

(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2016-145201

(P2016-145201A)

(43) 公開日 平成28年8月12日 (2016. 8. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/16 (2006.01)	C 1 2 N 5/16	4 C O 5 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-14329 (P2016-14329)
 (22) 出願日 平成28年1月28日 (2016. 1. 28)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-17356 (P2015-17356)
 (32) 優先日 平成27年1月30日 (2015. 1. 30)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 304027349
 国立大学法人豊橋技術科学大学
 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1 - 1
 (71) 出願人 500254354
 公益財団法人科学技術交流財団
 愛知県豊田市八草町秋合 1 2 6 7 番 1
 (71) 出願人 591148093
 公益財団法人京都高度技術研究所
 京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地
 (71) 出願人 000155023
 株式会社堀場製作所
 京都府京都市南区吉祥院宮の東町 2 番地
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一

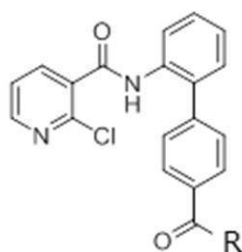
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ボスカリド抗体および該抗体を用いたボスカリド測定方法

(57) 【要約】

【課題】有機溶媒に強く、特異性の高い、ボスカリドに対する抗体を誘起しうる化合物、およびそのような化合物によって誘起される抗体またはその断片の提供。該抗体またはその断片を使用した、試料中のボスカリドを測定する方法、およびそのような測定に用いることができる測定キットの提供。

【解決手段】構造式



(式中、Rは、-OH、-R'、-NH-R'または-O-R'を表し、R'は、-(CH₂)_n-COOHを表し、nは、1~3の整数を表す。)であるボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片。

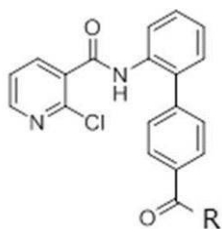
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造式

【化 1】



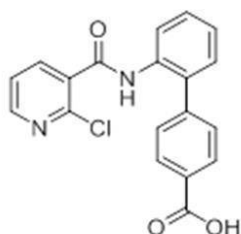
10

(式中、Rは、-OH、-R'、-NH-R'または-O-R'を表し、R'は、-(CH₂)_n-COOHを表し、nは、1～3の整数を表す。)であるボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片。

【請求項 2】

構造式

【化 2】



20

であるボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片。

【請求項 3】

免疫学上許容される担体がKLHである、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその断片

【請求項 4】

以下の (a) または (b) から選択される軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその断片：

30

(a) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(b) 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の抗体またはその断片の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の抗体またはその断片の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、ポリヌクレオチド。

40

【請求項 7】

以下の (a) または (b) から選択される発現ベクター：

(a) 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドおよび請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(b) 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターおよび請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の発現ベクターが導入された宿主細胞。

【請求項 9】

50

請求項 8 に記載の宿主細胞を培養し、抗体またはその断片を発現させる工程を含む、抗体またはその断片を生産する方法。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生する、受託番号NITE P-01991のハイブリドーマ。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその断片を試料に接触させる工程を含む、ボスカリドの測定方法。

【請求項 12】

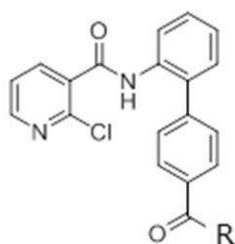
請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその断片を含む、ボスカリドの測定キット。

10

【請求項 13】

構造式

【化 3】



20

(式中、Rは、 $-OH$ 、 $-R'$ 、 $-NH-R'$ または $-O-R'$ を表し、 R' は、 $-(CH_2)_n-COOH$ を表し、 n は、1～3の整数を表す。)であるボスカリド誘導体。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ボスカリド誘導体によって得られる抗体またはその断片に関する。さらに本発明は、該抗体またはその断片を含むボスカリドの測定キット、ならびに該抗体またはその断片を用いたボスカリドの測定方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

アニリド系化合物の殺菌剤であるボスカリド (IUPAC: 2-クロロ-N-(4'-クロロピフェニル-2-イル)ニコチンアミド) は、ドイツのBASF社により発見された殺菌剤である (特許文献1)。ボスカリドはミトコンドリア内膜のコハク酸脱水素酵素系複合体の電子伝達を阻害することによって、農作物に発生する灰色かび病、菌核病に効果があることが知られ、農作物自体や動物に対する有害性も低いことから、本邦においても、農薬として広く利用されている。

40

【0003】

一方、残留農薬の基準値について、厚生労働省によって定められたポジティブリスト制が施行されており、全ての農薬や抗生物質・合成抗菌剤等について、加工食品を含む全ての食品が規制の対象となり、基準値を超えた食品の販売等は原則禁止されている状況である。ボスカリドについても、各食品別に残留農薬の基準値が規定されており、精度の高い分析を行う必要がある。

【0004】

ボスカリドの検出においては、検出対象由来の試料を粉碎あるいは細切後有機溶媒で抽出し、その抽出液を、濃縮した上で、NPD検出器付GCやGC/MSなどで分析する手法がある。しかしながら、該方法では、分析を精密に行うには熟練した技術を要し、大掛かりな測定

50

装置や設備が必要で、それに伴う測定の様々な制約がある。

【 0 0 0 5 】

一方、臨床診断の分野で用いられてきた免疫学的測定法による、環境負荷化学物質の測定への適用が進んでいる。免疫学的測定法は、抗原抗体反応を利用して抗原の測定を行うもので、測定精度が優れているばかりでなく、迅速、簡便かつ経済的な測定法である。しかし、測定試料の調製の関係上含まれる有機溶媒が、抗原に対する抗体の親和性に影響を与えやすいため、有機溶媒に対して高い耐性を有する抗体の開発が課題となっていた。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

10

【 特許文献 1 】 WO 2003/029219

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、有機溶媒に強く、特異性の高い、ボスカリドに対する抗体を誘起しうる化合物、およびそのような化合物によって誘起される抗体またはその断片を提供することを目的とする。本発明はまた、そのような抗体またはその断片を使用した、試料中のボスカリドを測定する方法、およびそのような測定に用いることができる測定キットを提供することを目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

20

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、微量のボスカリドを正確に検出し測定できるような方法を提供すべく鋭意研究を行った結果、有機溶媒に強く、ボスカリドに対する特異性の高い抗体を誘起し得る化合物を見出し、以って該化合物によって誘起される抗体またはその断片、それらを用いた測定方法または測定キット等を完成した。

