

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 262633

(P2003 - 262633A)

(43)公開日 平成15年9月19日 (2003.9.19)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 4
B 0 1 L 11/00		B 0 1 L 11/00	4 G 0 5 7
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 15数)

(21)出願番号 特願2002 - 62747(P2002 - 62747)

(22)出願日 平成14年3月7日(2002.3.7)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年9月7日 第132回 日本獣医学会発行の「第132回日本獣医学会学術集会 講演要旨集」に発表

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 鎌田 洋一

奈良県五条市田園2 - 42 - 7

(72)発明者 南川 総子

兵庫県神戸市東灘区本山中町4 - 12 - 4

(72)発明者 多田 哲子

京都府長岡京市久貝2 - 2 - 22

(72)発明者 坂 雅宏

京都府宇治市伊勢田町南遊田1 - 9

(74)代理人 100080034

弁理士 原 謙三

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 内分泌攪乱物質汚染の評価方法、およびこれに用いられる抗体、並びに該抗体を用いた検出用試薬および検出キット

(57)【要約】

【課題】 内分泌攪乱物質による汚染の調査を行なう場合に、モニタリング対象として適した動物を用いて、内分泌攪乱物質による汚染の状況の評価を行なう方法を提供する。

【解決手段】 本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、淡水ガメ由来のピテロジェニンの特異的に認識するピテロジェニン抗体を、該ピテロジェニンの検出対象となる淡水ガメの体液と反応させる免疫反応工程と、ピテロジェニン抗体による免疫反応の有無を判定する免疫反応判定工程とを含むことを特徴としている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】淡水ガメ由来のビテロジェニンの特異的に認識するビテロジェニン抗体を、該ビテロジェニンの検出対象となる淡水ガメの体液と反応させる免疫反応工程と、ビテロジェニン抗体による免疫反応の有無を判定する免疫反応判定工程とを含むことを特徴とする内分泌攪乱物質汚染の評価方法。

【請求項2】さらに、上記ビテロジェニン抗体による免疫反応に基づいて、淡水ガメ体内におけるビテロジェニンの産生量を定量化するビテロジェニン定量化工程を有することを特徴とする請求項1に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法。

【請求項3】上記ビテロジェニン定量化工程は、測定した吸光度に基づいて、ビテロジェニン量を推定するための検量線を用いることにより定量化することを特徴とする請求項2に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法。

【請求項4】上記ビテロジェニン抗体は、クサガメ由来のビテロジェニンを抗原として認識することを特徴とする請求項1ないし3の何れか1項に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法。

【請求項5】上記ビテロジェニン抗体がポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項1ないし4の何れか1項に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法。

【請求項6】上記ビテロジェニン抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1ないし4の何れか1項に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法。

【請求項7】上記ビテロジェニン抗体の免疫グロブリンクラスが、I g Gのモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項6に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法。

【請求項8】上記免疫反応判定工程では、免疫反応を判定する手法として、エライザ法、免疫沈降法、ウェスタンブロット法、アフィニティークロマトグラフィー法の何れかが用いられることを特徴とする請求項1ないし7の何れか1項に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法。

【請求項9】請求項1ないし8の何れか1項に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられるモノクローナル抗体であって、

淡水ガメ由来のビテロジェニンで免疫したマウス脾臓リンパ球とマウスのミエローマ細胞とを融合させてなるハイブリドーマにより産生され、上記淡水ガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項10】請求項1ないし8の何れか1項に記載の内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられるポリクローナル抗体であって、

淡水ガメ由来のビテロジェニンで免疫したウサギの免疫血清から精製され、上記淡水ガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体。

【請求項11】淡水ガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項12】上記ビテロジェニンが、クサガメ由来のビテロジェニンであることを特徴とする請求項11に記載のモノクローナル抗体。

【請求項13】淡水ガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体。

【請求項14】上記ビテロジェニンが、クサガメ由来のビテロジェニンであることを特徴とする請求項13に記載のポリクローナル抗体。

【請求項15】請求項9、11または12に記載のモノクローナル抗体、および請求項10、13または14に記載のポリクローナル抗体の少なくとも一方の抗体を含むことを特徴とするビテロジェニンの検出用試薬。

【請求項16】請求項15に記載の検出用試薬を含むことを特徴とする内分泌攪乱物質汚染の評価用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、淡水ガメのビテロジェニンに対する抗体を用いた、内分泌攪乱物質汚染の評価方法、およびこれに用いられる抗体、並びに該抗体を用いた検出用試薬および検出キットに関するものである。

【0002】

【従来の技術】ビテロジェニン(vitellogenin)は、卵黄タンパク前駆物質であり、エストロゲン(estrogen)刺激により産生される。雌では性成熟後、女性ホルモンの一種である上記エストロゲンが肝臓細胞に作用することにより、ビテロジェニン遺伝子が発現し、ビテロジェニンタンパク質が合成される。産生されたビテロジェニンは、血流を経て卵巣に到達し、卵黄タンパク質へと成熟する。

【0003】雄においても、ビテロジェニン遺伝子は保持されているが、通常ビテロジェニンが合成されることはない。しかしながら、外界からエストロゲン活性を有する物質の暴露を受けたとき、雄においてもビテロジェニンが合成され、血液中出现することが知られている(Environ Health Perspect 1995 May;103 Suppl 4:19-25 Palmer BDら)。内分泌攪乱物質(endocrine disruptors)いわゆる環境ホルモンが、エストロゲン活性を持つことはよく知られている。したがって、雄における血中ビテロジェニンの出現をモニタリングすることにより、モニタリング対象となる生物が生息する地域における、内分泌攪乱物質による環境汚染の状況を評価することができる。

【0004】上記の環境汚染の状況を評価する方法として、例えば、特開2000-125867号公報においては、コイをモニタリング対象とした淡水環境の汚染評価方法が提案されている。上記評価方法は、コイのビテロジェニンに対する抗体と、雄のコイの体液中のビテロジェニンとを反応させ、この反応により測定されたビテロジェニンの濃度の上昇を指標として、淡水環境の内分泌

泌攪乱物質による汚染状況を評価する方法である。これによれば、コイが生息する河川、湖沼などの淡水環境の内分泌攪乱物質による汚染状況を評価することができる。また、コイのピテロジェニン検出キットは、既に市販されている。

【0005】他に、淡水環境の内分泌攪乱物質による汚染状況を評価する場合のモニタリング対象としては、コイ以外では、メダカについても報告がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、淡水環境の内分泌攪乱物質による汚染状況を評価する場合、上記従来のコイ、メダカなどの魚類は、モニタリング対象には適さない。

【0007】魚類は遊泳するため、生育地点または生活水域を特定することが不確実となるという問題がある。魚類は、内分泌攪乱物質による汚染状況の評価対象とする水域から他の水域に遊泳し移動してしまう可能性が大きく、評価対象の水域における環境ホルモンの暴露を受ける確率が低いことが予想される。また、魚類は個体が生物として脆弱であるため、捕獲や採血、各種処置のための保持により死亡することも多く、処置後に放流して追跡調査を行なうことは困難である。さらに、環境ホルモンによって汚染されている水域では、同時に他の毒物により汚染されている可能性もあり、魚類は環境ホルモンの影響を受ける前に、他の種類の毒物のために死亡することもある。

【0008】また、魚類は体表を通じて、または水分や餌を摂取するときに、毒物の暴露を受けるため、このときの環境ホルモンの存在状態が暴露に大きく影響する。しかしながら、環境ホルモンは水に難溶性であるため、魚類の体表を通じて体内へ浸透してゆくことはない。環境ホルモンは、脂溶性という性質から、水中の微粒子固形物に結合している。環境ホルモンが結合した微粒子固形物の多くは、河川、湖沼の底の沈殿土壌中に集積されている。魚類は、河川、湖沼の底の沈殿土壌中に比べて、環境ホルモンの存在する割合が低い水中を徘徊する。このため、魚類が水底の泥を積極的に取り込まない限り、環境ホルモンの暴露を受ける確率は低いものとなる。

