

(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2006-193485

(P2006-193485A)

(43) 公開日 平成18年7月27日(2006.7.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>	CO7K 16/18	4B024
<b>CO7D 493/22 (2006.01)</b>	CO7D 493/22 CSP	4B064
<b>CO7K 14/435 (2006.01)</b>	CO7K 14/435	4B065
<b>CO7K 14/76 (2006.01)</b>	CO7K 14/76	4C071
<b>CO7K 14/765 (2006.01)</b>	CO7K 14/765	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 12 OL		(全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-8132 (P2005-8132)	(71) 出願人	000205627
(22) 出願日	平成17年1月14日 (2005.1.14)		大阪府 大阪府大阪市中央区大手前2丁目1番22号
		(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
		(72) 発明者	藤井 郁雄 大阪府堺市学園町1番1号 大阪府立大学内
		(72) 発明者	円谷 健 大阪府堺市学園町1番1号 大阪府立大学内
		(72) 発明者	平間 正博 宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘5-43-3 0-205
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 シガトキシン類を認識するモノクローナル抗体、およびそれを用いるシガトキシン類検出キット

## (57) 【要約】

【課題】 M環部に水酸基を有するシガトキシン類を特異的に検出できる手段を提供する。

【解決手段】 M環部に水酸基を有するシガトキシン類を特異的に認識するモノクローナル抗体、および該抗体を含むシガトキシン類検出キットにより上記の課題を解決する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

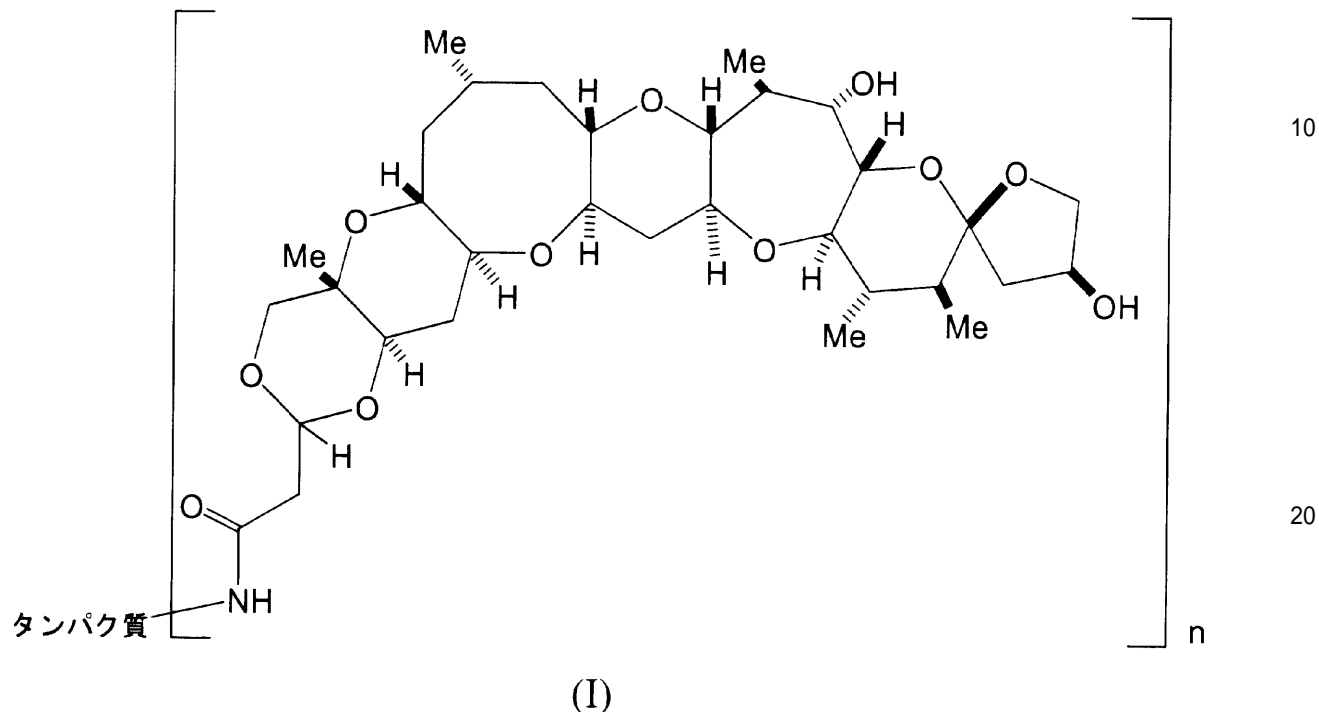
## 【請求項 1】

M環部に水酸基を有するシガトキシン類を特異的に認識するモノクローナル抗体。

## 【請求項 2】

次の式(1)：

## 【化 1】



(式中、nは整数を表す)

で表されるタンパク質コンジュゲートで動物を免疫して得られるものである、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 3】

動物がマウスである請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 4】

M環部に水酸基を有するシガトキシン類が、シガトキシン 51-OH-CTX3C である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を産生する受領番号 FERM AP-20347 として受領されたハイブリドーマ 8H4。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体、および受託番号 FERM PB-8292 として受託されたハイブリドーマ 10C9 により産生されるモノクローナル抗体を含む、サンドイッチ法によるシガトキシン類検出キット。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体、または受託番号 FERM PB-8292 として受託されたハイブリドーマ 10C9 により産生されるモノクローナル抗体が標識されてなるものである、請求項 6 に記載のシガトキシン類検出キット。

## 【請求項 8】

標識が酵素標識である、請求項 7 に記載のシガトキシン類検出キット。

## 【請求項 9】

次の式(II)：

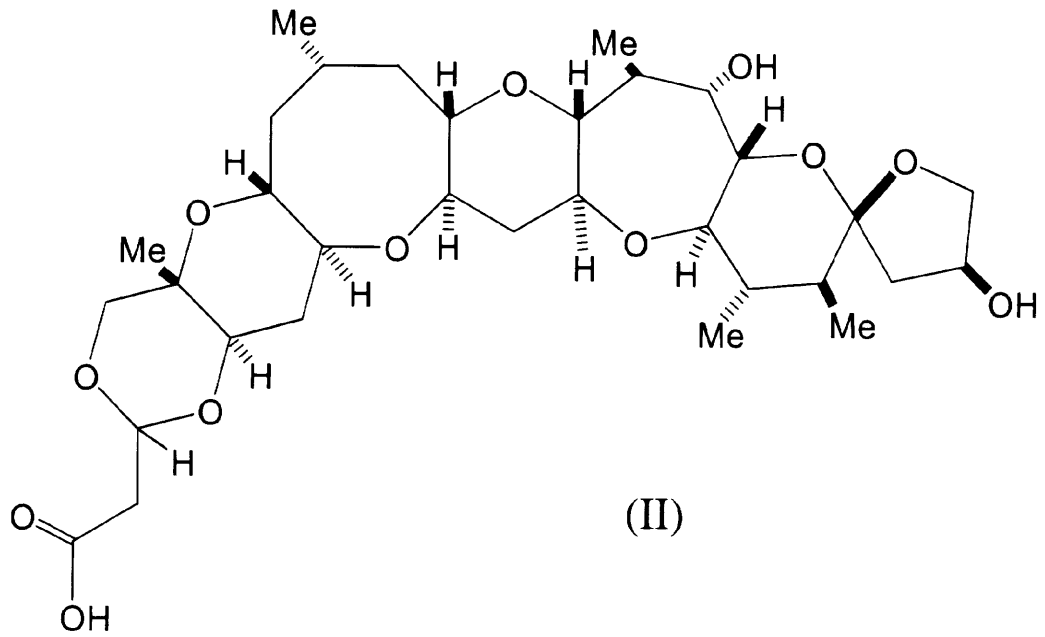
10

20

30

40

【化 2】



10

(II)

