、陽性クローンをさらに単一なものに仕上げる。一般的なクローニング法は限界希釈法及び軟寒天法であるが前者の方が一般的である。限界希釈法では、ハイブリドーマ細胞を1個／ウェル程度となるように96ウェル培養プレートにまき込んで7日～14日間培養し、生じたコロニーが単一でありかつ陽性クローンであることを条件として選択する。一般にクローニングは2回以上繰り返す方が単一なクローンを得られやすくなる。

得られたクローンは、24ウェルプレートへ移して拡大培養し、最終的には100mL前後のスケールまで増殖させる。増殖して得られたハイブリドーマは、通常、-80℃以下、望ましくは液体窒素中で凍結保存することが望ましい。

適当な方法で凍結保存されたハイブリドーマは必要に応じて融解し、増殖させることができる。十分に増殖したハイブリドーマの培養上清にはモノクローナル抗体が約10μg/mL～100μg/mL程度含まれている。またハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔に接種し、マウス体内で無ウイルス的にハイブリドーマを増殖させることができる。十分な増殖が達成されれば、マウスの腹水および血液から10mg/mL前後のモノクローナル抗体が得られる。

得られたモノクローナル抗体は様々な視点からスクリーニングされ、1個～数個のクローンに絞られるのが普通である

【0020】

モノクローナル抗体の利用分野は広範囲にわたるが、例えば、本研究の成果では、モノクローナル抗体を用いた牛白血病の主要表面構造糖タンパクgp51の特異的な検出がある。

材料としてはBLV感染細胞例えば感染動物から得られた抹消リンパ球や、感染動物のリンパ球を感受性細胞例えばFLK（ヒツジ胎児腎臓細胞）に接種して数日培養後、ウイルスを増殖させたものを用いる。ブランクとしてウイルス感染のない上記細胞を用いる。これらの細胞を温和な非イオン系界面活性剤、例えばノニデットP-40（商標）やTriton X（商標）などを0.1W/V%～10W/V%の濃度で加えて細胞膜を溶解する。これを一般にセルライセートと呼ぶ。セルライセートの上清を遠心分離（10000rpm程度）により得て、一般に用いられるSDS電気泳動に供する。すなわち、上清100μLに対して0.625Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）12.5μL、β-メルカプトエタノール5μL、2mg SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、ブロモフェノールブルー（BPB）0.05W/V%を加えて56℃で30分間あるいは25℃で18～24時間処理する。これをスラブ電気泳動のウェルに各10μLずつチャージする。同時に分子量マーカー（第一化学薬品製）を5μLチャージする。

スラブ電気泳動用のポリアクリルアミドゲルは濃縮ゲル3.5～5.0V/V%、分離ゲル7.5～12V/V%とし、20mAで時間通電し、BPBのラインがゲルの下端から5mm程度まで泳動したら通電をとめる。

泳動後、ゲルをニトロセルロースメンブランに電気通電によって転写し、1重量%スキムミルクを含む生理食塩液に浸して4℃で18～24時間あるいは37℃で1時間ブロッキングを行う。次にメンブランを0.05重量%Tween 20（登録商標）を含む生理食塩液で洗浄し、分子量マーカーが泳動されたレーンのみを切り取ってクマジーブリリアントブルー染色液（CBB）で染色する。モノクローナル抗体を0.05重量%Tween 20（登録商標）を含む生理食塩液で10倍希釈し、上記メンブランを浸し、振盪しながら25℃で1時間反応させる。次にメンブランを0.05重量%Tween 20（登録商標）を含む生理食塩液で充分洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG（ザイメッド社製）を0.05重量%Tween 20（登録商標）を含む生理食塩液で200倍に希釈してメンブランを浸し、振盪しながら25℃で30分間反応させる。次にメンブランを0

10

20

30

40

50

． 0 5 重量% T w e e n 2 0（登録商標）を含む生理食塩液で充分洗浄した。次に 5 0 m M 4-クロロ-1-ナフトール（シグマ社製）および 0 . 0 0 3 容量% 過酸化水素水を含むリン酸緩衝液（p H 7 . 2）にメンブランを浸して室温で発色させる。

C B Bで染色された分子量マーカーの位置と比較して、上記ウエスタンブロットにより、ウイルス感染細胞にはモノクローナル抗体と特異的に結合した分子量は 5 1 k D a の位置に抗原のバンドが認められ、一方、非感染細胞には全くバンドが認められない。ポリクローナル抗体を用いた場合、非感染細胞にもバンドが出現することがしばしば起こる。これは用いた細胞に対する抗体を含んでいる場合があるためで、5 1 k D a 付近に出現する場合は特に紛らわしい。従って、モノクローナル抗体を用いることはきわめて有意義である。

10

【0 0 2 1】

また、本発明の効果として牛白血病抗体の検出がある。抗原を固相に固相化し、モノクローナル抗体が認識する抗原エピトープと全く同一の部位を認識する抗体だけを検出する競合的 E L I S A によって、モノクローナル抗体の認識エピトープの機能が明らかであれば、検出された抗体の持つ機能的意義が明確となる。具体的には、牛白血病ウイルス由来の抗原を固相、例えば 9 6 穴式ポリスチレン製マイクロタイタープレートに固相化する。抗原はウイルスの超遠心ショ糖密度勾配法による分画精製画分、ウイルスを含む培養上清等があげられる。しかし、得られる g p 5 1 の量は極めて少ないため、実用的ではない。牛白血病のような持続型感染の経過をとるウイルスは一般的に得られるウイルス粒子量が極めて少なく、ある程度大量に必要な場合は遺伝子組み換えによって発現された必要な抗原エピトープを含んだ画分が有効である。この方法では標的とする牛白血病ウイルスの特定エピトープたとえば g p 5 1 , p 2 4 , p 1 2 , g p 3 0 などの遺伝子配列が上述の通り既知である（非特許文献 1 参照）。

