

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3931625号  
(P3931625)

(45) 発行日 平成19年6月20日(2007.6.20)

(24) 登録日 平成19年3月23日(2007.3.23)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/553</b> (2006.01)	GO 1 N 33/553	
<b>GO 1 N 33/577</b> (2006.01)	GO 1 N 33/577	B
<b>C 1 2 P 21/08</b> (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
<b>C O 7 K 16/18</b> (2006.01)	C O 7 K 16/18	

請求項の数 8 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2001-330696 (P2001-330696)	(73) 特許権者	306008724
(22) 出願日	平成13年10月29日(2001.10.29)		富士レビオ株式会社
(65) 公開番号	特開2003-130880 (P2003-130880A)		東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号
(43) 公開日	平成15年5月8日(2003.5.8)	(74) 代理人	100088546
審査請求日	平成16年9月30日(2004.9.30)		弁理士 谷川 英次郎
		(72) 発明者	品川 森一
			北海道帯広市南町東2条3丁目57-1
		(72) 発明者	堀内 基広
			北海道帯広市西11条南40丁目5番7号
		(72) 発明者	柳谷 孝幸
			東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号
			富士レビオ株式会社内
		(72) 発明者	松井 利生
			東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号
			富士レビオ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異常型プリオン免疫測定用試薬を用いた異常型プリオンの免疫測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

異常型プリオンを含んでいるかもしれない試料を界面活性剤、コラゲナーゼ及び蛋白質分解酵素で処理する工程と、次いで遠心分離操作を経ることなく、得られた生成物を変性剤で処理する工程と、得られた生成物を、磁性粒子に、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第1抗体又はその抗原結合性フラグメントを不動化して成る異常型プリオン免疫測定用試薬と反応させる工程と、磁性ビーズを洗浄し、磁力により磁性ビーズを集める工程と、前記第1抗体又はその抗原結合性フラグメントに捕捉された、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを反応させる工程と、磁性ビーズを洗浄し、磁力により磁性ビーズを集める工程と、磁性ビーズに結合した第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを測定する工程とを含む、異常型プリオンの測定方法。

【請求項2】

前記変性剤は、グアニジン若しくはその酸付加塩又はグアニジンチオシアン酸若しくはその塩である請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記第1抗体は、モノクローナル抗体44B1(FERM P-18515)又はモノクローナル抗体72-5(FERM P-18516)である請求項1 又は2記載の方法。

【請求項4】

異常型プリオンを含んでいるかもしれない試料を界面活性剤、コラゲナーゼ及び蛋白質

分解酵素で処理する工程と、次いで遠心分離操作を経ることなく、得られた生成物を変性剤で処理する工程と、得られた生成物と、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第1抗体と、表面にプロテインGが結合された磁性粒子とを反応させる工程と、磁性ビーズを洗浄し、磁力により磁性ビーズを集める工程と、前記第1抗体に捕捉された、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを反応させる工程と、磁性ビーズを洗浄し、磁力により磁性ビーズを集める工程と、磁性ビーズに結合した第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを測定する工程とを含む、異常型プリオンの測定方法。

【請求項5】

試料を界面活性剤、コラゲナーゼ及び蛋白質分解酵素で処理する工程は、界面活性剤処理、コラーゲン処理、蛋白質分解酵素処理をこの順序で逐次行うことにより行われる請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項6】

前記蛋白質分解酵素がプロテインアーゼKである請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

蛋白質分解酵素処理後、該蛋白質分解酵素の阻害剤を添加する工程をさらに含む請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記第2抗体又はその抗原結合性フラグメントが標識されており、磁性ビーズに結合した第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを測定する工程は、磁性ビーズに結合した該標識を測定することにより行われる請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、異常型プリオン免疫測定用試薬を用いた異常型プリオンの免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