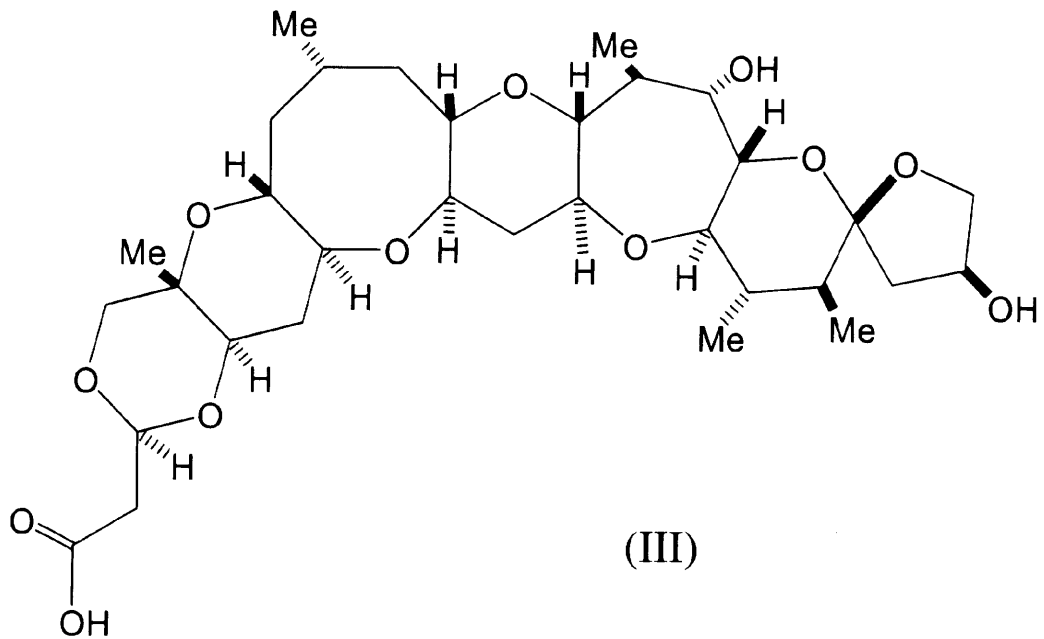
で表される化合物。

20

【請求項 10】

式 (II) の化合物が、次の式 (III) :

【化 3】



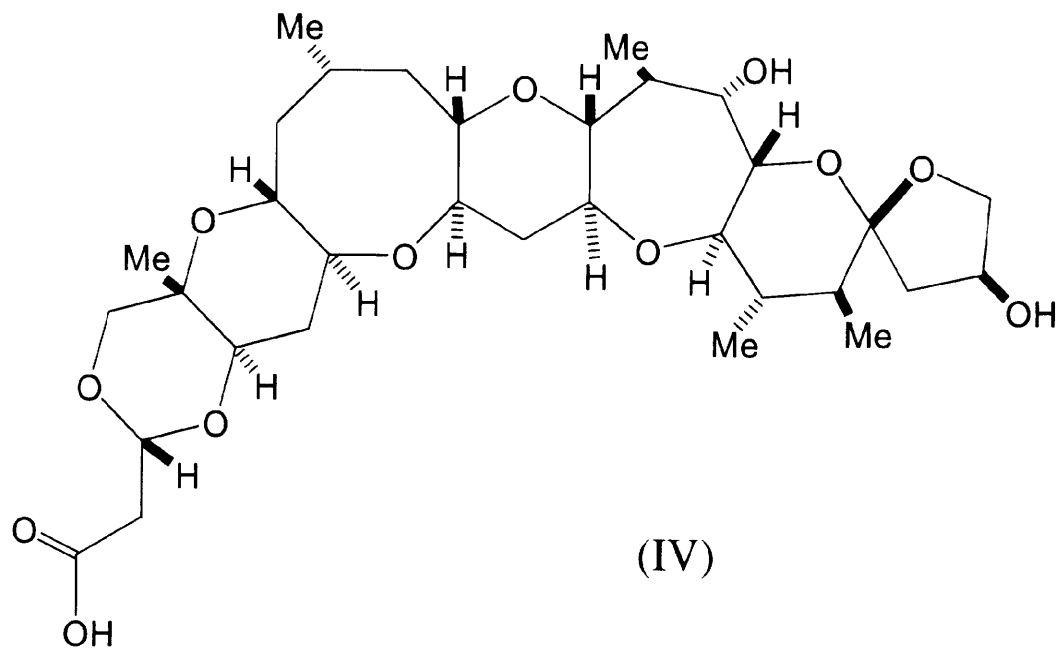
30

(III)

40

で表される化合物、および式 (IV) :

【化 4】



10

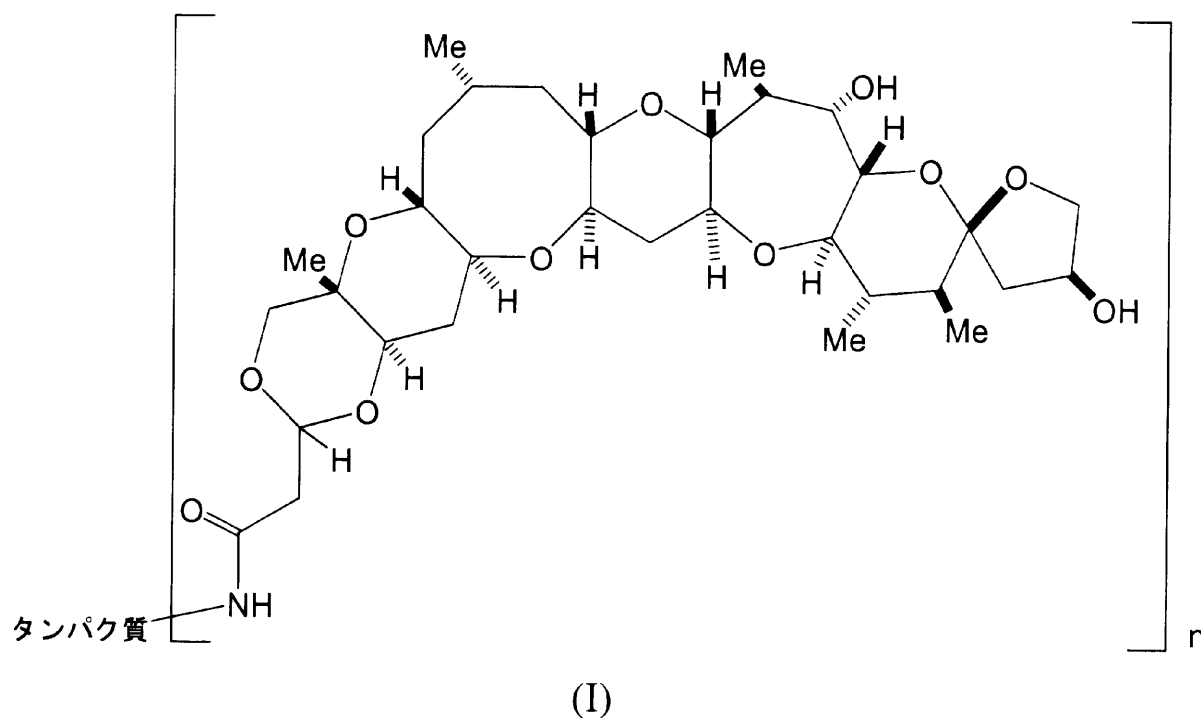
で表される化合物のジアステレオマー混合物である、請求項 9 に記載の化合物。

20

【請求項 1 1】

請求項 9 または 10 に記載の化合物がキャリアタンパク質と結合してなる、次の式 (I) :

【化 5】



30

40

(式中、 $n$ は整数を表す)

で表されるタンパク質コンジュゲート。

【請求項 1 2】

キャリアタンパク質が、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニンまたは卵アルブミンである請求項 1 1 に記載のタンパク質コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、シガトキシン類、特にM環部に水酸基を有するシガトキシン51-OH-CTX3CまたはCTX1Bを認識することができるモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、および該モノクローナル抗体を用いるシガトキシン類検出キットに関する。

## 【0002】

本発明は、また上記のモノクローナル抗体を得るために用いられる化合物、該化合物がキャリアタンパク質に結合してなるコンジュゲート化合物にも関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

食中毒シガテラは、ポリネシア、ハワイ、沖縄、カリブ海などの広いサンゴ礁海域で頻発し、年間2万人以上の中毒患者が発生している。シガテラ毒素は植物プランクトンが生産し、食物連鎖を介して魚介類に含まれることとなる。したがって、一旦発生すると多数の食用魚が広範に毒化して深刻な社会問題となることから、シガテラ毒素を迅速に検出することが食中毒シガテラの予防にとって重要である。

## 【0004】

食中毒シガテラの主要原因毒であるシガトキシン類(ciguatoxin、CTX)の免疫学的手法を用いた検出に関する研究は、ラジオイムノアッセイの発展に伴い、1977年頃から始まった。免疫学的手法による研究においては、シガトキシン類を認識する抗体が必要であるが、シガトキシン類は天然からごく微量しか採集されず(例えば850匹、4tの毒ウツボから毒本体のシガトキシンはわずか0.35 mg)培養による生産も困難なことから、抗体を製造することも困難である。

## 【0005】

ハワイ大学ホカマらは、シガテラ毒の本体であるシガトキシン(1 $\mu$ g)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し、これを抗原としてマウスに免疫して、モノクローナル抗体を調製した(非特許文献1参照)。