20

既知配列を適当なベクターに組み込み、標的蛋白を発現させる試みもすでになされている（非特許文献 3 , 4 参照）。いずれにせよエピトープが保存されており、かつ液状物質となっていれば固相への固相化は達成可能である。抗原溶液は、陰イオンクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の分離精製用担体を用いてさらに精製することが望ましい。陰イオンクロマトグラフィーは例えば D E A E-セファロースがある。アフィニティークロマトグラフィーでは、モノクローナル抗体の抗原結合部位を損なうことなく固定化できるものであれば何でも良い。例えばアフィゲル 1 0（バイオラッド社製）がある。

30

一方、組み換え蛋白の末端にヒスチジン 6 残基が付加されるようにあらかじめ塩基配列の設計を施してあれば、得られた組み換え蛋白はニッケルキレートアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製可能である。

精製された抗原をタンパク量で 0 . 0 1 μ g / m L ~ 2 0 μ g / m L の濃度範囲で中性～アルカリ性の緩衝液で希釈する。希釈した抗原液は 5 0 μ L ~ 1 0 0 μ L ずつマイクロタイタープレートに加えて 4 $^{\circ}$ C ~ 1 0 $^{\circ}$ C で 1 5 時間 ~ 2 4 時間静置する。

0 . 0 5 重量% ~ 0 . 1 重量% の T w e e n 2 0（登録商標）を含む生理食塩水で該プレートを洗浄する。洗浄回数は 5 回程度が望ましい。

次にブロッキング操作を行う。ブロッキング剤としては牛血清アルブミン、オブアルブミン、スキムミルク、ゼラチンまたはカゼインなどの 0 . 1 重量% ~ 1 0 重量% の生理食塩溶液を用いることが出来る。該プレートに 3 0 0 μ L ずつブロッキング剤を含む溶液を分注し、該プレートを 4 $^{\circ}$ C ~ 1 0 $^{\circ}$ C で 1 5 時間 ~ 1 8 時間静置する。

40

該プレートを 0 . 0 5 重量% ~ 0 . 1 重量% の T w e e n 2 0（登録商標）を含む生理食塩水で洗浄する。

洗浄が終了したプレートを水気を良く切った後、室温中で自然乾燥又は減圧乾燥させる。以上のように抗原を固定化して得られたプレートを乾燥剤が同封されたビニール袋に入れば、4 $^{\circ}$ C にて長期保存が可能である。

【0 0 2 2】

次に、酵素標識モノクローナル抗体の作製法について述べる。酵素標識に先立って、モノ

50

クローナル抗体を精製しなければならない。モノクローナル抗体はマウス腹水由来あるいは培養上清由来のいずれでも良い。一般には33V/V%飽和～50V/V%飽和相当の硫酸アンモニウム粉末を加えて、抗体画分を沈殿させて得た後、プロテインAあるいはプロテインG固定化担体を用いて精製する。プロテインA固定化担体あるいはプロテインG固定化担体には例えばプロテインAセファロース（ファルマシア社製）あるいはプロテインGセファロース（ファルマシア社製）がある。これら用いた抗体の精製法は既存の方法例えば非特許文献5等が参考にできる。精製されたモノクローナル抗体は、各種の酵素、例えばペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、で標識することができる。これらのうち、ペルオキシダーゼによる標識は、バックグラウンドが低く、高感度であることから、近年多く使われている。方法は、ペルオキシダーゼ糖鎖を過ヨウ素酸酸化して生じたアルデヒド基と抗体の一級アミンとを反応させる方法（非特許文献6参照）、抗体をペプシン消化、2-メルカプトエタノールによる還元で生じたSH基とペルオキシダーゼの一級アミンとをマレイミド架橋試薬を用いて結合させる方法（非特許文献7参照）などがある。いずれの方法でも抗体とペルオキシダーゼの結合モル比は1：1～1：3程度が望ましい。

【0023】

次にELISAの術式について述べる。

被検血清を2～200倍に希釈する。血清を希釈するための溶液は0.05重量%のTween 20（登録商標）および1重量%から10重量%のブロッキング剤を含む生理食塩水が望ましい。同様に、陰性コントロール血清および陽性コントロール血清も希釈する。希釈した被検血清ならびに陰性コントロール血清および陽性コントロール血清を上記作成したプレートのウェルに50～100 μ Lずつ加える。測定は2連以上で行うことが望ましい。プレート上に蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムを張り、該プレートを20℃～37℃で一定時間望ましくは30分以上静置する。

【0024】

次に、洗浄液でプレートを洗浄するが、洗浄液は0.05重量%～1.0重量% Tween 20（登録商標）を含む生理食塩水が適当である。洗浄回数は3回～10回が適当である。

次に、標識モノクローナル抗体を希釈液で5000～10000倍に希釈し、上述のウェルに50～100 μ Lずつ加える。

標識抗体を加えた後、蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムをプレート上に張り、20℃～37℃で一定時間望ましくは30分以上静置する。

次に、洗浄液でプレートを洗浄する。洗浄液は0.05重量%のTween 20（登録商標）を含む生理食塩水が適当である。洗浄回数は3回～10回が適当である。

【0025】

次に、発色操作を行う。標識抗体の標識酵素がペルオキシダーゼの場合、発色基質は2, 2'-アジノジ-（3-エチルベンズチアゾリン）-6-スルホン酸、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン等が適当である。過酸化水素を含むこれらの発色基質溶液を50～100 μ Lずつウェルに加えて発色をスタートさせる。