異常型プリオンは、狂牛病に代表されるプリオン病の原因となるタンパク質である。異常型プリオンは、蛋白質分解酵素に耐性を有しているため、経口摂取しても消化酵素による分解を受けずに動物体内に侵入し得る。一旦動物体内に侵入すると、脳、脊髄、眼球などの特定部位において新たに生産される正常型プリオンを異常型プリオンに変えてしまう働きをし、この結果、これらの特定部位において異常型プリオンが蓄積する。脳に異常型プリオンが蓄積すると、脳がスポンジ状になり、動物は死に至る。近年、ウシの異常型プリオンをヒトが経口摂取することにより、ヒトもプリオン病に罹患することがわかり、大きな問題となっている。ウシからヒトへの感染を完全に防止するためには、ウシが狂牛病に感染しているか否かを屠殺される全てのウシについて検査し、陰性のものだけを食用に供することが求められる。

30

【0003】

従来より、異常型プリオンは、ELISAやウェスタンブロットのような免疫測定により検出されている。異常型プリオンは、正常型プリオンとアミノ酸配列の一次構造が同じなので、正常型プリオンと交差反応しない抗異常型プリオン抗体を作製することは容易ではなく、従来法では、異常型プリオンがプロテインアーゼKに耐性であるが正常型プリオンはプロテインアーゼKに分解される性質を利用して、脳組織等の被検試料をプロテインアーゼKで処理することにより、正常型プリオンを分解、除去した後に免疫測定を行っている。さらに、異常型プリオンは、凝集する性質があり、抗プリオン抗体によって認識されるエピトープが露出していない。このため、プロテインKによる処理後、免疫測定の前にグアニジンチオシアン酸のような変性剤で処理して凝集状態を解除し、エピトープを露出させてから免疫測定を行っている。

40

50

## 【0004】

従来行われているウェスタンブロット法は、電気泳動を行う必要があり、煩雑で時間がかかるので、多数のウシを短時間に検査しようとするためには適していない。また、ELISAプレートを用いるELISAによる場合は、必要な感度を達成するために、プロテインアーゼK処理後の組織をグアニジンチオシアン酸で変性処理する前に、SDSによる一次変性処理及びメタノール処理（蛋白質濃縮操作）を行う必要があり、メタノール処理の前及びグアニジンチオシアン酸処理の前にそれぞれ遠心分離を行う必要がある。遠心分離操作は時間がかかるので、多数のウシを短時間に検査しようとするためには適していない。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、時間のかかる電気泳動操作や遠心分離操作を行うことなく、高感度に異常型プリオンを検出することができる免疫測定法を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、磁性粒子を固相としたサンドイッチ法により、電気泳動操作や遠心分離操作を行うことなく高感度に異常型プリオンを免疫測定することができることを見出し、本発明を完成した。

## 【0007】

すなわち、本発明は、異常型プリオンを含んでいるかもしれない試料を界面活性剤、コラゲナーゼ及び蛋白質分解酵素で処理する工程と、次いで遠心分離操作を経ることなく、得られた生成物を変性剤で処理する工程と、得られた生成物を、磁性粒子に、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第1抗体又はその抗原結合性フラグメントを不動化して成る異常型プリオン免疫測定用試薬と反応させる工程と、磁性ビーズを洗浄し、磁力により磁性ビーズを集める工程と、前記第1抗体又はその抗原結合性フラグメントに捕捉された、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを反応させる工程と、磁性ビーズを洗浄し、磁力により磁性ビーズを集める工程と、磁性ビーズに結合した第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを測定する工程とを含む、異常型プリオンの測定方法を提供する。さらに、本発明は、異常型プリオンを含んでいるかもしれない試料を界面活性剤、コラゲナーゼ及び蛋白質分解酵素で処理する工程と、次いで遠心分離操作を経ることなく、得られた生成物を変性剤で処理する工程と、得られた生成物と、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第1抗体と、表面にプロテインGが結合された磁性粒子とを反応させる工程と、磁性ビーズを洗浄し、磁力により磁性ビーズを集める工程と、前記第1抗体に捕捉された、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを反応させる工程と、磁性ビーズを洗浄し、磁力により磁性ビーズを集める工程と、磁性ビーズに結合した第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを測定する工程とを含む、異常型プリオンの測定方法を提供する。

## 【0008】

## 【発明の実施の形態】

上記の通り、本発明で用いられる試薬は、磁性粒子に、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第1抗体又はその抗原結合性フラグメントを不動化して成るものである。