しかしながら、この抗体はシガトキシンに結合するが、シガトキシン類と類似の構造を有する海産ポリエーテル系毒素である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(非特許文献2参照)。

また、その他の海産ポリエーテル系毒素であるプレベトキシン、マイトトキシン、パリトキシンなどとも交差活性を示すことが分かっているが、詳しいデータは発表されていない(非特許文献3参照)。

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の試薬や、キット(Cigua Check(商標))などが開発されている。

## 【0006】

ところで、シガトキシン類は、単一の化合物ではなく、多種の毒素の混合物であり、次の一般式：

## 【0007】

10

20

30



毒の毒素として作用し得る。従って、シガテラ食中毒を広く予防するには、上記のシガトキシンCTX3C以外のシガトキシン類を検出することも必要である。

【特許文献1】特開2003-55400号公報

【特許文献2】特開2003-267978号公報

【特許文献3】特開2003-267979号公報

【非特許文献1】Toxicon第15巻、(1977年)、第317頁

【非特許文献2】Journal of Clinical Laboratory Analysis第6巻、(1992年)、第54頁

【非特許文献3】Journal of AOAC International第81巻、(1998年)、第727頁

【非特許文献4】Synthesis (1999年)、第1431頁

【非特許文献5】Toxicon第38巻(2002年)第669頁

10

【非特許文献6】Journal of American Chemical Society 第125巻、(2003年)、第7608頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の課題は、シガトキシン類、特にM環部に水酸基を有するシガトキシン51-OH-CTX3CやCTX1Bを検出することができる手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、上記の課題を解決するために、シガトキシン類のHIJKLM環部の構造を有する化合物を初めて合成し、これをハプテンとして用いることにより、上記の課題を解決

20

【0017】

したがって、本発明は、M環部に水酸基を有するシガトキシン類を特異的に認識するモノクローナル抗体である。

また、本発明は、上記のモノクローナル抗体を産生する受領番号FERM AP-20347として受領されたハイブリドーマ8H4 (受領番号FERM AP-20347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領された。受領日：平成16年12月22日、本明細書ではこのハイブリドーマを抗体と同じ名称8H4と表示する。)である。

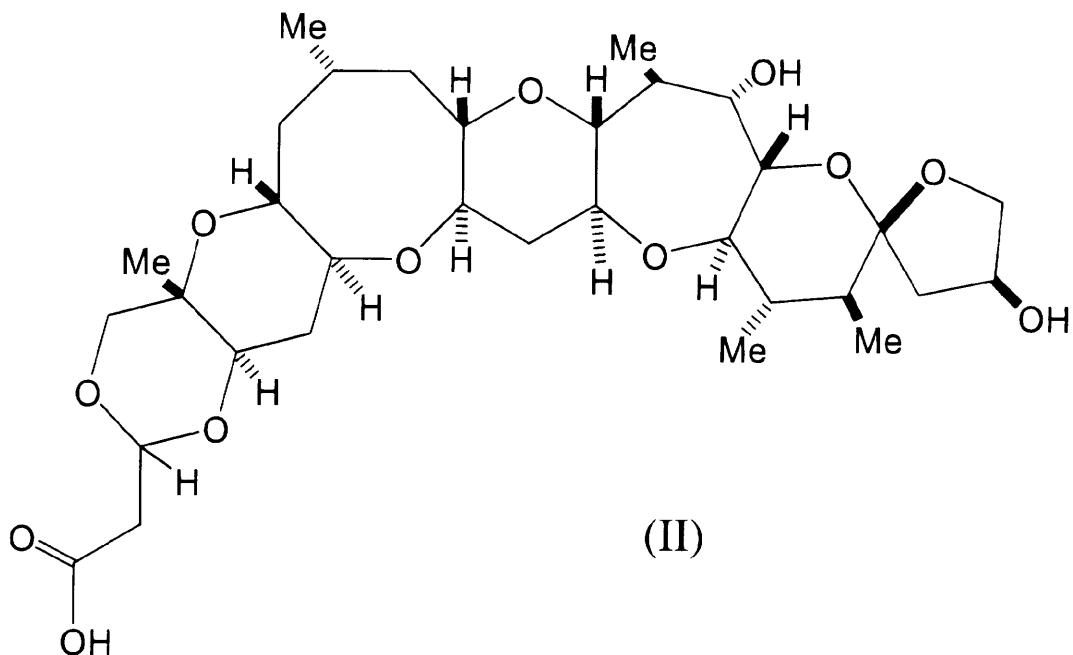
また、本発明は、上記のモノクローナル抗体、および受託番号FERM PB-8292として受託されたハイブリドーマ10C9 (平成14年3月5日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託)により産生されるモノクローナル抗体を含む、サンドイッチ法によるシガトキシン類検出キットである。

30

【0018】

さらに本発明は、次の式(II)：

【化2】



10

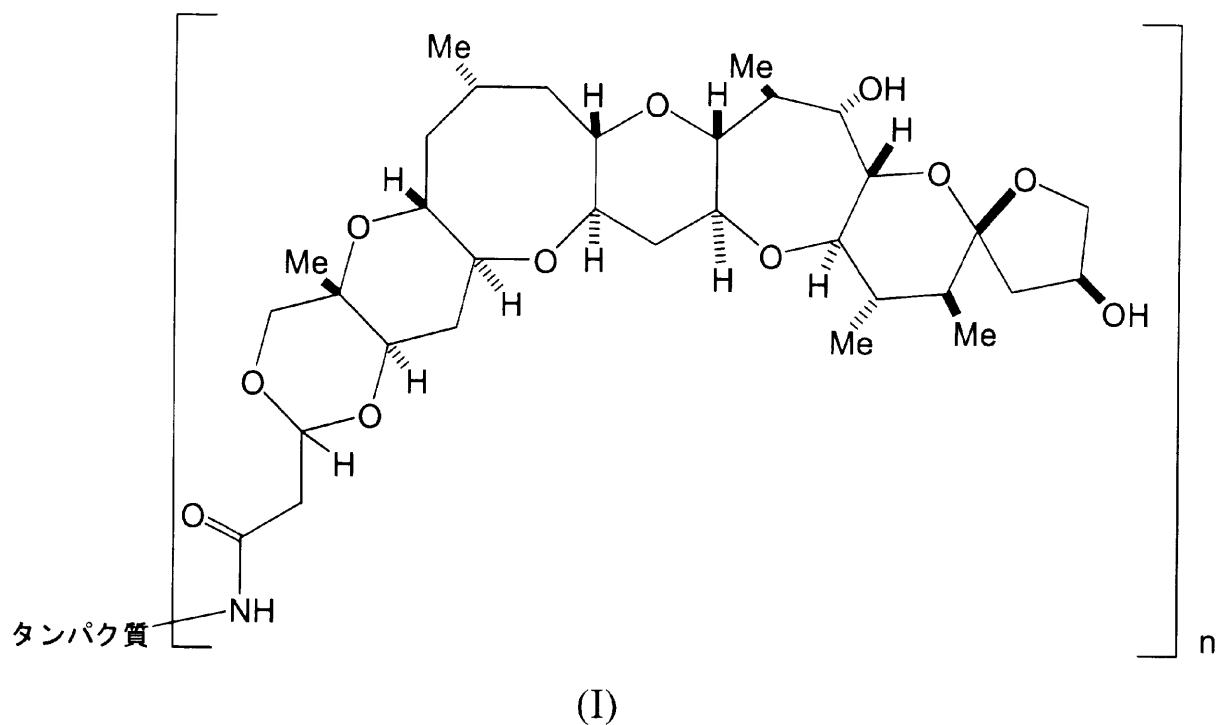
で表される化合物である。

20

【0019】

また、本発明は、上記の式(II)の化合物がキャリアタンパク質と結合してなる、次の式(I)：

【化3】



30

40

(式中、nは整数を表す)

で表されるタンパク質コンジュゲートでもある。

【発明の効果】

【0020】

本発明を用いることにより、今まで免疫的手法により検出することができなかったシガトキシン類、特にM環に水酸基を有するシガトキシン51-OH-CTX3CやCTX1Bを検出すること

50

ができるシステムを構築することができ、食中毒シガテラをより効果的に予防することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

本発明のモノクローナル抗体は、M環部に水酸基を有するシガトキシン類を特異的に認識するモノクローナル抗体である。M環部に水酸基を有するシガトキシン類としては、シガトキシン51-OH-CTX3C（上記の化合物2）、シガトキシンCTX1B（上記の化合物4）などが挙げられる。

【0022】

本発明のモノクローナル抗体は、シガトキシン51-OH-CTX3Cに対する結合解離定数(Kd)が30~100 nM程度であり、シガトキシンCTX1Bに対するKdが1~10 μM程度である。