15分～40分間、20℃～37℃で静置後、反応停止液を50 μ L～100 μ Lずつウェルに加えて発色反応を停止させる。反応停止液としては、1M～2M 硫酸水溶液、1M～4M 塩酸水溶液、1M～3M 水酸化ナトリウム水溶液が挙げられる

直ちにプレートリーダーで発色反応を停止させたプレートの吸光度を測定する。酵素や用いた発色基質により極大吸収が異なるので、最適波長を選択する。例えば酵素がペルオキシダーゼで発色基質が2, 2'-アジノジ-（3-エチルベンズチアゾリン）-6-スルホン酸の場合は405nm～415nm、同じく酵素がペルオキシダーゼで発色基質が3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジンの場合は450nmが適当である。

【0026】

抗原固定化プレート、ならびにこれに付随する、陰性コントロール血清、陽性コントロール血清、洗浄液、標識抗体溶液、血清希釈用液、発色基質および反応停止液はあらかじめ

調製して安定な条件下、例えば凍結乾燥あるいは安定剤を添加した溶液状態で4℃～8℃で保存すれば長期保存および即時使用可能となる。測定用キットは上記の条件で調製した抗原固定化プレート及びこれに付随する標識抗体溶液、血清希釈用液、発色基質、反応停止液をセットしたものからなる。キットは上述と同様の方法で使用する。

得られた吸光度は被検血清中の抗牛白血病抗体の量に反比例対数的に増加する。この結果から抗体価の高低を比較する。

また、測定に必要な、抗原固定化済みのプレートやその他必要な試薬をセットにしたキットとして提供することも可能である。

【0027】

抗原固定化プレート、ならびにこれに付随する、陰性コントロール血清、陽性コントロール血清、洗浄液、標識抗体溶液、血清希釈用液、発色基質および反応停止液はあらかじめ調製して安定な条件下、例えば凍結乾燥あるいは安定剤を添加した溶液状態で4℃～8℃で保存すれば長期保存および即時使用可能となる。測定用キットは上記の条件で調製した抗原固定化プレート及びこれに付随する標識抗体溶液、血清希釈用液、発色基質、反応停止液をセットしたものからなる。キットは上述と同様の方法で使用する。

【0028】

以下実施例をあげて本発明の具体的な説明をするが、本発明はこれに限定されるわけではない。

【実施例1】

(モノクローナル抗体評価用抗原固相化プレートの作製)

牛白血病ウイルスの構造蛋白のうち、表面糖蛋白のgp51に相当する全長0.902kbのgp51遺伝子(理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット)をバキュロウイルストランスファーベクター:pYNGsigHis(カタクラ工業(株)製)に組み込んだ。該ベクターは発現蛋白のN末端側にヒスチジンTagが付加されるよう設計されている。組み換えバキュロウイルスはカイコに感染、増殖させることによりカイコ体液に多量の組み換えgp51が発現した。組み換え及び組み換えバキュロウイルスによる大量発現はカタクラ工業(株)の特開平07-303488に基づくベクター及び製造方法に従って行った。すなわち、バキュロウイルスベクターのBに相当するEcoRI、XbaIサイト内にgp51遺伝子配列を組み込み、タンパク分解酵素遺伝子欠損カイコに感染させた。

カイコ体液1mLを結合バッファー:20mMリン酸ナトリウムバッファー+0.5M NaCl+10mMイミダゾール(pH 7.4)1Lに対して24時間4℃で透析した。ニッケルキレートセファロース(アマシャム社製)をバイオラッド製エコノカラム(1.0cmφ×5cm)に充填し、ゲル体積を1mLとし、結合バッファーで平衡化した。カラムはエコのシステム(バイオラッド社製)に接続し、カイコ体液を同カラムに0.1mL/分の流速で添加した。全量添加後、約10倍ゲル体積分の結合バッファーを流しつづけた。続いて溶出バッファー:結合バッファー+490mMイミダゾールを0.2mL/分で流し、組み換えgp51を溶出した。紫外線吸収検出器によって検出されたピーク位置の溶出画分を分取した(gp51画分)。gp51画分を0.05M炭酸ナトリウムバッファー(pH 9.6)で20倍に希釈し、96穴平底ポリスチレン製マイクロタイタープレート(ヌンク社製)に50μL加え、4℃で24時間静置した。内容物を廃棄後、1W/V%スキムミルクを含むPBSで全ウェルを満たし、4℃で24時間静置した。内容物を廃棄後、0.05W/V%Tween 20(登録商標)を含むPBSで5回洗浄して直ちに使用した。

【0029】

【実施例2】

(ポリクローナル血清の調製)

牛白血病ウイルス感染細胞である羊胎児腎臓由来株化細胞(理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット FLK:Van, der Maaten and Miller, 1976)を抗原として用いた。FLKは牛白血病ウイルスに持続的に感染し、細胞の増殖