## 【0009】

磁性粒子としては、表面に抗体を結合することができ、磁性を有する粒子であれば特に限定されるものではない。免疫測定の固相に磁性粒子を用いること自体は公知であり、従来より免疫測定に用いられている、例えばフェライトで被覆したラテックス又はポリマー粒子等を好適に用いることができる。また、抗体の結合を容易にするために、免疫グロブリンのFc領域と結合する性質を有するプロテインGを表面に結合した免疫測定用磁性粒子が知られており、このような免疫測定用磁性粒子を好適に用いることができる。磁性粒子の粒径は、特に限定されないが通常、1µmないし6µm程度、好ましくは2µm～4µ

10

20

30

40

50

m程度である。これらの条件を満足する免疫測定用磁性粒子は市販されており、市販品を好ましく利用することができる。

#### 【0010】

磁性粒子の表面には、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第1抗体又はその抗原結合性フラグメントが不動化される。ここで、「変性剤」とは、凝集状態にある異常型プリオンの内部にあるエピトープ部分を露出させることができる薬剤であり、好ましい例としては、グアニジン若しくはその酸付加塩又はグアニジンチオシアン酸若しくはその塩を挙げることができる。第1抗体は、異常型プリオン又は正常型プリオンを免疫原として動物に投与する常法により容易に作製することができる。なお、異常型プリオンと正常型プリオンは、一次アミノ酸配列が完全に同一又はほぼ完全に同一であるので、抗正常型プリオン抗体は、通常、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する。免疫原として用いるプリオンは、検査に供する動物種由来のプリオンであることが好ましいが、プリオンのアミノ酸配列は種を越えてよく保存されているので、検査に供する動物のプリオンと交差反応する抗体の産生を誘起できるものであれば、他種動物のプリオンを免疫原として用いてもよい。例えば、マウス由来プリオンを免疫原として用いて誘起された抗マウスプリオン抗体は、マウスのみならずウシ、ヒツジ、ハムスター等のプリオンと交差反応するし、ウシ由来プリオンを免疫原として用いて誘起された抗ウシプリオン抗体は、ウシのみならず、ヒトを含む霊長類、ヒツジ、ウサギ、ミンク、マウス、ハムスター等と交差反応する。また、免疫原は、大腸菌等を宿主として遺伝子工学的的手法により生産した組換え型プリオンであってもよい。第1抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、精度及び再現性を高める観点からモノクローナル抗体が好ましい。また、第1抗体に代えて、第1抗体のFabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのような抗原結合性フラグメントを用いることもできる。ただし、磁性粒子表面に結合されたプロテインGに第1抗体を結合させる場合には、抗体のFc領域が必要となるので、Fc領域を欠く抗原結合性フラグメントを用いることはできない。

10

20

#### 【0011】

磁性粒子の表面に担持する抗体の量は、正確な免疫測定が可能な量であれば特に限定されないが、通常、1～5重量%の磁性粒子の懸濁液に、抗体の重量換算で10～100μg/ml程度の濃度になるように抗体又はその抗原結合性フラグメントを添加し、放置することにより磁性粒子に担持される程度の量が好ましい。また、磁性粒子表面上への抗体の結合は、磁性粒子懸濁液に抗体又はその抗原結合性フラグメント（通常、溶液の形態にある）を添加し、室温で30分間ないし2時間程度放置することにより達成することができる。なお、磁性粒子の表面にプロテインGが結合されている場合には、予めプロテインGに第1抗体を結合したものを調製し、これを試料と反応させてもよいし、免疫測定時に、被検試料と共に第1抗体を添加することにより、第1抗体をその場で磁性粒子に結合してもよい。免疫測定時に第1抗体をその場で結合させる場合、第1抗体が磁性粒子上に先ず不動化されてそれに変性剤処理した異常型プリオンが結合する場合と、第1抗体と変性剤処理した異常型プリオンが先ず結合し、生成された抗原抗体複合物の第1抗体のFc領域がプロテインGに結合する場合とが同時に生じると考えられるが、これらの場合も本発明の方法に包含されるものと解釈する。

