

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/059837

発行日 平成22年3月4日(2010.3.4)

(43) 国際公開日 平成20年5月22日(2008.5.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C07K 16/14 (2006.01)	C07K 16/14	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 G	
GO1N 33/548 (2006.01)	GO1N 33/548 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2008-544150 (P2008-544150)	(71) 出願人	000155023 株式会社堀場製作所
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/072010		京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地
(22) 国際出願日	平成19年11月13日(2007.11.13)	(74) 代理人	110000729 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	特願2006-311200 (P2006-311200)	(72) 発明者	内ヶ島 美岐子 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場製作所内
(32) 優先日	平成18年11月17日(2006.11.17)	(72) 発明者	三宅 司郎 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場製作所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	山下 弘 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場製作所内
		Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフラトキシンに対する抗体、その抗体を用いた担体、アフラトキシンの免疫学的検出方法、ならびにアフラトキシンの濃縮および精製方法

(57) 【要約】

食物などの試料中に含まれる可能性のあるアフラトキシンのすべてのタイプを検出・濃縮・精製すること、ならびにそれらの総量または個別の量を高感度に検出すること。アフラトキシンB₂またはその誘導体をハプテン化合物に用い、各アフラトキシン類縁体間に対して同等の反応性を示すと同時に、有機溶媒に耐性の高い抗体を得て、当該抗体を用いた検出・濃縮・精製手段ならびに免疫学的検出手段を構築する。構築された検出手段は、高感度かつ定量性に優れている。

【特許請求の範囲】

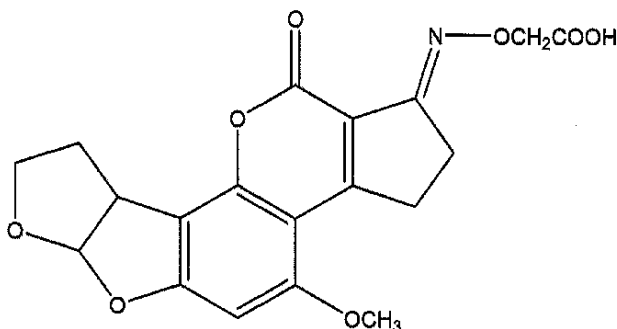
【請求項 1】

アフラトキシン B 2 又はその誘導体由来する抗原を用いて得られる抗体またはそのフラグメントであって、アフラトキシン B 1、B 2、G 1、G 2、および M 1 のすべてに対して同等の結合能を有し、かつ有機溶媒耐性を有する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項 2】

前記アフラトキシン B 2 の誘導体が以下の式 (1) :

【化 1】



10

で表される構造を有する化合物である、請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメント。 20

【請求項 3】

前記アフラトキシン B 2 の誘導体由来する抗原が、前記式 (1) の化合物と高分子化合物との複合体である、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 から 3 までのいずれかに記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 から 3 までのいずれかに記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体が、A F B 2 - 3 - 7 F 3 - 3 である、請求項 5 に記載の抗体又はそのフラグメント。 30

【請求項 7】

請求項 5 または 6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はそのフラグメントを産生するハイブリドーマ。

【請求項 8】

受領番号 F E R M A B P - 1 0 9 3 1 で国際寄託されている、請求項 7 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 9】

請求項 1 から 6 までのいずれかに記載の抗体又はそのフラグメントを用いる、アフラトキシンの免疫学的検出方法。 40

【請求項 10】

アフラトキシン B 1、B 2、G 1、G 2、および M 1 からなる群より選択される 1 種またはそれ以上、あるいは総量を検出しようとする請求項 9 に記載のアフラトキシンの免疫学的検出方法。

【請求項 11】

さらに、固相吸着剤を用いる、請求項 9 または 10 に記載のアフラトキシンの免疫学的検出方法。

【請求項 12】

固相吸着剤およびそれに固定化した請求項 1 から 6 までのいずれかに記載の抗体又はそ 50

のフラグメントとを含む担体。

【請求項 13】

前記固相吸着剤が、セファロースである、請求項 12 に記載の担体。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 に記載の担体を含む、親和性カラム。

【請求項 15】

アフラトキシンを含む可能性のある試料を準備する工程； 請求項 14 に記載の親和性カラム上に該試料を載せる工程； および溶離剤をカラムに通して流出物を回収し、該アフラトキシンを該抗体又はそのフラグメントから溶離させて該流出物中に回収する工程とを含む、被検試料中のアフラトキシンを濃縮および／または精製する方法。

10

【請求項 16】

前記カラム上に試料を載せる工程において使用される溶剤が、濃度 1 (v/v) % 以上 20 (v/v) % 以下のアセトニトリル、又は濃度 1 (v/v) % 以上 40 (v/v) % 以下のメタノールである、請求項 15 に記載のアフラトキシンを濃縮および／または精製する方法。

【請求項 17】

前記アフラトキシンが、B1、B2、G1、G2、およびM1 からなる群より選択される 1 種または 2 種以上である、請求項 15 または 16 に記載のアフラトキシンを濃縮および／または精製する方法。

【請求項 18】

アフラトキシン含有試料を、請求項 12 または 13 のいずれかに記載の担体上に保持された抗体又はそのフラグメントに捕捉させた後、溶出する、アフラトキシンを濃縮および／または精製する方法。

20

【請求項 19】

前記アフラトキシンが、B1、B2、G1、G2、およびM1 からなる群より選択される 1 種または 2 種以上である、請求項 18 に記載のアフラトキシンを濃縮および／または精製する方法。

【請求項 20】

前記アフラトキシンが、B1、B2、G1、G2、およびM1 の総量である、請求項 15 から 19 のいずれかに記載のアフラトキシンを濃縮および／または精製する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アフラトキシンに対する新規な性質を有する抗体またはそのフラグメントに関する。さらに本発明は、このような抗体またはそのフラグメントを用いた、アフラトキシンの捕捉用担体、親和性カラム、アフラトキシンの免疫学的検出方法、ならびに濃縮方法および精製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

カビが生産する天然毒アフラトキシンは発がん性毒素として知られ、ピーナッツ、ピーナッツバター等の加工品、とうもろこし、ハト麦、そば粉などの穀類及びその加工品、ナツメグ、白胡椒等の香辛料、ピスタチオナッツ等多くの食品から検出の可能性がある。アフラトキシンは、Aspergillus flavus、Aspergillus parasiticus 等の糸状菌が産生する 2 次代謝産物で、B1、B2、G1、G2 およびその代謝物でアフラトキシンを摂取したウシの乳から見つかった水溶性の M1 等の類縁体が知られており、それぞれ単離され、特徴づけがなされている。中でもアフラトキシン B1 は、経口的に摂取された場合極めて高い発癌性を示すことが広く知られている。

40

【0003】

アフラトキシン B1 以外のタイプの B2、G1、G2 および M1 等の構造類似体アフラトキシンについても、動物種により多少の相違があり、B1 ほど毒性は高くないとはいえ、種々の動物に発がん性および急性毒性が認められている。

50

【0004】

わが国では、食品衛生法により食品中のアフラトキシンB1濃度は10ppb以下に規制されているとともに、*A. flavus*やアフラトキシンB1が高頻度で検出されるピーナッツ、トウモロコシ、穀物類等で、汚染地域と考えられる国から輸入されるものについては、特に嚴重な検査がなされている。検査においては、多数のサンプルを迅速に処理し、かつ微量のアフラトキシンを検出する必要があることから、薄層クロマトグラフィー(TLC)、HPLC蛍光法、及び確認試験としてLC/MS法が採用されている。

【0005】

これら化学的な分析法を使用する場合には、サンプルを粉碎後有機溶媒で抽出し、その抽出液を、濃縮精製する必要がある。濃縮精製手段には、通常液液分配やシリカゲルカラムクロマトグラフィー、フロリジルカラムクロマトグラフィーが用いられる。さらに、これらのクロマトグラフィーは濃縮精製効果が比較的低いことから、微量に汚染するアフラトキシンを検出するため、抗アフラトキシン抗体のアフラトキシンとの特異的結合能を利用した抗体アフィニティークラムクロマトグラフィーが用いられるようになった。しかし、既存の抗体カラムクロマトグラフィーは、使用されている抗体が有機溶媒に弱く、使用可能な有機溶媒が限られかつ低い濃度でしか使用できないという欠点があった。また、毒性の強いアフラトキシンB1に特異的な抗体は、多数開発され公表されているが、アフラトキシンB2、G1、G2、M1にも厳格に同等に反応するものはこれまで得られていなかった。アフラトキシンB2、G1、G2、M1についても発癌性を始めとする毒性があるため、最近の外国の規制では、アフラトキシンB1のみならず、すべてのアフラトキシンの個々の含有量及び総量を対象にしているところも多く、今後もこの傾向は増していくものと推定される。しかしながら、B1以外のタイプのアフラトキシンに対するモノクローナル抗体については、その必要性が高いにもかかわらず、研究は進んでいなかった。