【0009】すなわち、魚類をモニタリング対象として淡水環境の汚染状況を評価したときに、環境ホルモンの存在が確認された場合は、評価対象としている水域の水底の沈殿土壌中では、既に環境ホルモンによる汚染がある程度進行していると推測される。したがって、魚類をモニタリング対象とした場合、環境ホルモンによる汚染が進行してゆく過程の早期において、環境ホルモンの存在を判別することは困難である。

【0010】さらに、魚類は食物連鎖上高次に位置しておらず、上記のように追跡調査も困難であるため、環境ホルモンの生物濃縮を調査する場合の対象としては適さ

ない。

【0011】本発明は、上記従来の問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、強度の汚染が進んだ水域の評価、および環境ホルモンの生物濃縮の調査を可能とし、また、環境ホルモンによる汚染を測定する期間の長期化、並びに環境ホルモンによる汚染に関する測定データの精度の向上を図り得る淡水環境の内分泌攪乱物質汚染の評価方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者は、強度の汚染が進んだ水域の評価、および環境ホルモンの生物濃縮の調査を可能とし、また、環境ホルモンによる汚染を測定する期間の長期化、並びに環境ホルモンによる汚染に関する測定データの精度の向上を図り得る内分泌攪乱物質汚染の評価方法を提供することから、淡水ガメのピテロジェニンに対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作製した。その結果、淡水環境の内分泌攪乱物質による汚染状況を評価する場合において、淡水ガメをモニタリング対象とすることが可能となり、本発明を完成させるに至った。

【0013】第一に、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、淡水ガメ由来のピテロジェニンを特異的に認識するピテロジェニン抗体を、該ピテロジェニンの検出対象となる淡水ガメの体液と反応させる免疫反応工程と、ピテロジェニン抗体による免疫反応の有無を判定する免疫反応判定工程とを含むことを特徴としている。

【0014】また、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、上記の内分泌攪乱物質汚染の評価方法において、さらに、上記ピテロジェニン抗体による免疫反応に基づいて、淡水ガメ体内におけるピテロジェニンの産生量を定量化するピテロジェニン定量化工程を有することを特徴としている。

【0015】さらに、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、上記の内分泌攪乱物質汚染の評価方法において、上記ピテロジェニン定量化工程が、測定した吸光度に基づいて、ピテロジェニン量を推定するための検量線を用いることにより定量化することを特徴としている。

【0016】上記の発明によれば、淡水環境の内分泌攪乱物質いわゆる環境ホルモンによる汚染状況を評価する場合において、強度の汚染が進んだ水域でも生息できる淡水ガメをモニタリング対象とするため、魚類による調査が困難であった水域の汚染状況のデータを得ることが可能となる。

【0017】上記強度の汚染が進んだ水域とは、例えば、環境ホルモンおよび他の種類の毒物により汚染されていて、魚類が生存困難な水域をいう。淡水ガメは、生活廃水中や環境ホルモンが蓄積されている河川、湖沼の土壌沈殿槽においても、生息かつ繁殖する能力がある。

【0018】また、淡水ガメは、水底の泥中を徘徊する

性質があり、魚類が影響を受けにくい河川、湖沼の水底の土壌沈殿槽中に存在する環境ホルモンの影響を受けやすい。このため、環境ホルモンによる淡水環境の汚染状況を評価する場合に、モニタリング対象を淡水ガメとすることにより、環境ホルモンによる汚染が進行してゆく過程の早期において、環境ホルモンの存在を判別することが可能になる。

【0019】さらに、淡水ガメは、特定の水域に固着する性質があり、10年以上の寿命をもち、年齢も同定でき、また、採血や実験処置にも強く、処置後放流することが可能である。これによって、淡水ガメを汚染評価のモニタリング対象とすると、評価対象の水域において、長期間に渡り個体ごとの定期的な調査が行なえるため、汚染状況を長期間測定することが容易になり、より精度の高い測定データが得られる。

【0020】また、淡水ガメは雑食性であり、魚類と比較して食物連鎖上高次に位置しており、上述のように長期間の定期的調査を行なえることから、環境ホルモンの生物濃縮の調査も可能となる。

【0021】したがって、淡水環境の内分泌攪乱物質いわゆる環境ホルモンによる汚染状況を調査する場合において、強度の汚染が進んだ水域の評価、および環境ホルモンの生物濃縮の調査を可能とし、また、環境ホルモンによる汚染を測定する期間の長期化、並びに環境ホルモンによる汚染に関する測定データの精度の向上を図り得る内分泌攪乱物質汚染の評価方法を提供することができる。

【0022】本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、さらに、下記a)～d)の何れかの上記ビテロジェニン抗体の特徴によって特定されるものであってもよい。

- a) クサガメ由来のビテロジェニンを抗原として認識する。
- b) ポリクローナル抗体である。
- c) モノクローナル抗体である。
- d) 免疫グロブリンクラスが、I g Gのモノクローナル抗体である。

【0023】上記の発明のa)によれば、淡水環境の内分泌攪乱物質の汚染状況を評価する場合に、モニタリング対象をクサガメとすることができる。

【0024】また、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、上記の内分泌攪乱物質汚染の評価方法において、上記免疫反応判定工程では、免疫反応を判定する手法として、エライザ法、免疫沈降法、ウェスタンブロット法、アフィニティークロマトグラフィー法の何れかが用いられることを特徴としている。

【0025】上記の発明によれば、上記の何れかの免疫反応を判定する手法により、ビテロジェニン抗体による免疫反応の有無を判定することができる。

【0026】第二に、本発明に係るモノクローナル抗体

は、上記内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられるモノクローナル抗体であって、淡水ガメ由来のビテロジェニンで免疫したマウス脾臓リンパ球とマウスのミエローム細胞とを融合させてなるハイブリドーマにより産生され、上記淡水ガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合することを特徴としている。

【0027】また、本発明に係るポリクローナル抗体は、上記内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられるポリクローナル抗体であって、淡水ガメ由来のビテロジェニンで免疫したウサギの免疫血清から精製され、上記淡水ガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合することを特徴としている。

【0028】さらに、本発明に係るモノクローナル抗体としては、例えば、淡水ガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体や、上記ビテロジェニンが、クサガメ由来のビテロジェニンであるモノクローナル抗体が挙げられる。

【0029】また、本発明に係るポリクローナル抗体としては、例えば、淡水ガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体や、上記ビテロジェニンが、クサガメ由来のビテロジェニンであるポリクローナル抗体が挙げられる。

【0030】第三に、本発明に係るビテロジェニンの検出用試薬は、上記のモノクローナル抗体および上記のポリクローナル抗体の少なくとも一方の抗体を含むことを特徴としている。

【0031】また、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価用キットは、上記のビテロジェニンの検出用試薬を含むことを特徴としている。

【0032】

【発明の実施の形態】本発明の実施の一形態について図1～図5に基づいて説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0033】本発明者は、内分泌攪乱物質による汚染の調査を行なう場合に、モニタリング対象として適した動物を用いて、内分泌攪乱物質による汚染の状況の評価を行なう方法を確立する目的で、淡水ガメのビテロジェニン(Vitellogenin: VTG)に対する抗体を作製した。

【0034】本実施の形態の内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、淡水ガメ由来のビテロジェニンを特異的に認識するビテロジェニン抗体を、該ビテロジェニンの検出対象となる淡水ガメの体液と反応させる免疫反応工程と、ビテロジェニン抗体による免疫反応の有無を判定する免疫反応判定工程とを有する。