30

40

#### 【0012】

次に、上記異常型プリオン免疫測定用試薬を用いた、異常型プリオンの免疫測定方法について説明する。

#### 【0013】

本発明の免疫測定方法に供される試料は、異常型プリオンを含むかもしれないいずれのものであってもよく、好ましい例として、脳、脊髄、眼球、回腸遠位部等の組織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く、これらと接触した可能性のある他の部位の組織や、器具、環境等であってもよい。また、試料は、いずれの動物種由来のものであってもよく、通常、ウシ、ヒツジ、ヒト、ネコ、マウス等、プリオン病に罹ることがわかっている動物種に由来するが、これら以外の動物種であってもよい。

50

## 【0014】

本発明の第1工程では、試料を界面活性剤、コラゲナーゼ及び蛋白質分解酵素で処理する。この工程は、単一工程で行うことも、2工程以上に任意に分けて行うことも可能であるが、界面活性剤処理、コラゲナーゼ処理、蛋白質分解酵素処理を別々にこの順序で行うことが好ましい。

## 【0015】

界面活性剤処理は、試料組織をバラバラにするために行うものであり、この目的に用いることができるいずれの界面活性剤も採用することができる。界面活性剤は、両イオン性、陽イオン性、陰イオン性、非イオン性のいずれの界面活性剤でも良いが、両イオン性界面活性剤が好ましい。また、試料組織は、界面活性剤と共にすりつぶして組織乳剤の形態にすることが好ましい。使用する界面活性剤の量は、特に限定されないが、通常、2～8重量%程度の界面活性剤を用いて5～20重量%程度の濃度の組織乳剤を調製することが好ましい。界面活性剤処理の条件は特に限定されないが、通常、20～100、好ましくは55～75で、15～240分間、好ましくは30～90分間程度が適当である。

10

## 【0016】

コラゲナーゼ処理は、試料組織中に含まれるコラーゲンを分解してプリオンが蛋白質分解酵素と接触しやすくするために行うものである。コラゲナーゼの使用量は特に限定されないが、試料組織100mg当たり、通常、0.2～2mg程度が適当である。また、コラゲナーゼ処理の条件は特に限定されないが、通常、コラゲナーゼの至適温度又はその近傍(±3程度)で、1時間～4時間程度が好ましい。なお、コラゲナーゼ処理と同時に、又はコラゲナーゼ処理に続いて、DNase処理を行って試料中のDNAを分解することが好ましい。DNaseの使用量は、特に限定されないが、試料組織100mg当たり、通常、20μg～80μg程度が適当である。また、DNase処理を独立して行う場合の処理条件は、上記コラゲナーゼ処理の条件と同様でよい。

20

## 【0017】

蛋白質分解酵素処理は、正常型プリオンを分解するために行うものであり、正常型プリオンを分解することができるいずれの蛋白質分解酵素も用いることが可能である。好ましい蛋白質分解酵素としてプロテインアーゼKを挙げることができる。蛋白質分解酵素の使用量は、特に限定されないが、試料組織100mg当たり、通常、20μg～80μg程度が適当である。また、蛋白質分解酵素処理の条件は特に限定されないが、通常、蛋白質分解酵素の至適温度又はその近傍(±3程度)で、15分間～1時間程度が好ましい。蛋白質分解酵素処理を行うことにより、正常型プリオンは分解されるが、異常型プリオンは蛋白質分解酵素に対して耐性を有しているので分解されず、後の免疫測定工程において測定可能である。蛋白質分解酵素処理工程後、後の工程で変性剤処理した異常型プリオンが分解されることを防止するために、用いた蛋白質分解酵素の阻害剤を添加して蛋白質分解酵素を失活させておくことが好ましい。

30

## 【0018】

次に、得られた生成物を変性剤で処理し、凝集を解いてエピトープを露出させる。変性剤としては、上記したグアニジン若しくはその酸付加塩又はグアニジンチオシアン酸若しくはその塩が好ましいが、これらに限定されるものではない。変性剤処理における変性剤の濃度は、特に限定されないが、最終濃度で1～6M、さらに好ましくは4～6M程度である。また、処理条件は、特に限定されないが、通常、20～80、好ましくは55～75で、15～90分間、好ましくは15～30分間程度が適当である。なお、次の免疫測定に入る前に、変性剤の濃度が0.2～0.8M程度になるように希釈し、免疫測定に使用される抗体又はその抗原結合性フラグメントが変性しないようにすることが好ましい。