【0006】

例としてあげると、これまで知られているアフラトキシンB1に対する抗体は、他のタイプのアフラトキシンに対する認識が弱いか、あるいは、アフラトキシンB1、B2、およびM1のみを認識するモノクローナル抗体(例えば、Candlish J.E.ら、*Letters in Appl. Microbiol.* 1, 57 (1985); Groopmanら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7728 (1984))、毒性の強いB1とG1のみを認識し、他のタイプを認識しないモノクローナル抗体(例えば、米国特許第4, 835, 100号)などである。この他にも、B1をハプテンとし、B1に特異的な抗体として、B1あるいはB2に対する結合能と、G1に対する結合能とが桁違いに減少している場合(特開昭63-219394)などがある。一方、全アフラトキシンの検出に有用なモノクローナル抗体として作成されている例(特開平4-360695)もあるが、アフラトキシンB1、B2、G1、およびG2の交差反応性は、 IC_{50} 値の比較で、1/5から1/10以上の開きがあり、実際のサンプルにおける検出用としては、各アフラトキシン類縁体間に対するばらつきが考えられる。

【0007】

一方、アフラトキシンB1に対するモノクローナル抗体を用いたアフラトキシンB1の定量方法が研究され(Hertzog P.J.ら、*Carcinogenesis* 3: pp.825-828 (1982))、ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)等によってアフラトキシンB1の検出が実際に行われている。しかし、このような方法においても、抗体が有機溶媒に弱くかつ他の類縁体に対する反応性が低いことから、抗体アフィニティークラムクロマトグラフィー同様に抽出したサンプルを十分に希釈しなければならず、またアフラトキシン類縁体の含有比によっては正確に定量できない欠点があった。

【特許文献1】米国特許第4, 835, 100号公報

【特許文献2】特開昭63-219394

【特許文献3】特開平4-360695

【非特許文献1】Candlish J.E.ら、*Letters in Appl. Microbiol.* 1, 57 (1985)

【非特許文献2】Groopmanら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7728 (1984)

【非特許文献3】Hertzog P.J.ら、*Carcinogenesis* 3: pp.825-828 (1982)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

このように、従来、アフラトキシンに対する抗体は、アフラトキシンが脂溶性でかつ4つの類縁体と1つの代謝物を測定する必要性があったにもかかわらず、有機溶媒に弱くかつ類縁体との反応性が同等でないという欠点があった。さらには、これらの抗体を利用した抗体アフィニティーカラムクロマトグラフィーは、同様に有機溶媒に弱くかつ全ての類縁体と代謝物を均等に濃縮精製することができなかつた。また、さらには、これらの抗体を利用した免疫学的測定法は、抽出したサンプルを十分に希釈しなければならず、またアフラトキシン類縁体の含有比によっては正確に定量できない欠点があった。そのため、これらの一連の解決法が要望されていた。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、アフラトキシンB1、B2、G1、G2、およびM1のすべてのタイプを同等に検出でき、かつ10ppb未満の極微量のアフラトキシンをも正確に検出するような検出方法を提供すべく鋭意研究を行った結果、アフラトキシンのすべてのタイプに同等の結合能を有し、かつ有機溶媒耐性を持つ抗体またはそのフラグメント、それを用いた検出方法等を見出し、本発明を完成した。

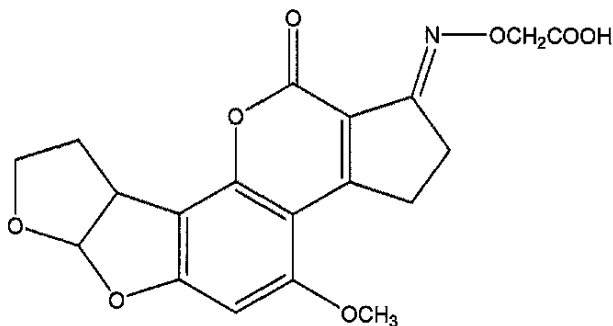
【0010】

すなわち本発明の抗体またはそのフラグメントは、アフラトキシンB2又はその誘導体に由来する抗原を用いて得られる抗体またはそのフラグメントであつて、アフラトキシンB1、B2、G1、G2、およびM1のすべてに対して同等の結合能を有し、有機溶媒耐性を有する。

【0011】

本発明の1つの態様では、上記アフラトキシンB2の誘導体は、以下の式(1)：

【化1】



で表される構造を有する化合物である。

【0012】

本発明の1つの態様では、上記アフラトキシンB2の誘導体に由来する抗原が、上記式(1)の化合物と高分子化合物との複合体である。

【0013】

上記抗体は、ポリクローナル抗体であり得る。

【0014】

上記抗体はモノクローナル抗体であり得る。

【0015】

上記モノクローナル抗体は、AFB2-3-7F3-3である。

【0016】

本発明のハイブリドーマは、上記のいずれかのモノクローナル抗体を産生する。

【0017】

本発明のハイブリドーマは、受領番号FERM ABP-10931の下、2007年11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国際寄託されているハイブリドーマであり得る。

【0018】

本発明のアフラトキシンの免疫学的検出方法は、上記のいずれかの抗体又はそのフラグメントを用いる。

【0019】

本発明のアフラトキシンの免疫学的検出方法は、上記のいずれかの抗体又はそのフラグメントを用い、アフラトキシンB1、B2、G1、G2、およびM1のすべてを単独で、2種以上の組合せで、あるいは総量として検出する。

10

【0020】

本発明のアフラトキシンの免疫学的検出方法の1つの態様では、さらに、固相吸着剤を用いる。

【0021】

本発明の担体は、固相吸着剤およびそれに固定化した上記のいずれかの抗体又はそのフラグメントとを含む。

【0022】

上記固相吸着剤は、セファロースであり得る。

【0023】

本発明の親和性カラムは、上記のいずれかの担体を含む。

20

【0024】

本発明の被検試料中のアフラトキシンを濃縮および/または精製する方法においては、アフラトキシンを含む可能性のある試料を準備する工程；上記の親和性カラム上に該試料を載せる工程；および溶離剤をカラムに通して流出物を回収し、該アフラトキシンを該抗体又はそのフラグメントから溶離させて該流出物中に回収する工程とを含む。

【0025】

上記カラム上に試料を載せる工程において使用される溶剤は、濃度1 (v/v) %以上20 (v/v) %以下のアセトニトリル、又は濃度1 (v/v) %以上40 (v/v) %以下のメタノールであり得る。

【0026】

30

本発明のアフラトキシンを濃縮および/または精製する方法の別の態様においては、上記アフラトキシンが、B1、B2、G1、G2、およびM1からなる群より選択される1種または2種以上である。

【0027】

本発明のアフラトキシンを濃縮および/または精製する方法において、アフラトキシン含有試料を、上記のいずれかの担体上に保持された抗体又はそのフラグメントに捕捉させた後、溶出する工程を含む。

【0028】

1つの態様において、本発明のアフラトキシンを濃縮および/または精製する方法では、上記アフラトキシンが、B1、B2、G1、G2、およびM1からなる群より選択される1種または2種以上である。

40

【0029】

本発明のアフラトキシンを濃縮および/または精製する方法では、上記アフラトキシンは、B1、B2、G1、G2、およびM1の総量としても得ることができる。

【発明の効果】

【0030】

本発明の抗体またはそのフラグメントは、アフラトキシンのすべてのタイプに同等の結合能を有し、かつ有機溶媒耐性を持つ。その為、この抗体またはそのフラグメントを利用したアフラトキシンの検出方法においては、アフラトキシンのすべてのタイプの総量または個別の量を同時に、かつ微量でも正確に検出することが可能となる。

50

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】 アフラトキシンB 2-K L H免疫マウス抗血清の間接競合阻害E L I S A法におけるアフラトキシンB 2に対する阻害曲線を示す。

【図2】 抗体[A F B 2-3-7 F 3-3]を用いた直接競合阻害E L I S A法におけるアフラトキシンに対する阻害曲線を示す。

【図3】 メタノール存在下での抗体[A F B 2-3-7 F 3-3]を用いた直接競合阻害E L I S A法におけるアフラトキシンB 2に対する阻害曲線を示す。

【図4】 アセトニトリル存在下での抗体[A F B 2-3-7 F 3-3]を用いた直接競合阻害E L I S A法におけるアフラトキシンB 2に対する阻害曲線を示す。

10

【図5】 抗体[A F B 2-3-7 F 3-3]を用いて調製したゲルを用いたアフィニティークロマトカラム（自社）と市販アフィニティークロマトカラムとの、アフラトキシンB 1、B 2、G 1およびG 2を含む20%アセトニトリル溶液を添加したときの回収率の比較を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

以下、本発明を詳細に説明する

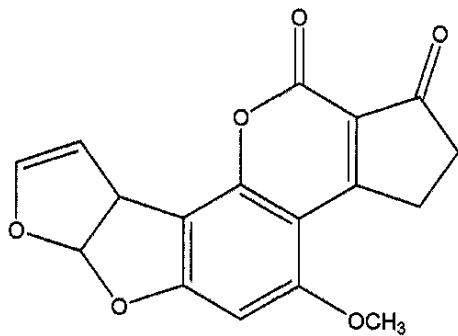
本明細書において対象となる「アフラトキシン」とは、アフラトキシンB 1、B 2、G 1、G 2、およびM 1のいずれか1種を表すかまたは2以上のすべてを総称する。