【0035】ビテロジェニンは、卵黄タンパク前駆物質であり、図1に示すように、分子量約214,000(214kDa)のポリペプチド鎖2本からなるホスホリポグリコプロテインである。図1には、淡水ガメの一種であるクサガメ由来のビテロジェニン(VTG)の分子量を示した。図1のMWMは、分子量マーカを示す。

【0036】淡水ガメとしては、例えば、ニホンイシガメ、ミシシippアカミガメ、クサガメが挙げられる。クサガメは、他の種の淡水ガメと比較して個体数が多く、そのため捕獲量も多い。また、汚染の進んだ環境から、清浄な環境でも生息でき、汚染が進んでも他の流域に拡散逃避することもなく、毒物への耐性も強いので、汚染の調査を行なう場合のモニタリング対象として適している。

【0037】本実施の形態においては、例えば、クサガメを用いるが、その他の淡水ガメを用いても実施可能である。以下、各工程について詳細に説明する。

【0038】まず、免疫反応工程においては、従来公知のエライザ法(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay、酵素結合免疫吸着定量法)を好適に用いて、淡水ガメの体液に、ピテロジェニンが含まれているか否かを確認する。具体的には、上記ピテロジェニン抗体を市販のエライザプレートにコーティングし、洗浄し、ブロッキングした後に、淡水ガメから血液を採取して、遠心分離にかけて調製した血清を適宜希釈し、上記エライザプレートの各ウェルに加え、反応させる。

【0039】次に、免疫反応判定工程においては、上記ピテロジェニン抗体に結合し、発色基質により発色するように標識した二次抗体、例えば、HRP(horseradish peroxidase: ホースラディッシュペルオキシダーゼ)標識抗体を用いて上記免疫反応工程の判定を行なう。具体的には、上記免疫反応工程の反応後に上記エライザプレートを洗浄し、HRP標識抗体を上記エライザプレートに加え、反応させる。該反応後、上記エライザプレートを洗浄し、上記エライザプレートに発色基質として、この場合、例えば、過酸化水素およびo-フェニレンジアミン(o-phenylenediamine)を加え、反応させる。該反応における発色の有無により、淡水ガメの体液に、ピテロジェニンが含まれているか否かを判定することができる。換言すれば、上記免疫反応判定工程は、エライザ法の発色工程である。

【0040】また、上記免疫反応判定工程の発色反応後、市販のプレートリーダーを用いて、各ウェルの発色強度を測定することによって、より正確に免疫反応を判定することができる。

【0041】さらに、上記免疫反応工程においては、上記ピテロジェニン抗体を2種類用いることも可能である。例えば、淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体(monoclonal antibody: mAb)と、淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体(polyclonal antibody: pAb)とを組み合わせて用いることができる。また、例えば、クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体と、クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体とを組み合わせて用いることができる。

【0042】上記免疫反応工程に上記ピテロジェニン抗体を2種類用いる場合は、従来公知のサンドイッチエライザ(Sandwich ELISA)法を好適に用いることができる。サンドイッチエライザ法は、免疫検定系に用いられる2種類の一次抗体のうち的一方をエライザプレートに固定する。このエライザプレートに固定する側の一次抗体を固相化抗体とする。サンドイッチエライザ法の免疫検定系には、エライザプレート上に固定して用いる固相化抗体と、二次抗体が結合する側の一次抗体との2種類の一次抗体を用いる。

【0043】上記免疫反応工程に淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体と、淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体とを組み合わせて用いる場合、どちらを固相化抗体としても構わない。

【0044】例えば、上記免疫反応工程において、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体を固相化抗体として用い、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体を二次抗体が結合する側の抗体として用いるサンドイッチエライザ法は、次のように行なう。

【0045】まず、固相化抗体として用いる上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体を、市販のエライザプレートにコーティングし、固相化する。固相化後、上記エライザプレートを洗浄し、ブロッキングする。次に、クサガメから血液を採取し、遠心分離にかけて調製した血清を上記エライザプレートに加える。これにより、固相化抗体の上記ポリクローナル抗体とクサガメ由来のピテロジェニンとを反応させる。該反応後、上記エライザプレートを洗浄し、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体を、上記エライザプレートに加える。これにより、固相化抗体に結合したクサガメ由来のピテロジェニンと、二次抗体が結合する側の一次抗体である上記モノクローナル抗体とを反応させる(免疫反応工程)。該反応後、上記エライザプレートを洗浄し、次に、発色基質として、市販のHRP標識抗マウスIgG抗体(Anti-Mouse IgG-HRP)を上記エライザプレートに加え、上記モノクローナル抗体と反応させる。該反応後、上記エライザプレートを洗浄し、過酸化水素およびo-フェニレンジアミンを、上記エライザプレートに加え、免疫反応の有無を判定する(免疫反応判定工程)。

【0046】上記サンドイッチエライザ法のように、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体を固相化抗体として用いる場合をシステム1(Sandwich ELISA System 1)とする(図2参照)。

【0047】また、例えば、上記免疫反応工程において、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体を固相化抗体として用い、上記

クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体を二次抗体が結合する側の抗体として用いるサンドイッチエライザ法は、次のように行なう。

【0048】上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体を固相化抗体として用い、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体を二次抗体が結合する側の抗体として用い、市販のHRP標識抗ラビットIgG抗体 (Anti-Rabbit IgG-HRP) を発色基質として用いる以外は、上記システム1と同様にして、免疫反応工程および免疫反応判定工程を行なう。

【0049】上記サンドイッチエライザ法のように、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体を二次抗体が結合する側の抗体として用いる場合をシステム2 (Sandwich ELISA System II) とする (図3参照)。

【0050】また、上記免疫反応工程の前に、例えば、淡水ガメから血液を採取し、遠心分離にかけて血清を調製し、この血清を試料として用いて、SDS (sodium dodecyl sulfate: ドデシル硫酸ナトリウム) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis: PAGE) を行ない、泳動後、ウェスタンブロット法 (Western blotting) により、上記ピテロジェニン抗体との反応性を確認する免疫反応試行工程を加えてもよい。すなわち、泳動後、ゲル上のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、タンパク質が転写された上記ニトロセルロース膜と、上記ピテロジェニン抗体とを作用させて、その反応の有無を確認する。

【0051】上記反応の有無の確認は、上記ピテロジェニン抗体に結合し、発色基質により発色するように標識した二次抗体、例えば、HRP標識抗体を用いる。発色基質を加え、発色の有無により、淡水ガメの体液に、ピテロジェニンが含まれているか否かを免疫反応工程前にあらかじめ確認することができる。

【0052】また、複数の上記ピテロジェニン抗体がある場合、その中からどの抗体を使用するかを選別するときの指標に、上記免疫反応試行工程を用いてもよい。

【0053】本実施の形態の内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、さらに、上記ピテロジェニン抗体による免疫反応に基づいて、淡水ガメ体内におけるピテロジェニンの産生量を定量化するピテロジェニン定量化工程を有する。

【0054】上記ピテロジェニン定量化工程は、測定した吸光度 (Absorbance) に基づいて、ピテロジェニン量を推定するための検量線を用いることにより定量化する。

【0055】定量化工程においては、淡水ガメ体内におけるピテロジェニンの産生量を定量化するために、例えば、吸光度からピテロジェニンの量を推定することができる検量線を用いる。上記免疫反応判定工程の発色時

に、吸光度をプレートリーダにより測定する。この吸光度の値を上記検量線の式に代入して、淡水ガメ体内におけるピテロジェニンの産生量を算出する。

【0056】上記検量線は、精製した淡水ガメ由来のピテロジェニンを段階希釈したものと、一定濃度の上記ピテロジェニン抗体とを用いて、上記免疫反応工程および上記免疫反応判定工程を実施し、発色時の吸光度をプレートリーダにより測定し、その測定値に基づいて作製することができる。

