

(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2013-126952

(P2013-126952A)

(43) 公開日 平成25年6月27日(2013.6.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/32 (2006.01)	C07K 14/32	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	D
G01N 33/569 (2006.01)	G01N 33/569	F
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 16/12	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2010-78920 (P2010-78920)	(71) 出願人	597128004 国立医薬品食品衛生研究所長 東京都世田谷区上用賀一丁目18番1号
(22) 出願日	平成22年3月30日 (2010.3.30)	(71) 出願人	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	100088546 弁理士 谷川 英次郎
		(72) 発明者	鎌田 洋一 東京都世田谷区上用賀1丁目18番1号 国立医薬品食品衛生研究所内
		(72) 発明者	権平 文夫 新潟県五泉市南本町一丁目2番2号 デン カ生研株式会社新潟工場内
		Fターム(参考)	4H045 AA11 BA10 BA60 CA11 DA76 DA86 EA52 FA73 FA80

(54) 【発明の名称】 免疫原の調製方法及びそれを用いた抗体の作製方法

(57) 【要約】

【課題】 抗原がセレウリドのような疎水性低分子であっても抗体の産生を可能にする、免疫原の調製方法及びそれを用いた抗体の作製方法を提供すること。

【解決手段】 免疫原の調製方法は、セレウリドのような抗原をメタノールのような水溶性有機溶媒に溶解する工程と、得られる抗原溶液と、サルモネラ死菌体のような、それ自身が抗原性を有する担体とを混合する工程と、次いで前記水溶性有機溶媒を蒸発させる工程とを含む。本発明により、抗セレウリド抗体が初めて提供された。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原を水溶性有機溶媒に溶解する工程と、得られる抗原溶液と、それ自体が抗原性を有する担体とを混合する工程と、次いで前記水溶性有機溶媒を蒸発させる工程とを含む、免疫原の調製方法。

【請求項 2】

前記水溶性有機溶媒が低級アルコールである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記低級アルコールがメタノールである請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記担体が病原菌の死菌体である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記担体がサルモネラ死菌体である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記抗原が、疎水性ポリペプチドから主として成る、分子量 10,000 以下の抗原である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗原がセレウリドである請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法により調製された免疫原で動物（ヒトを除く）を免疫することを含む、抗体の作製方法。

【請求項 9】

セレウリドと抗原抗体反応する抗セレウリド抗体。

【請求項 10】

抗セレウリド抗体とセレウリドとの抗原抗体反応を利用した免疫測定により、被検試料中のセレウリドを測定することを含む、セレウリドの免疫測定方法。

【請求項 11】

前記免疫測定方法が、サンドイッチ法、凝集法または競合法のいずれかである請求項 10 記載の免疫測定方法。

【請求項 12】

抗セレウリド抗体を含む、セレウリドの免疫測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明は、免疫原の調製方法及びそれを用いた抗体の作製方法並びに抗セレウリド抗体及びその免疫測定に関する。

【背景技術】

【0002】

セレウス菌(*Bacillus cereus*)は、土壌、塵埃、河川水等の自然環境中に広く存在する有芽胞菌である。セレウス菌は食品中で旺盛に増殖し、タンパクや多糖類などの分解性が強いので、穀類、食肉製品、香辛料、野菜および乳製品等の食品を腐敗、変敗を起こすことが知られている。セレウス菌の芽胞は耐熱性であるため、セレウス菌の芽胞に汚染された食品原材料が加熱されても芽胞は生き残り、食品の放冷と共に発芽、増殖することがある。また、セレウス菌は食品中で増殖する過程で毒素を産生することによって消化器障害を引き起こし、食品衛生上最も重要視される食中毒の原因菌となることもある。セレウス菌による食中毒は臨床症状や潜伏期間の違いから、「嘔吐型」と「下痢型」の 2 つが存在し、嘔吐型食中毒は嘔吐毒素（セレウリド）が、下痢型毒素は下痢原性毒素（エンテロトキシン）が関与することが報告されている。嘔吐型食中毒の原因となるセレウリドは、高压滅菌（126、30分）でも安定であり強い耐熱性を示すことから、一度食品中で産生されると通常の食品の調理では失活せず、食中毒を引き起こす。