【0033】

アフラトキシンB 1は、以下の式

20

【化2】



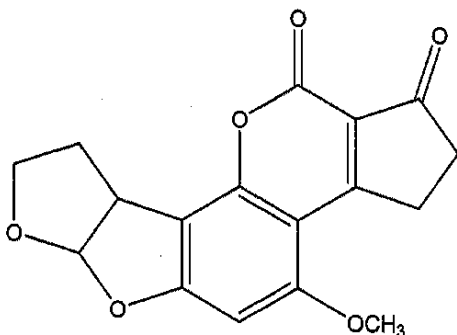
30

で表される化合物である。

【0034】

アフラトキシンB 2は、以下の式

【化3】



40

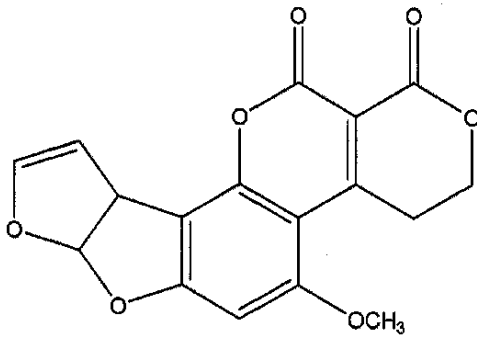
で表される化合物である。

【0035】

50

アフラトキシンG1は、以下の式

【化4】



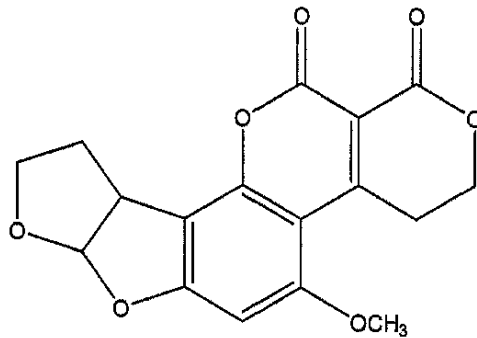
10

で表される化合物である。

【0036】

アフラトキシンG2は、以下の式

【化5】



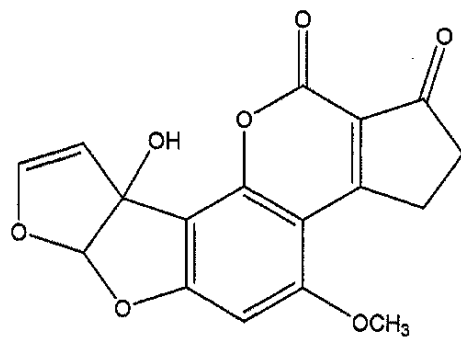
20

で表される化合物である。

【0037】

アフラトキシンM1は、以下の式

【化6】



40

で表される化合物である。

【0038】

本明細書において用いられる、「同等の結合能を有する」または「同等に反応する」とは、B1、B2、G1、G2、M1に対する反応性の違いが、IC₅₀値 (ng/ml) でB2に対する結合能を中心に±50%以内であることを指す。

【0039】

本明細書において用いられる、「有機溶媒耐性」とは、被検試料を有機溶媒に溶解して 50

親和性マトリックスと接触させる時点において、公知の各種有機溶媒に存在させても抗体またはそのフラグメントが変性を起さないことをいうが、特に、40%メタノールあるいは20%アセトニトリル中に少なくとも1時間存在させても、アフマトキシシンB1、B2、G1、G2、M1に対する反応性が変化しないことを指す。

【0040】

アフマトキシシンに対する抗体を作製しようとする場合、タンパク質と結合可能な官能基を持ち、毒性も類縁体の中で最も高いアフマトキシシンB1が一般的に免疫用のハプテン（免疫原）として用いられている。免疫原としてアフマトキシシンB1誘導体を用いることにより、アフマトキシシンB1に対し高い反応性を示し、かつアフマトキシシンB1に特異性の高い抗体が作製できることは良く知られた事実である。

10

【0041】

一方、他の類縁体に対しても高い反応性を示す、すなわちアフマトキシシンの少なくとも測定対象となる類縁体アフマトキシシンB1、アフマトキシシンB2、アフマトキシシンG1、アフマトキシシンG2、アフマトキシシンM1と同等に反応する抗体は、参考例で示したように、免疫原としてアフマトキシシンB1誘導体を用いた方法では得ることが出来なかった。この理由としては、アフマトキシシンB1を免疫原とした場合、アフマトキシシンB1のC-8,9間の二重結合の存在、すなわち、末端ジヒドロフラン環のC-8,9位の sp^2 炭素によりこの部分が平面構造をとると同時に8位と9位の炭素間距離が短くなるため、8,9位に sp^3 炭素を有するアフマトキシシンB2と比較して立体的に障害が少なく、この平面ジヒドロフラン構造を強く認識するポケットを有した抗体ができやすく、この抗体とアフマトキシシンB1とが結合した場合、その結合部位のポケットの最深部へ入り込み強固な結合を形成するため、アフマトキシシンB1に強い認識力を持つのではないかと考えられた。一方、C-8,9位に sp^3 炭素を有するアフマトキシシンB2やG2については、テトラヒドロフラン環面に対し8,9位の上下方向に突き出た水素原子の存在によりアフマトキシシンB1に比べより立体的に嵩高いために、このポケットの奥深くには入ることができず、その結果アフマトキシシンB1に比較して格段に弱い認識力しか示さないものと推測された。また、アフマトキシシンM1についても9a位に嵩高い水酸基が存在するため、アフマトキシシンB2やG2と同様、このポケットに入り得ないのであろうと推測した。

20

【0042】

そこで、目的に見合う抗体を作製するためにハプテンのデザインを検討し、以下の理由でアフマトキシシンB2をその候補に選択した。

30

【0043】

(1) C-8,9間が単結合になっていて、アフマトキシシンB1よりその近傍の構造が立体的に嵩高く、アフマトキシシンB2を認識する抗体はアフマトキシシンB1をも認識し得るものと考えられる。(2) アフマトキシシンG1とアフマトキシシンG2は、アフマトキシシンB1とアフマトキシシンB2と比較して、キャリアタンパク質との結合部位近傍で構造が違うのみなので、得られた抗体は両者の違いをそれ程認識しない抗体が含まれる可能性が高い。この仮説が正しければ、これらの抗体の中からモノクローナル抗体作製技術によって、アフマトキシシンB1、アフマトキシシンB2、アフマトキシシンG1、アフマトキシシンG2と等価に反応する抗体を選択することが可能と考えられる。(3) アフマトキシシンM1については、免疫原にアフマトキシシンB2を用いても反応性の高い抗体を得る可能性は上記アフマトキシシンG1、アフマトキシシンG2の場合より低いと想定される。しかし、アフマトキシシンB2を免疫原とすることによって、アフマトキシシンM1の水酸基が納まる空間を持つ抗体が産生される可能性は、アフマトキシシンB1と比較して高いと考えられる。実際、アフマトキシシンB1を免疫原とした場合に得られた抗体でも、全くアフマトキシシンM1と反応しないわけではなく数十分の一程度の反応性を示すことが多い。そこで、アフマトキシシンB2誘導体を免疫原とすることで、アフマトキシシンB1誘導体を免疫原として用いるよりもアフマトキシシンM1との反応性の高い抗体を得ることは可能と考えられる。

40

【0044】

これらの作業仮説を勘案し、アフマトキシシンの各類縁体に同等に反応する抗体を作製す

50

るため、アフラトキシンB 2をハプテンとして選択し、モノクローナル抗体作製技術により、目的の反応性を示す抗体の作製を目指すことにした。

【0045】

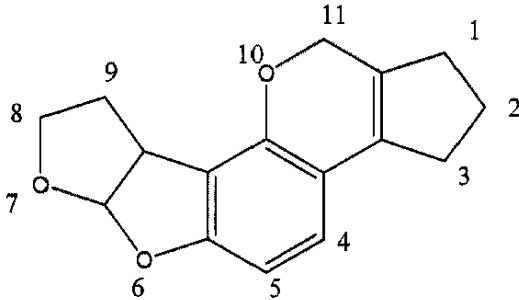
本発明に用いられるアフラトキシンB 2またはその誘導体由来する抗原は、アフラトキシンB 2自体、アフラトキシンB 2から公知の様々な方法を用いて誘導される化合物と、高分子化合物との複合体が好都合に使用され得る。

【0046】

ここで、アフラトキシンB 2誘導体は、アフラトキシンB 2に、特に高分子化合物との結合を容易にする為の公知の様々な反応基を導入した化合物を指す。本明細書でアフラトキシンB 2誘導体というときには、下記の骨格を有し、

10

【化7】



20

かつ、アフラトキシンB 2の1位または11位のカルボニル基に反応基を導入した化合物を指す。

【0047】

特に好ましいアフラトキシンB 2誘導体は、式(1)で表される化合物であり、限定はされないが、例えばアフラトキシンB 2の1位のケトン基を、*Chu, F. S., Hsia, M-T. S., Sun. P., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 791 (1977)*の記載に準じて、カルボキシメトキシイミノ誘導体に変換することにより得ることができる。

【0048】

上述のような製造方法によって得られた化合物を、必要に応じてシリカゲルクロマトグラフィー又は再結晶操作等を行うことにより、純度の高い、目的の化合物を得ることができる。