【 0 0 0 9 】

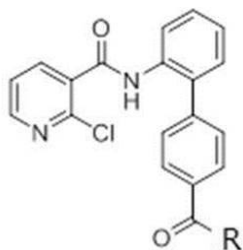
すなわち、本発明は、

[1] 構造式

【 0 0 1 0 】

【 化 1 】

30



【 0 0 1 1 】

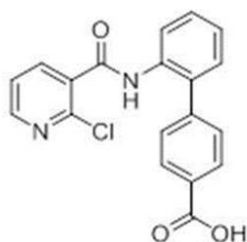
(式中、Rは、-OH、-R'、-NH-R'または-O-R'を表し、R'は、-(CH₂)_n-COOHを表し、nは、1～3の整数を表す。)であるボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片；

40

[2] 構造式

【 0 0 1 2 】

【化 2】



【 0 0 1 3 】

であるボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体に 10
対する抗体またはその断片；

[3] 免疫学上許容される担体がKLHである、[1] または [2] に記載の抗体またはその断片；

[4] 以下の (a) または (b) から選択される軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む、
[1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載の抗体またはその断片；

(a) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

(b) 配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域；

[5] [4] に記載の抗体またはその断片の軽鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、 20
ポリヌクレオチド；

[6] [4] に記載の抗体またはその断片の重鎖可変領域をコードする塩基配列を含む、
ポリヌクレオチド；

[7] 以下の (a) または (b) から選択される発現ベクター；

(a) [5] に記載のポリヌクレオチドおよび [6] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(b) [5] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターおよび [6] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター；

[8] [7] に記載の発現ベクターが導入された宿主細胞；

[9] [8] に記載の宿主細胞を培養し、抗体またはその断片を発現させる工程を含む、 30
抗体またはその断片を生産する方法；

[1 0] [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載の抗体を産生する、受託番号NITE P-01991のハイブリドーマ；

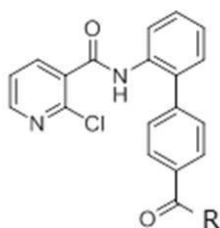
[1 1] [1] ~ [4] のいずれか 1 つに記載の抗体またはその断片を試料に接触させる工程を含む、ボスカリドの測定方法；

[1 2] [1] ~ [4] のいずれか 1 つに記載の抗体またはその断片を含む、ボスカリドの測定キット；

[1 3] 構造式

【 0 0 1 4 】

【化 3】



【 0 0 1 5 】

(式中、R は、- OH、- R '、- NH - R ' または - O - R ' を表し、R ' は、- (C H ₂)_n - C O O H を表し、n は、1 ~ 3 の整数を表す。) であるボスカリド誘導体；

[1 4] [1 3] に記載のボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む免疫原 50

性を有する複合体；
を提供する。

【発明の効果】

【0016】

本発明の抗体またはその断片は、有機溶媒に対し高い耐性を持ち、ボスカリドに特異的な結合能を有するため、試料中の有機溶媒濃度を適切な検出範囲に合わせるための再度の希釈が不要となり、分析作業の工数低減および希釈に伴う誤差低減が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】間接競合ELISAを用いた、マウス抗血清、BSC7抗体、BSC72抗体のボスカリドに対する阻害曲線を示す図である。縦軸：阻害率（ボスカリド添加／ボスカリド無添加）、横軸：ボスカリド濃度

10

【図2】直接競合ELISAを用いた、BSC7抗体、BSC72抗体のボスカリドに対する阻害曲線を示す図である。縦軸：阻害率（ボスカリド添加区／ボスカリド無添加区）、横軸：ボスカリド濃度

【図3】表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた、BSC7抗体のボスカリドに対する阻害曲線を示す図である。縦軸：阻害率（ボスカリド添加区／ボスカリド無添加区）、横軸：ボスカリド濃度

【図4】間接競合ELISAを用いた、BSC72 scFvのボスカリドに対する阻害曲線を示す図である。縦軸：阻害率（ボスカリド添加／ボスカリド無添加）、横軸：ボスカリド濃度

20

【図5】間接競合ELISAを用いた、BSC7 scFvのボスカリドに対する阻害曲線を示す図である。縦軸：阻害率（ボスカリド添加／ボスカリド無添加）、横軸：ボスカリド濃度

【図6】直接競合ELISAを用いた、BSC7抗体の各濃度のメタノール中のボスカリドに対する阻害曲線を示す図である。縦軸：吸光度（450nm）、横軸：ボスカリド濃度

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、ボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む、免疫原性を有する複合体を提供する。

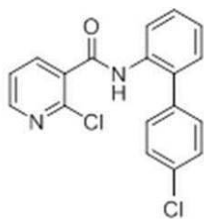
【0019】

本明細書においてボスカリドとは、下記の式

30

【0020】

【化4】



【0021】

で表される化合物である。

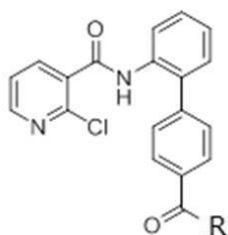
40

【0022】

また、本明細書においてボスカリド誘導体とは、下記の式

【0023】

【化5】



【0024】

(式中、Rは、-OH、-R'、-NH-R'または-O-R'を表し、R'は、-(CH₂)_n-COOHを表し、nは、1～3の整数を表す。)で表される化合物である。

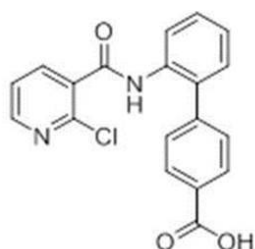
10

【0025】

このうち、好ましいボスカリド誘導体とは、下記の式

【0026】

【化6】



20

【0027】

で表される化合物である。

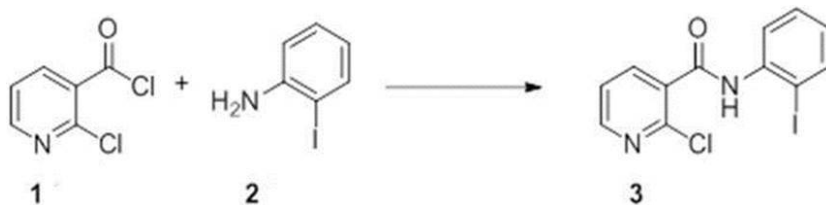
【0028】

前記ボスカリド誘導体の製造は、様々な合成方法により行なうことができ、特に限定されるものではない。たとえば、好ましいボスカリド誘導体の場合、下記反応式の通り、無水ジクロロメタンに溶解させたChloronicotinoyl chloride(化合物1)および2-Iodoaniline(化合物2)を出発原料として、塩基の存在下において、反応時間30分～10時間、反応温度0～30で攪拌し、反応させた後、反応液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで単離・精製することによって、2-chloro-N-(2-iodophenyl)pyridine-3-carboxamide(化合物3)を得る。ここで、反応で用いられる塩基は、特に限定されないが、トリエチルアミン(TEA)などが好ましく用いられる。