10

【0023】

上記のモノクローナル抗体は、上記の式(I)のタンパク質コンジュゲートで動物を免疫して得ることができる。動物を免疫する方法としては、公知の方法を用いることができる。また、動物としては、通常の免疫学的手法において用いられる動物を用いることができ、例えばヤギ、ウサギ、マウスなどが挙げられ、マウスが好ましく用いられる。

【0024】

本発明のモノクローナル抗体は、シガトキシン類のHIJKLM環部を認識して結合していると考えられる。このモノクローナル抗体が認識するシガトキシン類の部位とは別の部位を認識するその他のモノクローナル抗体を、本発明のモノクローナル抗体と組み合わせて用いることにより、サンドイッチ法により高感度でシガトキシン類を検出するキットを得ることができる。ここで、サンドイッチ法とは、2種以上の抗体を用い、1種の抗体を固定化しておき抗原を該抗体に結合させた後、別の抗体を該抗原に結合させる方法をいう。

20

【0025】

したがって、本発明のシガトキシン類検出キットは、本発明のモノクローナル抗体と、該モノクローナル抗体が認識するシガトキシン類の部位とは別の部位を認識するその他のモノクローナル抗体とを含むものである。

【0026】

その他のモノクローナル抗体としては、受託番号FERM PB-8292として受託されたハイブリドーマ10C9により産生されるモノクローナル抗体を好ましく用いることができる。このモノクローナル抗体は、本発明者らにより、シガトキシン類のABCDE環部を合成ハプテンとして用いて、シガトキシン類に特異的に結合し得るモノクローナル抗体として作製された(特開2003-267978号参照)。

30

【0027】

本発明のシガトキシン類検出キットにおいて、本発明のモノクローナル抗体およびその他のモノクローナル抗体は、いずれかが標識されていることが好ましい。該標識としては、免疫学的手法において通常用いられるものであればよく、例えば酵素標識(例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼなど)、蛍光標識(例えばフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、アロフィコシアニン(APC)、フィコエリスリン(PE)、カルボシアニンなど)、放射性標識(例えばトリチウム( $^3\text{H}$ )、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ など)などが挙げられる。本発明においては、酵素標識を用いるのがより好ましい。

40

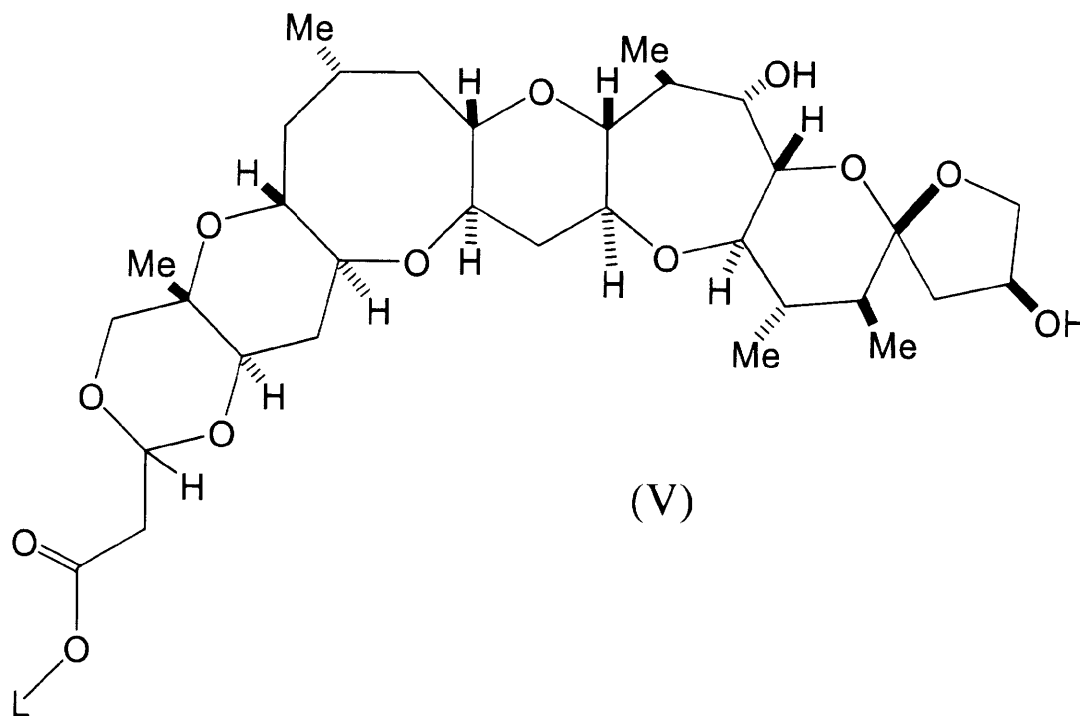
モノクローナル抗体を標識する方法としては公知の方法を用いることができ、また、市販の抗体標識用キットを用いることもできる。

【0028】

上記の式(I)の化合物は、上記の式(II)の化合物から得ることができる。式(I)の化合物を得る方法としては、例えば、式(II)の化合物と活性化剤とを反応させ、次の式(V)：

【0029】

## 【化4】



10

20

(式中、-O-Lは活性化剤に由来する脱離基を表す)

で表される中間体を得て、これをキャリアタンパク質と反応させる方法を挙げることができる。

## 【0030】

上記の活性化剤としては、タンパク質コンジュゲートを作製する際に通常用いられる化合物であればよく、例えばN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-p-トルエンスルホネートのようなカルボジイミドなどが挙げられる。

30

## 【0031】

上記の式(V)の中間体において-O-Lをキャリアタンパク質で置換することにより、上記の式(1)のタンパク質コンジュゲートを得ることができる。式(1)の化合物は、式(11)の部分合成ハプテンとして有するタンパク質コンジュゲートとして用いることができる。

## 【0032】

キャリアタンパク質としては、通常、免疫学的手法においてハプテンに結合させるキャリアとして用いられているものであればよく、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、卵アルブミン(OVA)、フィブリノゲンなどが挙げられ、BSA、KLH、OVAが好ましい。

## 【0033】

上記の式(V)の中間体とキャリアタンパク質とを反応させる方法としては、公知の方法を用いることができる。例えば、上記の式(V)の中間体をキャリアタンパク質の溶液中で反応させる方法が挙げられる。