10

20

30

40

50

【0003】

セレウリドを検出する方法としてHEp-2細胞を用いたバイオアッセイやLC/MSを用いた機器分析による方法がある。また近年では、セレウリド合成酵素に着目した検出方法が開発されており、セレウリド合成酵素の遺伝子の配列に基づいて設計したプライマーを用いたPCRキット(Bacillus cereus(CRS gene)PCR Detection Kit:TaKaRa)やセレウリド合成酵素を抗原抗体反応で検出することが報告されている(特許文献1)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特許第4340227号掲載公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

セレウリドを検出する方法としてHEp-2細胞を用いたバイオアッセイやLC/MSを用いた機器分析による方法が用いられてきたが、これらの方法は手技の煩雑さや時間や費用がかかるなどの点で問題があり、迅速で簡易な方法が望まれてきた。また、セレウリドを合成する酵素遺伝子の配列に基づいて設計したプライマーを用いたPCRキットやセレウリド合成酵素を抗原抗体反応により検出する方法が報告されているが、これらの方法はセレウリドを直接、検出するわけではない。

【0006】

食物内毒素型食中毒であるセレウスの嘔吐型食中毒においては、食品中のセレウリドの量が食中毒発生の要因となることから、セレウリドを直接、迅速で簡易な免疫測定法により検査する方法を開発することが望まれている。しかし、セレウリドは高い疎水性を持つ低分子の環状ペプチドであり、分子量が小さく抗原性を示さないことから、これまでセレウリドに対する抗体を作製することができなかった。このため、これまでセレウリドを免疫測定法で検出する方法及び検査キットを開発することができなかった。

【0007】

従って、本発明の目的は、抗原がセレウリドのような疎水性低分子であっても抗体の産生を可能にする、免疫原の調製方法及びそれを用いた抗体の作製方法を提供することである。また、本発明の目的は、抗セレウリド抗体並びにそれを用いて免疫測定方法及び免疫測定用キットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、抗原を水溶性有機溶媒に溶解し、得られる抗原溶液と、それ自体が抗原性を有する担体とを混合し、次いで水溶性有機溶媒を蒸発させて調製した免疫原を動物に投与すると、セレウリドのような疎水性低分子量で、通常の免疫方法では抗体産生が誘導されない抗原であっても、動物体内で抗体が産生されることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、抗原を水溶性有機溶媒に溶解する工程と、得られる抗原溶液と、それ自体が抗原性を有する担体とを混合する工程と、次いで前記水溶性有機溶媒を蒸発させる工程とを含む、免疫原の調製方法を提供する。また、本発明は、上記本発明の方法により調製された免疫原で動物(ヒトを除く)を免疫することを含む、抗体の作製方法を提供する。さらに、本発明は、セレウリドと抗原抗体反応する抗セレウリド抗体を提供する。さらに本発明は、抗セレウリド抗体とセレウリドとの抗原抗体反応を利用した免疫測定により、被検試料中のセレウリドを測定することを含む、セレウリドの免疫測定方法を提供する。さらに本発明は、抗セレウリド抗体を含む、セレウリドの免疫測定用キットを提供する。