に伴い、細胞内にウイルス粒子を蓄積し、一部は細胞外に放出されている。F L Kを10 V/V%牛胎児血清 (Trace社製) 加イーグルMEM培地 (日水製薬製) 中、220 cm² フラスコ (住友ベークライト製) (培地量10 mL) 中で72時間培養後、培養液を除去し、リン酸緩衝食塩液 (PBS-) で2回細胞を洗浄後、トリプシン-EDTA混液 (ギブコ社製) を0.5 mL加えて細胞をフラスコから剥離し、直ちに培地10 mLを加えて消化を停止した。300×gで遠心して細胞を集めた。培養液を捨て、細胞ペレットに1 W/V%非イオン性界面活性剤トライトン-X (登録商標) 生理食塩水溶液20 mL加えてウイルスの不活化ならびに可溶化を行った。PBS-に対して24時間4℃で透析し、10000×gで4℃、10分間遠心し、上清25 mLを得た。使用時まで-80℃で保存した。この上清をセルライセートと呼ぶ。

10

セルライセートを不完全フロイントアジュバントとし、これをBALB/cマウスの皮下に注射した。2週間ごとに同様に追加免疫を行った。マウスが牛白血病ウイルスに対して免疫状態になったことを確かめるため、ELISAによって免疫前後の抗体価の変動を調べた。ELISAは実施例1で作製したプレートを用いた。すなわち、マウスの尾静脈より採血して得られた被検血清を0.05重量%のTween 20 (登録商標) および5重量%のスキムミルク (和光純薬製) を含むPBSで1000倍に希釈した。希釈した被検血清ならびプレートのウェルに100 μLずつ加えた。プレート上に蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムを張り、該プレートを37℃で1時間静置した。

次に、プレートを0.05重量% Tween 20 (登録商標) を含むPBSで6回洗浄した。

20

次に、西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (和光純薬製) を上記洗浄液で500倍希釈し、ウェルに100 μLずつ加えた。蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムをプレート上に張り、37℃で30分静置した。

次に、プレートを0.05重量% Tween 20 (登録商標) を含むPBSで6回洗浄した。

ジメチルホルムアミド (和光純薬製) に55 mM 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジ (同仁化学製) 相当の粉末を溶解し、0.05 M酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) に1/100容溶解し、さらに30 V/V%過酸化水素水 (和光純薬製) を蒸留水で100倍希釈したものを1/100容加えたものを発色基質100 μLずつウェルに加えて発色をスタートさせた。

30

15分間、室温で静置後、1 M 硫酸水溶液を50 μLずつウェルに加えて発色反応を停止した。

直ちにプレートリーダー (バイオラッド社製 モデル3550) で発色反応を停止させたプレートの450 nmの吸光度を測定した。

これにより、抗牛白血病抗体だけが牛白血病ウイルスの最初の注射に先立ってマウスから得られた対照血清よりもそれらに結合するようになる。3度目の免疫注射により、免疫前より100倍に抗体力価が上昇した。十分な抗体価があると判断した。最終免疫として実施例1で調製した組み換え精製gp51画分を希釈せずにマウスの尾静脈に50 μL注射した。最終免疫から3日後、マウスは全採血を行うと同時に直ちに次の実施例3に供した。

40

【0030】

【実施例3】

(ハイブリドーマの作成)

実施例2で全採血されて死亡したマウスからその脾臓を摘出した。骨髓腫細胞SP-0/Ag14 (理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット Schulmanら、Nature、276、269 (1978)) を15 V/V%牛胎児血清と10⁻⁵ Mβ-メルカプトエタノールとペニシリン100 U/mLとストレプトマイシン100 μg/mLとアンホテリシンB2.5 μg/mLを含むイスコフ培地 (GIBCO社) 中で増殖した。脾臓を1 mMグルタミンと5 mMHEPESを含むMEM培地 (日水製薬) で2回洗浄し、先曲がりピンセットで脾細胞を押し出した。200メッシュのステンレスメッシュ上で

50

夾雑物を除去し、脾細胞を集めた。脾細胞 (1×10^8 個) は次に 2×10^7 の骨髓腫細胞と共に 50 mL の円錐チューブに入れ 10 分間 1000 rpm の回転速度で遠心した。上清を吸引し、その細胞に 50 重量% のポリエチレングリコール 1 mL を 1 分間以上かけて滴下し、骨髓腫細胞と脾細胞を融合した。次の 5 分間にわたって 10 mL の無血清イスコフ培地を滴下した。混合物を 1000 rpm で 10 分間遠心し、上清を吸引除去した。細胞ペレットを軽くほぐし、HAT 培地すなわち 0.088 mg/mL アミノプテリンと 1.94 mg/mL チミジンと 6.8 mg/mL のヒポキサンチンと 15 V/V % 牛胎児血清と 10^{-5} M β -メルカプトエタノールとペニシリン 100 U/mL とストレプトマイシン 100 μ g/mL とアンホテリシン B 2.5 μ g/mL を含むイスコフ培地を 100 mL に再懸濁した。再懸濁した細胞液は 5 枚の 96 ウェル培養プレートに 100 μ /ウェルとなるようにまき込みを行った。炭酸ガスインキュベーター内で、湿度 99 %、37 °C、炭酸ガス濃度 7.0 V/V % の条件で培養した。培養後 1 日目に HAT 培地を各ウェルに 150 μ L ずつ滴下した。4 日目に各ウェルの培地を半量吸引除去し、新たに HAT 培地を 150 μ L ずつ各ウェルに加えた。クローンは 7 日～10 日目に現れた。各ウェルの上清の ELISA 測定によって牛白血病抗体陽性のクローン数は 16 であることを確認した。確認培養のため、各陽性クローンを 24 ウェルプレートに移し、HT 培地すなわち HAT 培地からアミノプテリンのみをのぞいた培地を 0.5 mL 各ウェルに加え、2 日～3 日間培養した。クローンが目視できるようになるまで増殖したら、再び ELISA で陽性クローンを確認した。この時点で 14 クローンが陽性で、残るクローンは抗体生産能が消失していた。陽性クローンをさらにクローニングし、モノクローナルなハイブリドーマに仕上げた。すなわち各陽性ウェル中のハイブリドーマを 5 個/mL となるまで HT 培地で希釈し、96 ウェルプレート 1 枚に各ウェル 200 μ L ずつまき込んだ。7 日～10 日後に出現したクローンのうち、高い抗体価を示し、コロニーが単一であるクローンを選択した。選択したクローンをさらに 24 ウェルプレートにまき込んで増殖させ、上述と同じクローニング操作をもう一度繰り返し、完全な単一クローンを得た。クローニングの過程で 4 個のクローンが増殖能を失い、最終的に 10 個の単一なクローンが得られた。各クローンは 24 ウェルプレートへ増殖培養後、10 mL 培養フラスコへ増殖させ、最終的に 100 mL のスケールまで増殖させた。300 $\times$ g の遠心分離により培養上清と細胞と分け、各クローンは 2×10^7 個/mL ずつ 10 % ジメチルスホルムアミド (和光純薬社製) を含む牛胎児血清に懸濁し、プラスチックバイアル (住友ベークラト) に 0.5 mL ずつ分注後、液体窒素内で保存した。保存した各クローンの細胞は 10 V/V % 牛胎児血清、0.18 W/V % 炭酸水素ナトリウムおよび 2 mM グルタミンを含む RPMI 1640 培地 (日水製薬) で培養可能であった。必要に応じて凍結細胞を同培地で復帰させ、100 mL スケールまで培養した。培養上清はモノクローナル抗体を含むため、実施例 3～6 に供した。なお、10 種の各クローンはそれぞれ 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 の番号を付した。このうちクローン 7 を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寄託番号 FERM P-19010 として寄託した。