40

## 【0019】

本発明の方法では、上記蛋白質分解酵素処理工程と変性剤処理工程との間に、遠心分離操作を含む工程が入らない。従って、試料調製にかかる時間を従来法よりも大幅に短縮することができ、多数の検体について短時間に検査を行わなければならない場合等にとりわけ有利である。

50

## 【0020】

次いで、上記のようにして調製した試料を、免疫測定に供する。免疫測定の第1工程では、試料と、第1抗体又はその抗原結合性フラグメントを不動化した磁性粒子とを接触させる。これは、上記のようにして調製した試料溶液に、第1抗体又はその抗原結合性フラグメントを不動化した磁性粒子を添加することによって行うことができるし、緩衝液のような反応媒体に試料及び第1抗体又はその抗原結合性フラグメントを不動化した磁性粒子を添加して混合することによっても行うことができる。反応液中の磁性粒子の最終濃度は、特に限定されないが、通常、1～5重量%程度が適当であり、また、試料の最終濃度は、出発物質として用いた組織の重量に換算して0.1～10重量%程度が適当である。磁性粒子の表面にプロテインGが結合されており、磁性粒子と、第1抗体と、試料とをこの段階で反応させる場合には、反応液中の第1抗体の最終濃度は、特に限定されないが、10～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度が適当である。免疫反応の温度は、特に限定されず、4～37程度で行うことができ、室温で行うことが便利である。反応時間は、温度にもよるが、室温で行う場合、特に限定されないが、30分間ないし2時間程度でよい。この工程により、試料中存在する変性剤処理異常型プリオン(抗原)が第1抗体又はその抗原結合性フラグメントに結合され、ひいては磁性ビーズに結合される。

10

## 【0021】

次いで、反応後の磁性ビーズを洗浄する。洗浄は、リン酸緩衝液のような緩衝液中にビーズを懸濁し、磁力によってビーズを集めることによって容易に行うことができる。洗浄液は、0.5～2重量%程度の界面活性剤を含んでいることが好ましい。

20

## 【0022】

続く第3工程で、ビーズと第2抗体又はその抗原結合性フラグメントとを反応させる。第2抗体も、第1抗体と同様、被検試料である、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応するものであり、第1抗体について上記した説明をそのまま第2抗体の説明として適用できる。もっとも、第1抗体及び第2抗体の両者共にモノクローナル抗体を用いる場合には、抗原をサンドイッチする必要があるので、第1抗体及び第2抗体の両者が同時に抗原に結合できる抗体の組合せを選択する必要がある。この選択は、既知濃度の標準試料を用いて実際に免疫測定を行い、正確な免疫測定が可能か否かを調べるというルーチンな実験により容易に行うことができる。また、第2抗体又はその抗原結合性フラグメントは、後の工程で測定する必要があるため、第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを標識しておくことが好ましい。抗体又はその抗原結合性フラグメントの標識は、免疫測定の分野において周知であり、酵素標識、蛍光標識、ピオチン標識、放射標識等の周知の標識を常法により抗体に結合することができる。また、感度を上げるために、第2抗体はポリクローナル抗体とすることも好ましい。

30

## 【0023】

反応液中の第2抗体又はその抗原結合性フラグメントの最終濃度は、特に限定されないが、抗体の重量として、通常、0.2～1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度が適当である。また、免疫反応の温度は、特に限定されず、4～37程度で行うことができ、室温で行うことが便利である。反応時間は、温度にもよるが、室温で行う場合、特に限定されないが、30分間ないし2時間程度でよい。この工程により、第1抗体又はその抗原結合性フラグメントを介して磁性ビーズに結合されている試料中の変性剤処理異常型プリオン(抗原)に第2抗体又はその抗原結合性フラグメントが結合され、第1及び第2抗体又はその抗原結合性フラグメントにより抗原がサンドイッチされる。

40

## 【0024】

次に反応後のビーズを上記と同様に洗浄し、ビーズを回収する。

## 【0025】

次いで、ビーズに結合された第2抗体又はその抗原結合性フラグメントを測定する。なお、本明細書において、「測定」は、検出と定量の両者を包含する意味で用いており、検出のみを行う場合も定量まで行う場合も本発明の免疫測定方法の範囲に含まれる。第2抗体又はその抗原結合性フラグメントの測定は、第2抗体又はその抗原結合性フラグメントが