【発明の効果】

【0010】

10

20

30

40

50

本発明により、抗原がセレウリドのような疎水性低分子であっても抗体の産生を可能にする、免疫原の調製方法及びそれを用いた抗体の作製方法が初めて提供された。そして、この方法により、これまで得ることができなかった抗セレウリド抗体が初めて提供された。本発明により、抗セレウリド抗体が初めて提供されたので、それを用いて被検試料中のセレウリドを免疫測定することが初めて可能になり、簡便、迅速にセレウリドを測定することが可能になった。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の免疫原の調製方法に供される抗原は、動物体内において抗体産生が誘導される抗原であれば特に限定されないが、公知の方法では抗体産生が起きない、疎水性ポリペプチドから主として成る、低分子量の抗原を用いることにより本発明の威力が最も発揮される。ここで、疎水性とは、水溶液にたいして溶解し難い事、メタノール、アセトニトリル、アセトン等の有機溶媒に溶解する事、極性の弱いことを意味する。この定義によれば、セレウリドは疎水性のポリペプチドである。また、低分子量とは、分子量が10,000以下、好ましくは数千以下を意味する。セレウリドの分子量は、1191.6であるので、セレウリドはここで言う低分子量の抗原に該当する。また、ここで言う、ポリペプチドは、糖鎖が付加した糖タンパク質や脂質が付加したりポタンパク質を包含する意味で用いている。

10

【0012】

本発明の免疫原の調製方法に供される抗原として特に好ましいものとして、セレウリドを挙げることができる。セレウリドの調製方法自体は公知であり、セレウス菌を培養した培養上清から精製することにより得ることができるし、遺伝子工学的手法により生産する方法も公知である。また、セレウリドは、市販もされているので、市販品を好ましく用いることができる。

20

【0013】

本発明の方法に用いられる水溶性有機溶媒は、水と任意の割合で混じり合う有機溶媒を意味する、好ましい水溶性有機溶媒としては、低級(炭素数1~4)アルコールを挙げることができ、抗体産生の誘導効率の観点から、特にメタノールが好ましい。また、水溶性有機溶媒の濃度が50重量%以上であれば、水溶性有機溶媒と水や水系緩衝液、KClやNaCl等の塩の水溶液との混合物も本発明でいう「水溶性有機溶媒」に包含される。

30

【0014】

本発明の免疫原の調製方法では、上記抗原を、上記水溶性有機溶媒に溶解する。溶媒は後で蒸発されるので、この際の抗原濃度は、特に限定されない。

【0015】

得られる抗原溶液を、それ自体が抗原性を有する担体とを混合する。ここで、「担体」は、抗原を吸着ないしは付着させるものであるから抗原分子よりも大きなものであり、また、担体は、免疫原として動物に注射されるものであるから、注射針を通過できるものである。自体が抗原性を有するこのような担体の好ましい例として、病原菌の死菌体を挙げることができる。病原菌としては、特に限定されず、サルモネラ菌等を用いることができる。これらのうち、抗体産生の誘導効率の観点からサルモネラ菌が特に好ましい。なお、「死菌体」は、全菌の死菌体のみならず、全菌の死菌体の断片であってもよく、例えば、下記実施例に記載のとおり、死菌体を凍結乾燥処理で粉末化したものでもよい。

40

【0016】

死菌体の調製方法は特に限定されず、例えば、水や親水性有機溶媒で洗浄後、減圧乾固し、さらに好ましくは凍結乾燥して粉末状にする方法が挙げられるがこれに限定されるものではない。

【0017】

抗原溶液と、担体との混合比率は、後で有機溶媒を蒸発させるので、特に限定されないが、通常、担体1mgに対して抗原溶液が0.01mL~1mL程度、特に0.05mL~0.2mL程度である。また、混合の際の温度は特に限定されないが、常温で行うことが抗原や担体の変性を起

50

こさず、また便利であり好ましい。混合物を蒸発させると抗体が担体上に吸着ないしは付着するので、混合時間は重要ではなく、単に混合すれば十分である。

【0018】

なお、抗原溶液の調製した後、得られた抗原溶液を担体と混合することが好ましいが、抗原と、担体と、水溶性有機溶媒を同時に混合して抗原溶液の調製と担体との混合を単一工程で行うことも可能である。

