

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6655302号
(P6655302)

(45) 発行日 令和2年2月26日(2020.2.26)

(24) 登録日 令和2年2月5日(2020.2.5)

(51) Int. Cl.			F I		
GO 1 N	33/569	(2006.01)	GO 1 N	33/569	A
GO 1 N	33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 2 1
GO 1 N	33/577	(2006.01)	GO 1 N	33/577	B
CO 7 K	16/12	(2006.01)	CO 7 K	16/12	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

請求項の数 6 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2015-110585 (P2015-110585)
 (22) 出願日 平成27年5月29日(2015.5.29)
 (65) 公開番号 特開2016-223913 (P2016-223913A)
 (43) 公開日 平成28年12月28日(2016.12.28)
 審査請求日 平成30年5月7日(2018.5.7)

(73) 特許権者 591125371
 デンカ生研株式会社
 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
 (74) 代理人 110001656
 特許業務法人谷川国際特許事務所
 (72) 発明者 小樋山 理沙
 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デ
 ンカ生研株式会社 鏡田工場内
 (72) 発明者 宮澤 恭
 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デ
 ンカ生研株式会社 鏡田工場内
 審査官 北条 弥作子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】被検対象の検出方法及びそのための免疫測定器具及びモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被検対象の検出を可能とする2種類以上の抗原が存在する被検対象の検出方法であって、前記2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いた免疫測定方法により行う、前記被検対象の検出方法であって、前記被検対象がマイコプラズマ・ニューモニエであり、前記2種類以上の抗原がP1タンパク質とP30タンパク質である、方法。

【請求項2】

前記モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片が標識または固相の少なくともいずれか一方に使用される、前記免疫測定方法がサンドイッチ法である請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記免疫測定方法がイムノクロマトグラフィー法である請求項2記載の方法。

【請求項4】

請求項1記載の方法を行うための免疫測定器具であって、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片が標識または固相の少なくともいずれか一方に使用される免疫測定器具であり、前記被検対象がマイコプラズマ・ニューモニエであり、前記2種類以上の抗原がP1タンパク質とP30タンパク質である、免疫測定器具。

【請求項5】

イムノクロマト試験片である請求項4記載の免疫測定器具。

【請求項6】

マイコプラズマ・ニューモニエ由来のP1タンパク質とP30タンパク質に対して特異的に反応するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、病原菌等の被検対象を免疫測定により検出する検出方法並びにそのための免疫測定器具及びモノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

モノクローナル抗体は、特定の抗原のみを認識するため、その特定の抗原の検出に広く用いられている。例えば、マイコプラズマ・ニューモニエを免疫測定する方法であって、マイコプラズマ・ニューモニエのP30タンパク質を認識するモノクローナル抗体を固相に固定化したサンドイッチ法による免疫測定方法が特許文献1に記載されている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】WO 2015/025968

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

20

ポリクローナル抗体は様々な抗原や抗原決定域を認識する種々の抗体が混在したものであり、モノクローナル抗体はある特定の抗原の、ある特定領域のみを認識するという性質から、ポリクローナル抗体と比較して、一般的に特異性が高い。その一方、抗体と結合可能な抗原の種類とその総数において、ポリクローナル抗体に対して、モノクローナル抗体で劣ることは容易に想定される。これは、モノクローナル抗体およびそれを用いた免疫測定方法及び免疫測定器具において、感度の低さをもたらす。

【0005】

本発明の目的は、被検対象を免疫測定により検出する方法であって、該免疫測定にモノクローナル抗体を用い、それでいてモノクローナル抗体を用いることによる感度の低さを改善した、新規な検出方法を提供することである。さらに本発明の目的は、上記本発明の検出方法に用いられる免疫測定器具を提供することである。さらに本発明の目的は、上記本発明の方法によるマイコプラズマ・ニューモニエの検出に利用可能な新規なモノクローナル抗体を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