【0057】また、上記検量線としては、例えば、図4および図5に示す検量線 (後述の実施例参照) を用いてもよい。図4および図5に示す検量線を用いる場合、上記免疫反応判定工程の発色時に、市販のプレートリーダにより450nmで吸光度を測定する。図4および図5の縦軸は、上記プレートリーダによる450nmでの測定値を示し、横軸はピテロジェニン濃度を示す。

【0058】図4の検量線を用いる場合は、上記システム1を実施する。このシステム1においては、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体のうち、ACVTG-5 (後述の実施例参照) を上記二次抗体が結合する側の抗体として用いる。

【0059】また、図5の検量線を用いる場合は、上記システム2を実施する。このシステム2においては、上記クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体のうち、上記ACVTG-5を上記固相化抗体として用いる。

【0060】また、本実施の形態の内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられる上記ピテロジェニン抗体は、クサガメ由来のピテロジェニンを抗原として認識する抗体であることが好ましい。

【0061】さらに、本実施の形態の内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられる上記ピテロジェニン抗体は、ポリクローナル抗体であってもよい。

【0062】また、本実施の形態の内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられる上記ピテロジェニン抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。さらに、上記ピテロジェニン抗体の免疫グロブリンクラス (immunoglobulin class) が、IgGのモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0063】また、本実施の形態の内分泌攪乱物質汚染の評価方法の上記免疫反応判定工程では、免疫反応を判定する手法として、エライザ法、免疫沈降法、ウェスタンブロット法、アフィニティークロマトグラフィー法の何れかが用いられる。

【0064】免疫反応を判定する手法としてエライザ法を用いる場合、上述のように、淡水ガメの体液中にピテロジェニンが存在するか否かを、上記ピテロジェニン抗体と上記HRP標識抗体とを用いた免疫反応の有無から判定する。

【0065】免疫反応を判定する手法として免疫沈降法

を用いる場合、淡水ガメの血液から調製した血清中に、上記ピテロジェニン抗体を添加し、さらに抗IgG抗体をアガロースビーズに固相化したものを添加する。反応後、上記アガロースビーズを洗浄し、血清中に含まれていたピテロジェニンを抽出する。この抽出液をSDS-PAGE用の試料とし、SDS-PAGEを行ない、分子量が一致するか否かにより目的のピテロジェニンであるか否かを判定してもよい。さらに、SDS-PAGE後、ウェスタンブロットを行ない、抗原抗体反応の結果から目的の淡水ガメ由来のピテロジェニンであるか否かを判定してもよい。

【0066】免疫反応を判定する手法としてアフィニティークロマトグラフィー法を用いる場合、不溶性の支持体に上記ピテロジェニン抗体を結合して、カラムに詰め特異的吸着体すなわち抗体カラムを作製する。淡水ガメの血液から調製した血清を上記抗体カラムを通過させることにより、該抗体カラムに目的の淡水ガメ由来のピテロジェニンが吸着する。その後、上記抗体カラムに結合しないものをカラムからすべて洗浄し、通過溶液のタンパク質濃度測定により、通過溶液中にタンパク質がないことを確認する。次に、例えば、pHを2.5から3.0に調製した0.2Mグリシン緩衝溶液、またはクエン酸緩衝溶液、もしくはチオシアン化カリウム、チオシアン化ナトリウムを含んだリン酸緩衝溶液(PBS)などの溶出溶液を、上記抗体カラムに添加することにより、該カラムに結合していた淡水ガメ由来のピテロジェニンを遊離させて溶出する。この溶出液のタンパク質濃度測定により、一過性のピークが得られる。これにより溶出液中にタンパク質があることが確認できる。

【0067】上記溶出液中のタンパク質をSDS-PAGE用の試料とし、SDS-PAGEを行ない、分子量が一致するか否かにより目的のピテロジェニンであるか否かを判定してもよい。さらに、SDS-PAGE後、ウェスタンブロットを行ない、抗原抗体反応の結果から目的の淡水ガメ由来のピテロジェニンであるか否かを判定してもよい。

【0068】さらに、本実施の形態のモノクローナル抗体は、上記内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられるモノクローナル抗体であって、淡水ガメ由来のピテロジェニンで免疫したマウス脾臓リンパ球とマウスのミエロマ細胞とを融合させてなるハイブリドーマにより産生され、上記淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合する。

【0069】また、本実施の形態のポリクローナル抗体は、上記内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられるポリクローナル抗体であって、淡水ガメ由来のピテロジェニンで免疫したウサギの免疫血清から精製され、上記淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合する。

【0070】さらに、本実施の形態のモノクローナル抗体は、淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合す

るモノクローナル抗体であって、上記ピテロジェニンが、クサガメ由来のピテロジェニンであることがより好ましい。

【0071】また、本実施の形態のポリクローナル抗体は、淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体であって、上記ピテロジェニンが、クサガメ由来のピテロジェニンであることがより好ましい。

【0072】本実施の形態のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、淡水ガメまたはクサガメ由来のピテロジェニンタンパク質、それらのフラグメントまたはその他の誘導体、あるいはそれらのアナログ、もしくはそれらを発現する細胞を免疫原として用いることによりを産生することができる。これらは通常の免疫操作、またはハイブリドーマ法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256, 495-497 (1975))、トリオーマ法、ヒトB-細胞ハイブリドーマ法(Kozbor, Immunology Today 4, 72 (1983))およびEBV-ハイブリドーマ法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96 (1985))などにより行なわれる。

【0073】さらに、本実施の形態のピテロジェニンの検出用試薬は、上記モノクローナル抗体、および上記ポリクローナル抗体の少なくとも一方を含む。

【0074】本実施の形態のピテロジェニンの検出用試薬に用いられるモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、1M~10Mの公知の緩衝溶液(pH7~8)で希釈して、0.001μg/mL~1μg/mLの濃度にし、内分泌攪乱物質汚染の評価用試薬として用いることができる。緩衝溶液としては、例えば、リン酸緩衝溶液(PBS)、トリス緩衝溶液、グリシン緩衝溶液などが挙げられる。

【0075】また、上記緩衝溶液中に、例えば、市販のグリセロールなどを成分として含むものとしてもよい。

【0076】また、本実施の形態の内分泌攪乱物質汚染の評価用キットは、上記検出用試薬を含む。

【0077】上記検出用試薬に用いられるモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、例えば、担体に固定化して使用することができる。担体としては、市販のセファロースなどのゲル過剰製品が挙げられる。また、例えば、上記検出用試薬に用いられるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を担体に結合させ、緩衝液中に分散させ、またはカラムに詰めることにより使用することができる。

【0078】また、上記内分泌攪乱物質汚染の評価用キットの、例えば、説明書には、この評価用キットに用いられているモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を使用した場合に、測定した吸光度に基づいて、ピテロジェニン量を推定するための検量線が示されている。

【0079】また、上記内分泌攪乱物質汚染の評価用キットは、さらに、例えば、市販のグリセロール、牛血清

アルブミン、ゲラチン、スキムミルク（Difco社製）、ブロッカー（雪印乳業社製）などのブロッキング用の試薬を含んでもよい。

【0080】

【実施例】以下、実施例および図1、図2、図6～図10に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれに限定させるものではない。なお、実施例にて用いたピテロジェニンは次に示すようにして精製した。また、実施例にて用いたポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、次に示すようにして作成した。さら