【0019】

次に、混合物から水溶性有機溶媒を蒸発させる。これにより、抗原が担体に吸着ないし付着される。蒸発は自然蒸発でもよいし、窒素ガスなどの不活性ガスを軽く吹き付けて時間を短縮してもよい。

10

【0020】

上記のようにして得られる免疫原を動物（ヒトを除く）に投与することにより、免疫原中の所望の抗原に対する抗体を動物体内で生産させることができる。この際の投与量は、特に限定されない。動物は、ヒト以外の哺乳動物や鳥類が好ましく、ウサギ、マウス、ニワトリ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等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。

【0021】

免疫方法自体及び免疫した動物からポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を調製する方法は、この分野において一般的に用いられる周知の方法により行うことができ、下記実施例にもその一例が詳細に記載されている。

20

【0022】

上記方法により、これまで得ることができなかった、抗セレウリド抗体が初めて得られた。従って、本発明は、セレウリドと抗原抗体反応する抗セレウリド抗体をも提供するものである。また、本発明により抗セレウリド抗体が提供されたので、これを用いた免疫測定により被検試料中のセレウリドを測定することが可能になった。なお、ここで、「測定」には定量及び検出の両者が包含される。

【0023】

免疫測定としては、サンドイッチ法、凝集法及び競合法等が広く用いられており、これらのいずれをも採用することができる。これらの免疫測定方法自体は周知であり、下記実施例にも具体的に記載されている。

30

【0024】

また、本発明により、抗セレウリド抗体を含む免疫測定用キットも提供された。免疫測定用キット自体も周知であり、通常、抗体を担持したELISAプレートやビーズのような担体や、免疫測定に必要な緩衝液等がキット化されている。キットは、EIA、RIA、RPLA、ラテックス凝集法、イムノクロマト法等、この分野で広く用いられている様々な形態のものとすることができる。

【0025】

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。

【0026】

実施例1 免疫原の調製

(1) セレウリド溶液の調製

セレウリドは、有限会社バイオコントロール研究所（名古屋市）より購入した。セレウリドを、75wt%メタノール/250mM KClで1mg/mlに調製した。

【0027】

(2) サルモネラ死菌体の調製

サルモネラ菌(Salmonella Minnesota R595)をL-Brothに接種し37℃で一晩培養した。培養液にフェノールを添加し、遠心分離して菌体を得た。菌体を蒸留水、アセトン、エーテルで洗浄し、減圧乾固した。得られたサルモネラ死菌体を1%酢酸で洗浄し、1%酢酸に懸濁後、100℃で2時間加温した。蒸留水で洗浄した後、蒸留水に懸濁し、凍結乾燥して粉末に

40

50

した。

【0028】

(3) セレウリド溶液とサルモネラ死菌体の混合

(2)で調製したサルモネラ死菌体を1 mg秤量し、ガラス試験管の底部に取った。(1)で調製したセレウリド溶液を0.1mlとり、サルモネラ菌体粉末上に添加した。窒素ガスを柔らかく吹き掛け、メタノールを蒸発させた。1 mlのPBSを加え、水槽型の音波発生装置で1分処理し、菌体をPBS中に均一に分散させ、免疫原とした。

【0029】

実施例2 マウスモノクローナル抗体の作製

実施例1で調製した免疫原をマウスに免疫した。マウスは、Balb/cマウスの雌で4週齢で免疫を開始した。免疫は、足裏に行い、1回/1匹につき25 µgを免疫した。Day 1,3,7で免疫後、Day 10で鼠径リンパ節を採取し、常法によりハイブリドーマを作製した。培養上清の一次スクリーニングで、抗体産生陽性クローンを選別した。抗体産生陽性クローンを限界希釈法で希釈した後、培養上清の抗体価を測定した。