モノクローナル抗体の感度が低いという欠点を補うため、複数のモノクローナル抗体を用いた免疫測定法が考えられる。一般的なELISA、イムノクロマトグラフィといった免疫測定法は、使用できる抗体の量がELISAプレートやイムノクロマトグラフィストリップの面積や標識物の面積に依存する。この場合、単一のモノクローナル抗体を使用する場合に比べ、複数のモノクローナル抗体を使用することで、それら抗体と結合可能な抗原の種類と総数は、優位になる。使用される抗体量に対し抗原量が過剰の場合に差は見えないが、使用される抗体量に対し、抗原量が不足の時、免疫測定法における高感度化をもたらす。

40

【0007】

しかし、各モノクローナル抗体の使用量が単一のモノクローナル抗体を用いる場合より少なくなることから、特定の抗原あたりの抗体との遭遇確率は減少し、単位時間あたりの反応性は低下してしまう。これが免疫測定法における高感度化を容易に達成できない要因の一つであり、満足できる感度を得る事を難しくしてきた。

【0008】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、特異性を有しながら2種類以上の抗原を認識するモ

50

ノクローナル抗体を用いることにより、従来のモノクローナル抗体を単独または複数で用いる方法よりも感度が優れていることを見出し、本発明を完成した。さらに、このモノクローナル抗体を用いた免疫測定法により、従来のモノクローナル抗体を用いる免疫測定と比較して感度に優れたことを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、被検対象の検出を可能とする2種類以上の抗原が存在する被検対象の検出方法であって、前記2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いた免疫測定方法により行う、前記被検対象の検出方法であって、前記被検対象がマイコプラズマ・ニューモニエであり、前記2種類以上の抗原がP1タンパク質とP30タンパク質である、方法を提供する。また、本発明は、上記本発明の方法を行うための免疫測定器具であって、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片が標識または固相の少なくともいずれか一方に使用される免疫測定器具であり、前記被検対象がマイコプラズマ・ニューモニエであり、前記2種類以上の抗原がP1タンパク質とP30タンパク質である、免疫測定器具を提供する。

10

【発明の効果】

【0010】

本発明の方法は、免疫測定にモノクローナル抗体を用いるので特異性が高く、それでいてモノクローナル抗体を用いることによる感度の低さが改善されている。また、本発明により、本発明の新規な検出方法に用いる免疫測定器具及びモノクローナル抗体が提供された。

20

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】下記実施例において作製した本発明のモノクローナル抗体の反応性をウェスタンブロット法により調べた結果を示す図である。

【図2】本発明のイムノクロマト免疫測定器具の好ましい1形態を模式的に示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の方法により検出される被検対象は、その検出を可能とする2種類以上の抗原が存在するものであり、細菌、ウイルス、菌類、リケッチア等の種々の病原体を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。下記実施例では、被検対象がマイコプラズマ・ニューモニエであり、2種類以上の抗原がP1タンパク質とP30タンパク質である。なお、被検対象を定量又は半定量する場合でも、定量や半定量は、必然的に「検出」を伴うので、本発明で言う「検出」に包含される。

30

【0013】

本発明の方法では、上記2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いて免疫測定を行う。ここで、「認識する」とは、特異的に反応する、すなわち、抗原抗体反応する、という意味である。「特異的」とは、タンパク質と該抗体が混じり合う液系において、該抗体が抗原のタンパク質成分と検出可能なレベルで抗原抗体反応を起こさないか、または何らかの結合反応や会合反応を起こしたとしても、該抗体の抗原との抗原抗体反応よりも明らかに弱い反応しか起こさないことを意味する。

40

【0014】

本発明のモノクローナル抗体を基に、抗原結合部位のみを分離させた抗原結合性断片も本発明の方法に使用することができる。すなわち、公知の方法により作製された、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)などの特異的な抗原結合性を有する断片(抗原結合性断片)を用いる場合も本発明の範囲に含まれる。また、モノクローナル抗体のクラスはIgGに限定されず、IgMやIgYでもよい。