【0081】〔クサガメ由来のピテロジェニンの精製例〕雌のクサガメの腹腔内に、エストロゲン作用を有する市販の17 β -エストラジオールを、コーンオイルに希釈（1 μ g/カメ体重g）し、これを0.1mL、1日1回7日間注射し、その後、最初の注射日から数えて21日目まで、1日置きに同量を注射した。最後の注射日の翌日、すなわち22日目に全採血し、血漿を採取した。分離した血漿5mLに20mMのEDTA（ethylene diaminetetraacetic acid：エチレンジアミン四酢酸）溶液を20mL加え、攪拌した。次に、0.5MのMgCl₂を1.6mL加え穏やかに攪拌し、その後、遠心分離によって沈殿を形成させた。上澄みを捨て、遠心分離によって生じた沈殿に、1MのNaClを含んだ50mMのTris-HCl緩衝溶液を3mL加えて沈殿を溶解し、その後、遠心分離によって再度沈殿を形成させた。上澄みを捨て、遠心分離によって生じた沈殿に、上記1MのNaClを含んだ50mMのTris-HCl緩衝溶液を3mL加えて沈殿を再度溶解した。

【0082】この溶解液について、市販のSepharose-6Bを用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行ない、単一のピークを回収することにより、精製クサガメピテロジェニンを得ることができた。この精製物の一部を試料として用いて、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。この結果、クサガメ由来のピテロジェニンは、図1に示すように、分子量約214,000のタンパク質であることが確認された。

【0083】〔ポリクローナル抗体の作製例〕抗原とする上記精製クサガメピテロジェニン1mg/mLと、等量の市販の Freund のアジュバントとを混合してエマルジョンを作製し、ウサギの背中皮内に1mL/匹ずつ免疫した。3週間おきに追加免疫（1mL/匹）を行なった。最終の3回目の免疫は、上記アジュバントを混合せず、上記精製クサガメピテロジェニン1mg/mLのみを0.5mL注射した。最終免疫を行ってから1週間後に採血を行ない、血清を採取した。この血清を、市販のアフィニティークロマトグラフィー、proteinAカラムに添加し、精製した。

【0084】〔モノクローナル抗体の作製例〕市販のマウス由来のミエローマ細胞（X63.Ag.653）と、クサガメ

由来のピテロジェニンで免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞とをポリエチレングリコール法によって、細胞融合したのち、HAT選択を行なった。エライザ法によるスクリーニングで抗体産生陽性細胞群を選び、それら細胞群についてクローニングを行ない、抗体産生ハイブリドーマを確立した。ハイブリドーマをマウス腹腔内に移植して腹水を採取し、市販のアフィニティークロマトグラフィー、proteinGカラムを用いて精製モノクローナル抗体とした。クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体は、4種類確立した。それぞれをACVTG-1、ACVTG-3、ACVTG-4、ACVTG-5と名づけた。

【0085】〔抗体価の評価〕前記抗体の抗体価を、エライザ法を用いて評価した。

【0086】上記作製したクサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体のエライザ抗体価の評価方法を以下に具体的に説明する。

【0087】10 μ g/mLのクサガメ由来のピテロジェニンを含むリン酸緩衝溶液（PBS）を100 μ L/well市販のエライザプレートに加え、4 \times で一晚静置し、固相化した。抗体溶液を除去した後、0.05%Tween20を含んだPBSで2回洗浄し、10%のスキムミルク（Difco社製）を含んだPBSを200 μ L/well加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間放置し、ブロッキングした。この後、一次抗体として、0.05%Tween20を含んだPBSで段階希釈した上記ポリクローナル抗体を100 μ L/well上記エライザプレートに加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。上記と同様の洗浄操作を5回繰り返した後、さらに、二次抗体として、0.05%Tween20を含んだPBSで3000倍に希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体（Bio-Rad社製）を100 μ L/well上記エライザプレートに加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。次に、0.006%過酸化水素を含んだ0.4mg/mLのo-フェニレンジアミン（o-phenylenediamine）水溶液を上記エライザプレートに150 μ L/well加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間発色反応を行ない、市販のプレートリーダーにより450nmで吸光度を測定した。

【0088】この結果を図6に示す。上記ポリクローナル抗体の100ng/mLにおけるエライザ抗体価は、450nmの吸光度を測定した結果、3.00となった。図6の縦軸は、上記プレートリーダーによる450nmでの測定値を示し、横軸は、上記ポリクローナル抗体の濃度を示す。

【0089】上記作製したクサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体のエライザ抗体価の評価方法を以下に具体的に説明する。

【0090】一次抗体として、0.05%Tween20を含むPBSで段階希釈した上記モノクローナル抗体ACVTG-1を用い、また、二次抗体として、0.05%Tween20を含むPBSで3000倍に希釈したHRP標識抗マウスI

g G抗体を用いた以外は、上記ポリクローナル抗体のエライザ抗体価の評価方法と同様にして、上記モノクローナル抗体のエライザ抗体価を測定した。また、上記モノクローナル抗体ACVTG - 3、ACVTG - 4、ACVTG - 5についても、上記ポリクローナル抗体のエライザ抗体価の評価方法と同様にして、エライザ抗体価を測定した。

【0091】この結果を図7に示す。上記モノクローナル抗体ACVTG - 1、ACVTG - 3、ACVTG - 4、ACVTG - 5の100 ng / mLにおけるそれぞれのエライザ抗体価は、市販のプレートリーダーを用いて450 nmで吸光度を測定した結果、表1に示す値となった。図7の縦軸は、上記プレートリーダーによる450 nmでの測定値を示し、横軸は、上記モノクローナル抗体の濃度を示す。

【0092】また、上記モノクローナル抗体ACVTG - 1、ACVTG - 3、ACVTG - 4、ACVTG - 5の免疫グロブリンサブクラス (immunoglobulin subclass) は、全てマウスIgG₁であった。表1にクサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体の諸性状を示した。

【0093】

【表1】
クサガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するmAbの諸性状

mAb	immunoglobulin subclass	Absorbance at 450 nm *	Western blotting
ACVTG-1	I g G ₁	2. 161	+
ACVTG-3	I g G ₁	1. 245	++
ACVTG-4	I g G ₁	1. 544	-
ACVTG-5	I g G ₁	0. 372	+++

* 各mAb: 100 ng/ml

【0094】〔モノクローナル抗体と抗原との反応性の確認〕精製したクサガメ由来のピテロジェニンを試料として用い、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、その後、ウェスタンブロット法により、上記4種のモノクローナル抗体のクサガメ由来のピテロジェニンとの反応性を確認した。図8に示すように、ACVTG - 5が特に強い反応を示し、ACVTG - 4だけが反応を示さなかった。

【0095】〔実施例1〕クサガメ由来のピテロジェニンを抗原とし、上記ポリクローナル抗体を固相化抗体として用い、上記モノクローナル抗体のうちACVTG - 1を二次抗体が結合する側の抗体として用い、サンドイッチエライザ法 (システム1) を行なった (図2参照)。

【0096】具体的には、上記ポリクローナル抗体を10 μg / mL含むPBSを100 μL / well市販のエライザプレートに加え、4で一晩コーティングした。抗体溶液を除去した後、0.05% Tween20を含むPBSで2回洗浄し、10%のスキムミルク (Difco社製) を含んだP

20

30

40

BSを200 μL / well上記エライザプレートに加え、37で1時間放置し、ブロッキングした。PBSで段階希釈した精製したクサガメ由来のピテロジェニンを100 μL / well上記エライザプレートに加え、37で1時間反応させた。上記と同様の洗浄操作を5回繰り返した後、上記ACVTG - 1を1 μg / mL含むPBSを100 μL / wellずつ加え、37で1時間反応させた。

【0097】上記と同様の洗浄操作を5回繰り返した後、0.05% Tween20を含んだPBSで3000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体 (Bio-Rad社製) を100 μL / well上記エライザプレートに加え、37で1時間反応させた。次に、0.006%過酸化水素を含んだ0.4 mg / mLのo - フェニレンジアミン (o-phenylenediamine) 水溶液を上記エライザプレートに150 μL / well加え、37で30分間発色反応を行ない、市販のプレートリーダーにより450 nmで吸光度を測定した。この結果を、図9に示す。