10

【0030】

培養上清の抗体価の測定は、ELISAにより行った。使用したELISAプレートは次のようにして作製した。すなわち、有限会社バイオコントロール研究所より購入したセレウリドを10 µg/mlの濃度にメタノールに溶解し、マイクロプレートの各ウェルに100 µl加えた。50でインキュベートしてメタノールを蒸発乾固した。10%スキムミルク(in PBS)200 µl加えて4で1晩おきにブロッキングした。また、対照試験の非コーティングプレートはメタノールのみで蒸発乾固した後、上記と同様にブロッキングした。このように作製したELISAプレートを用いて、ELISAを行った。ELISAは具体的には次のようにして行った。培養上清をマイクロプレートのウェルに100 µl加え、室温で1時間、インキュベーションした。次にウェルを10%スキムミルク(in PBS)で5回洗浄後、ペルオキシダーゼ(HRP)標識された抗マウスIgGを100 µl加え、室温で1時間、インキュベーションした。次にウェルを10%スキムミルク(in PBS)で5回洗浄後、基質(TetraMethylbenzidin)と過酸化水素を混合した発色試薬をウェルに100 µl加え、室温で1時間、インキュベーションした後、1N H₂SO₄ 100 µlを加え反応を止めた。その後、450nmで吸光度を測定した。

20

【0031】

得られた陽性クローン10個についての結果を下記表1に示す。いずれのクローンでも、セレウリドコーティングプレートを用いた際の吸光度が、対照であるセレウリド非コーティングを用いた場合に比べて明らかに高くなっており、抗セレウリドモノクローナル抗体の産生が確認された。

30

【0032】

【表1】

クローン番号	セレウリドコーティングプレート	非コーティングプレート
1	0.107	0.013
2	0.119	0.033
3	1.12	0.05
4	0.897	0.037
5	1.133	0.055
6	1.018	0.044
7	0.297	0.064
8	0.233	0.037
9	0.222	0.022
10	0.286	0.037

40

【0033】

50

実施例 3、比較例 1 ニワトリポリクローナル抗体の作製

実施例 1 で調製した免疫原（実施例 3）又は実施例 1 (1) で調製したセレウリド溶液に市販のオイルアジュバントを等量混合した免疫原（比較例 1）をニワトリ（ホワイトレグホン）に免疫した。免疫量は 1 回/1 羽 100 μ g とし、各抗原を 1 羽ずつ 5 回腹腔免疫し、6 回目の免疫は静脈注射した後、全採血した。免疫前の血清と全採血後の血清の抗体価を上記のとおり ELISA で測定して比較した。

【0034】

ELISA は具体的には次のようにして行った。ELISA プレートは実施例 2 のセレウリドコーティングプレート及び非セレウリドコーティングプレートを使用した。免疫前と全採血後の血清は 10% スキムミルク (in PBS) で 500 倍に希釈したものを検体とした。測定手順はまず、マイクロプレートのウェルに検体を 100 μ l 加え、室温で 1 時間、インキュベーションした。次にウェルを 10% スキムミルク (in PBS) で 5 回洗浄後、ビオチンで標識された抗ニワトリ IgG を 100 μ l 加え、室温で 1 時間、インキュベーションした。次にウェルを 10% スキムミルク (in PBS) で 5 回洗浄後、ペルオキシダーゼ (HRP) で標識されたストレプトアビジンを 100 μ l 加え、室温で 1 時間、インキュベーションした。次にウェルを 10% スキムミルク (in PBS) で 5 回洗浄後、基質 (TetraMethylbenzidine) と過酸化水素を混合した発色試薬をウェルに 100 μ l 加え、室温で 1 時間、インキュベーションした後、1N H₂SO₄ 100 μ l を加え反応を止めた。その後、450nm で吸光度を測定した。

【0035】

得られた結果を下記表 2 に示す。実施例 3 で免疫した場合は、セレウリドコーティングプレートにおいて、免疫前と免疫後において ELISA の測定値が大幅に上昇した。対照であるセレウリド非コーティングを用いた場合は免疫前と免疫後において ELISA の測定値にあまり差がないことから、抗セレウリドモノクローナル抗体の産生が確認された。