【0015】

本発明の方法に用いるモノクローナル抗体は、公知の免疫学的手法を用い、目的の2種類以上の抗原を含む複合体や抽出物、あるいは2種類以上の抗原のうちの1つの抗原又は

50

それらの部分ペプチドを被免疫動物に免疫し、被免疫動物の細胞を用いてハイブリドーマを作製することにより得ることができる。免疫に用いるペプチドの長さは特に限定されないが、好ましくは5アミノ酸以上、より好ましくは10アミノ酸以上のペプチドを用いて免疫原とすることができる。免疫原は培養液から得ることもできるが、任意の抗原をコードするDNAをプラスミドベクターに組み込み、これを宿主細胞に導入して発現させることにより得ることもできる。免疫原とする任意の抗原またはその部分ペプチドは以下に例示するようなタンパク質と融合タンパク質として発現させ、精製の後、または未精製のまま免疫原として用いることもできる。融合タンパク質の作製には、当業者が「タンパク質発現・精製タグ」として一般的に用いる、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオレドキシン(TRX)、Nusタグ、Sタグ、HSVタグ、FRAGタグ、ポリヒスチジンタグなどが利用できる。これらとの融合タンパク質は、消化酵素を用いて任意の抗原あるいはその部分ペプチド部分とそれ以外のタグ部分とを切断し、分離精製した後に免疫原として用いることが好ましい。

【0016】

免疫した動物からのモノクローナル抗体の調製は、周知のケラーらの方法(Kohler et al., Nature, vol. 256, p495-497(1975))により容易に行うことができる。すなわち、免疫した動物から、脾細胞やリンパ球等の抗体産生細胞を回収し、これを常法によりマウスミエロマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、得られたハイブリドーマを限界希釈法等によりクローニングし、クローニングされた各ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のうち、動物の免疫に用いた抗原と抗原抗体反応するモノクローナル抗体を選択する。

【0017】

本発明の方法に用いるモノクローナル抗体は、2種類以上の抗原を認識するものであるから、このようにして選択された、2種類以上の抗原のうちの一つを認識するモノクローナル抗体について、さらに、もう1つの抗原を認識するモノクローナル抗体をスクリーニングする。3種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体を用いる場合には、さらに同様なスクリーニングを繰り返して各抗原を認識するモノクローナル抗体を選択していく。本発明の方法では、このようにして得られる2種類以上の抗原の両方を認識するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いる。なお、2種類の抗原を認識するモノクローナル抗体が存在し得るためには、2種類の抗原間で異なる抗原の中に存在する相同性の高い領域を認識する場合、異なる抗原の中に存在する立体構造の似通った領域を認識する場合、異なる抗原が複合体を形成しその隣接部位を跨った領域を認識する場合、異なる抗原が複合体を形成しその隣接部位を跨った立体構造を認識する場合等、さまざまな可能性が考えられる。従って、本願発明で言う、「被検対象の検出を可能とする2種類以上の抗原が存在する被検対象の検出方法」は、これらの2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体が得られる場合に限定される。また、通常、認識する抗原の種類が増えるほど、それらを認識するモノクローナル抗体は得られ難くなるので、モノクローナル抗体が認識する抗原は2種類であることが好ましい。なお、下記実施例においては、このようなスクリーニングにより、マイコプラズマ・ニューモニエのP1タンパク質とP30タンパク質を認識するモノクローナル抗体が得られている。

【0018】

腹水や培養上清からのモノクローナル抗体の精製は、公知のイムノグロブリン精製法を用いることができる。例えば、硫酸アンモニウムや硫酸ナトリウムを用いた塩析による分画法、PEG分画法、エタノール分画法、DEAEイオン交換クロマトグラフィー法、ゲルろ過法などが挙げられる。また免疫動物種とモノクローナル抗体のクラスに応じて、プロテインA、プロテインG、プロテインLのいずれかを結合させた担体を用いたアフィニティクロマトグラフィー法によっても精製することが可能である。

【0019】

本発明の免疫測定方法では、上記のようにして作製した2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片(以下、実施例の前までの記述において、文脈

10

20

30

40

50

からそうでないことが明らかな場合を除き、「抗体」は、「抗体又はその抗原結合性断片」を意味する)と検体中の抗原との抗原抗体反応を利用した免疫測定により測定する。このための免疫測定法としては、競合法、凝集法、ウェスタンブロット法、免疫染色法、サンドイッチ法など、当業者にとって周知のいずれの方法も用いることができる。なお、本発明において、「測定」には、定量、半定量、検出のいずれもが包含される。