40

## 【0034】

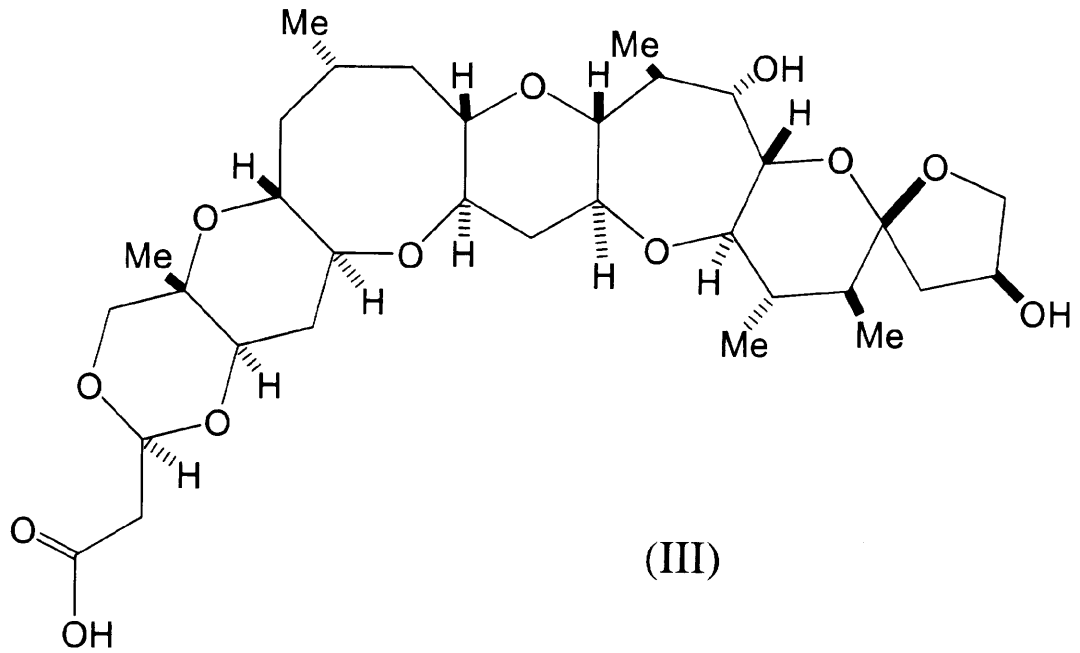
上記の式(11)の化合物は新規化合物であり、これも本発明の一つである。

式(11)の化合物は、下記の方法1により得ることができる。

式(11)の化合物は、次の式(111)：

## 【0035】

【化5】



10

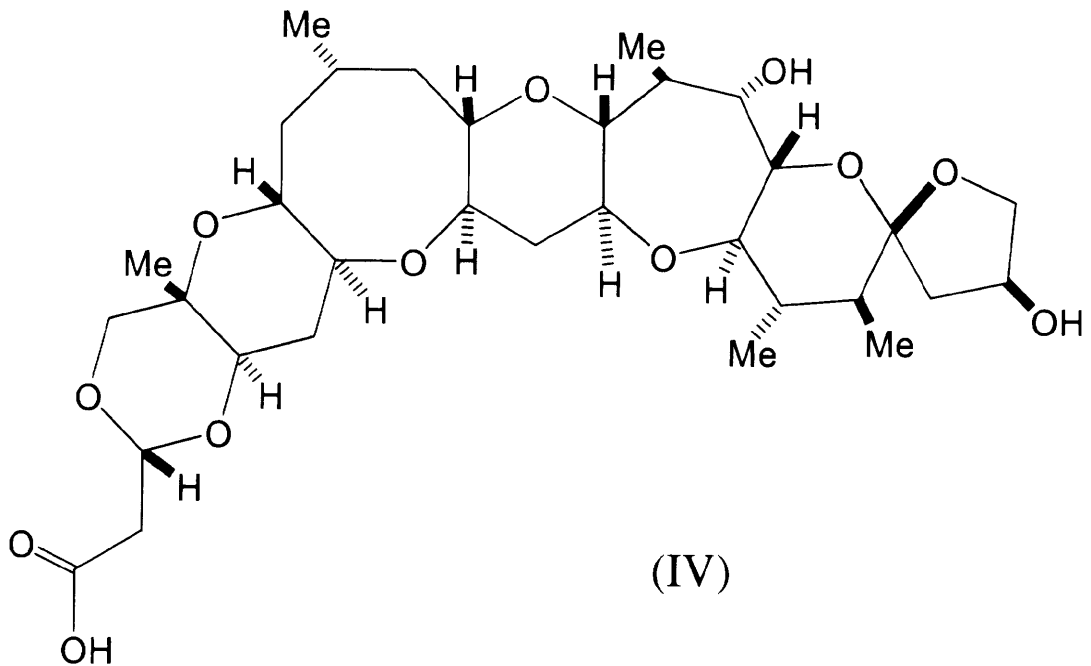
【0036】

20

で表される化合物、および式(IV)：

【0037】

【化6】



30

40

【0038】

で表される化合物からなるジアステレオマー混合物であり得る。

このジアステレオマー混合物は、順相、逆相カラムを用いる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分割することができる。例えば、シリカゲルカラムやオクタデシルシリカゲルカラムが利用可能である。

【0039】

以下に、本発明の化合物、タンパク質コンジュゲート、モノクローナル抗体、ハイブリドーマおよびシガトキシン類検出キットについての実施形態を記載して本発明をさらに詳

50

細に説明するが、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

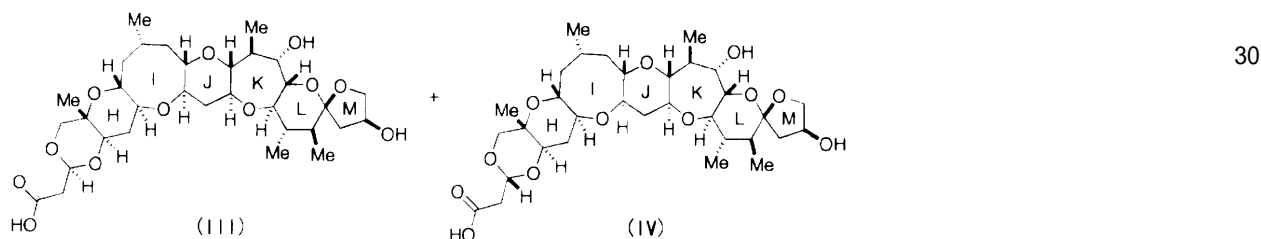
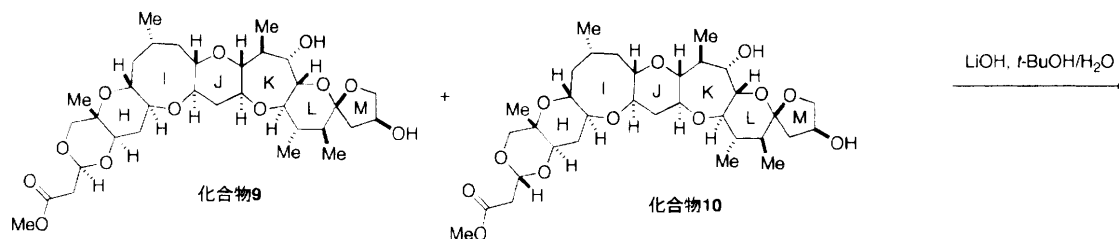
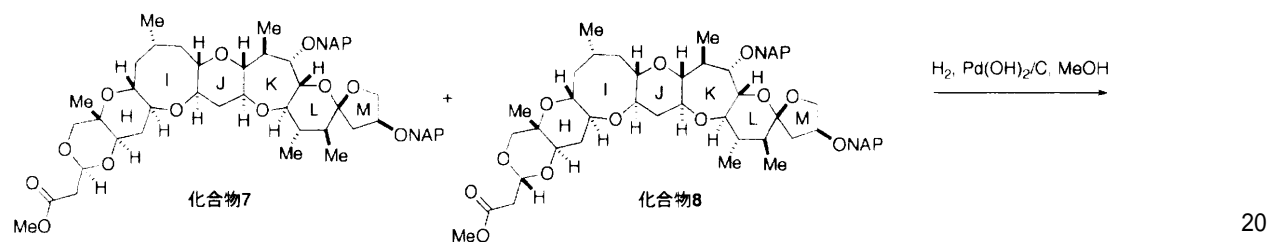
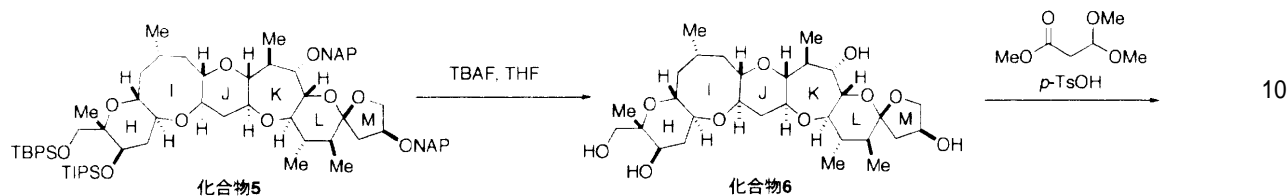
#### A. 式(II)の化合物の製造

上記の式(II)の化合物を、下記の方法1により式(III)および式(IV)のジアステレオマー混合物として合成した。

【0040】

方法1

【化7】



【0041】

式中、TBAFはテトラ-n-ブチルアンモニウム フルオライドを表し、THFはテトラヒドロフランを表し、MeOHはメタノールを表し、TBPSは(tert-ブチルジフェニルシリル)を表し、TIPSは(トリイソプロピルシリル)を表し、NAPは(ナフチルメチル)を表す。

40

【0042】

上記の方法1において、化合物5は、M. Inoue et al. J. Org. Chem. 2004, 69, 2797 ~ 2804に記載の方法により得た。

化合物5 (14.3 mg, 11.6 μmol)のTHF溶液(0.5 mL)に、室温でTBAF (116 μL, 1.0 M THF溶液、116 μmol)を加えた。反応溶液を室温で5時間攪拌後、溶媒を留去した。残渣をODS (オクタデシルシリル)カラム(ODS Merck RP18、溶離液：メタノール：H<sub>2</sub>O = 20：1~メタノール100%)で精製し、化合物6を得た(4.5 mg、収率：93%)。

【0043】

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.84-7.77 (8H, m, NAP), 7.52-7.43 (6H, m, NAP), 4.82 (1H, d, J = 12.0 Hz, NAP), 4.75 (1H, d, J = 12.0 Hz, NAP), 4.62 (1H, d, J = 12.5