【0036】

一方、比較例 1 で免疫した場合は、セレウリドコーティングプレート及び対照であるセレウリド非コーティングプレート共に免疫前と免疫後において ELISA の測定値にあまり差がないことから、抗セレウリドモノクローナル抗体の産生が確認されなかった。

【0037】

このように、本発明の方法によりニワトリのセレウリドに対する抗体価の上昇が認められ、抗セレウリド抗体が作製可能であることが明らかになった。

【0038】

【表 2 - 1】

・実施例 3

	セレウリドコーティングプレート	非コーティングプレート
免疫前	0. 017	0. 010
免疫後	0. 217	0. 024

【0039】

【表 2 - 2】

・比較例 1

	セレウリドコーティングプレート	非コーティングプレート
免疫前	0. 059	0. 024
免疫後	0. 069	0. 050

【0040】

実施例 4 ウサギポリクローナル抗体の作製

実施例 1 で調製した免疫原をウサギに免疫した。免疫量は1回/1羽100 μ g とし、1羽に1週間ごとに5回腹腔免疫し、6回目の免疫は静脈注射し、6回目の免疫の1週間後、全採血した。免疫前の血清と全採血後の血清の抗体価を上記のとおりELISAで測定して比較した。

【0041】

ELISAは具体的には次のようにして行った。ELISAプレートは実施例 2 のセレウリドコーティングプレート及び非セレウリドコーティングプレートを使用した。免疫前と全採血後の血清は10%スキムミルク (in PBS) で500倍に希釈したものを検体とした。測定手順はまず、マイクロプレートのウェルに検体を100 μ l 加え、室温で1時間、インキュベーションした。次にウェルを10%スキムミルク (in PBS) で5回洗浄後、ビオチンで標識された抗ウサギIgGを100 μ l 加え、室温で1時間、インキュベーションした。次にウェルを10%スキムミルク (in PBS) で5回洗浄後、ペルオキシダーゼ (HRP) で標識されたストレプトアビジンを100 μ l 加え、室温で1時間、インキュベーションした。次にウェルを10%スキムミルク (in PBS) で5回洗浄後、基質 (TetraMethylbenzidin) と過酸化水素を混合した発色試薬をウェルに100 μ l 加え、室温で1時間、インキュベーションした後、1N H_2SO_4 100 μ l を加え反応を止めた。その後、450nmで吸光度を測定した。

10

【0042】

得られた結果を下記表 3 に示す。サルモネラ死菌の菌体にセレウリドで免疫した場合は、セレウリドコーティングプレートにおいて、免疫前と免疫後においてELISAの測定値が大幅に上昇した。対照であるセレウリド非コーティングを用いた場合は免疫前と免疫後においてELISAの測定値にあまり差がないことから、抗セレウリドモノクローナル抗体の産生が確認された。

20

【0043】

このように、本発明の方法によりウサギのセレウリドに対する抗体価の上昇が認められ、抗セレウリド抗体が作製可能であることが明らかになった。

【0044】

【表 3】

・実施例 4

	セレウリドコーティングプレート	非コーティングプレート
免疫前	0.008	0.008
免疫後	0.385	0.011

30

【0045】

実施例 5 被検試料中のセレウリドの免疫測定

得られた抗セレウリド抗体を用いて被検試料中のセレウリドを競合ELISAにより免疫測定した。抗セレウリド抗体は、実施例 4 で得られた抗セレウリドウサギポリクローナル抗体を用いた。被検試料は、セレウリド産生株のセレウス菌の培養上清の希釈物を用いた。コントロールとしては、セレウリド非産生株のセレウス菌の培養上清の希釈物を用いた。培養上清は次のように調製した。すなわち、菌をBHI培地に接種し、32 で一晩、振盪培養 (110rpm/分) した。この培養液0.3mLをスキムミルク培地10mLの入った坂口フラスコに接種し、32 で24時間、振盪培養 (110rpm/分) した。培養液を3,000rpmで10分、遠心分離し上清を回収した。上清を0.45 μ mのフィルターでろ過し、ろ液を100 で10分加熱した。