【0020】

免疫測定としては、サンドイッチ法が好ましい。サンドイッチ法自体は免疫測定の分野において周知であり、例えばイムノクロマトグラフィー法やELISA法により行うことができる。これらのサンドイッチ法自体はいずれも周知であり、本発明の方法は、上記した本発明の2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体を用いること以外は、周知のサンドイッチ法により行うことができる。

10

【0021】

サンドイッチ法には、抗原を認識する2種類の抗体(固相に固定化される抗体と、標識抗体)が用いられるが、本発明の方法では、これらの2種類の抗体のうち、少なくともいずれか一方が、上記した2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体である。後述するように、固相に固定化される抗体は、単位面積当りに固定化可能な抗体量が限られているので、感度向上という本発明の目的をより良く達成するためには、少なくとも固定化抗体に上記した2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体を用いることが好ましい。なお、単一の分子又は単一の複合体の中に、該モノクローナル抗体により認識される抗原が少なくとも2種類存在する場合には、単一種類の該モノクローナル抗体を固相化抗体及び標識抗体として用いてサンドイッチ法を行うことも可能である(下記実施例参照)。

20

【0022】

サンドイッチ法を検出原理とする免疫測定において、抗体が固定化される固相としては、抗体を公知技術により固定可能なものは全て用いることができ、例えば、毛細管作用を有する多孔性薄膜(メンブレン)、粒子状物質、試験管、樹脂平板など公知のものを任意に選択できる。また、抗体を標識する物質としては、酵素、放射性同位体、蛍光物質、発光物質、有色粒子、コロイド粒子などを用いることができる。前述の種々の材料による免疫測定法の中でも、特に臨床検査の簡便性と迅速性の観点から、メンブレンを用いたラテラルフロー式の免疫測定法が好ましい。

【0023】

本発明では、2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体を用いてラテラルフロー式に免疫測定を行うことができる免疫測定器具をも提供する。本発明が提供する免疫測定器具は、測定対象物(抗原)を捕捉する抗体(抗体1)が固定化された検出領域を有する支持体、移動可能な標識抗体(抗体2)を有する標識体領域、検体を滴加するサンプルパッド、展開された検体液を吸収する吸収帯、これら部材を1つに貼り合わせるためのパッキングシートから成り、抗体1および抗体2の少なくとも一方が本発明の2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体である免疫測定器具である。

30

【0024】

なお、検出領域の数および標識体領域に含まれる標識抗体の種類は1に限られるものではなく、複数の測定対象物に対応する抗体を用いることで、2以上の抗原を同一の免疫測定器具にて検出することができる。

40

【0025】

図2は、本発明のイムノクロマト免疫測定器具の好ましい1形態を示した図である。イが支持体、ロが標識体領域、ハが検出領域、ニがサンプルパッド、ホが吸収帯、ヘがパッキングシートを指している。

【0026】

図2の上が上面図、下が切断断面図である。図の例では、パッキングシート上に2個の検出領域が形成された支持体、吸収帯、標識体領域、サンプルパッドらがそれぞれ積層されている。そして図示のように、吸収帯の一方の端部と支持体の一方の端部、支持体の他方の端部と標識体領域の一方の端部、標識体領域の他方の端部とサンプルパッドの一方の

50

端部がそれぞれ重ね合わされており、これにより連続したラテラルフローの流路が形成されている。

【0027】

支持体は、抗原を捕捉するための抗体を固定化する性能を持つ材料であり、かつ液体が水平方向に通行することを妨げない性能を持つ。好ましくは、毛細管作用を有する多孔性薄膜であり、液体およびそれに分散した成分を吸収により輸送可能な材料である。支持体を成す材質は特に限定されるものではなく、例えばセルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)、ガラス繊維、ナイロン、ポリケトンなどが挙げられる。このうちニトロセルロースを用いて薄膜としたものがより好ましい。