50

Hz, NAP), 4.58 (1H, d, J = 12.5 Hz, NAP), 4.27 (1H, m, H51), 3.98 (1H, dd, J = 9.5, 2.5 Hz, H52), 3.86 (1H, ddd, J = 11.5, 9.5, 4.5 Hz, H41), 3.84 (1H, dd, J = 9.5, 5.0 Hz, H52), 3.77 (1H, dd, J = 12.0, 4.5 Hz, H31), 3.62 (1H, d, J = 9.0 Hz, H45), 3.55 (1H, d, J = 10.5 Hz, H29), 3.47 (1H, d, J = 10.5 Hz, H29), 3.44 (1H, d, J = 3.0 Hz, H44), 3.41 (1H, dd, J = 9.0, 9.0 Hz, H46), 3.35 (1H, ddd, J = 12.0, 12.0, 3.0 Hz, H34), 3.12 (1H, ddd, J = 12.0, 12.0, 5.0 Hz, H33), 3.10 (1H, ddd, J = 11.5, 11.5, 4.5 Hz, H39), 2.99 (1H, ddd, J = 11.5, 11.5, 3.0 Hz, H38), 2.85 (1H, dd, J = 9.5, 4.5 Hz, H42), 2.28 (1H, ddd, J = 11.5, 4.5, 4.5 Hz, H40), 2.19 (1H, m, H43), 2.16 (1H, m, H50), 2.15 (1H, m, H50), 2.13 (1H, m, H32), 1.87 (1H, m, H36), 1.84 (1H, m, H37), 1.75 (1H, m, H35), 1.67 (1H, ddd, J = 12.0, 12.0, 12.0 Hz, H32), 1.61 (1H, m, H37), 1.55 (1H, m, H47), 1.50 (1H, m, H48), 1.44 (1H, m, H35), 1.42 (1H, ddd, J = 11.5, 11.5, 11.5 Hz, H40), 1.13 (3H, s, H53), 1.11 (3H, d, J = 8.0 Hz, Me55), 1.06 (3H, d, J = 6.0 Hz, Me56), 1.05 (3H, d, J = 7.0 Hz, Me54), 1.03 (3H, d, J = 6.5 Hz, Me57)

10

## 【0044】

化合物6 (5.2 mg、6.21 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液に、室温で(MeO)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me (46 mg、310 mmol)と触媒量のp-トルエンスルホン酸一水和物(p-TsOH・H<sub>2</sub>O)を加えた。反応溶液を室温で8時間攪拌後、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液を加えた。酢酸エチルで抽出したのち、分離した有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液：ヘキサン：酢酸エチル = 10 : 1 ~ 3 : 1)で精製し、化合物7と化合物8を2:1の混合物として得た(3.9 mg、収率 : 68%)。

20

## 【0045】

化合物7と化合物8の混合物(1.5 mg、1.63 μmol)のメタノール溶液に対して、Pd(OH)<sub>2</sub>/C(1 mg)を加え、水素雰囲気下に36時間攪拌した。セライトろ過後、溶媒を留去した。残渣にヘキサンを加え、メタノールで2回抽出した。あわせたメタノール相を濃縮し、化合物9と化合物10の混合物を得た(1.1 mg、収率 : 100%)。

## 【0046】

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 5.00 (0.5H, t, J = 5.0, 5.0 Hz), 5.00 (0.5H, t, J = 5.0, 5.0 Hz), 4.50 (1H, m), 3.88 (1H, dd, J = 10.0, 4.5 Hz), 3.81-3.62 (6H, m), 3.70 (3H, s), 3.48 (2H, m), 3.38-3.23 (4H, m), 3.15 (1H, m), 2.90 (1H, m), 2.86 (1H, dd, J = 9.5, 5.0 Hz), 2.71 (2H, m), 2.27-1.95 (5H, m), 1.86-1.39 (9H, m), 1.24 (3H, s), 1.14 (3H, d, J = 7.5 Hz), 1.06 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.05 (3H, d, J = 7.5 Hz), 1.01 (3H, d, J = 6.5 Hz)

30

ESI-TOFMS : C<sub>33</sub>H<sub>52</sub>O<sub>12</sub>Naについて算出 (M+Na<sup>+</sup>) : 663.401, 実測値 : 663.336.

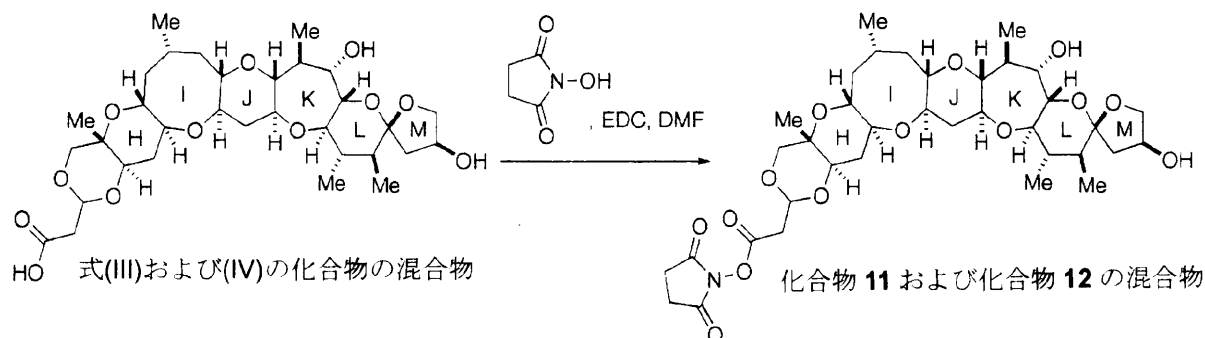
## 【0047】

化合物9と化合物10の混合物(3.8 mg、5.9 μmol)のt-ブタノール/H<sub>2</sub>O (容量比4:1、750 mL)溶液に対して、室温でLiOH (5.0 mg、0.12 mmol)を加え、1時間攪拌した。反応溶液に、pH 5になるまでKHSO<sub>4</sub>を加えた後、酢酸エチル(5 mL)で抽出した。有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥後、溶媒を留去して式(III)と式(IV)の化合物のジアステレオマー混合物を得た。

## 【0048】

40

## 【化8】



10

## 【0049】

上記の式(III)と式(IV)のジアステレオマー混合物のジメチルホルムアミド(DMF)(0.3 mL)溶液に、室温でN-ヒドロキシスクシンイミド(6.8 mg、59 μmol)と1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC、5.7 mg、30 μmol)を加え、2時間攪拌した。この溶液にさらに、N-ヒドロキシスクシンイミド(6.8 mg、59 μmol)と1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC、5.7 mg、30 μmol)を加え、11時間攪拌した後、酢酸エチル(2 mL)を加えた。有機相を水で洗い、水相を酢酸エチル(5 mL)で抽出した。あわせた有機相を濃縮し、上記の式で表されるジアステレオマー混合物(化合物11と化合物12)を合成し、DMF(200 μL)に溶解した。

20

## 【0050】

## B. タンパク質コンジュゲートの製造

キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)コンジュゲートの製造：KLH(6.6 mg)のPBS(phosphate buffered saline; 1.0 mL)溶液に、上記の方法により得られた化合物11と化合物12の混合物のDMF溶液(100 μL)を加えて室温で5分間攪拌した。室温で1日間静置後、4 でPBS(1 L)に対して透析した。6時間後にPBS(1 L)を交換し、12時間後に透析チューブからエッペンドルフチューブに移し変えて-78 で保存した。

## 【0051】

ウシ血清アルブミン(BSA)コンジュゲートの製造：BSA(6.6 mg)のPBS(1.0 mL)溶液に、上記の方法により得られた化合物11と化合物12の混合物のDMF溶液(100 μL)を加えて室温で5分間攪拌した。室温で1日間静置後、4 でPBS(1 L)に対して透析した。6時間後にPBS(1 L)を交換し、12時間後に透析チューブからエッペンドルフチューブに移し変えて-78 で保存した。

30

## 【0052】

## ハプテン価の解析

上記のようにして得られたBSAコンジュゲートを、MALDI-TOF-MSで分析した。BSAコンジュゲートの平均分子量は約71300であった(BSAの分子量は約66400)。上記の式(II)の化合物に由来する部分であるハプテン部分の分子量が608であるので、BSAコンジュゲートには平均8個のハプテンが連結されていることがわかる。

## 【0053】

## C. 免疫

上記のようにして得られたKLHコンジュゲート(100 μg)にRIBIアジュバント(RIBI Immunol. Res. Inst.製)を加え、よ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2週間毎に3回、腹腔内投与した。3回目の免疫から1週間後にマウスの血清を採取し、上記のBSAコンジュゲートを用いて下記のELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法で血清の抗体価を決定した。

40

## 【0054】

## ELISA法

96ウェルELISA用プレート(COSTAR社製3596)の各ウェルに上記のBSAコンジュゲート(2 μg/mL) 50 μL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