30

【0029】

【化7】



40

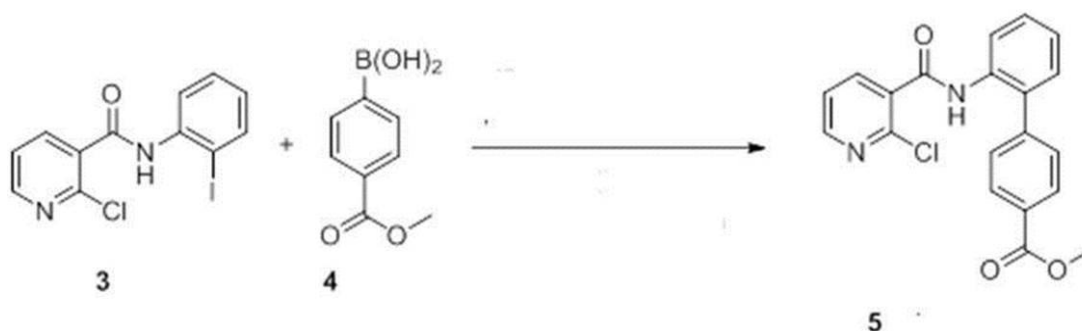
【0030】

さらに、前記反応式で得られた2-chloro-N-(2-iodophenyl)pyridine-3-carboxamide(化合物3)を、パラジウム触媒、塩基およびアルコールの存在下において、4-(Methoxycarbonyl)phenylboronic acid(化合物4)と反応時間10～30時間、反応温度0～100で攪拌し、反応させ、反応液を濃縮、ろ過し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製をし、ボスカリド誘導体のメチルエステル(化合物5)を得る。ここで、反応で用いられる塩基は、特に限定されないが、K₂CO₃あるいはNa₂CO₃が好ましく用いられる。また、パラジウム触媒として、Pd(PPh₃)₄やPd/Cなどが用いられる。

【0031】

50

【化 8】



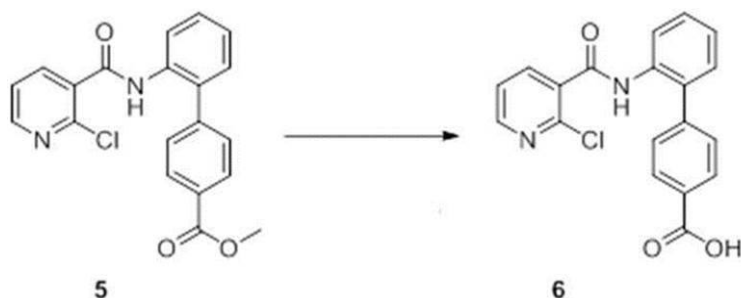
10

【0032】

さらに、前記反応式で得られたボスカリド誘導体のメチルエステル（化合物 5）を、塩基およびアルコールの存在下において、反応時間 30 分～10 時間、反応温度 0～30 で攪拌し、反応させ、反応液を濃縮し、酸で pH 調整することによって、ボスカリド誘導体（化合物 6）を得る。ここで、反応で用いられる塩基は、特に限定されないが、NaOH が好ましく用いられる。また、酸として、HCl などが用いられる。

【0033】

【化 9】



20

【0034】

このようにして得られるボスカリド誘導体は、ボスカリドの骨格を有し、かつボスカリドの有する特定のクロロ基がカルボキシル基に置換された低分子化合物であるため、免疫原性、すなわち抗体産生誘導能がないか、または非常に低い、ボスカリドのハプテンである。したがって、本発明のボスカリド誘導体を常法を用いて免疫学上許容される担体に結合して免疫原性を有する複合体もしくは免疫原性がより高められた複合体（以下、本発明の複合体と記載することがある）、すなわちボスカリドに対する人工抗原を作製することができる。

30

【0035】

免疫学上許容される担体としては、特に制限はないが、例えば牛血清アルブミン（BSA）、ウサギ血清アルブミン（RSA）、オボアルブミン（OVA）、スカシ貝ヘモシアニン（KLH）、チログロブリン（TG）、免疫グロブリン等の高分子量タンパク質の他、赤血球、多糖体等が挙げられ、好ましくは、KLH が挙げられる。ここで、ボスカリド誘導体のカルボキシル基は、免疫学上許容される担体との複合体を形成する際の共有結合に供され、得られた複合体は、免疫原性を有し、ボスカリドに特異的な抗体（本発明の抗体）を誘起するのに好適に用いられ得る。

40

従って、本発明は、ボスカリド誘導体および免疫学上許容される担体を含む、免疫原性を有する複合体に対する抗体またはその断片を提供する。

【0036】

本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体をともに包含する。また、当該抗体は、IgG、IgA、IgM、IgD または IgE のいずれの免疫グロブリンクラスに属するものであってもよいが、好ましくは IgG または IgM である。

【0037】

本発明のポリクローナル抗体は、例えば以下の方法により作製することができる。上記

50

の本発明の複合体と完全または不完全フロイントアジュバント(FCAまたはFIA)との混和物を感作抗原として、ウサギ、マウス、ラット、ヤギ、モルモットまたはハムスター等の哺乳動物に免疫(初回免疫から約1~4週間毎に1~数回追加免疫する)し、各追加免疫の約3~10日後に部分採血した血清の抗体価を従来公知の抗原抗体反応を利用して測定、その上昇を確認しておく。さらに、最終免疫から約3~10日後全血を採取して抗血清を精製する。ポリクローナル抗体は、硫酸分画等の塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィー等の慣用の分離技術を用いて単独の免疫グロブリンクラスとして精製することもできる。

【0038】

また、本発明のモノクローナル抗体は、通常細胞融合によって製造されるハイブリドーマ(融合細胞)から取得することができる。すなわち、上記ポリクローナル抗体の場合と同様、本発明の複合体を免疫感作した哺乳動物から抗体産生細胞を単離し、これと骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを形成させ、当該ハイブリドーマをクローン化し、ボスカリドあるいは本発明のボスカリド誘導体をマーカー抗原(あるいはマーカーハプテン)として、それに対して特異的な親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。また、あらかじめ単離された脾細胞あるいはリンパ球等に培養液中で上記の複合体を作用させて生じる抗体産生細胞も使用することができる。この場合にはヒト由来の抗体産生細胞も調製可能である。

【0039】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製はケーラーおよびミルシュタインの方法(Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975)およびその変法に従って行うことができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、前述のごとく免疫感作された動物から取得される脾細胞、リンパ節細胞、末梢リンパ球、骨髓腫細胞あるいは扁桃細胞等、好ましくは脾細胞に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒトの骨髓腫細胞(ミエローマ)との融合により得られるハイブリドーマを培養することにより調製される。培養は、インビトロまたはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹腔内等でのインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ培養上清あるいは哺乳動物の腹水から取得することができる。