【0098】図9の縦軸は、上記プレートリーダーによる450 nmでの測定値を示し、横軸はピテロジェニン濃度を示す。

【0099】〔実施例2〕上記二次抗体が結合する側の抗体として、上記モノクローナル抗体のうちACVTG - 3を用いた以外は、前記実施例1と同様にして、本発明に係る評価方法を実施した。その結果を、図9に示す。

【0100】〔実施例3〕上記二次抗体が結合する側の抗体として、上記モノクローナル抗体のうちACVTG - 4を用いた以外は、前記実施例1と同様にして、本発明に係る評価方法を実施した。その結果を、図9に示す。

【0101】〔実施例4〕上記二次抗体が結合する側の抗体として、上記モノクローナル抗体のうちACVTG - 5を用いた以外は、前記実施例1と同様にして、本発明に係る評価方法を実施した。その結果を、図9に示す。

【0102】〔実施例5〕クサガメ由来のピテロジェニンを抗原とし、上記モノクローナル抗体のうちACVTG - 1を固相化抗体として用い、上記ポリクローナル抗体を二次抗体が結合する側の抗体として用い、サンドイッチエライザ法 (システム2) を行なった (図3参照)。

【0103】具体的には、上記ACVTG - 1を10 μg / mL含むPBSを100 μL / well市販のエライザプレートに加え、4で一晩コーティングした。抗体溶液を除去した後、0.05% Tween20を含むPBSで2回洗浄し、10%のスキムミルク (Difco社製) を含んだPBSを200 μL / well上記エライザプレートに加え、37で1時間放置し、ブロッキングした。PBSで段階希釈した精製したクサガメ由来のピテロジェニンを100 μL / well上記エライザプレートに加え、37で1時間反応させた。上記と同様の洗浄操作を5回繰り返した後、上記ポリクローナル抗体を1 μg / mL含むPBSを100 μL / well上記エライザプレートに加え、37で1時間反応させた。

【0104】上記と同様の洗浄操作を5回繰り返した後、0.05% Tween20を含んだPBSで3000倍に希釈したHRP標識抗ラビットIgG抗体(Bio-Rad社製)を100 μ L/well上記エライザプレートに加え、37で1時間反応させた。次に、0.006%過酸化水素を含んだ0.4mg/mLのo-フェニレンジアミン(o-phenylenediamine)水溶液を上記エライザプレートに150 μ L/wellに加え、37で30分間発色反応を行ない、市販のプレートリーダーにより450nmで吸光度を測定した。この結果を、図10に示す。

【0105】図10の縦軸は、上記プレートリーダーによる450nmでの測定値を示し、横軸はピテロジェニン濃度を示す。

【0106】〔実施例6〕上記固相化抗体として、上記モノクローナル抗体のうちACVTG-3を用いた以外は、前記実施例5と同様にして、本発明に係る評価方法を実施した。その結果を、図10に示す。

【0107】〔実施例7〕上記固相化抗体として、上記モノクローナル抗体のうちACVTG-4を用いた以外は、前記実施例5と同様にして、本発明に係る評価方法を実

【0108】〔実施例8〕上記固相化抗体として、上記モノクローナル抗体のうちACVTG-5を用いた以外は、前記実施例5と同様にして、本発明に係る評価方法を実

【0109】上記の結果より、クサガメ由来のピテロジェニンを抗原として作製した上記モノクローナル抗体および上記ポリクローナル抗体は、クサガメ体液中のピテロジェニンの有無を判定する場合に利用することができる。よって、淡水環境の内分泌攪乱物質による汚染状況

【0110】また、システム1においては、二次抗体が結合する側の抗体としてACVTG-5を用いた前記実施例4の場合、最も良好に少量のピテロジェニンを捕捉した(図9参照)。ACVTG-5を用いた場合、最少検出ピテロジェニン濃度は、10ng/mLであり、100ng/mLまで優れた直線性を示す検量線が得られた(図4参照)。

【0111】さらに、システム2においては、固相化抗体としてACVTG-5を用いた前記実施例8の場合、最も良好に少量のピテロジェニンを捕捉した(図10参照)。ACVTG-5を用いた場合、最少検出ピテロジェニン濃度は、1ng/mLであり、50ng/mLまで優れた直線性を示す検量線が得られた(図5参照)。

【0112】

【発明の効果】本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、以上のように、淡水ガメ由来のピテロジェニンを特異的に認識するピテロジェニン抗体を、該ピテロジェニンの検出対象となる淡水ガメの体液と反応させる免

疫反応工程と、ピテロジェニン抗体による免疫反応の有無を判定する免疫反応判定工程とを含むものである。好ましくは、上記ピテロジェニン抗体による免疫反応に基づいて、淡水ガメ体内におけるピテロジェニンの産生量を定量化するピテロジェニン定量化工程を有するものである。

【0113】また、上記ピテロジェニン定量化工程は、測定した吸光度に基づいて、ピテロジェニン量を推定するための検量線を用いることにより定量化するものである。

【0114】さらに、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、上記ピテロジェニン抗体が、クサガメ由来のピテロジェニンを抗原として認識するものである。また、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、上記ピテロジェニン抗体がポリクローナル抗体である。さらに、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、上記ピテロジェニン抗体がモノクローナル抗体であり、好ましくは、免疫グロブリンクラスが、IgGのモノクローナル抗体である。

【0115】また、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、上記免疫反応判定工程では、免疫反応を判定する手法として、エライザ法、免疫沈降法、ウェスタンブロット法、アフィニティークロマトグラフィー法の何れかが用いられるものである。

【0116】本発明に係るモノクローナル抗体は、上記内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられるモノクローナル抗体であって、淡水ガメ由来のピテロジェニンで免疫したマウス脾臓リンパ球とマウスのミエロマ細胞とを融合させてなるハイブリドーマにより産生され、上記淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するものである。

【0117】また、本発明に係るポリクローナル抗体は、上記内分泌攪乱物質汚染の評価方法に用いられるポリクローナル抗体であって、淡水ガメ由来のピテロジェニンで免疫したウサギの免疫血清から精製され、上記淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するものである。

【0118】さらに、本発明に係るモノクローナル抗体は、淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体であり、好ましくは、上記ピテロジェニンが、クサガメ由来のピテロジェニンであるモノクローナル抗体である。

【0119】また、本発明に係るポリクローナル抗体は、淡水ガメ由来のピテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体であり、好ましくは、上記ピテロジェニンが、クサガメ由来のピテロジェニンであるポリクローナル抗体である。

【0120】それゆえ、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価方法は、淡水環境の内分泌攪乱物質いわゆる環境ホルモンによる汚染状況を調査する場合において、強

度の汚染が進んだ水域の評価、および環境ホルモンの生物濃縮の調査を可能とし、また、環境ホルモンによる汚染を測定する期間の長期化、並びに環境ホルモンによる汚染に関する測定データの精度の向上を図り得るという効果を奏する。

【0121】さらに、本発明に係るビテロジェニンの検出用試薬は、上記のモノクローナル抗体および上記のポリクローナル抗体の少なくとも一方の抗体を含むものである。

【0122】また、本発明に係る内分泌攪乱物質汚染の評価用キットは、上記のビテロジェニンの検出用試薬を含むものである。

【0123】それゆえ、上記の発明のビテロジェニンの検出用試薬および内分泌攪乱物質汚染の評価用キットは、上記の内分泌攪乱物質汚染の評価方法に記載の効果と同様の効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動-ウェスタンブロット法により、クサガメビテロジェニンの分子量を確認した実験結果を示す図面代用写真である。