10

【0028】

標識体領域は、標識抗体を含む多孔性基材から成り、基材の材質は一般的に用いられているガラス繊維や不織布等を用いることができる。該基材は、多量の標識抗体を含浸させるために、厚さ0.3mm~0.6mm程度のパッド状であることが好ましい。

【0029】

検出領域は、抗原を捕捉する抗体が固定化された支持体の一部の領域を指す。検出領域は、2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体を固定化した領域を少なくとも1つ設け、さらに標識抗体を検出するための検出領域を設けることが、実際の診断補助のためには好ましい。

【0030】

20

サンプルパッドは、検体または検体を用いて調製された試料を滴加するための部位であり、吸水性を持つ多孔性材料である。該材料には一般的に用いられるセルロース、ガラス繊維、不織布等を用いることができる。多量の検体を免疫測定に用いるために、厚さ0.3mm~1mm程度のパッド状であることが好ましい。なお、サンプルパッドと前述の標識体領域はあくまで機能的な区別であって、必ずしも個別の材料である必要はない。すなわち、サンプルパッドとして設置した材料の一部領域が標識体領域の機能を有することも可能である。

【0031】

吸収帯は、支持体に供給され検出領域で反応に関与しなかった成分を吸収するための部材である。該材料には、一般的な天然高分子化合物、合成高分子化合物等からなる保水性の高い紙、スポンジ等を用いることができるが、検体の展開促進のためには吸水性が高いものが好ましい。

30

【0032】

バックグシートは、前述の全ての材料、すなわち支持体、サンプルパッド、標識体領域、吸収帯らが、部分的な重なりをもって貼付・固定されるための部材である。バックグシートは、これら材料らが最適な間隔で配置・固定されるのであれば、必ずしも必要ではないが、製造上あるいは使用上の利便性から、一般的には用いたほうが好ましい。

【0033】

図2で説明した形態の免疫測定器具において、検体は、サンプルパッド、標識体領域、支持体、検出領域、吸収帯らの一連の接続により形成された多孔性流路を通過する。よって本形態においては、これら全てが検体移動領域となる。各構成材料の材質や形態によって、検体が材料内部を浸透せず界面を通行する形態もありうるが、本明細書で定義する検体移動領域は材料の内部か界面かを問わないため、該形態の免疫測定器具も本明細書の範囲に含まれる。

40

【0034】

図2の形態に基づき、本発明の免疫測定器具の使用方法について述べる。測定は、検体または検体を用いて調製された試料をサンプルパッドに滴加することにより開始される。滴加する検体試料は予め、界面活性剤を含む緩衝液を用いて2~20倍程度に希釈されていることが好ましい。

【0035】

50

サンプルパッドに滴加された検体試料は毛管作用によって標識体領域、支持体、吸収帯へと順次、水平方向に展開される。標識体領域では検体試料の展開と共に標識抗体が液中に放出され支持体へと展開される。検体試料中に抗原が存在する場合において、支持体の検出領域では捕捉抗体により抗原が特異的に捕捉され、なおかつ抗原は標識抗体とも特異的反応により複合体を形成する。これにより検出領域では抗原を介した抗体のサンドイッチが成立し、標識抗体 - 抗原複合体を検出領域にて検知することができる。

【0036】

特異性を有しながら2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体として、異なる抗原の中に存在する相同性の高い領域を認識する場合、異なる抗原の中に存在する立体構造の似通った領域を認識する場合、異なる抗原が複合体を形成しその隣接部位を跨った領域を認識する場合、異なる抗原が複合体を形成しその隣接部位を跨った立体構造を認識する場合等、さまざまな可能性が考えられるが、単一のモノクローナル抗体が認識する2種類以上の抗原は、同一の複合体中に含まれることがより望ましい。なお、ここで、「複合体」は、検体中で、複数の分子が何らかの作用により集合しているものを意味し、例えば、被検対象が菌体である場合、菌体上にある各抗原は、複合体を形成していると考えられる。下記実施例において、マイコプラズマ・ニューモニエのP1タンパク質とP30タンパク質は、ここで言う「複合体」を形成していると考えられる。