【0040】

細胞融合に用いられる骨髓腫細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-Ag8, P3/NS1/1-Ag4-1, P3/X63-Ag8.U1, SP2/0-Ag14、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag1.2.3., ヒト由来ミエローマU-266AR1, GML500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11あるいはCEM-T15等が挙げられる。

【0041】

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖のみられたウェル中の培養上清の、マーカー抗原(またはハプテン)に対する反応性を、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等によって測定することにより行うことができる。

【0042】

後述する実施例に記載の通り、ボスカリドに高い反応性を示す抗体を産生したハイブリドーマを、限界希釈法によって細胞クローニングし、モノクローナル抗体産生細胞(BSC7とBSC72)として取得した。これらのうちBSC7を平成27年1月13日に、受託番号NITE P-01991として独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室)に寄託した。

【0043】

モノクローナル抗体の単離精製は、上述のような方法によって製造される該抗体含有培養上清あるいは腹水を、イオン交換クロマトグラフィー、抗イムノグロブリンカラムまた

10

20

30

40

50

はプロテイン A カラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに付すことにより行うことができる。

【0044】

本発明のモノクローナル抗体は、上述の製造方法に限定されることなく、いかなる方法で得られたものであってもよい。また、通常モノクローナル抗体は免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明におけるモノクローナル抗体は、該糖鎖の構造差異により限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。さらに、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子を組み込まれたトランスジェニック動物から得られる組換えヒト型モノクローナル抗体、あるいはある哺乳動物由来のモノクローナル抗体の定常領域(Fc)をヒト由来モノクローナル抗体のFc領域と組換えたキメラモノクローナル抗体、さらには抗原と相補的に直接結合し得る相補性決定部位(CDR)以外の全領域をヒト由来モノクローナル抗体の対応領域と組換えたキメラモノクローナル抗体も本発明のモノクローナル抗体に包含される。

10

【0045】

また、本発明の抗体には、前記のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)等の天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体に加えて、これらの抗体の断片が含まれる。抗体の断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはFab、Fab'、F(ab')₂、scAb、scFv、またはscFv-Fc等を包含する。

【0046】

20

また、当業者であれば、本発明の抗体または断片と他のペプチドやタンパク質との融合抗体を作製することや、修飾剤を結合させた修飾抗体を作製することも可能である。融合に用いられる他のペプチドやタンパク質は、抗体の結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ヒト血清アルブミン、各種tagペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マルトース結合タンパク質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、各種毒素、その他多量体化を促進しうるペプチドまたはタンパク質等が挙げられる。修飾に用いられる修飾剤は、抗体の結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、糖鎖、リン脂質、リポソーム、低分子化合物等が挙げられる。

【0047】

30

また、後述する実施例の通り、本発明の抗体(モノクローナル抗体)を分泌するハイブリドーマBSC7およびBSC72からそれぞれmRNAを抽出し、軽鎖および重鎖の遺伝子(DNA)断片を増幅し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、ハイブリドーマBSC7から分泌される抗体の軽鎖可変領域は配列番号9に示されるアミノ酸配列からなり、かつ重鎖可変領域は配列番号10に示されるアミノ酸配列からなることが分かった。同様に、ハイブリドーマBSC72から分泌される抗体の軽鎖可変領域は配列番号11に示されるアミノ酸配列からなり、かつ重鎖可変領域は配列番号12に示されるアミノ酸配列からなることが分かった。

従って、本発明は、以下の(a)または(b)から選択される軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む、抗体またはその断片を提供する。

(a) 配列番号9に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、

40

(b) 配列番号11に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、及び、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域。

【0048】

上記の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む本発明の抗体またはその断片は、本願明細書に開示される軽鎖可変領域及び重鎖可変領域の配列情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。具体的には、本発明の抗体またはその断片の軽鎖可変領域アミノ酸をコードする塩基配列を含む軽鎖可変領域遺伝子断片、及び、本発明の抗体またはその断片の重鎖可変領域アミノ酸をコードする塩基配列を含む重鎖可変領域遺伝子断片を作製する。

50

【 0 0 4 9 】

上記の本発明の抗体またはその断片の軽鎖及び重鎖可変領域アミノ酸をコードする各可変領域遺伝子断片は、例えば、該軽鎖及び重鎖可変領域の塩基配列（例えば、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列としては配列番号 17 に示される塩基配列、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列としては配列番号 18 に示される塩基配列、配列番号 11 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域をコードする塩基配列としては配列番号 19 に示される塩基配列、および配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域をコードする塩基配列としては配列番号 20 に示される塩基配列がそれぞれ挙げられる）又は該軽鎖及び重鎖可変領域のアミノ酸配列に基づいてデザインされた塩基配列に基づき、当該分野で公知の遺伝子合成方法を利用して合成することが可能である。このような遺伝子合成方法としては、WO90/07861に記載の抗体遺伝子の合成方法等の当業者に公知の種々の方法が使用され得る。

10

【 0 0 5 0 】

次いで、上記の可変領域遺伝子断片と抗体の定常領域遺伝子とを連結させて抗体遺伝子を作製する。使用される抗体の定常領域は、どのようなサブクラスの定常領域（例えば、ヒト抗体の場合、重鎖として 1、2、3 または 4、軽鎖として または 鎖の定常領域）も選択可能であり得る。

また、上記の可変領域遺伝子断片を抗体の断片として発現させる場合は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を直接連結し、抗体遺伝子として作製しうる。例えば、本発明の抗体の断片として scFv を作製する場合、軽鎖可変領域アミノ酸をコードする塩基配列を含む軽鎖可変領域遺伝子断片と重鎖可変領域アミノ酸をコードする塩基配列を含む重鎖可変領域遺伝子断片とをリンカーを介して連結させて、抗体遺伝子を作製することができる。リンカーとしては、本発明の抗体の断片がボスカリドに結合する特性を有し得る限り特に限定されないが、例えばペプチドリinker（Gly₄Ser）₃ で表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

20

【 0 0 5 1 】

上記のようにして得られた抗体遺伝子を発現ベクターに連結し、抗体発現ベクターを作製する。発現ベクターとしては、原核細胞および/または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明の抗体又はその断片をコードする遺伝子を発現し、これらポリペプチドを産生できるものであれば特に制限されない。例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等を挙げることができる。

30

【 0 0 5 2 】

本発明の発現ベクターは、本発明の抗体遺伝子、及び当該遺伝子に機能可能に連結されたプロモーターを含み得る。細菌中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーターとしては、宿主がエシェリキア属菌の場合、例えば、Trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、PLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどが挙げられる。酵母中で本発明の抗体又はその断片を発現させるためのプロモーターとしては、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、アクチンプロモーター、CAGプロモーター（Niwa H. et al., Gene, 108, 193-200, 1991）、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。