30

【0049】

次に、アフラトキシンB 2誘導体と高分子化合物との複合体の作製は、限定はされないが、例えば以下のような方法を用いて、製造することができ、免疫用抗原として使用する。

【0050】

好ましい高分子化合物の例としては、スカシガイヘモシアニン(KLH)、卵白アルブミン(OVA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ウサギ血清アルブミン(RSA)などがある。

40

【0051】

アフラトキシンB 2誘導体と高分子化合物との結合は、例えば、誘導体中のカルボキシ基と高分子化合物とを活性化エステル法(A. E. Karu et al. : *J. Agric. Food Chem.*, 42, 301-309 (1994))、又は混合酸無水物法(B. F. Erlanger et al. : *J. Biol. Chem.*, 234, 1090-1094 (1954))等の公知の方法によって結合させることにより達成することができるが、特に限定はされない。

【0052】

さらに、上記と同様の方法により酵素等の標識物質をアフラトキシンB 2誘導体に結合させたものを、免疫学的検出方法において使用することができる。標識物質としては、放

50

放射性同位元素、蛍光物質、発光物質などがある。放射性同位元素としては、特に限定されるものではないが、例えば $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが好ましい。酵素としては、特に限定されるものではないが、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ（以下「HRP」と言う）、リンゴ酸脱水素酵素などが挙げられる。蛍光物質としては、特に限定されるものではないが、例えばフルオレスカミン、フルオレセインイソチオシアネートなどが挙げられる。発光物質としては、特に限定されるものではないが、例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが挙げられる。

【0053】

10

本発明では、アフラトキシンB2誘導体と高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより、アフラトキシンに対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を得ることができる。

【0054】

ポリクローナル抗体の作製は、例えば、式(1)の化合物のようなアフラトキシンB2誘導体と高分子化合物との複合体を用いて、各種動物の抗体産生が可能な部位、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって投与することにより、行いうる。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバント、又は不完全フロイントアジュバントを投与することもできる。

【0055】

20

抗原の投与は、1回のみでも良いが、通常は2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。ポリクローナル抗体を作製する動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられる。

【0056】

血清中の本発明の抗原に対する抗体価の測定は、液相法（例えば、標識化した本発明の抗原と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定する方法）、或いは固相法（例えば、96穴プレートの各ウェル内壁面に本発明の抗原を固着させておき、ここに血清を適当に希釈した溶液を添加し、抗体を抗原に結合させた後、ウェル中の溶液を洗浄することで夾雑物を除去し、ウェル内壁面に結合した抗体量を測定する方法）によりなされる。

30

【0057】

本発明のポリクローナル抗体の分離精製は、免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。これは、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAEなど）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法などが含まれ、単独であるいは適宜組み合わせで行い得る。

【0058】

モノクローナル抗体自体の製造も、通常の方法に従って調製できる。（例えば、*Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13 (2000)*）。具体的には、前記複合体を常法に従ってウサギ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを培養することにより得ることができる（*Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4 ~11.11*）。

40

【0059】

このようにして得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを一定の条件下にて培養し、抗体価を測定しながら、所望の性質を有する抗体をスクリーニングする。

【0060】

モノクローナル抗体の分離精製は、ポリクローナル抗体と同様に、免疫グロブリンの分

50

離精製法に従って行われる。すなわち、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAEなど）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法などが含まれ、単独あるいは適宜組み合わせで行い得る。

【0061】

また、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、特に限定されないが、下記のような常法に従って調製されうる。

【0062】

抗原をアジュバントと等量混合した後、BALB/cマウスの腹腔内に投与する。その後、定期的に追加免疫する。採取血液の血清中の抗体力価が高くなったマウスの脾臓を摘出し、無血清DMEM培地（ダルベッコ改変イーグル培地）中で、組織片等を取り除いた後に新しい培地中に移し、脾臓細胞を完全に培地中に浮遊させる。細胞を洗浄後、マウスのミエローマ細胞と混合する。細胞を沈殿させ上清を取り除いたあと、攪拌しながら50%ポリエチレングリコール（分子量1500）などを用いて細胞融合を行う。細胞融合後、HAT培地中などで懸濁し、適度な条件下にて培養する。培養液中の抗体の活性をELISAで調べ、目的とする抗体を産生しているウェルの細胞について、限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行う。クローニングにより、アフラトキシンに対する抗体を産生している安定なハイブリドーマ株を得る。

【0063】

本発明のハイブリドーマは、培地（例えば、10%牛胎児血清を含むDMEM）を用いて培養し、その培養液の遠心上清をモノクローナル抗体溶液とすることができる。また、本ハイブリドーマを由来する動物の腹腔に注入することにより、腹水を生成させ、得られた腹水をモノクローナル抗体溶液とすることができる。これらの抗体溶液は、さらに精製・濃縮することができる。

【0064】

本発明の用語で、抗体の「フラグメント」とは、抗原を認識する部位を含む抗体の断片を指す。

【0065】

また、本発明においては、アフラトキシンに特異的に結合する抗体を含むことにより、アフラトキシンを簡便に検出することができ、検出手段としてのキットおよび後述するアフラトキシンの検出方法に好適に使用することができる。前記キットは、さらに、検出法に応じて、標識された二次抗体もしくは標識されたアフラトキシンのハプテン化合物、緩衝液、検出試薬および/またはアフラトキシンの標準溶液等を含む。好ましいキットは、ELISA法や金コロイドを用いた検出法に用いられうるものであり、直接競合阻害ELISA法を用いる場合、固相化されたアフラトキシンに対する抗体、抗体を保持する担体、酵素標識された抗原および検出試薬などを含む。

【0066】

さらに、本発明は、前記抗体または検出手段を用いることを特徴とするアフラトキシンの検出方法に関する。検出方法としては、通常の抗原-抗体反応を利用する方法であれば特に制限されず、放射性同位元素免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光もしくは発光検出法、凝集法、イムノプロット法、イムノクロマト法等（Meth. Enzymol., 92, 147-523 (1983), Antibodies Vol. II IRL Press Oxford (1989))が挙げられる。標識の手段としては、酵素、金コロイド、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質などがある。放射性同位元素としては、特に限定されるものではないが、例えば $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが好ましい。酵素としては、特に限定されるものではないが、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが挙げられる。蛍光物質としては、特に限定されるものではないが、例えばフルオレスカミン、フルオレセインイソチオシアネートなどが挙げられる。発光物質としては、特に限定されるもの

ではないが、例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが挙げられる。これらのうち、特に感度や簡便性等の点から、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素を用いるELISA、あるいは金コロイドを用いたイムノクロマトが好ましい。

【0067】

代表的なELISAによる検出法は、間接競合阻害ELISAまたは直接競合阻害ELISAなどが挙げられる。例えば以下に述べるような本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を用いた直接競合阻害ELISAによってアフラトキシンの検出を行うことができる。

【0068】

(1) 本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を、担体に固相化する。用いる担体は、96穴、48穴、192穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、例えば、固相化用抗体を含む緩衝液を担体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗体の濃度は、通常 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ から $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

【0069】

(2) 担体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗体が吸着していない固相表面部分を、抗体と無関係なタンパク質等によりブロッキングする。ブロッキング剤としては、BSAもしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース（大日本住友製薬社製）等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を担体に添加し、例えば、約 4°C で一晩インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記(1)と同じ緩衝液を使用することができる。

【0070】

(3) 各種濃度のアフラトキシンを含む試料に、アフラトキシンのハプテン化合物と酵素を結合させた酵素結合ハプテンを加えた混合物を調製する。酵素結合ハプテンの調製は、アフラトキシンのハプテン化合物を酵素に結合する方法であれば特に制限なく、いかなる方法で行ってもよい。

【0071】

(4) 工程(3)の混合物を工程(2)で得られた抗体固相化担体と反応させる。アフラトキシンのハプテン化合物と酵素結合ハプテンとの競合阻害反応により、これらと固相化担体との複合体が生成する。反応は例えば、約 25°C で約1時間行う。アフラトキシンは、水に不溶性であるため、反応溶液中には各種有機溶媒を含有することができる。前記有機溶媒としては、アフラトキシンを溶解させ、かつ抗原-抗体反応を阻害しない範囲で有機溶媒およびその含有量を選択すればよい。具体的には、メタノール、アセトニトリルなどがあげられ、含有量は、アセトニトリルの場合は $1\%(\text{v}/\text{v})$ 以上 $20\%(\text{v}/\text{v})$ 以下であり、メタノールの場合は $1\%(\text{v}/\text{v})$ 以上 $40\%(\text{v}/\text{v})$ 以下、好ましくは $1\%(\text{v}/\text{v})$ 以上 $30\%(\text{v}/\text{v})$ 以下の濃度の溶剤が使用できる。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、固相化抗体と結合しなかった酵素結合ハプテンを除去する。固相化抗体-酵素結合ハプテン複合体の量を検出することにより、予め作成した検量線から試料中のアフラトキシンの量を決定する。