50

標識されている場合には、この標識を測定することにより容易に行うことができる。標識の測定方法自体は免疫測定分野において周知であり、用いた標識に応じて常法により容易に行うことができる。第2抗体が標識されていない場合には、第2抗体を誘導した動物の免疫グロブリンに結合する、標識した第3抗体を第2抗体に結合させ、洗浄後、第3抗体の標識を測定することにより第2抗体を測定することができる。

**【0026】**

種々の既知濃度の試料を用いて上記の免疫測定を行うことにより検量線を作成することができ、この検量線に基づいて未知の試料中の異常型プリオンを定量することができる。

**【0027】**

本願発明者らは、種々の抗プリオンモノクローナル抗体を作出し、種々検討した結果、上記本発明の免疫測定方法において、極めて高感度、高精度に異常型プリオンを測定することができる2種類のモノクローナル抗体の作出に成功した。すなわち、モノクローナル抗体(mAb)44B1及び72-5である。これらのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、生命工学工業技術研究所に寄託されており、受託番号は、それぞれFERM P-18515及びFERM P-18516である。これらのモノクローナル抗体を作出した方法は、下記具体例に詳述する。なお、mAb 44B1及びmAb 72-5は、いずれか一方を第1抗体として、他方を第2抗体として用いることにより、極めて高感度、高精度な免疫測定を行うことができる。mAb 44B1を第1抗体として用いることがより好ましく、また、mAb 44B1を第1抗体として用い、第2抗体としてポリクローナル抗体を用いても高感度、高精度な免疫測定を行うことが可能である。

**【0028】****【実施例】**

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。

**【0029】**

実施例1 モノクローナル抗体44B1及び72-5の作出並びに対応エピトープの決定

**(1) モノクローナル抗体の作出**

C57BL/Jマウスから常法により染色体DNAを抽出し、これを鋳型として用いてPCRを行った。PCRに用いたプライマーは、MPrP5(aaggatccgaaaaagcggccaaagcctgga)及びMPrP3(gagaattcagctggatcttctcccgtcgt)であった。これにより、マウスプリオン(PrP)の第23番目~第230番目のアミノ酸配列(23-230a.a.)(230番目のアミノ酸のコードンの次に停止コドン挿入)をコードする遺伝子領域を増幅した(配列番号1)。得られた増幅断片を原核細胞発現ベクターpRSTEB(Invitrogen社)およびpET22b(Novagen社)に組み込み、大腸菌にて組換えPrP(rPrP)を発現させた(rPrP23-231P(停止コドンを含む))。マウスrPrP23-231Pは、常法に基づき、銅イオンアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、および逆相クロマトグラフィーにより精製した。精製rPrP23-231Pを免疫原とした。

**【0030】**

一方、プリオン感染マウス脳から分別遠心法によりマウス異常型プリオン(PrPSc)を精製した。精製は、Bolton, D. C.ら(Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 258, 579-590, 1987)の方法に従い行った。得られた精製マウスPrPScも免疫原として用いた。

**【0031】**

得られた免疫原(濃度1.0 mg/ml)を等量のフロイント完全アジュバントと混和し、PrP遺伝子欠損マウス(Yokoyama et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 276, 11265-11271, 2001)に0.2 mg/mlづつ頸部皮下に接種した。免疫は2週間ごとに計3回行った。最終免疫3日後に脾臓を摘出し、細胞を分散させた後に、ポリエチレングリコール法によりP3U1ミエローマ細胞との細胞融合を行った。なお、動物から抗血清も回収し、ポリクローナル抗体B-103を得た。

**【0032】**

10

20

30

40

50

抗PrP体産生細胞のスクリーニングは、pRSETBおよびpET22bにて発現させたマウスrPrPを抗原としたELISA法により行った。マウスrPrPを吸着させたELISAプレートにハイブリドーマの培養上清を加えて反応させた後に洗浄し、続いてペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリンロバ血清 (Amersham Farmacia社) を反応させた。ウェルを洗浄後に、ペルオキシダーゼ基質を加えて、波長405 nmにおける吸光度を測定した。ELISAの結果が陽性であったハイブリドーマの培養上清からモノクローナル抗体を精製し、種々のモノクローナル抗体を得た。