【図2】本発明に係るサンドイッチエライザ法を用いたビテロジェニンの定量法であるシステム1を示す模式図である。

【図3】本発明に係るサンドイッチエライザ法を用いた

ビテロジェニンの定量法であるシステム2を示す模式図である。

【図4】上記システム1において、本発明に係るクサガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体ACVTG-5を用いたときのビテロジェニン検量線を示すグラフである。

【図5】上記システム2において、本発明に係るクサガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体ACVTG-5を用いたときのビテロジェニン検量線を示すグラフである。

【図6】作製したクサガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するポリクローナル抗体のエライザ抗体価を示すグラフである。

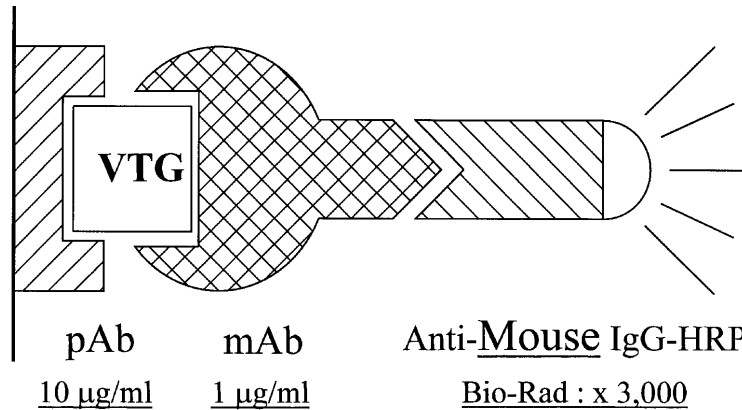
【図7】作製したクサガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体のエライザ抗体価を示すグラフである。

【図8】ウェスタンブロット法により、作製したクサガメ由来のビテロジェニンに特異的に結合するモノクローナル抗体と、クサガメビテロジェニンとの反応性を確認した実験結果を示す図面代用写真である。