【0072】

(5) 担体に結合した標識酵素と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を検出することによって検量線からアフラトキシンの量を算出することができる。標識酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、例えば、過酸化水素と、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンまたはo-フェニレンジアミンを含む発色基質溶液を使用することができる。通常、発色基質溶液を加えて室温で約10分程度反応させた後、硫酸を加えることにより酵素反応を停止させる。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを使用する場合、 450nm の吸光度を検出する。o-フェニレンジアミンを使用する場合、 492nm の吸光度を検出する。なお、バックグラウンド値を補正するため、 630nm の吸光度も

10

20

30

40

50

同時に検出することが望ましい。

【0073】

標識酵素としてアルカリホスファターゼを使用する場合には、例えば p-ニトロフェニルリン酸を基質として発色させ、NaOH 溶液を加えて酵素反応を止め、415 nm での吸光度を検出する方法があげられる。

【0074】

アフラトキシンを添加しない反応溶液の吸光度に対して、アフラトキシンを添加して抗体と反応させた溶液の吸光度の減少率を阻害率として計算する。既知の濃度のアフラトキシンを添加した反応液の阻害率により予め作成しておいた検量線を用いて、試料中のアフラトキシンの濃度を算出することができる。

10

【0075】

別の態様としてアフラトキシンの検出は以下のような手順により間接競合阻害 ELISA によって行うことができる。

(1) 抗原を担体に固相化する。

用いる担体は、通常の ELISA に用いる担体であれば特に制限されないが、96 穴、48 穴、192 穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、例えば、固相化用抗原を含む緩衝液を担体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗原の濃度は、通常 $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ から $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

【0076】

20

(2) 担体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗原が吸着していない固相表面部分を、抗原と無関係なタンパク質等によりブロッキングする。ブロッキング剤としては、BSA もしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース (大日本住友製薬社製) 等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を担体に添加し、例えば、約 4°C で一晚インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記 (1) と同じ緩衝液を使用することができる。

【0077】

(3) 前記 (1) および (2) で処理された固相表面にアフラトキシンを含む試料および本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体溶液を加え、該抗体を前記固相化抗原およびアフラトキシンに競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体およびアフラトキシンに対する抗体複合体を生成させる。反応は、通常室温、1 時間程度で行うことができる。アフラトキシンは、水に不溶性であるため、反応溶液中には各種有機溶媒を含有することが必要である。前記有機溶媒としては、アフラトキシンを溶解させ、かつ抗原-抗体反応を阻害しない範囲で有機溶媒およびその含有量を選択すればよい。具体的には、メタノール、アセトニトリルなどがあげられ、含有量は、アセトニトリルの場合は $1\% (v/v)$ 以上 $20\% (v/v)$ 以下であり、メタノールの場合は $1\% (v/v)$ 以上 $40\% (v/v)$ 以下、好ましくは、 $1\% (v/v)$ 以上 $30\% (v/v)$ 以下の濃度の溶媒が使用できる。

30

【0078】

40

(4) 固相化抗原-抗体複合体の量は、酵素標識した二次抗体 (例えば、マウス抗体を認識する抗体) を添加して検出することができる。例えばアフラトキシンに対する抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いる場合、酵素標識 (例えば、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ等) した抗マウス-ヤギ抗体を用いて、担体に結合したアフラトキシンに対する抗体と反応させるのが望ましい。反応は、前記 (3) と同様の条件下で行えばよい。反応後、緩衝液で洗浄する。

【0079】

(5) 担体に結合した二次抗体の標識酵素と反応する発色基質溶液を加え、二次抗体に結合させた酵素に反応する発色基質溶液を前述の直接競合阻害 ELISA 法と同様に加え、吸光度を検出することによりあらかじめ作成した検量線からアフラトキシンの量を算出

50

することができる。

【0080】

前記本発明の検出方法においては、検出対象物に応じた前処理をして試料とした後、直接競合阻害ELISAの工程または間接競合阻害ELISAに供することができる。ほとんどの食品の場合、アフラトキシンが抽出できる全ての方法を用いることができる。抽出物は、メタノールあるいはアセトニトリルに転溶させて緩衝液で希釈後、検出試料にする。簡便法として、メタノールあるいはアセトニトリルで抽出し緩衝液で希釈したものをそのまま試料とすることも可能である。

【0081】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントを担持した親和性カラムを用いてアフラトキシンの検出を行うこともできる。 10

【0082】

本発明においては、アフラトキシンのすべてのタイプに結合し、かつ耐有機溶媒性を有する抗体を含むことにより、被検試料中に含まれるアフラトキシンの個別の量および総量を、固相吸着剤を用いて検出、濃縮および／または精製することができる。このような方法は、特に限定されないが、例えば以下に説明するような方法が用いられ得る。

【0083】

精製された本発明の抗体又はそのフラグメントを用いて、例えば、ファーマシア・ファイン・ケミカルズに記載された以下の方法によって親和性マトリックス材料（担体）をつくることができる。抗体としては、ポリクローナル抗体もモノクローナル抗体およびそれらのフラグメントも使用することができるが、特にモノクローナル抗体を好適に用いることができる。この場合、十分量のモノクローナル抗体を、NaHCO₃とNaClとを含む結合緩衝液（pH 8.3）に溶解し、この抗体溶液を、例えば予めHCl中で一夜インキュベートした、臭化シアンによって活性化されたセファロース-4B（シグマ社）に加える。セファロースと抗体溶液とを反応させた後、この固相吸着材料を、例えば1.0Mのエタノールアミン（pH 8.5）で適度な時間インキュベートすることによって、抗体が結合されたゲルの未結合部位をブロックする。固相吸着材料上に固定化されたモノクローナル抗体によって親和性マトリックスが形成され、これをアフラトキシンの検出用に用いることができる。 20

【0084】

好ましい固相吸着材料は活性化されたセファロース4Bゲルであるが、これに限定されない。他の様々な材料を固相材料として用いることができる。例えば他のアガロースゲル組成物、デキストラン、ガラス板を包含する炭素及びケイ素粒状製剤を挙げることができる。同様に、モノクローナル抗体をそれぞれの化学組成物上に固定化する方法もこの分野において公知であり、種々記載されている。 30

【0085】

本発明における液体試料中のアフラトキシンを検出、単離、濃縮および／または精製する方法には、次の工程を含む親和性クロマトグラフィー法が例示されるが、これに限定されない。まず、本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体またはそのフラグメントが固相吸着材料上に固定化された、均一な親和性マトリックスに、被検試料中のアフラトキシンが結合され保持されるように、被検試料と親和性マトリックスとを接触させる。この際、被検試料を溶解した溶剤としてはアセトニトリルまたはメタノールなどがあるが、これらに限定されない。アセトニトリルの場合は1%（v/v）以上20%（v/v）以下であり、メタノールの場合は1%（v/v）以上40%（v/v）以下、好ましくは1%（v/v）以上30%（v/v）以下の濃度の溶剤が使用できる。次に、本発明のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはそのフラグメントからアフラトキシンを放出させるための溶離剤を親和性マトリックスに加える。この溶離剤は、アセトニトリルまたはメタノールなどであるが、これらに限定されない。次に、このような親和性マトリックスからの回収された流出物中にアフラトキシンが存在するかどうか、どのタイプがどれだけ含まれるかを、例えばHPLCなどを用いて同定することができる。 40 50

【0086】

本発明における液体試料中のアフラトキシンを濃縮・精製する方法には、本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体あるいはそのフラグメントを固定化した親和性マトリックス材料を用いた以下の方法が例示されるが、これに限定されない。まず、本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体またはそのフラグメントが固相吸着材料上に固定化された、均一な親和性マトリックスに、被検試料中のアフラトキシンが結合され保持されるように、被検試料と親和性マトリックスとを接触させる。次に、夾雑物を洗浄除去する。そして、本発明のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体またはそのフラグメントからアフラトキシンを放出させるための溶離剤を親和性マトリックスに加える。このようにして、液体試料中のアフラトキシンを、免疫学的に夾雑物の少ない状態で、元の試料中の濃度の数千から数万倍もの高倍率に濃縮できる。これにより、試料中に極微量しか存在しないアフラトキシンでも、抗体を利用しない他の濃縮方法と比較して、はるかに高倍率に濃縮することができ、しかも定量を妨害する夾雑物等の含量の少ない濃縮液を得ることができる。被検試料を溶解して親和性マトリックスと接触させるのに用いる溶剤は、アセトニトリルまたはメタノールなどであるが、これらに限定されない。アセトニトリルの場合は、1% (v/v) 以上20% (v/v) 以下であり、メタノールの場合は、1% (v/v) 以上40% (v/v) 以下、好ましくは1 (v/v) 以上30% (v/v) 以下の濃度のものが使用できる。

【0087】

本発明のアフラトキシンに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の重要な特徴は、アフラトキシンB2抗原に対するだけでなく、B1、G1、G2、M1のいずれに対しても同等の高い結合能（親和性）を有することである。さらに、通常の既存の抗アフラトキシンB1モノクローナル抗体と比較して優れた有機溶媒耐性を有する。従って、被検試料を溶解して親和性マトリックスと接触させるのに用いる溶剤には、比較的高い濃度の有機溶媒を用いることができる。