【0031】

【実施例 4】

(ハイブリドーマのタイピング)

実施例 2 で得られた 10 種のハイブリドーマが生産する抗体のサブクラスを決定するため、市販のタイピングキットを用いて検査した。各ハイブリドーマの培養上清をタイピングキット (ピアス社製) に供試した。その結果、すべて IgG1 産生株で、L 鎖はすべてカッパー鎖であった。

【0032】

【実施例 5】

(モノクローナル抗体の抗原との反応部位)

ウエスタンブロットにより、組み換え gp51 との反応位置を牛白血病抗体陽性牛血清 (北里研究所製) と比較した。

実施例 1 で得た gp51 100 μ L に対して 0.625 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8. 50

0) 12.5 μ L、 β -メルカプトエタノール5 μ L、2 mg SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)を加えて100℃で3分間加熱処理した。これをスラブ電気泳動の濃縮ゲル上に各100 μ Lチャージした。同時に分子量マーカー(第一化学薬品製)を専用レーンに5 μ Lチャージした。

スラブ電気泳動用のポリアクリルアミドゲルは濃縮ゲル5.0 V/V%、分離ゲル10 V/V%とし、30 mAで1.5時間通電した。

泳動後、ゲルをニトロセルロースメンブランに電気通電によって転写し、1重量%スキムミルクを含む生理食塩液に浸して37℃で1時間振盪しながらブロッキングを行った。次にメンブランを0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含む生理食塩液で洗浄した。分子量マーカーが泳動されたレーンのみを切り取ってクマジーブリリアントブルー染色液(CBB)で染色した。残りのメンブランは、幅約4 mmに切り、短冊状にした。実施例3で得たおのおのモノクローナル抗体の培養上清は0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含む生理食塩液で2倍希釈し、牛白血病陽性牛血清および陰性血清は同液で20倍希釈した。それぞれに短冊状のメンブランを浸し、振盪しながら37℃で1時間反応させた。次にメンブランを0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含む生理食塩液で充分洗浄した。モノクローナル抗体についてはペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (和光純薬製)を、牛陽性血清についてはペルオキシダーゼ標識抗ウシIgG (カペル社製)をそれぞれ0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含む生理食塩液で200倍に希釈してメンブランを浸し、振盪しながら37℃で30分間反応させた。次にメンブランを0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含む生理食塩液で充分洗浄した。次に50 mM 4-クロロ-1-ナフトール(シグマ社製)および0.003容量%過酸化水素水を含むリン酸緩衝液(pH 7.2)にメンブランを浸して室温で発色させた。結果を図1に示す。

CBBで染色された分子量マーカーの位置と比較して、上記ウエスタンブロットにより、糖鎖修飾が数段になされており牛白血病抗体陽性血清で複数のバンドが認められた。牛白血病抗体陽性血清がgp51と特異的に結合した抗原の分子量は30 kDa~66 kDaを有しており、これと共通のバンドが現れたモノクローナル抗体は1、2、7、8であった。これら以外のクローンは35 kDa付近に単一バンドが認められるが、牛陽性血清にはこの分子量位置にバンドは存在しなかった。

【0033】

【実施例6】

(競合ELISAによるクローンの絞込み)

実施例1で作製したプレートに牛白血病抗体陽性血清(北里研究所製)、ならびに牛白血病抗体陰性血清(ハイクローン社製)をそれぞれ0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含む生理食塩液で2倍希釈したものをウェルに50 μ Lずつ加えてプレート上に蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムを張り、該プレートを37℃で1時間静置した。37℃で1時間静置した。