【図9】上記システム1の実験結果を示すグラフである。

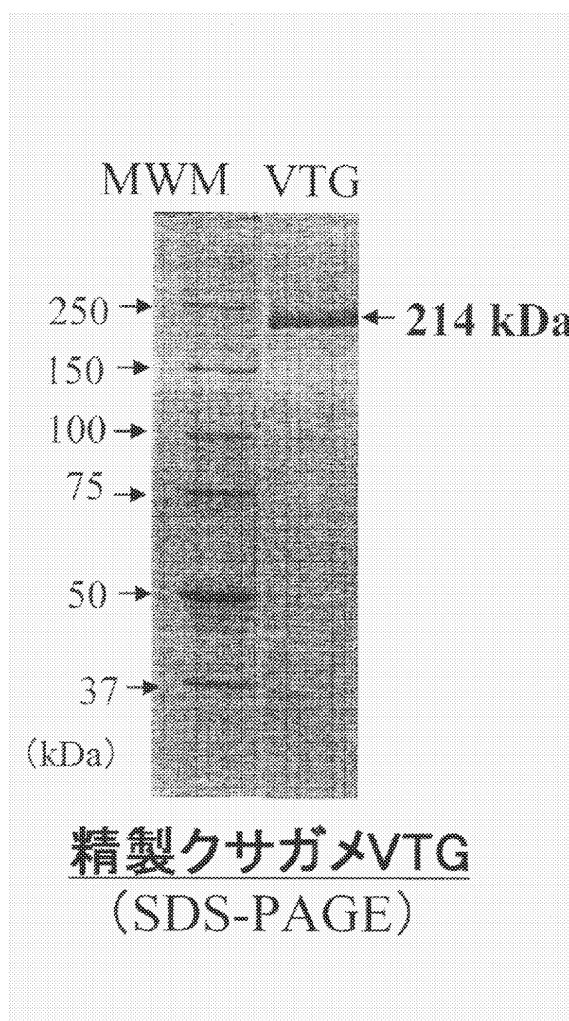
【図10】上記システム2の実験結果を示すグラフである。

【図2】

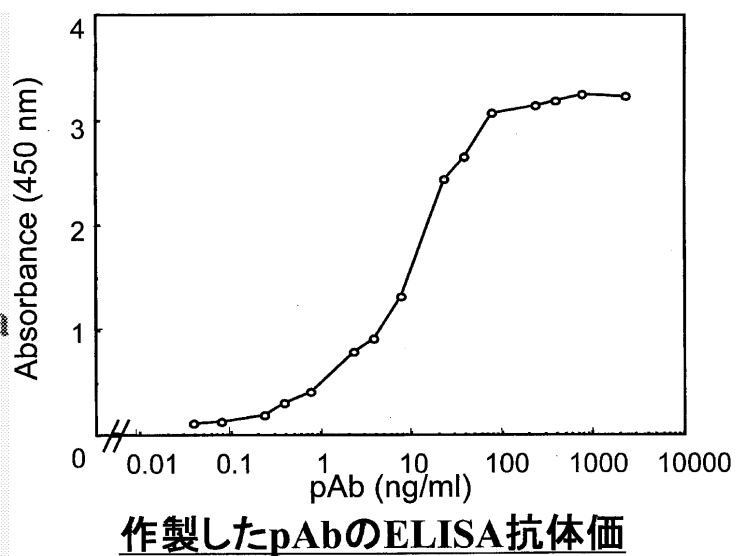


クサガメVTG定量: Sandwich ELISA System I

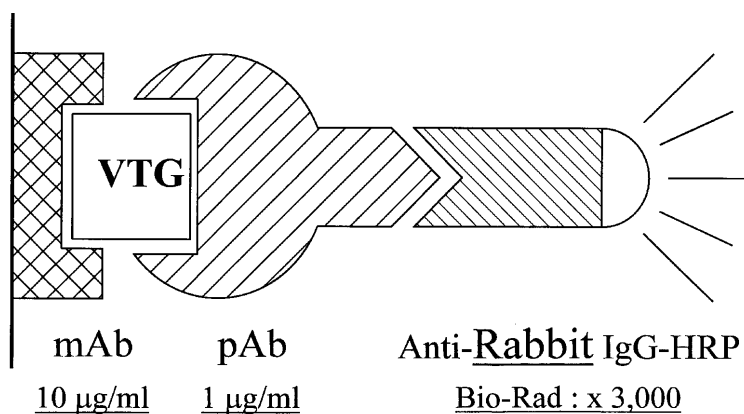
【図1】



【図6】

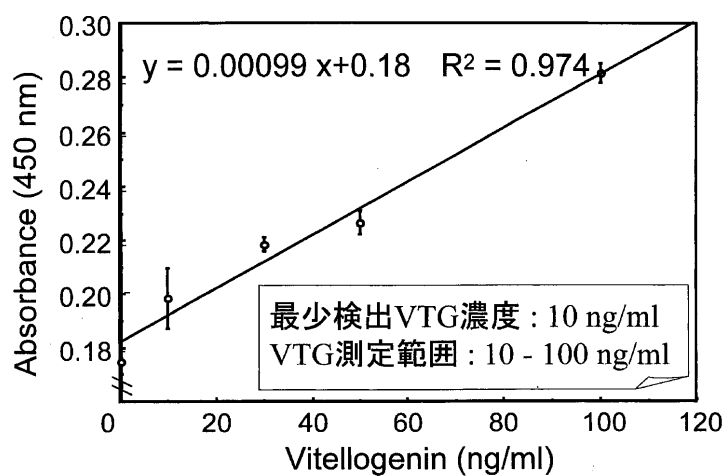


【図3】



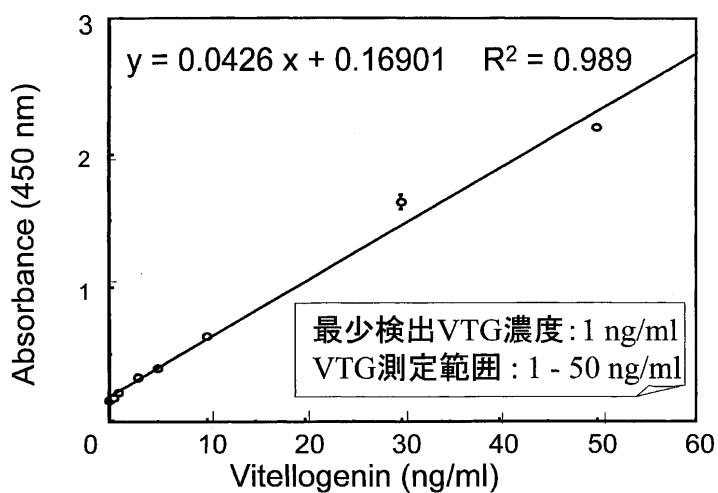
クサガメVTG定量: Sandwich ELISA System II

【図4】



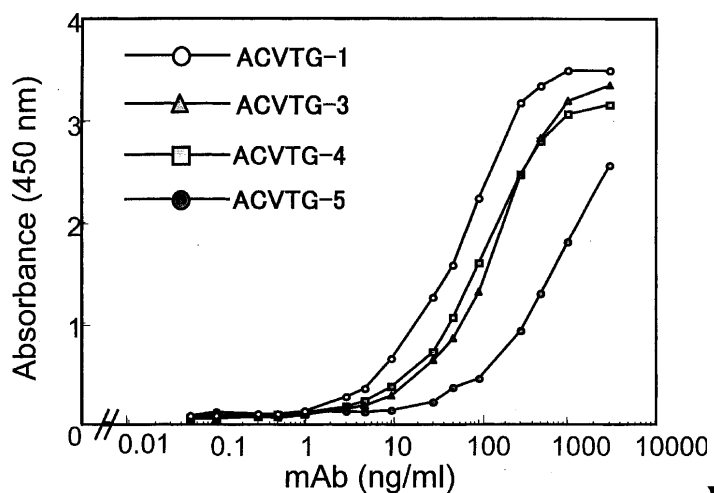
System IにおけるACVTG-5の低濃度VTGに対する反応性

【図5】



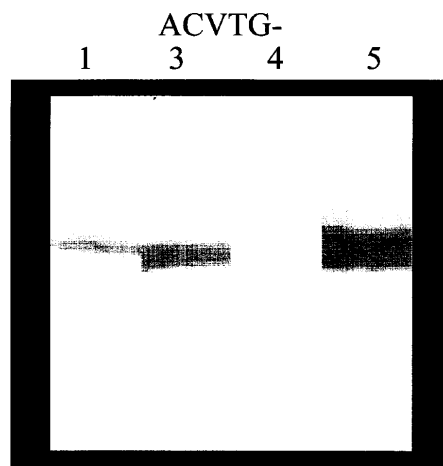
System IIにおけるACVTG-5の低濃度VTGに対する反応性

【図7】



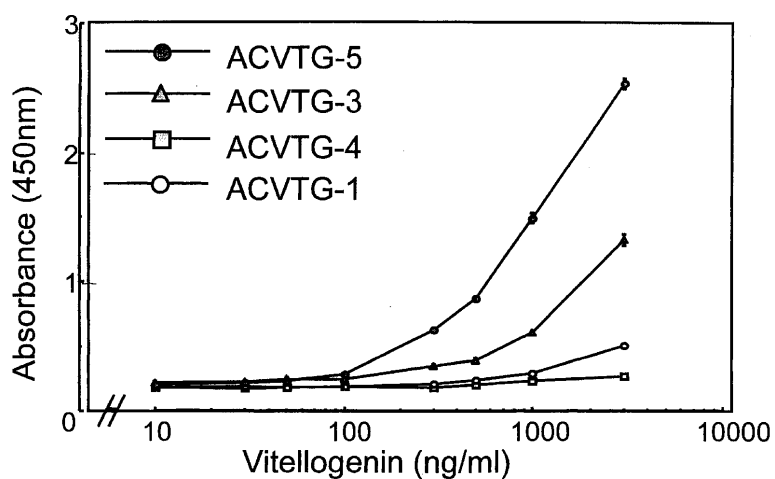
作製したmAbのELISA抗体価

【図8】



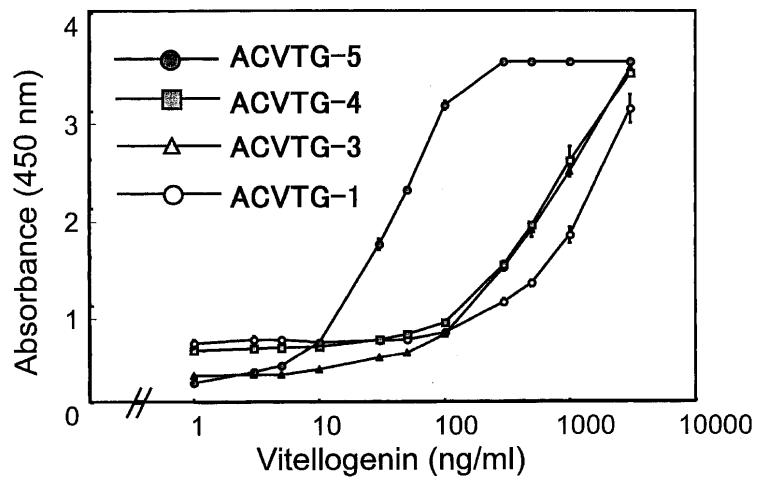
Western blottingによる各mAbのVTGへの反応

【図9】



Sandwich ELISA System I : mAbの比較

【図10】



Sandwich ELISA System II : mAbの比較

フロントページの続き

(72)発明者 坂 雅宏
京都府宇治市伊勢田町南遊田 1 - 9

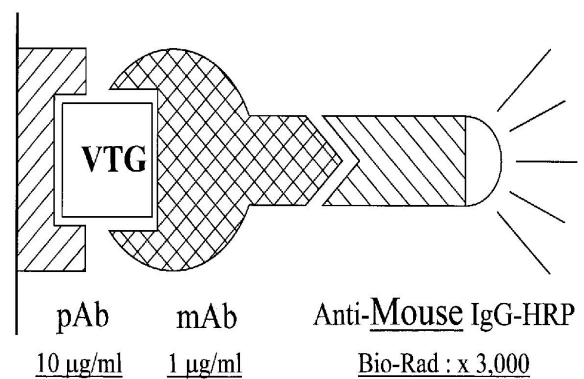
F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 DA16
 4G057 AB38 AF13
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75
 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	内分泌干扰物污染的评价方法，用于其的抗体，以及使用该抗体的检测试剂盒和检测试剂盒		
公开(公告)号	JP2003262633A	公开(公告)日	2003-09-19
申请号	JP2002062747	申请日	2002-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
[标]发明人	鎌田洋一 南川総子 多田哲子 坂雅宏		
发明人	鎌田 洋一 南川 総子 多田 哲子 坂 雅宏		
IPC分类号	G01N33/53 B01L99/00 C07K16/18 C12P21/08 B01L11/00		
FI分类号	G01N33/53.D B01L11/00 C07K16/18 C12P21/08 B01L99/00		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA16 4G057/AB38 4G057/AF13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，通过使用一种在调查内分泌干扰物污染的情况下适合监测的动物，来评估内分泌干扰物的污染状态。根据本发明的用于评估内分泌干扰物污染的方法包括免疫反应步骤，该步骤使特异性识别源自淡水龟的卵黄蛋白原的卵黄蛋白原抗体与将被卵黄蛋白原检测的淡水龟体液反应。一种免疫反应确定步骤，用于确定卵黄蛋白原抗体是否存在免疫反应。

【图2】



クサガメVTG定量: Sandwich ELISA System I