【0088】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例1】

【0089】

(1) 式(1)の化合物(アフラトキシンハプテン)の合成

アフラトキシンB2(和光純薬) 8.2mg (26.1 μ mol)をピリジン:メタノール:水(1:4:1)溶液6.3mlに溶解し、アミノオキシ酢酸ヘミ塩酸塩10.3mg (93.9 μ mol)を加え、2時間加熱還流した。これを濃縮し、残渣をシリカゲルカラム(クロロホルム:メタノール=9:1)で精製し、白色粉末のアフラトキシンB2ハプテン9.1mg(収率90%)を得た。

【0090】

得られたB2ハプテンのTLC(和光純薬製シリカゲル70F254プレート; 展開溶媒は、クロロホルム:メタノール=9:1)でのRf値は、アフラトキシンB2が0.70であったのに対してハプテンは0.54だった。

【実施例2】

【0091】

(免疫原の調製)

免疫原としてスカシガイヘモシアニン(KLH)と実施例1で得られた式(1)で示されるハプテンとの複合体を、活性エステル法を用いて作製した。

【0092】

実施例1で製造したアフラトキシンB2ハプテン3.3mg、N-ヒドロキシスクシンイミド2.2mg、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩3.7mgをジメチルスルホキシド0.5mlに溶解し、この溶液を室温、暗所で1.5時間攪

拌し、アフラトキシンB2ハプテン溶液とした。別途、0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)1mlにK L H 10mgを加え、これにアフラトキシンB2ハプテン溶液248 μ lを徐々に滴下し、室温、暗所で1.5時間攪拌した。反応終了後、4℃で2日間、生理的リン酸緩衝液(150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸緩衝液)に対して透析した後、-40℃で貯蔵した。同様にアフラトキシンハプテンとBSAとの複合体を作製した。このようにして得られたアフラトキシンハプテンとK L Hとの複合体を免疫原として使用した。

【実施例3】

【0093】

(モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製)

10

実施例2で調製した免疫原を2mg/mLとなるように生理的リン酸緩衝液に溶解し、これに等量の完全アジュバント(商品名:フロイント完全アジュバント;FCA)を等量混合しエマルジョン化し、その100 μ Lを6~7週齢のメスのBALB/cマウスに腹腔投与した。これと同様の手順で、不完全アジュバント(商品名:フロイント不完全アジュバント;FICA)を等量混合した0.5mg/mLの免疫原100 μ Lを2週間毎に追加免疫した。4回の免疫後、眼底から採血し、血清中の抗体力価が十分に上がっていることを間接ELISAにて確認した。

【0094】

間接競合阻害ELISA法によるアフラトキシンの検出

(1) 実施例2で得られたアフラトキシンハプテンとBSAとの複合体を、150mM NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液を用いて1 μ g/mLに希釈し、96穴マイクロプレートに100 μ L/ウェルずつ分注し、4℃で一晩放置することにより固相化した。次に液を吸引除去後、0.4%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸ナトリウム緩衝液を300 μ L/ウェル分注し、4℃で一晩静置することによりブロッキングを行った後、ブロッキング液を吸引除去した。

【0095】

(2) メタノールに溶解したアフラトキシンB1、B2、G1、G2、およびM1それぞれの標準溶液0、100、250、500、1000、2500、5000、および10000ng/mLを、0.2%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸ナトリウム緩衝液にそれぞれ1%添加し、アフラトキシンの濃度が0.0、1.0、2.5、5.0、10、25、50、および100ng/mLになるよう調製した。各アフラトキシンの希釈溶液を(1)で作製したアフラトキシンハプテンとBSAとの複合体固相化プレートに50 μ L/ウェルずつ分注した。先に得られた抗血清を、0.2%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸ナトリウム緩衝液で20,000倍希釈したものをさらに50 μ L/ウェルずつ添加して、25℃で1時間静置しアフラトキシンの競合阻害反応をさせた。

【0096】

(3) HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)と抗マウスIgGヒツジ抗体の複合体(ICN社)を、0.2%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸ナトリウム緩衝液で4000倍に希釈して2次抗体希釈液とした。

【0097】

(4) (2)で反応させたウェルを、150mM NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液で3回洗浄したあと、上記の2次抗体希釈液を100 μ L/ウェル分注して、25℃1時間静置して反応させた。

【0098】

(5) 上記の(4)で反応させた後のウェルを、150mM NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液で3回洗浄し、TMB基質溶液(100 μ g/mLの3',5'-テトラメチルベンチジンおよび0.006%過酸化水素を添加した0.1N酢酸ナトリウム溶液(pH5.5))100 μ Lをウェルに加え、25℃で10分間インキュベーションした後、1N硫酸100 μ Lをウェルに加えて発色反応を止め、450nmの吸光度をマイクロプレートリー

50

ダーで検出した。この実施例におけるアフラトキシンB 2についての結果を図1に示す。

【0099】

モノクローナル抗体の確認

マウスの血中の抗体価が十分に高くなったマウスを用いて、最終免疫（10 μg/マウス）した。その3日後に当該マウスから脾臓を摘出し細胞融合に供した。

【0100】

摘出した脾臓を無血清DMEM培地（ダルベッコ改変イーグル培地）中で余分な組織片を切除したあと、脾臓から完全に細胞を取り出し、培地中に浮遊させた。浮遊している大きな組織片を沈降させるために5分間静置、細胞浮遊液を遠沈管に集め、1500 rpmで遠心し、上清を吸引除去して、新しい無血清DMEMを添加して細胞を浮遊させた。この操作を2回繰り返した。

10

【0101】

あらかじめ培養してあったミエローマ細胞（P3X63Ag8.653）を回収し、遠沈、上清除去、無血清DMEM培地で再浮遊を2回繰り返した。

【0102】

それぞれの細胞数を計数して脾臓細胞とミエローマ細胞との比率が10:1~7.5:1になるように混合し、1500 rpmで5分間遠心して、上清を吸引除去した。

【0103】

遠沈管を激しく攪拌しながら50%ポリエチレングリコール（分子量1500）溶液2 mLを約60秒かけて添加した。次いで約10 mLの無血清DMEMを攪拌しながら3~4分かけて添加した。

20

【0104】

遠沈管を1000 rpm, 5分で遠心して上清を完全に吸引除去し、脾臓細胞が 2.5×10^6 個/mLになるようにHT培地（ヒポキサンチン、チミジン、10%牛胎児血清入DMEM培地）に浮遊させ、96穴培養プレートに100 μL/ウェル分注し、37℃、8%炭酸ガス、加湿条件下で培養を開始した。

【0105】

翌日に約40 μL/ウェルのHAT培地（ヒポキサンチン、チミジン、アミノプテリン、10%牛胎児血清入DMEM培地）を添加し、ミエローマ細胞が死滅し、ハイブリドーマ細胞のコロニーが形成されるまで観察を続け、以後は細胞の状態を見ながらHT培地を添加した。

30

【0106】

培養開始から10日後に培養液を採取し、間接競合阻害法でアフラトキシンに対する抗体を産生しているウェルをスクリーニングし、96ウェル、48ウェル、24ウェルと順次培養スケールを上げた。

【0107】

24ウェルの段階で限界希釈法によるクローニングを行ない、アフラトキシンに対するAFB2-3-7F3-3モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を得た。得られたハイブリドーマについては、受託番号FERM P-21126の下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国内寄託した。また、受領番号FERM AB P-10931の下、2007年11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国際寄託した。

40

【0108】

ここで、ハイブリドーマのスクリーニングは、アフラトキシンB1, B2, G1, G2との反応性が1ppbを下回りかつほぼ等価であることを指標に行った。また、濃度を変えたアセトニトリルおよびメタノール存在下でのアフラトキシンB1との反応性が、可能な限り高いものを選択することを指標にスクリーニングを行うことで、AFB2-3-7F3-3抗体産生細胞以外にも複数の同様な反応特性を示す抗体産生細胞を選択することができた。

【実施例4】

50

【0109】

(モノクローナル抗体の作製)

実施例3で得られたAFB2-3-7F3-3抗体産生ハイブリドーマ株を10%牛胎児血清入りDMEMで培養し、約 2×10^6 個の細胞をBALB/cメスRetireマウスの腹腔内に注射し、腹水液を採取した。得られた腹水はプロテインGカラムによりIgG精製を行った。得られたモノクローナル抗体はサブクラスがIgG1、Light chainが λ 鎖であった。

【0110】

一方、AFB2-3-7F3-3抗体産生細胞を、10%牛胎児血清添加ダルベッコMEM培地を用いて、37°C、5%炭酸ガス存在下で培養し、コンフルエントに増殖させた。これを、1500rpmで遠心分離することによって培養上清を得た。培養上清は0.2%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸ナトリウム緩衝液で50倍に希釈して間接競合阻害法に用いた。

【実施例5】

【0111】

間接競合阻害ELISA法によるアフラトキシンの検出

(1) 実施例2で得られたアフラトキシンハプテンとBSAとの複合体を、150mM NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液で $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、96穴マイクロプレートに $100 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ ずつ分注し、4°Cで一晩放置することにより固相化した。次に液を吸引除去後、0.4%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸ナトリウム緩衝液を $300 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ 分注し、4°Cで一晩静置することによりブロッキングを行った後、ブロッキング液を吸引除去した。