【0037】

同一の複合体中に含まれることにより、単体で存在する場合に比べ、抗体間の立体障害を受ける可能性は低下し、上記免疫測定法におけるサンドイッチが成立する確率は高まる。

【0038】

本発明の方法により、免疫測定の感度が向上する原理は以下の通りであると考えられる。サンドイッチ法においては、固相に固定化された抗体が用いられるが、固相の単位面積当りに固定化可能な抗体の量は限られている。また、抗原抗体反応の時間も限られている。特に、イムノクロマトグラフィー法では、検体又は検体を用いて調製された試料（検体の希釈物など）が、上流から流れて来て検出領域を通過する間だけ抗原抗体反応が行われるので、この時間内に抗体に結合できなかった抗原は、そのまま検出領域よりも下流に流れて行き、検出されることはない。検体中の抗原量が少ない場合には、固相化抗体として、1種類の抗原を認識する1種類のモノクローナル抗体を用いる（通常のスンドイッチ法）よりも、2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体を用いた場合の方が、抗体に結合する抗原の量が増えるので、感度が向上する。また、固相化抗体として、それぞれ1種類の抗原を認識するモノクローナル抗体を2種類組み合わせる場合、固相化される各モノクローナル抗体の量は、それぞれ、全固相化抗体量の半分であるから、抗原抗体反応の時間が短い場合には、ある抗原が、この抗原と結合可能なモノクローナル抗体と所定の方向で衝突して結合する確率は、固相化抗体の全部がその抗原を認識するモノクローナル抗体である場合と比較すると1/2になる。一方、2種類以上の抗原を認識するモノクローナル抗体を用いる場合には、2種類以上の抗原のいずれでも、固相化抗体と所定の方向で衝突すれば抗体と結合するので、固相化抗体に捕捉される抗原量は、それぞれ1種類の抗原を認識するモノクローナル抗体を2種類組み合わせる場合よりも多くなり、従って、免疫測定の感度が向上する。

【実施例】

【0039】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0040】

実施例1 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の作製

1. マイコプラズマ・ニューモニエ抗原の調製

マイコプラズマ・ニューモニエを培養し、その培養液を60、30分間の熱処理で不活化したものを用いた。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

2 . 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の作製

1 . のマイコプラズマ不活化抗原をBALB/cマウスに免疫し、一定期間飼育したマウスから脾臓を摘出し、ケラーらの方法 (Kohler et al., Nature, vol, 256, p495-497(1975)) によりマウスミエローマ細胞 (P3×63) と融合した。得られた融合細胞 (ハイブリドーマ) を、37℃インキュベーター中で維持し、マイコプラズマ・ニューモニエP1抗原を固相したプレートとマイコプラズマ・ニューモニエP30抗原を固相したプレートを用いたELISAにより上清の抗体活性を確認しながら細胞の純化 (単クローン化) を行った。

【 0 0 4 2 】

その結果、表1に示されるとおり抗マイコプラズマ・ニューモニエP1抗体、抗マイコプラズマ・ニューモニエP30抗体及び抗マイコプラズマ・ニューモニエP1・P30抗体を産生するハイブリドーマ細胞株が複数得られた。

【 0 0 4 3 】

【表1】

クローン名	反応抗原
P1A	P1
P1B	P1
P30A	P30
P30B	P30
P1-P30A	P1、P30
P1-P30B	P1、P30

【 0 0 4 4 】

なお、このELISAに用いたP1、P30は、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーにより調製した。

【 0 0 4 5 】

取得した細胞株をプリスタン処理したBALB/cマウスに腹腔投与し、約2週間後、抗体含有腹水を採取した。得られた腹水から、プロテインAカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィー法によりIgGを精製し、精製抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体を複数得た。

【 0 0 4 6 】

以下の実施例では複数得られた抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体のうち、反応性およびエピトープを考慮して選択した抗体を用いた。

【 0 0 4 7 】

実施例2 抗マイコプラズマ・ニューモニエモノクローナル抗体の反応性

実施例1で得た各モノクローナル抗体とマイコプラズマ・ニューモニエとの反応性をウエスタンブロッティングで確認した。マイコプラズマ・ニューモニエはPPL0 Brothで培養し、その培養液をサンプルとした。