40

【 0 0 5 3 】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位をさらに含み得る。一方、宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン、終止コドンを含み得る。また、この場合、エンハンサー配列、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の 5' 側および 3' 側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデ

50

ニレーション部位、または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる選択マーカー（例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子）を含んでいてもよい。また、必要に応じて、シグナル配列をコードする塩基配列（シグナルコドン）を、上記の抗体遺伝子の5'末端側に付加（またはネイティブなシグナルコドンと置換）してもよい。例えば、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが用いられる。

【0054】

本発明はまた、本発明の抗体遺伝子が導入された形質転換体を提供する。このような形質転換体は、例えば、本発明の発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより作製できる。形質転換体の作製に用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞（例えば、Sf9）など）が例示される。形質転換は、自体公知の方法により行われ得る。

10

【0055】

本発明はまた、本発明の抗体遺伝子を宿主細胞に発現させること、即ち、このような形質転換体を用いることを含む、本発明の抗体又はその断片の生産方法を提供する。好ましくは、該方法で使用される宿主細胞は、本発明の発現ベクターが導入されており、該発現ベクターは、本発明の抗体またはその断片の重鎖および軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを別々にか又は同時に含んでもよい。

20

【0056】

本発明の抗体又はその断片の生産において、形質転換体は、栄養培地中で培養され得る。栄養培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えば、テトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

30

【0057】

形質転換体の培養は自体公知の方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、適宜選択される。例えば、宿主が動物細胞の場合、培地としては、約5～20%の牛胎児血清を含むMEM培地(Science, Vol. 122, p. 501, 1952)、DMEM培地(Virology, Vol. 8, p. 396, 1959)、RPMI1640培地(J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, p. 519, 1967)、199培地(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p. 1, 1950)等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が昆虫細胞の場合、例えば牛胎児血清を含むGrace's培地(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 8404, 1985)等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。宿主がE. coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地(Millerら、Exp. Mol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, p. 431, 1972)等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培地(Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p. 4505, 1980)が挙げら

40

50

れ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0058】

本発明の抗体又はその断片は、上述のような形質転換体を培養し、該形質転換体から回収、好ましくは単離、精製することができる。単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、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など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

10

【0059】

また、当業者であれば、本発明に基づいて、本発明の抗体またはその断片と他のペプチドやタンパク質との融合抗体を作製することや、修飾剤を結合させた修飾抗体を作製することも可能である。融合に用いられる他のペプチドやタンパク質は、抗体のボスカリド結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ヒト血清アルブミン、各種tagペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マルトース結合タンパク質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、各種毒素、その他多量体化を促進しうるペプチドまたはタンパク質等が挙げられる。修飾に用いられる修飾剤は、抗体のボスカリド結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、糖鎖、リン脂質、リポソーム、低分子化合物等が挙げられる。

20

【0060】

上記のようにして得られる本発明の抗体またはその断片は、有機溶媒に強く、高濃度有機溶媒中のボスカリドに対しても親和性を喪失せず、農薬規制値から見て非常に好都合の特異性を有する。例えば、有機溶媒がメタノールである場合、1%(v/v)～20%(v/v)メタノール中のボスカリドに対して親和性を維持することができる。通常は抗体の親和性に障害が生じる2%(v/v)以上のメタノール中のボスカリドに対しても、本発明の抗体またはその断片は親和性を減衰せずに維持することができ、サンプルを粉碎あるいは細切後有機溶媒で抽出した後に、適切な検出範囲に合わせるための有機溶媒濃度の調整や再度の希釈を減らすことが可能となり、分析作業の工数低減および希釈に伴う誤差低減が可能となる。結果として測定操作による誤差が小さくなり、再現性および正確性の向上にもつながる。

30

従って、本発明はまた、上記のようにして取得される本発明の抗体またはその断片を用いて、ボスカリドを測定することの特徴とする、試料中のボスカリドの測定方法を提供する。

【0061】

本発明の測定方法に供試される試料の原材料としては、特に制限されないが、野菜、穀物、果物などが挙げられる。野菜としては、例えば、小豆、インゲン、キャベツ、レタス、たまねぎ、トマト、ミニトマト、ピーマン、なす、きゅうりなどが挙げられる。穀物としては、米、小麦、大麦などが挙げられる。果物としては、すいか、メロン、みかん、りんご、なし、桃、ネクタリン、桜桃、いちご、ぶどうなどが挙げられる。試料は、例えば、上記原材料を破碎し、有機溶媒と混合した後、遠心分離や濾過などによって有機溶媒層を分離することによって得ることができる。使用される有機溶媒としては、特に限定されないが、メタノール、エタノール、アセトニトリルなどが用いられる。

40

【0062】

本発明の測定方法としては、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[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]

50

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 - ガラクトシダーゼ、 - グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、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sein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、 - ガラクトシダーゼ、 - グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、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。

【0063】

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抗体（またはその断片、以下同様）を用いた直接競合阻害ELISAによってボスカリドの検出を行うことができる。

【0064】

(1) 本発明の抗体を、支持体に固相化する。用いる支持体は、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支持体上に載せ、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 µg/mLから10 µg/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。

【0065】

(2) 支持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、該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支持体に添加し、例えば、約4時間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。

【0066】

(3) 各種濃度のボスカリドを含む試料に、ボスカリド（または本発明のボスカリド誘導体、以下同様）と酵素を結合させた酵素結合ボスカリドを加えた混合物を調製する。酵素結合ボスカリドの調製は、ボスカリド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。

【0067】

(4) 工程(3)の混合物を工程(2)で得られた抗体固相化支持体と反応させる。ボスカリドと酵素結合ボスカリドとの競合阻害反応により、これらと固相化抗体との複合体が生成する。反応は例えば、約25℃で約1時間行う。ボスカリドは、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、ボスカリドを溶解させ、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、エタノールなどがあげられる。反応終了後、緩衝液で支持体を洗浄し、固相化抗体と結合しなかった酵素結合ボスカリドを除去する。固相化抗体-酵素結合ボスカリドの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ボスカリドの量を決定する。

【0068】

(5) 支持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ボスカリド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、450 nm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、492 nmの吸

10

20

30

40

50

光度を検出する。なお、バックグランド値を補正するため、630 nmの吸光度も同時に検出することが望ましい。

【0069】

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。

【0070】

ボスカリドを添加しない反応溶液の吸光度に対して、ボスカリドを添加して本発明の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。既知の濃度のボスカリド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、試料中のボスカリドの濃度を算出することができる。

10

【0071】

別の態様としてボスカリド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) 前述のボスカリドに対する人工抗原を支持体に固相化する。用いる支持体は、通常のELISAに用いる支持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、固相化用ボスカリド(または本発明のボスカリド誘導体、以下同様)を含む緩衝液を支持体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中のボスカリドの濃度は、通常0.01 µg/mLから100 µg/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。