【0112】

(2) メタノールに溶解したアフラトキシンB1、B2、G1、G2、M1それぞれの標準溶液0、10、25、50、100、250、500、および $1000 \text{ ng}/\text{mL}$ を、0.2%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸ナトリウム緩衝液にそれぞれ1%添加し、アフラトキシンの濃度が0.0、0.1、0.25、0.50、1.0、2.5、5.0、及び $10.0 \text{ ng}/\text{mL}$ になるよう調製した。各アフラトキシンの希釈溶液を(1)で作製したアフラトキシンハプテンとBSAとの複合体固相化プレートに $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ ずつ分注した。さらに実施例4で得られたモノクローナル抗体AFB2-3-7F3-3産生細胞培養液を、0.2%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mMリン酸ナトリウム緩衝液で50倍希釈したものを $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ ずつ添加して、25°Cで1時間静置しアフラトキシンの競合阻害反応をさせた。

【0113】

以降は実施例3と同様の操作を行った。

【0114】

モノクローナル抗体AFB2-3-7F3-3溶液についての間接競合阻害法によるアフラトキシンB1、B2、G1、G2、M1のそれぞれの標準阻害曲線を図2に示す。モノクローナル抗体AFB2-3-7F3-3溶液を用いた間接競合阻害ELISA法により、すべてのタイプのアフラトキシンに対して IC_{50} 値がB1:0.26、B2:0.34、G1:0.34、G2:0.34、M1:0.4であることから、B1、B2、G1、G2、M1の反応性の違いが IC_{50} 値でB2を中心に $\pm 50\%$ 以内にあり、同等の検出感度を表すことがわかった。

【0115】

実施例3で得られた他のハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体についても同様の実験を行った。その結果、例えば、モノクローナル抗体AFB2-2-5E10-1溶液からは、すべてのタイプのアフラトキシンに対して IC_{50} 値がB1:0.33、B2:0.44、G1:0.43、G2:0.57、M1:0.55およびAFB2-3-4E4-1溶液からはB1:0.3、B2:0.44、G1:0.43、G2:0.53、M

1 : 0.58 となった。

【0116】

これらの値は、本発明の抗体が、アフラトキシンB1、B2、G1、G2、およびM1のすべてに対して優れた結合能を有することを示している。これまでに存在するアフラトキシンに対するモノクローナル抗体では、B1をハプテンとして誘起したものがあるが、いずれも他のタイプのアフラトキシンへの結合能との比較において、本明細書でいう「同等の結合能を有する」ものではない。例えば、特開昭63-219394では、B1をハプテンとし、B1に特異的な抗体の取得を意図しており、それ故にB1あるいはB2に対する結合能と比較して、G1に対する結合能は、桁違いに減少している。例えば表1でAF-1と称される抗体では、結合能の違いが一番少ないが、それでも、B1またはB2に対して、G1に対する結合能は、1/10程度である。一方、全アフラトキシンの検出に有用なモノクローナル抗体として作成されている例もあるが、例えば、特開平4-360695に示される例では、アフラトキシンB1、B2、G1、およびG2の交差反応性は、IC₅₀。値の比較で、それぞれ、0.44 ng/ml、2.1 ng/ml、2.4 ng/ml、5.2 ng/mlなどとなっている。

10

【0117】

以上の結果から、本発明のアフラトキシンハプテン化合物を用いて得られるモノクローナル抗体を使用する間接競合阻害ELISA法により、すべてのタイプのアフラトキシンの総量分析および各アフラトキシン類縁体間の分析が高感度で可能となることがわかる。

20

【実施例6】

【0118】

抗体のメタノール耐性

モノクローナル抗体 AFB2-3-7F3-3のメタノール耐性を調べた。0%、20%、40%、60%、80%、100%メタノール水溶液を調製し、それぞれのメタノール水溶液に、0.2%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mM リン酸ナトリウム緩衝液を19:1の割合で混合し、さらに各メタノール濃度の水溶液にアフラトキシンB2標準液0、10、25、50、100、250、500および1000ng/ml溶液をそれぞれ1%添加してアフラトキシンB2濃度0、0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、および10.0ng/mlとなるよう調製した。実施例3の(1)で作製したアフラトキシンハプテンとBSAとの複合体固相化プレートに各メタノール濃度、各アフラトキシンB2濃度の溶液を50μl/ウェル添加した。

30

【0119】

一方、モノクローナル抗体 AFB2-3-7F3-3の産生細胞培養液を、0.2%BSAおよび150mM NaClを含みpH7.0に調節した10mM リン酸ナトリウム緩衝液で2.5倍に希釈し、さらに0%、20%、40%、60%、80%、100%メタノール溶液にそれぞれ19:1の割合で添加して抗体希釈液とした。

【0120】

先に記した各濃度のアフラトキシンB2溶液を分注したプレートに、メタノール濃度の同じウェルへ抗体希釈液を50μl/ウェルずつ添加して、25℃で1時間静置して反応させた。以後は実施例3の(3)、(4)、(5)に示す通り反応を行い反応液中メタノール濃度それぞれにおける阻害曲線を求めた。

40

【0121】

その結果を図3に示す。アフラトキシン抗体AFB2-3-7F3-3は、38%メタノール中でも、阻害曲線が乱れず、メタノールに対し高い耐性を有していた。食物中に存在しているアフラトキシンを抽出する際、メタノールは一般的に使用される非常に優れた溶媒であり、メタノールに対し高い耐性を有することはアフラトキシン検出用の抗体としてAFB2-3-7F3-3は極めて有用であることを示している。

【実施例7】

【0122】

抗体のアセトニトリル耐性

50

モノクローナル抗体 AFB2-3-7F3-3のアセトニトリル耐性を調べた。0%、20%、40%、60%、80%、100%アセトニトリル水溶液を調製し、各アセトニトリル濃度の水溶液にアフラトキシンB2標準液0、10、25、50、100、250、500および1000 ng/ml溶液をそれぞれ1%添加してアフラトキシンB2濃度0、0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、および10.0 ng/mlとなるよう調製した。実施例3の(1)で作製したアフラトキシンハプテンとBSAとの複合体固相化プレートに各アセトニトリル濃度、各アフラトキシンB2濃度の溶液を50 μ l/ウェル添加した。

一方、モノクローナル抗体 AFB2-3-7F3-3の産生細胞培養液を0.2% BSAおよび150 mM NaClを含みpH7.0に調節した10 mM リン酸ナトリウム緩衝液で50倍に希釈し、先のプレートの各ウェルに50 μ l/ウェル分注した。25℃で1時間静置して反応させ、以後は実施例3の(3)、(4)、(5)に示す通り反応を行い反応液中アセトニトリル濃度0%、10%、20%、30%、40%、50%における阻害曲線を求めた。

【0123】

その結果を図4に示す。アフラトキシン抗体AFB2-3-7F3-3は、20%アセトニトリル中でも、阻害曲線が乱れず、アセトニトリルに対し高い耐性を有していた。食物中に存在するアフラトキシンを抽出する際、アセトニトリルは一般的に使用される非常に優れた溶媒であり、アセトニトリルに対し高い耐性を有することはアフラトキシン検出用の抗体としてAFB2-3-7F3-3は極めて有用であることを示している。

【実施例8】

【0124】

ゲルの調製

NHS活性化セファロース4FF (GEヘルスケアバイオサイエンス) 1 mLを、1 M 冷塩酸10 mLで3回洗浄した。ここに、実施例4で得られた抗体(0.5 mg/ml、0.2% BSAおよび150 mM NaClを含みpH7.0に調節した10 mM リン酸ナトリウム緩衝液にて希釈した抗体溶液) 10 mLを入れ、室温で4時間攪拌後、モノエタノールアミン緩衝溶液、酢酸ナトリウム緩衝溶液、モノエタノールアミン緩衝溶液の順に10 mLで3回ずつ洗浄した。これに、モノエタノールアミン緩衝溶液10 mLを加え、室温で3時間攪拌し、酢酸ナトリウム緩衝溶液、モノエタノールアミン緩衝溶液、酢酸ナトリウム緩衝溶液、リン酸緩衝液の順に10 mLで3回ずつ洗浄した。

【実施例9】

【0125】

アフラトキシン用アフィニティーカラムの調製

実施例8で調製したゲル0.2 mLをエンブティーカーラムにつめ、150 mM NaClを含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液3 mLで2回ずつ洗浄した。

【実施例10】

【0126】

アフラトキシン用アフィニティーカラムによる添加回収実験

このカラムに、アフラトキシンB1、B2、G1、G2のすべてのタイプについて、各々5 ng、10 ng、25 ng、50 ng、100 ng、および200 ng含む2%アセトニトリル溶液6種類を調整し、その各10 mLを添加した。次にこのカラムをさらに150 mM NaClを含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液3 mLにて2回、水3 mLにて2回ずつ洗浄し、100%アセトニトリル1 mLにて3回溶出した。

【0127】

次に、得られた溶出液をHPLCで分析し、アフラトキシンB1、B2、G1、G2のそれぞれのタイプの溶出量を測定した。HPLCの条件は、以下の通りである。すなわち、カラムは、ODSカラム(4.6 \times 150 mm、5 μ m)、移動相：アセトニトリル-メタノール-0.2 M酢酸アンモニウム緩衝液(pH5.0)-水(1:3:0.5:5.5)、流速1.0 mL/min、カラム温度40℃、検出器：蛍光検出器(励起波長