次に、プレートを0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含むPBSで4回洗浄した。

次に、実施例3で得た各クローンの培養上清を0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含む生理食塩液で10倍希釈したものを牛白血病抗体陽性血清ならびに牛白血病抗体陰性血清を加えていたウェルにそれぞれ50 μ Lずつ加えてプレート上に蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムを張り、該プレートを37℃で30分間静置した。次に、プレートを0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含むPBSで4回洗浄した。西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(American Qual ex社製)を上記洗浄液で1000倍希釈し、ウェルに100 μ Lずつ加えた。蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムをプレート上に張り、37℃で30分静置した。

次に、プレートを0.05重量% Tween 20 (登録商標)を含むPBSで4回洗浄した。

ジメチルホルムアミド(和光純薬製)に55 mM 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベ

ンチジ（同仁化学製）相当の粉末を溶解し、0.05 M 酢酸ナトリウムバッファー（pH 5.5）に1/100容溶解し、さらに30 V/V% 過酸化水素水（和光純薬製）を蒸留水で100倍希釈したものを1/100容加えたものを発色基質100 μLずつウェルに加えて発色をスタートさせた。

12分間、室温で静置後、1 M 硫酸水溶液を50 μLずつウェルに加えて発色反応を停止した。

直ちにプレートリーダー（バイオラッド社製 モデル3550）で発色反応を停止させたプレートの450 nmの吸光度を測定した。

牛陰性血清の吸光度に対する牛陽性血清の吸光度の割合を次式から求め、抑制率としたとき、1、2、7、8、は50%以上の抑制率だったが、これら以外はすべて0%であった 10

この結果は実施例4において牛陽性血清と共通のバンドが認められたクローン番号と一致していた。

このことから、今後の実施例では1、2、7、8のクローンについて絞り込んだ検討を行った。

抑制率 (%) = 100 (1 - 牛陽性血清吸光度 / 牛陰性血清吸光度)

【表1】

クローン番号	抑制率 (%)
1	77
2	86
3	0
4	0
5	0
6	0
7	57
8	83
9	0
10	0

20

30

【0034】

【実施例7】

（培養上清からのモノクローナル抗体の精製）

実施例6で絞り込んだ各クローン（1、2、7、8）の培養上清（約1000 mL）に硫酸アンモニウムを300 g加えて溶解し、4℃で一晩静置して沈殿を生じさせた。沈殿を10000×gで5分間遠心して沈殿部を得る。沈殿部にPBSを10 mL加えて溶解する（粗抗体液）。あらかじめプロテインGセファロースFF（アマシャム社製）を1.5 cmφ×5 cmのエコノカラム（バイオラッド社製）にゲル体積5 mLとなるように充填し、PBSで平衡化した。これに粗抗体液を0.2 mL/分の流速で加え、全量加えた後にPBSを20 mL流しつづけて洗浄した。次に0.1 M グリシン塩酸酸バッファー（pH 2.5）を0.4 mL/分で流し、紫外線吸収検出器で280 nmの吸収をモニターし、現れたピークを分取した。得られた画分を精製水4 Lに対して24時間透析し、凍結乾燥した。それぞれ約50 mgの精製モノクローナル抗体が得られた。 40

（モノクローナル抗体のペルオキシダーゼ標識）

0.3 M 炭酸ナトリウム溶液（pH 8.1）1 mLに西洋わさびペルオキシダーゼ（和光純薬社製）を10 mg溶解し、1 mLの20 mM-NaIO₄水溶液を加えた。25℃で30分静置し、精製モノクローナル抗体粉末40 mgを0.1 M 炭酸ナトリウム1 mLに 50

溶かし、先の溶液に加えた。グリセロールを20 μ L加え、4℃で18時間反応させた。50%飽和となるように飽和硫酸を加え、10000 $\times$ gで10分遠心し、沈殿を得た。

沈殿にPBSを1mL加えて溶解した。1mLのグリセロールを加えて、使用時まで-20℃で保存した。

得られた酵素標識モノクローナル抗体は後述の実施例にあるように適宜希釈してELISAに供した。

【0035】

【実施例8】

(エピトープ解析)

10

実施例7で標識した4種のモノクローナル抗体をそれぞれ1-HRP、2-HRP、7-HRP

8-HRPとする。実施例3で得た各非標識モノクローナル抗体(培養上清)と標識モノクローナル抗体を用いて精製組み換えgp51に対する競合ELISAを行った。競合ELISAにあたっては実施例6で示した試薬を使用した。

実施例1で作製したプレートにそれぞれのモノクローナル抗体培養上清およびモノクローナル抗体産生細胞用の培養液を50 μ L加え、37℃で1時間静置した。4回洗浄後、1-HRP、2-HRP、7-HRP、8-HRPをそれぞれ洗浄液で1000倍希釈したものを50 μ Lずつ各ウェルに加え、37℃で30分間静置した。洗浄後、発色基質で発色させて吸光度を測定した。モノクローナル抗体産生細胞用の培養液の発色強度を100とした場合の各発色強度を下表に示す。

20

【表2】

		非標識モノクローナル抗体			
		1	2	7	8
標識モノクローナル抗体	1-HRP	0	15	95	100
	2-HRP	12	0	102	96
	7-HRP	98	92	2	3
	8-HRP	101	99	11	1

30

40

数値が低いほど競合していることを示す。たとえば同一クローンの非標識、標識モノクローナル抗体は競合して数値が低くなるのが普通である。1と2のクローンおよび7と8のクローンの競合性は高く、数値が低い。したがってモノクローナル抗体1と2が似通ったエピトープ、7と8が似通ったエピトープを認識していると考えられた。逆に1や2は明らかに7や8とは異なるエピトープを認識していると考えられた。

【0036】

【実施例9】

(ウエスタンブロットによる抗原検出)