【 0 0 4 8 】

マイコプラズマ・ニューモニエの培養液と分子量マーカーを常法のSDS-PAGEで電気泳動を行った。電気泳動後、PVDf膜に転写した。スキムミルクでブロッキングを行った後、PBS-Tweenで十分に洗浄した。PBS-Tweenで1µg/mLに調整した抗P30抗体を室温で1時間反応させた。PBS-Tweenで十分に洗浄した後、3000倍に希釈したHRP標識抗マウス抗体を室温で1時間反応させた。PBS-Tweenで十分に洗浄した後、ECL試薬(；GEヘルスケア)またはPODイムノステインキット(；和光)を用いてシグナルを検出した。

【 0 0 4 9 】

ウエスタンブロッティングの結果を図1に示す。図1に示された通り、実施例1で得られたモノクローナル抗体はELISAの結果と同様に各抗原に特異的に反応することが確

10

20

30

40

50

認できた。なお、図1の左上の図（ECLにて蛍光検出）が、P1AとP1Bについての結果を示しており、各右のレーンが菌体についての結果、左のレーンが分子量マーカを示す（図1中の他の図も同様）。各右のレーンでP1タンパク質のバンドが明確である。図1の右上の図（POD染色後、デンストメーターで撮影）は、P30AとP30Bについての結果を示す。各左のレーンにおいてP30タンパク質のバンドが明確である。図1の左下の図（POD染色後、デンストメーターで撮影）は、P1-P30Aについての結果を示す。左のレーンにおいて、P1タンパク質のバンドとP30タンパク質のバンドが明確である。図1の右下の図（ECL試薬にて蛍光検出）は、P1-P30Bについての結果を示す。P30タンパク質のバンドが明確であり、P1タンパク質のバンドも弱いながらも確認できる。

【0050】

10

実施例3 マイコプラズマ・ニューモニエを測定する免疫測定器具

1. 抗マイコプラズマ・ニューモニエ抗体のニトロセルロースメンブレンへの固定化

実施例1で作製した抗体を1.0mg/mLになるように精製水で希釈した液及び抗マウスIgG抗体を準備し、PETフィルムで裏打ちされたニトロセルロースメンブレンのサンプルパッド側に抗体、吸収体側に抗マウスIgG抗体をそれぞれ線状に塗布した。その後、ニトロセルロースメンブレンを45、30分間乾燥させ、抗マイコプラズマ・ニューモニエ抗体固定化メンブレンを得た。本実施例において抗体固定化メンブレンと呼ぶ。

【0051】

2. 抗マイコプラズマ・ニューモニエ抗体の着色ポリスチレン粒子への固定化

実施例1で作製した抗体を1.0mg/mLになるように精製水で希釈し、これに着色ポリスチレン粒子を0.1%になるように加え、攪拌後、カルボジイミドを1%になるように加え、さらに攪拌する。遠心操作により上清を除き、50mM Tris (pH9.0)、3%BSAに再浮遊し、抗マイコプラズマ・ニューモニエ抗体結合着色ポリスチレン粒子を得た。本実施例において、抗体固定化粒子と呼ぶ。

20

【0052】

3. マイコプラズマ・ニューモニエP1、P30及びP1とP30を測定する試験片の作製

1で作製した抗体固定化メンブレンと他部材（バックグシート、吸収帯、サンプルパッド）とを貼り合せて5mm幅に切断し、マイコプラズマ・ニューモニエ試験片とした（図2参照）。これらを本実施例において、試験片と呼ぶ。

30

【0053】

実施例4、比較例1、比較例2

P1、P30及びP1とP30を測定する免疫測定器具の感度比較

実施例1で得られたモノクローナル抗体を表2の組み合わせで実施例3の手順によりP1試験片（比較例1）、P30試験片（比較例2）、P1-P30試験片（実施例4）の3種類作製した。

【0054】

【表2】

試験片	使用抗体	
	抗体固定化メンブレン	抗体固定化粒子
P1試験片（比較例1）	P1A	P1B
P30試験片（比較例2）	P30A	P30B
P1-P30試験片（実施例4）	P1-P30A	P1-P30A