360 nm、蛍光波長450 nm)、注入量：100 μ l、フォトケミカルリアクター (Aura Industries Inc.) をカラム-検出器間に設置した。

【0128】

回収率 (%) は、表1に示すとおりである。

【表1】

	アフラトキシン					
	5ng	10ng	25ng	50ng	100ng	200ng
G2	107	100	95	94	89	46
G1	95	95	94	92	89	54
B2	108	98	91	88	88	61
B1	99	94	89	87	88	72

(明示なき数値の単位は%)

10

表1から、アフラトキシンB1、B2、G1、G2のすべてのタイプについて、5 ng から100 ngまで、ほぼ確実に回収できていることがわかった。

【実施例11】

【0129】

実施例10において調製した、本発明のモノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムと市販されているアフラトキシン用アフィニティーカラムを用いて、比較実験を行った。実施例10で調製したこのカラム、および市販カラムA、B、Cに、アフラトキシンB1、B2、G1、G2のそれぞれのタイプについて50 ngを含む20%アセトニトリル溶液各10 mlのアフラトキシン標準品を添加した。次にこのカラムをさらに150 mM NaClを含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液3 mlにて2回、水3 mlにて2回ずつ洗浄し、100%アセトニトリル1 mlにて3回溶出した。図5は、それぞれのカラムにおけるアフラトキシンのタイプB1、B2、G1およびG2の回収率を示している。

20

【0130】

図5から分るように、市販のカラムでは各アフラトキシン類縁体間に回収率の差が認められるのに対し、本発明のモノクローナル抗体を固定化したアフィニティーカラムを用いると、類縁体間で回収率に殆ど差が認められず、アフラトキシン類縁体の全てを濃縮・精製するための理想的な性質を有している。さらに、本発明のモノクローナル抗体を固定化したアフィニティーカラムにおいては、20%アセトニトリルといった、高い有機溶媒含有率を有する溶剤をも使用することができる。

30

【0131】

以上より、本発明で得られたモノクローナル抗体ならびにその抗体を用いたアフラトキシン類を濃縮・精製することができるアフィニティーカラムを用いることで、高感度のアフラトキシン類の定量が可能になるばかりでなく、アフラトキシン類縁体個々の含有量や、アフラトキシン類縁体の総量の定量も可能になる。

40

【0132】

(参考例)

アフラトキシンB1について、アフラトキシンB2についての実施例1で示した方法によりアフラトキシンB1ハプテンを得た。このハプテン化合物を用いて実施例2で示した方法により免疫原を調製し、実施例3に示した方法によりマウスを免疫した。同様に家兎についても免疫した。実施例2で調製した免疫原を0.4 mg/mLとなるようにPBSに溶解し、これに等量の完全アジュバント(商品名：フロイント完全アジュバント；FCA)を混合しエマルジョン化し、その2 mLを2.5 kg~3.0 kgのメスの家兎(日本白色種)に皮内投与した。これと同様の手順で、不完全アジュバント(商品名：フロイント不完全アジュバント；FICA)を等量混合した免疫原を2週間毎に4回追加免疫した

50

。最終免疫後、1週間後に全採血し、血清中の抗体力価が十分に上がっていることを間接ELISAにて確認した。血清中の抗体力価を間接競合ELISA法にて確認した。結果を表2に示した。

【表2】

抗血清のアフラトキシン類縁体に対する結合活性

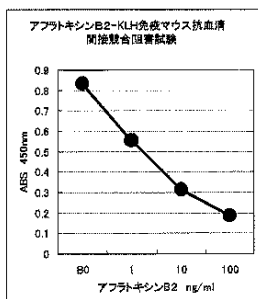
免疫動物	IC ₅₀ ng/ml (%)	
	マウス	家兎
アフラトキシンB1	0.07 (2163)	0.07 (2429)
アフラトキシンB2	1.5 (100)	1.7 (100)
アフラトキシンG1	0.6 (250)	0.63 (270)
アフラトキシンG2	16 (9)	18 (9)
アフラトキシンM1	11 (14)	14 (12)

10

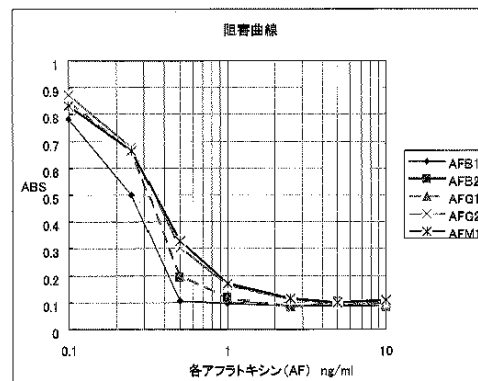
表2の結果から、アフラトキシンB1誘導体をハプテンとして用いて得られた免疫原により動物を免疫した結果、得られた抗血清はマウスにおいても家兎においてもアフラトキシンB1に対して特に高い結合活性が得られ、アフラトキシンG1に対してはそれに次ぎ、アフラトキシンG2やM1には低い結合活性しか認められなかった。

20

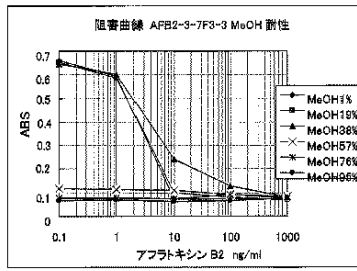
【図1】



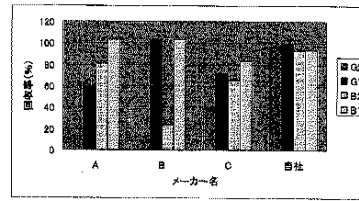
【図2】



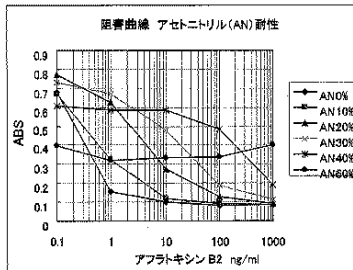
【図 3】



【図 5】



【図 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/072010
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/14(2006.01) i, C07D493/14(2006.01) i, C07D493/22(2006.01) i, C07K17/08(2006.01) i, C12N5/10(2006.01) i, C12P21/08(2006.01) i, G01N33/02 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/14, C07D493/14, C07D493/22, C07K17/08, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/BIOSIS/REGISTRY/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	Hastings, Kenneth L.; Tulis, Jerry J.; Dean, Jack H., Production and characterization of a monoclonal antibody to aflatoxin B2, Journal of Agricultural and Food Chemistry (1988), 36(2), 404-8	1-20
Y	JP 2001-187800 A (Toyobo Co., Ltd.), 10 July, 2001 (10.07.01), Abstract; Claims (Family: none)	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 December, 2007 (03.12.07)		Date of mailing of the international search report 18 December, 2007 (18.12.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 7 2 0 1 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/14(2006.01)i, C07D493/14(2006.01)i, C07D493/22(2006.01)i, C07K17/08(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/02(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/14, C07D493/14, C07D493/22, C07K17/08, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/02			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/BIOSIS/REGISTRY/WPIDS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
XY	Hastings, Kenneth L.; Tulis, Jerry J.; Dean, Jack H., Production and characterization of a monoclonal antibody to aflatoxin B2, Journal of Agricultural and Food Chemistry (1988), 36(2), 404-8	1-20	
Y	J P 2 0 0 1 - 1 8 7 8 0 0 A (東洋紡績株式会社) 2 0 0 1 . 0 7 . 1 0, 【要約】、【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-20	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 03.12.2007		国際調査報告の発送日 18.12.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内藤 伸一	4N 8615
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 30/88 (2006.01)	G 0 1 N 30/88 Z	
	G 0 1 N 30/88 1 0 1 Z	
	G 0 1 N 30/88 2 0 1 R	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4B065 AB05 BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	黄曲霉毒素抗体，使用该抗体的载体，黄曲霉毒素的免疫检测方法，黄曲霉毒素浓度和纯化方法		
公开(公告)号	JPWO2008059837A1	公开(公告)日	2010-03-04
申请号	JP2008544150	申请日	2007-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所		
申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所		
[标]发明人	内ヶ島美岐子 三宅司郎 山下弘		
发明人	内ヶ島 美岐子 三宅 司郎 山下 弘		
IPC分类号	C07K16/14 C12P21/08 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/548 G01N30/88		
CPC分类号	G01N33/56961 C07D493/14 C07D493/22 C07K16/14 C07K16/44 Y10S530/809		
FI分类号	C07K16/14 C12P21/08 C12N5/00.B G01N33/53.G G01N33/548.Z G01N30/88.Z G01N30/88.101.Z G01N30/88.201.R		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2006311200 2006-11-17 JP		
其他公开文献	JP5149806B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于检测，浓缩和纯化样品（例如食品）中可能包含的所有类型的黄曲霉毒素，并以高灵敏度检测其总量或单个量。黄曲霉毒素B2或其衍生物用作半抗原化合物，以显示每个黄曲霉毒素类似物之间的等效反应性，并同时获得对有机溶剂具有高度抗性的抗体。并构建了免疫学检测手段。构建的检测装置具有高灵敏度和优异的定量。