#### 【0033】

これらの種々のモノクローナル抗体の種々の組合せを用いて、後述する免疫測定を行い、特に高感度、高精度で免疫測定が可能であったモノクローナル抗体として、mAb 44B1及びmAb 72-5を選抜した。mAb 44B1はrPr23-231Pを免疫原として得られたものであり、mAb 72-5は精製PrPScを免疫原として得られたものである。これらのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、上記の通り生命工学工業技術研究所に寄託した。

#### 【0034】

##### (2) 対応エピトープの決定

(1)のrPr23-231Pの作製方法と同様な方法により、マウスPrPの89-231a.a., 23-214a.a., 155-231a.a.及び23-167a.a.を作製した。これらの欠損変異体を抗原としたELISA法および免疫プロット法によりエピトープを含むおおまかな領域を決定した。免疫プロットで陽性となる抗体は連続エピトープを、陰性となる抗体は非連続エピトープを認識すると判定した。さらに、PrPの連続した13アミノ酸配列のペプチド断片を結合させたセルロース膜 (ペプスポット膜) を使用して詳細なエピトープを決定した。

#### 【0035】

モノクローナル抗体のエピトープは表1に示した。mAb 72-5はマウスPrPアミノ酸89-231から構成される非連続エピトープを認識する。その一部はマウスPrPアミノ酸143-151を含む。mAb 44B1はマウスPrPアミノ酸155-231から構成される非連続エピトープを認識した。

#### 【0036】

##### 【表1】

表1 モノクローナル抗体のエピトープ

モノクローナル抗体	免疫プロット	連続/非連続	エピトープ
mAb 72-5	—	非連続	89-231, 143-151を含む
mAb 44B1	—	非連続	155-231

#### 【0037】

##### 実施例2 免疫測定

##### (1) 試料の調製

試料組織としてプリオン感染マウス脳及び、陰性対照として非感染マウス脳を用いた。マウス脳を、4%両イオン性界面活性剤 (「Zwittergent 3-12」 (3-ドデシル-ジメチルアンモニオ-プロパン-1-スルフォネート、Calbiochem-Novabiochem社製)、100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris (pH 7.5)を含む緩衝液中ですりつぶすし混和することにより、10重量%の脳組織を含む組織乳剤を調製した。組織100 mgに対してコラゲナーゼ0.5 mg、DNase I 40 µgを加えて37℃、2時間処理した。組織100 mgに対してプロテインアーゼK 40 µgを加えて37℃、30分間処理した。プロテインアーゼK阻害剤であるペファブロック (Roche社製) を最終濃度1 mMになるよう加えた。グアニジンチオシアン酸を最終濃度5 Mになるよう加え、PrPSc凝集体を変性させた (65℃, 15分間)。グアニジンチオシアン酸の濃度が0.4 M以下になるように緩衝液で乳剤を希釈した。

#### 【0038】

## (2) 免疫測定

(1)で得られた被験試料にプロテインG結合磁性ビーズ (DynaI社) と第1抗体であるmAb 44B1を加え、室温で1時間攪拌した。プロテインG結合磁性ビーズの反応液中の最終濃度は2重量%、mAb 44B1の反応液中の最終濃度は100 $\mu$ g/mlであった。磁性ビーズを1% Triton X-100 (商品名) を含むリン酸緩衝液で3回洗浄し、磁力をかけてビーズを集めた。第2抗体としてビオチン化mAb 72-5又はビオチン化ポリクローナル抗体B-103を使用し、室温で一時間反応させた。第2抗体の反応液中の最終濃度は、1 $\mu$ g/mlであった。磁性ビーズを1% TritonX-100 (商品名) を含むリン酸緩衝液で3回洗浄し、磁力をかけてビーズを集めた。次いで、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Pierce社) (最終濃度: 2mg/ml) と室温で30分間反応させた。磁性ビーズを1% TritonX-100 (商品名) を含むリン酸緩衝液で3回洗浄し、磁力をかけてビーズを集めた。ペルオキシダーゼ基質 (100 $\mu$ g/mlのABTS及び0.04%過酸化水素水) を加え5分間反応させた。波長405nmにおける吸光度を測定した。