40

【0046】

抗セレウリド抗体をコーティングしたELISAプレートは実施例 2 のセレウリドコーティングプレートを使用した。

【0047】

このELISAプレートを用い、上記培養上清の希釈物を被検試料として、競合ELISAを行っ

50

た。競合ELISAは具体的には次のようにして行った。培養上清を10%スキムミルク(in PBS)で希釈したものを検体とした。測定手順はまず、検体と実施例4の抗セレウリドウサギポリクローナル抗体を混合したものをマイクロプレートのウェルに検体を100 μ l加え、室温で1時間、インキュベーションした。次にウェルを10%スキムミルク(in PBS)で5回洗浄後、ビオチンで標識された抗ウサギIgGを100 μ l加え、室温で1時間、インキュベーションした。次にウェルを10%スキムミルク(in PBS)で5回洗浄後、ペルオキシダーゼ(HRP)で標識されたストレプトアビジンを100 μ l加え、室温で1時間、インキュベーションした。次にウェルを10%スキムミルク(in PBS)で5回洗浄後、基質(TetraMethylbenzidin)と過酸化水素を混合した発色試薬をウェルに100 μ l加え、室温で1時間、インキュベーションした後、1N H₂SO₄ 100 μ lを加え反応を止めた。その後、450nmで吸光度を測定した。

10

【0048】

結果を下記表4に示す。表4に示されるように、セレウリド産生株の培養上清を被検試料とした場合には、希釈倍数に依存して吸光度が変化しており、セレウリドが免疫測定できることが確認された。一方、セレウリド非産生株の培養上清を被検試料とした場合には、希釈倍数に拘わらず、吸光度は希釈液のみの場合とほぼ同じであり、セレウリドは検出されなかった。

【0049】

【表4】

菌株	培養上清の希釈倍数	測定値
セレウリド産生株	2	0.452
	4	0.596
	8	0.835
	16	0.983
	32	1.320
	希釈液のみ	1.625
セレウリド非産生株	2	1.966
	4	1.782
	8	1.769
	16	1.757
	32	1.795
	希釈液のみ	1.784

20

30

专利名称(译)	制备免疫原的方法和使用其制备抗体的方法		
公开(公告)号	JP2013126952A	公开(公告)日	2013-06-27
申请号	JP2010078920	申请日	2010-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立医薬品食品衛生研究所長 デンカ生研株式会社		
[标]发明人	鎌田洋一 権平文夫		
发明人	鎌田 洋一 権平 文夫		
IPC分类号	C07K14/32 G01N33/53 G01N33/569 C07K16/12		
CPC分类号	C07K16/1278 A61K39/07 A61K2039/6006 G01N33/56911 G01N33/6893 G01N2333/32 G01N2800/06		
FI分类号	C07K14/32 G01N33/53.D G01N33/569.F C07K16/12		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA60 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA73 4H045/FA80		
代理人(译)	谷川荣次郎		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种制备即使抗原是疏水性小分子如脑苷脂也能产生抗体的免疫原的方法，并提供使用该抗原产生抗体的方法。溶液：制备方法免疫原包括：将诸如脑苷的抗原溶解在水溶性有机溶剂如甲醇中的步骤；将获得的抗原溶液与具有抗原性的载体本身混合的步骤，例如死沙门氏菌细胞；和蒸发水溶性有机溶剂的步骤。制备免疫原的方法是首先提供抗谷胱甘肽抗体。

クローン番号	セレウリドコーティングプレート	非コーティングプレート
1	0.107	0.013
2	0.119	0.033
3	1.12	0.05
4	0.897	0.037
5	1.133	0.055
6	1.018	0.044
7	0.297	0.064
8	0.233	0.037
9	0.222	0.022
10	0.286	0.037