50

B L V 感染 F L K 細胞ならびに非感染 F L K 細胞（理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット）を 10% ウシ胎児血清を含むイーグル M E M 培地中、24 穴細胞培養プレート（コースター社製）で 5% 炭酸ガス雰囲気下、37℃ 4 日間培養した。培養液を廃棄し、1 W/V% ノニデット P-40（商標）を含む生理食塩水を 0.5 mL 加えて細胞膜を溶解した。このセルライゼートの上清を遠心分離 10000 rpm の遠心分離により得て、S D S 電気泳動に供した。すなわち、上清 100 μL に対して 0.625 M トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）12.5 μL、β-メルカプトエタノール 5 μL、2 mg S D S（ドデシル硫酸ナトリウム）、ブロモフェノールブルー（B P B）0.05 W/V% を加えて 56℃ で 30 分間処理した。これをスラブ電気泳動のウェルに各 10 μL ずつチャージした。同時に分子量マーカー（第一化学薬品製）を 5 μL チャージした。

10

スラブ電気泳動用のポリアクリルアミドゲルは濃縮ゲル 3.5 V/V%、分離ゲル 10 V/V% とし、20 mA で通電し、B P B のラインがゲルの下端から 5 mm 程度まで泳動したら通電をとめた。

泳動後、ゲルをニトロセルロースメンブラン（ワットマン製）に電気通電によって転写し、1 重量% スキムミルクを含む生理食塩液に浸して 4℃ で 18~24 時間あるいは 37℃ で 1 時間ブロッキングを行った。次にメンブランを 0.05 重量% T w e e n 20（登録商標）を含む生理食塩液で洗浄し、分子量マーカーが泳動されたレーンのみを切り取ってクマジーブリアントブルー染色液（C B B）で染色した。実施例 5 のごとく、感染細胞及び非感染細胞を泳動して得たメンブランは 4 mm 幅の短冊状に切り分けた。

4 種（No. 1, 2, 4, 7）の精製モノクローナル抗体溶液ならびに市販の抗 g p 5 1 モノクローナル抗体 2 種（V M R D 社製 B L V 1 と B L V 2）を 0.05 重量% T w e e n 20（登録商標）を含む生理食塩液でそれぞれ希釈し、I g G 濃度として 1 μg/mL となるように調製した。I g G 濃度は希釈前の溶液の 280 nm の紫外吸収値から求めた。それぞれに上記短冊状のメンブランを浸し、振盪しながら 25℃ で 1 時間反応させた。次にメンブランを 0.05 重量% T w e e n 20（登録商標）を含む生理食塩液で充分洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス I g G（ザイメッド社製）を 0.05 重量% T w e e n 20（登録商標）を含む生理食塩液で 200 倍に希釈してメンブランを浸し、振盪しながら 25℃ で 30 分間反応させる。次にメンブランを 0.05 重量% T w e e n 20（登録商標）を含む生理食塩液で充分洗浄した。次に 50 mM 4-クロロ-1-ナフトール（シグマ社製）および 0.003 容量% 過酸化水素水を含むリン酸緩衝液（pH 7.2）にメンブランを浸して室温で発色させた。結果を図 2 に示す。

20

30

C B B で染色された分子量マーカーの位置と比較して、上記ウエスタンブロットにより、ウイルス感染細胞にはモノクローナル抗体 No. 1 と 2 はきわめて薄いバンドが認められたが明瞭とは言いがたかった。No. 8 は全くバンドが認められなかった。本発明の No. 7 は最も強く 51 kDa の位置に明瞭な抗原のバンドが認められ、一方、非感染細胞には全くバンドが認められなかった。市販の 2 種のモノクローナル抗体はいずれも g p 5 1 相当の位置に特異バンドはほとんど認められなかった。

【0037】

【実施例 10】

（牛血清中の抗牛白血病抗体価の測定）

40

実施例 1 で作製したプレートおよび実施例 6 で得た M a b 7-H R P を用いた。

ゲル内沈降反応（北里研究所製）により判別された牛白血病抗体陽性群の牛 10 頭及び牛白血病抗体陰性牛 10 頭の血清を被検血清とし、2 倍に希釈した。血清を希釈するための溶液は 0.05 重量% の T w e e n 20（登録商標）を含む P B S を用いた。同様に、陰性コントロール血清（ハイクローン社製）および陽性コントロール血清（北里研究所製）も 2 倍希釈した。希釈した被検血清ならびに陰性コントロール血清および陽性コントロール血清を上記作成したプレートのウェルに 50 μL ずつ 4 連で加えた。プレート上に蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムを張り、該プレートを 37℃ で 1 時間静置した。洗浄液でプレートを 5 回洗浄した。

次に、M a b 7 を西洋わさびペルオキシダーゼ（和光純薬社製）で標識した標識モノクロ

50

ーナル抗体を希釈液で10000倍に希釈したものを各ウェルに50 μ Lずつ加えた。希釈用の液は上記血清希釈用の液を用いた。蒸発を防ぐためにビニール製のフィルムをプレート上に張り、37℃で30分静置した。次に、洗浄液でプレートを5回洗浄した。

55mM 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジンジメチルホルムアミド溶液（同仁化学社製）および0.3容量%過酸化水素水を0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）に1/100容加え、発色基質溶液とした。発色基質溶液を100 μ Lずつウェルに加えて発色をスタートさせた。