50

ートを吸着させた。プレートをPBS-Tween (5% Tween 20 [ICI社製Tween-20(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)相当品No. 167-11515]を含むPBS) で3回洗浄後、MILLI-Q水(Millipore社製のDirect-Qにより複数段階の樹脂やフィルターを用いて脱イオン化した精製水)で1回洗浄し、吸着しなかったコンジュゲートを除去した。ウェルに抗血清(またはハイブリドーマ培養上清、精製抗体溶液)を加え、室温で1時間放置後、PBS-TweenとMILLI-Q水でそれぞれ3回順次洗浄した。50 $\mu$ 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ターゼ(HRP))(BIO-RAD社製、170-6516、1000倍希釈)を各ウェルに入れ、室温で1時間放置後、PBS-TweenとMILLI-Q水でそれぞれ3回順次洗浄した。100 $\mu$ Lの基質溶液(1,2-フェニレンジアミン 4.0 mg、過酸化水素水10 $\mu$ L、0.1 M クエン酸バッファー (pH 5.0) 10 mL)を加え、数分間呈色反応を進行させた後、2規定硫酸(50 $\mu$ 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社製、モデル680)を用いて、490 nmの吸光度を測定した。

10

#### 【0055】

##### 血清中の抗体価の測定

マウスから採取した血清を、10% ウシ胎児血清(FBS)含有PBSを用いて400倍から51200倍まで順次2倍希釈した希釈系列サンプルを作製した。上記のようにしてBSAコンジュゲートを吸着させたELISAプレート(COSTAR社製3596)に、希釈系列サンプルを50 $\mu$ Lずつ入れ、室温で1時間放置後、上記と同様にして490 nmの吸光度を測定した。5匹のマウスについて、血清希釈度の対数と吸光度とをプロットした結果を図1に示す。

図1より、血清中の抗体が血清濃度依存的にBSAコンジュゲートと結合することがわかる。

20

#### 【0056】

##### D. 抗体価の高いマウスからの脾臓の摘出、細胞融合、モノクローナルハイブリドーマの作製

3回目の免疫から3週間後に、5匹の中で最も高い抗体価を示したマウスを選択した。このマウスの腹腔内に、KLHコンジュゲート(100 $\mu$ g)にRIBIアジュバント(RIBI Immunol. Re s. Inst. 社製)を加え、よく攪拌してエマルジョンとしたものを追加免疫し、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、無血清培地 [RPMI 1640 Medium (GIBCO社製、11875-185) 1000 mLにペニシリン・ストレptomycin (GIBCO社製、15140-122) 10 mLを加えたもの] 15 mL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。脾臓細胞浮遊液を濾過後、50 mL遠心管に移した。さらに、無血清培地15 mLを加え、よくピペティングして濾過し全量を30 mLとした。800 rpmで5分間、室温で遠心分離し、上清を除去し、タッピングした。

30

#### 【0057】

-180 の液体窒素細胞保存容器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 の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後、チューブ内の細胞浮遊液を無血清培地30 mLに移した。800 rpm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、増殖培地(無血清培地にFBS 100 mL、L-グルタミン(200 mM、GIBCO社製、25030-081) 10 mL、ブライクローン(BioResearch Ireland社製BR-001) 20 mLを加えたもの) 10 mLを加え、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、炭酸ガス培養器に入れた。2~3日毎に継代し、250 mLフラスコ2本分 (90~100 mL)にした。

40

#### 【0058】

マウスから取り出した脾臓細胞( $2 \times 10^8$ 個)と、上記のミエローマ細胞( $5 \times 10^7$ 個)とを混合し、遠心分離(800 rpm、5分間、室温)し、上清を除去し、タッピングした。これにECFバッファー[マンニトール45.5 g、10 mM 塩化マグネシウム 10 mL、10 mM 塩化カルシウム 10 mL、20 mM Tris-HCl (pH 7.2) 10 mLを蒸留水で溶解して1000 mLとしたもの]を30 mL加え、遠心分離(800 rpm、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ウェルプレート(SUMIRON社製、MS-80060)の各ウェルに1.2 mLずつ分注し、SSH-10細胞融合装置(島津社製)を用い、以下の条件で

50

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：40 V；交流初期印加時間：10秒 (s)；パルス幅：40 (マイクロ秒 ( $\mu$ s))；パルス電圧：230 V；パルス電界強度：2.30 kV/cm；交流2次印加電圧：1.0 V；パルス印加間隔：0 秒；印加パルス数：1；パルス電圧変化：+0V；交流最終印加時間：0 秒；交流電圧減衰率：0%；接触強化：off。

#### 【0059】

得られたハイブリドーマ細胞を(Mouse-Mouse hybridoma)をHAT培地[無血清培地132 mLにFCS 40 mL、L-グルタミン(200 mM、GIBCO社製25030-081)、ブライクロン(BioResearch Ireland社製BR-001) 10 mL、およびHAT(ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン、GIBCO社製31062-011) 4 mLを加えたもの] 100 mLに浮遊させ、100  $\mu$ Lずつ96ウェルプレート10枚に移した。炭酸ガス培養装置中、約2週間培養し、ハプテンとした上記の式(I)および式(II)の化合物のBSAコンジュゲートに結合する抗体を産生するハイブリドーマ8H4を含むハイブリドーマを、BSAコンジュゲートを用いてELISA法でスクリーニングした。陽性のウェルを選択し、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ナルハイブリドーマを順次培養し、それぞれ約200 mLまで増殖させた。この結果、3種類のモノクローナル抗体(8H4、8B9および7C9)をそれぞれ産生するハイブリドーマを得た。

10

#### 【0060】

##### E. モノクローナル抗体の評価

##### 抗体の精製およびサブクラスの決定

上記の3種のハイブリドーマの培養上清を、抗マウスIgG + IgMアフィニティーカラム(N GK Industries, Ltd.製)で精製した(結合用バッファー：リン酸バッファーpH 7.0、溶出用バッファー：0.2 M Gly-HCl pH 2.5)。精製した抗体をSDS-PAGEで分析し、それぞれ95%の純度であることを確認した。タイピングキット(PIERCE社製37501)を用いて、それぞれの抗体のサブクラスを決定した。その結果、8H4はIgG<sub>1</sub>、8B9はIgG<sub>1</sub>、7C9はIgG<sub>2b</sub>であった。

20

#### 【0061】

##### 抗体の親和性解析(競争阻害実験)

上記のようにして精製した3種の抗体について、次のようにして抗体とハプテンとの解離定数(Kd)を求めた。ELISA用プレートに競合阻害剤(PBS溶液、各30  $\mu$ L)の溶液を順次2倍希釈で調製した。これに上記の抗体溶液(30  $\mu$ L)を加え、室温で2時間放置した。抗体と阻害剤の混合液50  $\mu$ Lを、BSAコンジュゲート(0.625  $\mu$ g/mL)を吸着させた96ウェルELISA用プレート(COSTAR社製3596)に加え、室温で15分間放置した。プレートをPBS-TweenとMILLI-Q水でそれぞれ3回順次洗浄した後、50  $\mu$ Lの酵素標識二次抗体(ヤギ抗マウスIgG-HRP)(BIO-RAD社製、170-6516、1000倍希釈)を各ウェルに入れ、室温で1時間放置後、PBS-TweenとMILLI-Q水でそれぞれ3回順次洗浄した。100  $\mu$ Lの基質溶液(1,2-フェニレンジアミン 4.0 mg、過酸化水素水10  $\mu$ L、0.1 M クエン酸バッファー (pH 5.0) 10 mL)を加え、数分間呈色反応を進行させた後、2規定硫酸(50  $\mu$ 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社製、モデル680)を用いて、490 nmの吸光度を測定し、滴定曲線を得た。Fr iguetらの方法(Journal of Immunological Method, 第77巻(1985年)、第305頁)を参考に、Klotzプロットを作製して得た直線の傾きから阻害剤のKdを求めた。

30

40

化合物6を競合阻害剤として用いた場合の結果を表1に示す。表1から、3種類のモノクローナル抗体はいずれもハプテン化合物6に強く結合することがわかる。

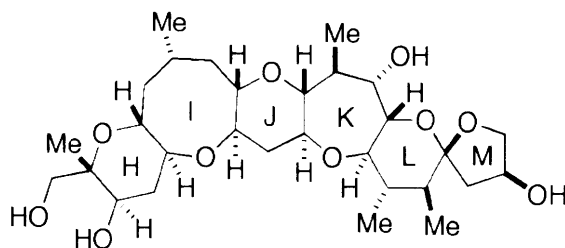
#### 【0062】

【表 1】

モノクローナル抗体	Kd (nM) 対 化合物 6
7C9	407
8B9	108
8H4	48

【 0 0 6 3 】

【 化 9 】



化合物 6

10

20

【 0 0 6 4 】

これら 3 種のモノクローナル抗体の中から化合物 6 との結合が最も強かった 8H4 について、シガトキシン 51-OH-CTX3C (化合物 2) を用いて同様の阻害実験を行ったところ、モノクローナル抗体 8H4 はシガトキシン 51-OH-CTX3C に対して高い親和性を示すことがわかった ( $K_d = 75 \text{ nM}$ )。また、モノクローナル抗体 8H4 は M 環に水酸基を有さないシガトキシン CTX3C (化合物 1) には弱い親和性しか示さず ( $K_d = 3.2 \text{ } \mu\text{M}$ )、他のポリエーテル系海産毒 (プレベトキシン A および B、オカダ酸、マイトトキシン) とはほとんど交差反応を示さなかった。