20

【0072】

(2) 支持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、ボスカリド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キングエース(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支持体に添加し、例えば、約4時間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。

【0073】

(3) 前記(1)および(2)で処理された固相表面にボスカリドを含む試料および本発明の抗体溶液を加え、該抗体を前記固相化ボスカリドおよびボスカリドに競合的に反応させて、固相化ボスカリド-抗体複合体およびボスカリド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。ボスカリドは、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、ボスカリドを溶解させ、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、エタノールなどがあげられる。

30

【0074】

(4) 固相化ボスカリド-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。例えばボスカリド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、支持体に結合したボスカリドに対する本発明の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。

40

【0075】

(5) 支持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ボスカリドの量を算出することができる。

【0076】

50

前記本発明の測定方法においては、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。検出対象物が食品（野菜、果物、穀物など）の場合、ボスカリドが抽出できる全ての方法を用いることができる。ボスカリドを含む食品からの抽出物は、メタノール、エ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。

【0077】

また、本発明は前記のボスカリド測定方法を実施するためのボスカリド測定キットを提供する。本発明の測定キットは、このような測定方法を好適に行い得るように、本発明の抗体またはその断片を含む。さらに、該キットは、本発明の測定方法を実施する際に使用される周知の試薬類（例えば、反応緩衝液、ブロッキング液、洗浄液、標識検出試薬等）および器具類（例えば、反応容器等）を含んでいてもよい。

10

【実施例】

【0078】

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

【0079】

実施例1 ボスカリドにカルボキシ基を導入した誘導体（ボスカリド誘導体）の合成

ボスカリド誘導体は、以下の3段階の反応を経て合成した。

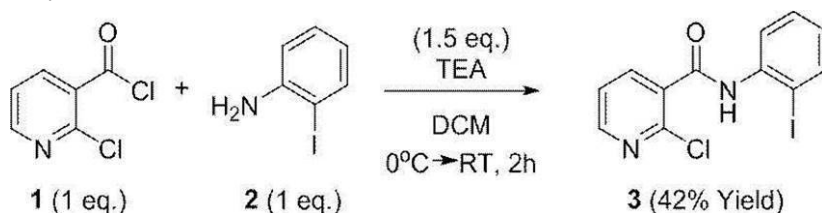
【0080】

(1) 2-chloro-N-(2-iodophenyl)pyridine-3-carboxamide の合成

20

【0081】

【化10】



【0082】

三方コックを付け、攪拌子を入れた50 mL 枝付フラスコに、2-Iodoaniline（化合物2）876.1 mg（Mw. 219.03, 4.0 mmol）を入れ、脱気、Ar置換した。無水ジクロロメタン4.0 mLを加えて溶解させ、トリエチルアミン836 μL （Mw.101.14, d=0.73, 6.0 mmol）を加えた。氷浴で0 にし、無水ジクロロメタン20 mLに溶解した Chloronicotinoyl chloride（化合物1）704.0 mg（Mw. 176.00, 4.0 mmol）を15分かけて滴下後、室温にて2時間攪拌した。反応液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate=2/1)で単離・精製をし、2-chloro-N-(2-iodophenyl)pyridine-3-carboxamide（目的化合物3）を得た。化合物の構造は ^1H NMRにより決定した。

30

3 : ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 8.56 (dd, 1H, J = 4.88, 1.83 Hz, H-6 Py), 8.43 (br s, 1H, NH), 8.38 (d, 1H, J = 8.24 Hz, H-4 Py), 8.23 (dd, 1H, J = 7.63, 1.83 Hz, H-6 Ph), 7.86 (dd, 1H, J = 8.10, 1.34 Hz, H-3 Ph), 7.41-7.45 (m, 2H, H-5 Py, H-5 Ph), 6.94 (dt, 1H, J = 7.63, 7.63, 1.53 Hz, H-4 Ph) ppm.

40

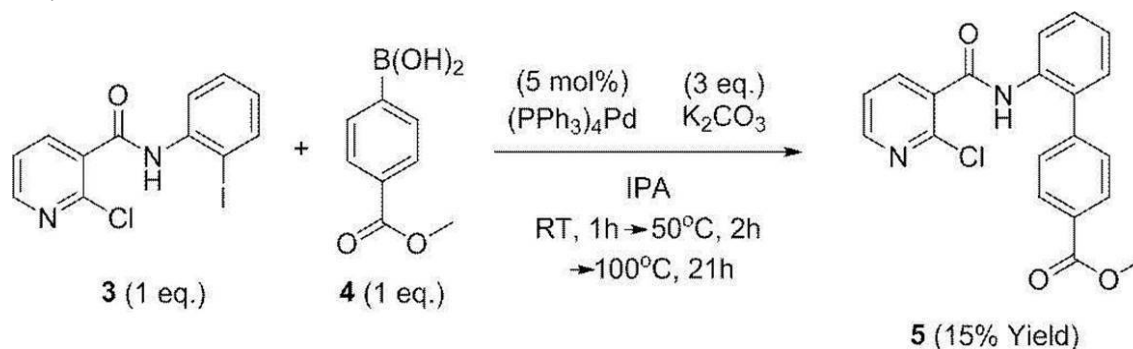
目的化合物 収率 42 %

【0083】

(2) ボスカリドにカルボキシ基を導入した誘導体（ボスカリド誘導体）メチルエステルの合成

【0084】

【化 1 1】



10

【0085】

三方コックとジムロートを付け、撹拌子を入れた50 mL ナスフラスコに、2-Chloro-N-(2-iodophenyl)pyridine-3-carboxamide (化合物 3) 179.3 mg (Mw. 358.56, 0.5 mmol)、4-(Methoxycarbonyl)phenylboronic acid (化合物 4) 90.0 mg (Mw. 179.97, 0.5 mmol)、(Ph₃P)₄Pd 28.9 mg (Mw. 1155.56, 0.0025 mmol)、炭酸カリウム 207.3 mg (Mw. 138.21, 1.5 mmol) を量り取り、脱気、Ar 置換した。無水イソプロピルアルコール 6.3 mL を加えて室温にて1時間、50 °Cにて2時間、100 °Cにて21時間撹拌した。反応液を濃縮後、ジクロロメタンにて吸引ろ過し、ろ液を減圧濃縮して、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/ethyl acetate=2/1-1/1)で精製をした後、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー(chloroform/acetone=30/1)で精製をし、目的化合物 5 を得た。化合物の構造は¹H NMR, ¹³C NMR, 質量分析, IRにより決定した。