室温で30分間静置後、反応停止液1M硫酸水溶液を50 μ Lずつウェルに加えて発色反応を停止させた。

直ちにプレートリーダー（バイオラッド社製 モデル3550）で発色反応を停止させたプレートの吸収波長450nmの吸光度を測定した。実施例5で示したように抑制率を求めると以下の表のようになり、ゲル内沈降反応で陽性となった検体は4つの標識モノクローナルのいずれでも50%以上の抑制率を示し、ゲル内沈降反応で陰性となった検体は4つの標識モノクローナルのいずれでも50%未満の抑制率を示した。このことから、抑制率50%以上を陽性、50%未満を陰性とすれば陽性と陰性の区分が容易に可能であることが示された。

【表3】

検体番号	ゲル内沈降反応	抑制率 (%)
B-1	陰性	14
B-2	陰性	-2
B-3	陰性	5
B-4	陰性	-6
B-5	陰性	25
B-6	陽性	95
B-7	陽性	103
B-8	陽性	69
B-9	陽性	78
B-10	陽性	102

【0038】

【発明の効果】

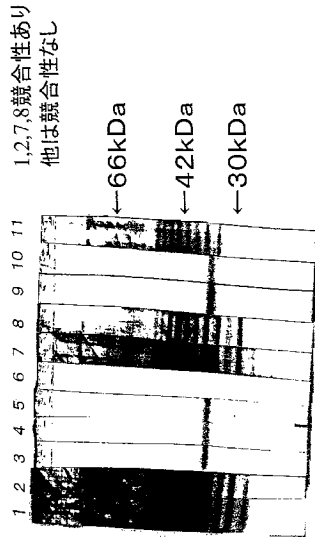
本発明は牛白血病ウイルス（Bovine Leukemia Virus）のエンベロープ主要糖タンパクであって、還元性条件下でSDSで変性され、且つ電気泳動的に定められた51kDaの分子量を有する抗原（gp51）に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供することにより、牛白血病特異抗原gp51をウエスタンブロット法により検出可能とし、さらに感染牛の血清抗体価測定を迅速、正確に行うことができる方法の開発に寄与するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】牛陽性血清、各クローンについて、組み換えgp51に対するウエスタンブロット像（実施例5）を示す。

【図2】BLV感染FLK細胞（FLK+）とBLV非感染細胞（FLK-）に対する牛陽性血清、各クローン、市販抗gp51モノクローナル抗体のウエスタンブロットにおける反応性（実施例9）を示す。

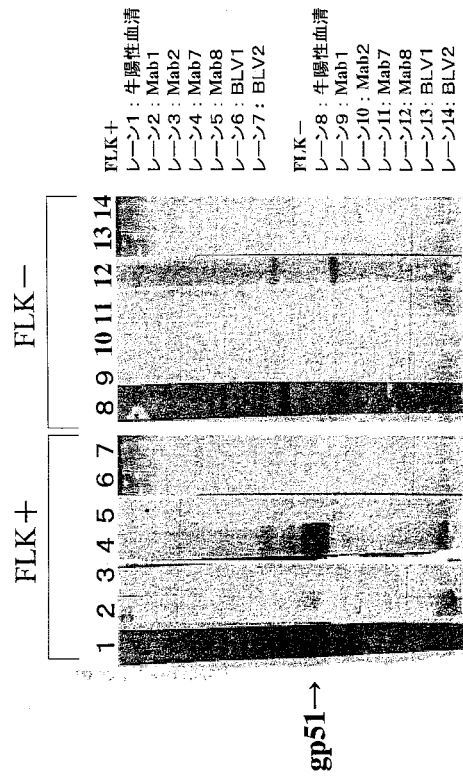
【図 1】



1: 3-C4 2: 2-F1 3: 2-A2 4: 4-A3 5: 5-B11
6: 3-C12 7: 2-H9 8: 4-G7 9: 3-F3 10: 5-E3
11: BLV陽性牛血清

組み換え gp51 に対する各クローンの反応パターン

【 図 2 】



各モノクローナル抗体とFLKとの反応性

フロントページの続き

(72)発明者 高橋 雅彦

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

(72)発明者 若本 裕晶

神奈川県横浜市金沢区大川 5-1 チッソ株式会社横浜研究所内

(72)発明者 平田 玲子

神奈川県横浜市金沢区大川 5-1 チッソ株式会社横浜研究所内

F ターム(参考) 4B064 AG27 BA15 CA10 CA20 CC24 DA15

4H045 AA11 BA53 CA01 DA76 EA53 FA72 HA06

专利名称(译)	单克隆抗体及其使用方法		
公开(公告)号	JP2004107219A	公开(公告)日	2004-04-08
申请号	JP2002268987	申请日	2002-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所 智索股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	RIKEN Chisso公司		
[标]发明人	間陽子 高橋雅彦 若本裕晶 平田玲子		
发明人	間 陽子 高橋 雅彦 若本 裕晶 平田 玲子		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/10 C12P21/08 G01N33/569		
FI分类号	C07K16/10 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.L		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/BA15 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA15 4H045/AA11 4H045/BA53 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/EA53 4H045/FA72 4H045/HA06		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：开发可用于检测牛白血病毒的单克隆抗体，并提供一种通过使用单克隆抗体在短时间内具有良好再现性的特异性检测牛白血病毒的方法。解决方案：问题可以通过单克隆抗体解决，该单克隆抗体是牛白血病毒的包膜主要糖蛋白，并且在还原条件下与用十二烷基硫酸钠（SDS）修饰的抗原（gp51）特异性结合，并且通过电泳测量具有51kDa的分子量。。Ž

クローン番号	抑制率（%）
1	7 7
2	8 6
3	0
4	0
5	0
6	0
7	5 7
8	8 3
9	0
1 0	0