【 0 0 6 5 】

#### F. サンドイッチ法によるシガトキシン類検出キット

##### 8H4 抗体の酵素標識 (サンドイッチ法に用いる 8H4-HRP の合成)

8H4 の HRP 標識は、Peroxidase Labeling Kit -NH<sub>2</sub> (商品名、Dojindo Molecular Technologies, Inc. 製) を用い、製造業者の説明書に従って行った。すなわち、キットに添付の洗浄バッファ 100  $\mu\text{L}$  とモノクローナル抗体 8H4 (0.2 mg) とを Filtration Tube に入れた。ピペッティングにより軽く混合した後、遠心分離した (8000  $\times$  g、10 分間)。洗浄バッファ 100  $\mu\text{L}$  を加え、もう一度遠心分離した (8000  $\times$  g、10 分間)。この抗体 8H4 が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上に、反応バッファ 10  $\mu\text{L}$  と NH<sub>2</sub>-Reactive Peroxidase とをピペッティングにより混合・溶解して得られた溶液を加えた。ピペッティングによりメンブレン上の抗体と溶液とを混合した後、37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間放置した。洗浄バッファ 100  $\mu\text{L}$  を加え、遠心分離した (8000  $\times$  g、10 分間)。保存バッファ 200  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティングにより標識された抗体を溶解した。溶液を 500  $\mu\text{L}$  チューブに入れて 4  $^{\circ}\text{C}$  で保存した。

30

40

【 0 0 6 6 】

##### シガトキシンのサンドイッチ検出法

ELISA 用プレート (COASTER 社製 3590) に、受託番号 FERM PB-8292 として受託されたハイブリドーマ 10C9 により産生されたモノクローナル抗体 10C9 の PBS 溶液 (4.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をウェル当たり 50  $\mu\text{L}$  入れ、4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩放置した。溶液を捨て、1% スキムミルク含有 PBS を加えて (400  $\mu\text{L}$ /ウェル)、室温で 1 時間静置した。溶液を捨て、PBS-Tween で 3 回洗浄後、シガトキシン 51-OH-CTX3C (化合物 2) の希釈溶液を入れ (50  $\mu\text{L}$ /ウェル)、室温で 1 時間静置した。溶液を捨て、PBS-Tween で 3 回洗浄した後、上記の HRP 標識モノクローナル抗体 8H4 の溶液 (1 mg/mL, 50  $\mu\text{L}$ ) を添加し、室温で 1 時間静置した。溶液を捨て、PBS-Tween で 3 回洗浄した

50

後、100  $\mu$ Lの基質溶液(1,2-フェニレンジアミン4.0 mg、過酸化水素水10  $\mu$ L、0.1 M クエン酸バッファー(pH 5.0) 10 mL)を加え、数分間呈色反応を進行させた後、2規定硫酸(50  $\mu$ 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社製、モデル680)を用いて、490 nmの吸光度を測定した。結果を図2に示す。

【0067】

図2の結果から、シガトキシン類のABCDE環部を持つハプテンを用いて作製した抗体である10C9と、酵素標識した8H4とを組み合わせることにより、シガトキシン51-OH-CTX3Cを感度よく検出することができることがわかる。

【図面の簡単な説明】

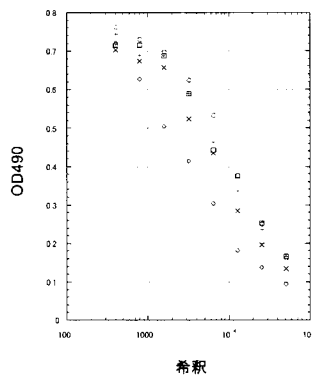
【0068】

【図1】図1は、本発明によるBSAコンジュゲートを用いて免疫したマウスから得られた血清の抗体価を表すグラフである。

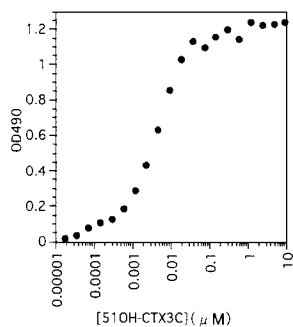
【図2】図2は、本発明のサンドイッチ法による検出キットを用いたシガトキシン51-OH-CTX3Cの検出特性を表すグラフである。

10

【図1】



【図2】



## 【手続補正書】

【提出日】平成17年1月31日(2005.1.31)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項5

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生する受託番号FERM P-20347として寄託されたハイブリドーマ8H4。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0017】

したがって、本発明は、M環部に水酸基を有するシガトキシン類を特異的に認識するモノクローナル抗体である。

また、本発明は、上記のモノクローナル抗体を産生する受託番号FERM P-20347として寄託されたハイブリドーマ8H4 (受託番号FERM P-20347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寄託された。受託日：平成16年12月22日、本明細書ではこのハイブリドーマを抗体と同じ名称8H4と表示する。)である。

また、本発明は、上記のモノクローナル抗体、および受託番号FERM PB-8292として受託されたハイブリドーマ10C9 (平成14年3月5日に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)により産生されるモノクローナル抗体を含む、サンドイッチ法によるシガトキシン類検出キットである。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	S
<b>G 0 1 N 33/577</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/577	B
<b>C 1 2 N 5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/00	B
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

## (72)発明者 井上 将行

宮城県仙台市青葉区角五郎2 - 6 - 2 0 - 5 0 3

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA03

4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 CE13 DA11 DA13

4B065 AA90Y AA91X AB05 BA08 CA25 CA46

4C071 AA01 BB03 CC15 EE05 FF17 GG01 GG06 HH05 LL10

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA51 CA40 DA70 DA76 EA50

FA30 FA72 GA26

专利名称(译)	识别雪卡毒素的单克隆抗体和使用其的雪卡毒素检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006193485A</a>	公开(公告)日	2006-07-27
申请号	JP2005008132	申请日	2005-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	大阪府		
申请(专利权)人(译)	大阪府		
[标]发明人	藤井郁雄 円谷健 平間正博 井上将行		
发明人	藤井 郁雄 円谷 健 平間 正博 井上 将行		
IPC分类号	C07K16/18 C07D493/22 C07K14/435 C07K14/76 C07K14/765 G01N33/53 G01N33/577 C12N5/10 C12P21/08 C12N15/09		
FI分类号	C07K16/18 C07D493/22.CSP C07K14/435 C07K14/76 C07K14/765 G01N33/53.S G01N33/577.B C12N5/00.B C12P21/08 C12N15/00.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/CE13 4B064/DA11 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C071/AA01 4C071/BB03 4C071/CC15 4C071/EE05 4C071/FF17 4C071/GG01 4C071/GG06 4C071/HH05 4C071/LL10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA51 4H045/CA40 4H045/DA70 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA30 4H045/FA72 4H045/GA26		
其他公开文献	JP4680607B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供能够特异性检测M环部分中具有羟基的雪卡毒素的方法。ZSOLUTION：特异性识别雪卡毒素的单克隆抗体在M环部分具有羟基。用于检测雪卡毒素的试剂盒包含抗体。Z

		(43) 公開日 平成18年7月27日 (2006-07-27)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参)	
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18	4B024	
<b>C07D 493/22 (2006.01)</b>	C07D 493/22	CSP	4B064
<b>C07K 14/435 (2006.01)</b>	C07K 14/435	4B065	
<b>C07K 14/76 (2006.01)</b>	C07K 14/76	4C071	
<b>C07K 14/765 (2006.01)</b>	C07K 14/765	4H045	
		審査請求 未請求	請求項の数 12 O L (全 20 頁) 最終
(21) 出願番号	特願2005-8132(P2005-8132)	(71) 出願人	000205627
(22) 出願日	平成17年1月14日 (2005.1.14)		大阪府 大阪府大阪市中央区大手前2丁目1号
		(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
		(72) 発明者	藤井 郁雄 大阪府堺市学園町1番1号 大阪府内
		(72) 発明者	円谷 健 大阪府堺市学園町1番1号 大阪府内
		(72) 発明者	平間 正博