40

【0055】

各試験片に、任意に希釈したマイコプラズマ・ニューモニエ抗原と2で作製した抗体固定化粒子を含む検体浮遊液を50μL滴加し、15分間静置した。

【0056】

50

抗マウス I g G 抗体及び抗マイコプラズマ・ニューモニエ抗体の両方の塗布位置で発色を目視で確認できた場合に + と判定した。抗マウス I g G 抗体の塗布位置のみで発色を目視で確認でき、抗マイコプラズマ・ニューモニエ抗体の塗布位置で発色を目視で確認できない場合は - と判定した。また、抗マウス I g G 抗体の塗布位置で発色を目視で確認できない場合は無効と判定した。

【 0 0 5 7 】

各試験片の結果を表 3 に示す。

【 0 0 5 8 】

【表 3】

	Blank	x32	x64	x128	x256	x512	x1024
P 1 試験片 (比較例 1)	—	+	—	—	—	—	—
P 3 0 試験片 (比較例 2)	—	+	+	±	—	—	—
P 1 - P 3 0 試験片 (実施例 4)	—	+	+	+	+	+	±

10

【 0 0 5 9 】

表 3 に示された通り、本発明のマイコプラズマ・ニューモニエの P 1 及び P 3 0 の両方を測定する免疫測定器具は、P 1 単独を測定する免疫測定器具と比較して 1 6 倍、P 3 0 単独を測定する免疫測定器具と比較して 8 倍優れた感度を示した。

20

【 0 0 6 0 】

実施例 5

P 1 - P 3 0 試験片の使用抗体を P 1 - P 3 0 A と P 1 - P 3 0 B の組み合わせで実施例 4 と同様に試験した。その結果、P 1 - P 3 0 A のみの組み合わせ (実施例 4) と比較して 2 ~ 4 倍優れた感度を示した。

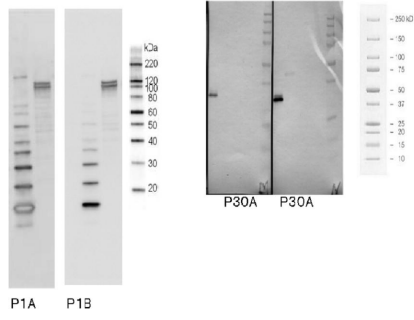
【符号の説明】

【 0 0 6 1 】

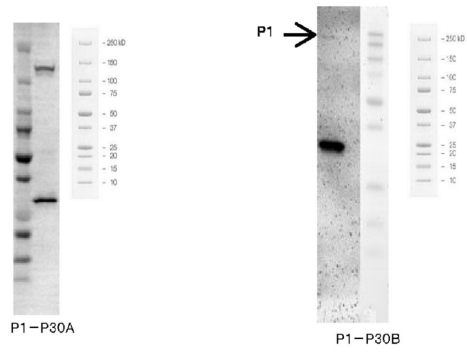
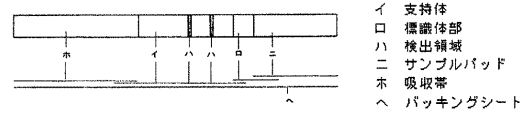
- イ 支持体
- ロ 標識体部
- ハ 検出領域
- ニ サンプルパッド
- ホ 吸収帯
- ヘ バッキングシート

30

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2011-220931(JP,A)
特開2004-258024(JP,A)
特開2011-079830(JP,A)
国際公開第88/004669(WO,A1)
国際公開第2015/025968(WO,A1)
中国特許出願公開第104198703(CN,A)
OWAIS, Mohammad, An Alternative Chemical Redox Method for the Production of Bispecific Antibodies: Implication in Rapid Detection of Food Borne Pathogens, PLOS ONE, PLOS, 2014年 3月, Volume 9, Issue 3 e91255, 1-13
GUTTIKONDA, Sujatha, Monospecific and bispecific antibodies against E. coli 0157 for diagnosis, Journal of Immunological Methods, 2007年 7月16日, 327, 1-9

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N33/48~33/98
C07K16/12
C12P21/08