20

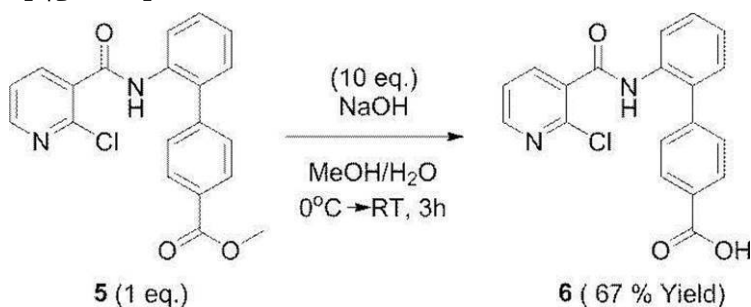
5 : ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 8.41 (dd, 1H, J = 4.59, 1.91 Hz, H-6 Py), 8.38 (d, 1H, J = 8.03, H-3' Ph), 8.19 (br s, 1H, NH), 8.09-8.11 (m, 3H, H-4 Py, H-3 and H-5 Ph), 7.47-7.51, 7.29-7.34 (m, 6H, H-5 Py, H-2 and H-6 Ph, H-4' and H-5' and H-6' Ph), 3.93 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) 166.5, 162.5, 151.2, 146.6, 142.6, 140.0, 134.1, 132.5, 131.0, 130.2, 130.0, 129.8, 129.5, 129.1, 125.4, 122.8, 122.3, 52.3 ppm. HRMS(DART) m/z : Calcd for C₂₀H₁₆ClN₂O₃ (M+1⁺) 367.0849, Found 367.0850. IR (neat) 3279, 3045, 1714, 1676 cm⁻¹.

目的化合物 収率 15 %

30

【0086】

【化 1 2】



40

【0087】

撹拌子を入れた100 mL ナスフラスコに、ボスカリド誘導体メチルエステル(化合物 5) 36.8 mg (Mw. 366.80, 0.1 mmol) とメタノール 1.3 mLを入れ、溶解させた。氷浴で0 にし、水 0.5 mLに溶解した水酸化ナトリウム 40.0 mg (Mw. 40.0, 1.0 mmol) を加えて室温にて3時間撹拌した後、反応液を減圧濃縮し、残渣に水を加えて1N 塩酸にてpH 2付近に調整した。再度濃縮、乾固し、THFを加えて抽出し、目的化合物 6 を得た。化合物の構造は¹H NMR, ¹³C NMR, 質量分析, IRにより決定した。

6 : ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) 8.41 (dd, 1H, J = 4.97, 1.91 Hz, H-6 Py), 8.07-8.10 (m, 2H, H-3 and H-5 Ph), 7.77 (dd, 1H, J = 7.64, 1.91 Hz, H-4 Py), 7.64 (d, 1H, J = 7.64 Hz, H-6' Ph), 7.55-7.57 (m, 2H, H-2 and H-6 Ph), 7.47-7.51 (m, 1H, H-5' Ph), 7.42-7.44 (m, 3H, H-5 Py, H-3' and H-4' Ph) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, C

50

DCI₃) 174.0, 167.1, 151.5, 148.4, 143.0, 139.5, 139.2, 136.5, 134.6, 133.9, 131.5, 130.5, 129.8, 129.5, 128.6, 128.4, 124.1 ppm. HRMS(DART) m/z : Calcd for C₁₉H₁₄ClN₂O₃ (M+1⁺) 353.0693, Found 353.0657. IR (neat) 3417, 1644-1660 cm⁻¹.

目的化合物 収率 67 %

【0088】

実施例2 免疫原、間接競合ELISA用抗原、直接競合ELISA用標識抗原の作製

実施例1において合成したボスカリド誘導体は、活性化エステル法によりスカシ貝ヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、および西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) と結合し、免疫原およびELISA抗原とした。

まず、ボスカリド誘導体5.0 μmolをDMSO 100 μLに溶解した。次にこれらの溶液にN-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) 6.0 μmolをDMSO 5 μLに溶解し添加後、さらに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) 6.0 μmolをDMSO 10 μLに溶解し添加した。室温にて1.5時間反応させた後、この反応溶液に10 mmol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 mLに溶解したKLH, BSA, HRP各々10 mgを添加し、再び室温にて1.5時間反応させた。反応終了後、150 mmolの塩化ナトリウムを添加した上記のリン酸緩衝液 (PBS) に対して透析し、ボスカリド-KLH結合体とボスカリド-BSA結合体を調製した。一方、ボスカリド-HRP結合体 (HRP標識ボスカリド) においては、ゲル濾過 (セファデックス G-25, fine グレード, GE社製) により精製した。

【0089】

実施例3 ボスカリド-KLH結合体の免疫

実施例2において調製したボスカリド-KLH結合体100 μgを、PBS 50 μLに溶解し、等量のフロイント完全アジュバントと乳化混合した後、Balb/cマウスの腹腔内に接種した。その後2週間ごとに2回、初回免疫量の1/4量を追加免疫し、さらに追加免疫と同量を最終免疫した。追加免疫の1週間後に部分採血し、抗体価の上昇を確認した。

【0090】

実施例4 間接ELISAによる抗体の反応性の確認

免疫により上昇した抗体価は、間接ELISAと間接競合ELISAを用いて確認した。すなわち、ボスカリド-BSA結合体をPBSで1 μg/mLに調製し、96ウェルのマイクロタイタープレートに100 μL/ウェルの量で添加した後、4℃で1晩静置することにより固相化した。液を吸引除去後、0.4% BSAを添加したPBS (以下、ブロッキング緩衝液という) 300 μL/ウェルを加えて室温で1時間ブロッキングした。このウェルを0.02% tween-20を添加したPBS (以下、洗浄液という) で洗浄後、マウスの抗血清を0.2% のBSAを添加したPBS (以下、抗体希釈液という) で希釈して50 μL/ウェルの量で加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄した後、抗体希釈液で2000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG (H+L) ウサギ抗体 (invitrogen社製) を100 μL/ウェルの量で加え、1時間反応させた。再び洗浄液で3回洗浄した後、100 μg/mLのTMBZと0.006%の過酸化水素を加えた0.1 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) (以下、発色基質液という) で発色させ、450 nmの吸光度を測定した。

【0091】

実施例5 間接競合ELISAによる抗体のボスカリドとの反応性の確認

ボスカリドとの反応性は、間接競合ELISAを用いて確認した。すなわち、実施例4の間接ELISAと同様にボスカリド-BSA結合体を固相化し、ブロッキングした。このウェルに、10%メタノールによって適当な濃度に希釈したボスカリド溶液 (丁度阻害がかかる濃度に希釈) と抗体希釈液 (前記のELISAにおいて、生じた吸光度が飽和している領域の50%の吸光度を示すように抗体を希釈) とを等量ずつ加えて混合したものを100 μL/ウェルの量で加え、室温で1時間反応させた。洗浄した後、前記の間接ELISAと同様に、HRP標識抗体と反応させ、吸光度を測定した。