10

## 【0039】

免疫磁性ビーズを用いたPrPScの検出結果は表2に示した。プリオン感染動物では陽性であったが、プリオン非感染動物では陰性であった。従って、免疫磁性ビーズの使用により、プリオン感染動物にのみ存在するPrPScを特異的に検出できることが明らかとなった。

## 【0040】

## 【表2】

表2 免疫磁性ビーズによるPrPScの検出

20

第1抗体	第2抗体	プリオン感染 マウス脳	プリオン非感染 マウス脳
mAb 44B1	mAb 72-5	+	-
mAb 44B1	B-103	+	-

## 【0041】

30

## 【発明の効果】

本発明により、時間のかかる電気泳動操作や遠心分離操作を行うことなく、高感度に異常型プリオンを検出することができる免疫測定法が初めて提供された。本発明の方法では、蛋白質分解酵素処理工程と変性剤処理工程との間に、遠心分離操作を含む工程が入らず、また、電気泳動も不要である。従って、試料調製にかかる時間を従来法よりも大幅に短縮することができ、多数の検体について短時間に検査を行わなければならない場合等にとりわけ有利である。

## 【0042】

## 【配列表】

<110> FUJIREBIO INC.

40

<120> Reagent and kit for immunoassay of abnormal type prion, and immunoassay of abnormal prion using the same

<130> 01725

<160> 3

## 【0043】



GAA AAC ATG TAC CGC TAC CCT AAC CAA GTG TAC TAC AGG CCA GTG GAT	432	
Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp		
130 135 140		
CAG TAC AGC AAC CAG AAC AAC TTC GTG CAC GAC TGC GTC AAT ATC ACC	480	
Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr		
145 150 155 160		
ATC AAG CAG CAC ACG GTC ACC ACC ACC ACC AAG GGG GAG AAC TTC ACC	528	10
Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr		
165 170 175		
GAG ACC GAT GTG AAG ATG ATG GAG CGC GTG GTG GAG CAG ATG TGC GTC	576	
Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Val		
180 185 190		
ACC CAG TAC CAG AAG GAG TCC CAG GCC TAT TAC GAC GGG AGA AGA TCC	624	
Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg Ser		20
195 200 205		
[ 0 0 4 4 ]		
<210> 2		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		30
<223> Nucleic acid used as primer used for PCR for amplifying 23-230a.a		
. of murine prion		
<400> 2		
aaggatccga aaaagcggcc aaagcctigga	30	

[ 0 0 4 5 ]

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid used as primer used for PCR for amplifying 23-230a.a  
. of murine prion

10

<400> 3

gagaattcag ctggatcttc tcccgtcgt

29

---

フロントページの続き

(72)発明者 梅谷 淳

東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平11-032795(JP,A)

特開2001-099838(JP,A)

国際公開第00/022438(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

专利名称(译)	使用异常朊病毒免疫测定试剂免疫测定异常朊病毒的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP3931625B2</a>	公开(公告)日	2007-06-20
申请号	JP2001330696	申请日	2001-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
当前申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	品川森一 堀内基広 柳谷孝幸 松井利生 梅谷淳		
发明人	品川 森一 堀内 基広 柳谷 孝幸 松井 利生 梅谷 淳		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/553 G01N33/577 C12P21/08 C07K16/18 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/553 G01N33/577.B C12P21/08 C07K16/18 G01N33/569.Z		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/FA74		
代理人(译)	谷川荣次郎		
其他公开文献	JP2003130880A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够在不进行电泳操作和离心操作的情况下以高灵敏度检测异常朊病毒的免疫测量方法，这需要花费很多时间。解决方案：该试剂用于测量异常朊病毒的免疫力，其通过使变性剂和第一抗体处理的异常朊病毒通过固定在磁性颗粒上的抗原 - 抗体反应来制备。这种测量异常朊病毒的方法包括用表面活性剂，胶原酶和蛋白酶处理可能包括异常朊病毒的样品的方法，通过变性剂处理所得产物而不进行离心操作的方法，和用试剂测定所得产物的免疫力的方法。

モノクローナル抗体	免疫アッセイ	連続/非連続	エピトープ
mAb 72-5	-	非連続	89-231, 143-151 を含む
mAb 44B1	-	非連続	155-231