間接競合ELISAによる抗血清とボスカリドとの反応性を、図1に示した。結果から明らかのように、抗血清は9.8~625 ng/mLの濃度範囲でボスカリドと反応した。

【0092】

実施例 6 ポスカリドと反応するマウスモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体の作製は、常法により行った。まず細胞融合には、最終免疫後3日目のマウスから取り出した脾臓細胞を用いた。メッシュで大きな固形物を除去しながら、RPMI1640培地中に取り出した脾臓細胞をRPMI1640培地にて3回洗浄した後、マウスのミエローマ細胞P3 - X63 - Ag8.653と細胞数の比で5 : 1 (脾臓細胞 : ミエローマ細胞) になるように混合し、遠心 (1200 rpm、5分間) して細胞沈渣を集めた。この細胞沈渣に予め37℃に加温しておいた50%ポリエチレングリコール (分子量1500) 1 mLを加え、細胞を融合した。細胞融合は、RPMI1640培地10 mLを徐々に添加し、牛胎児血清 (以下、FBSという) 1 mLを更に添加することにより、停止した。融合した細胞は、10%のFBSを添加したRPMI1640培地 (以下「RPMI1640/10% FBS培地」という) に100 $\mu\text{mol/L}$ のヒポキサンチン、0.4 $\mu\text{mol/L}$ のアミノプテリン、および16 $\mu\text{mol/L}$ のチミジンを添加したHAT培地に懸濁後、96ウェルのポリスチレンプレートに 2×10^5 細胞/ウェルで分注し、37℃、5%二酸化炭素存在下で10日間～14日間培養した。培養後、コロニーの生じたウェル中の抗体活性の有無を、上記の間接ELISAと間接競合ELISAを用いて、スクリーニングした。

ポスカリドに高い反応性を示す抗体を産生したウェル中のハイブリドーマは、限界希釈法によって細胞クロニングし、モノクローナル抗体産生細胞 (BSC7とBSC72) とした。これらのうちBSC7を平成27年1月13日に、受託番号NITE P-01991として独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室) に寄託した。

これらの細胞の培養上清は、BSC7由来のモノクローナル抗体 (以下、BSC7抗体という) およびBSC72由来のモノクローナル抗体 (以下、BSC72抗体という) として使用した。両抗体のサブクラスはIgG₁ だった。

間接競合ELISAを用いて、BSC7抗体とBSC72抗体のポスカリドとの反応性を調べた。結果は図1に示した通り、両抗体ともに抗血清と比較してポスカリドと高い反応性を示した。特に、BSC7抗体は反応性が高く、0.8～10 ng/mLの測定範囲でポスカリドと反応した。

【0093】

実施例 7 モノクローナル抗体を用いたポスカリドを測定するための直接競合ELISAの構築

BSC7抗体を用いた直接競合ELISAを以下のように構築した。PBSで5 $\mu\text{g/mL}$ に希釈した抗マウスIgGヤギ抗体 (Thermo Fisher Scientific社製) を、96ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルに100 μL /ウェルで添加した後、4℃で1晩静置することにより固相化した。次に、ブロッキング緩衝液に置き換え、室温で1時間ブロッキングした。洗浄液で1回洗浄した後、BSC7抗体を抗体希釈液によって希釈し、100 μL /ウェルで添加した後、室温で1時間反応させた。このウェルに、10%メタノールによって適当な濃度に希釈したポスカリド溶液と、抗体希釈液で250 ng/mLに希釈したHRP標識ポスカリドを等量ずつ加えて混合したものを100 μL /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄した後、発色基質液を加えて発色させ、450 nmの吸光度を測定した。その結果を図2に示す。図2から、BSC7抗体を用いた直接競合ELISAでは、間接競合ELISAと同様に0.75～8.8 ng/mLの濃度範囲でポスカリドと反応した。また、BSC72抗体では、1.8～50 ng/mLの濃度範囲でポスカリドと反応した。

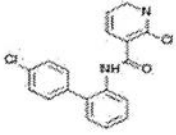
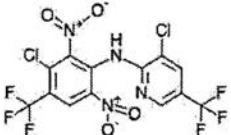
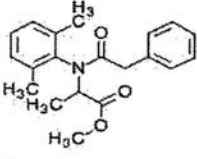
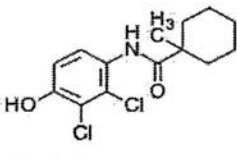
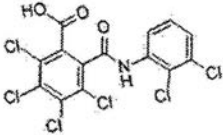
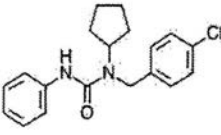
【0094】

実施例 8 作製したモノクローナル抗体の交差反応性

直接競合ELISAにおいて、5種類のポスカリド関連化合物であるアニリド系殺菌剤 (ペナラキシル、テクロフタラム、フルアジナム、フェンヘキサミドおよびペンシクロン) とBSC7抗体およびBSC72抗体との交差反応性 (CR%) を調べた。その結果は、表1に記載した通り、両抗体ともポスカリド以外の殺菌剤とは全く反応しなかった。

【0095】

【表 1】

殺菌剤	交差反応性 (%)		殺菌剤	交差反応性 (%)	
	7	72		7	72
ボスカリド	100	100	フルアジナム	<0.028	<0.078
					
ペナラキシル	<0.028	<0.078	フェンヘキサミド	<0.028	<0.078
					
テクロフタラム	<0.028	<0.078	ベンシクロン	<0.028	<0.078
					

10

20

【0096】

実施例 9 表面プラズモン共鳴 (SPR) によるイムノセンサーの構築

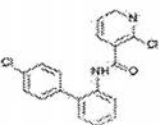
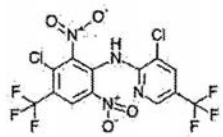
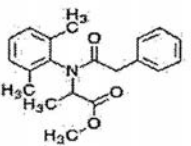
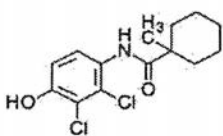
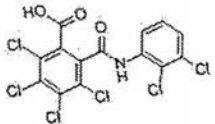
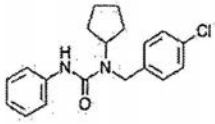
BSC7抗体を用いたSPRによるイムノセンサーは、SPR装置にBiacore T200 (GE社製) を用い、センサーチップにBiacore用のCM5 (GE社製) を用いて構築した。新しいチップをセット後、0.005% tween 20を添加したPBSでコンディショニングし、400 mmol/LのEDCと100 mmol/LのNHSの混合液を5 μ L/分で350秒送液した。次に、10 mmol/Lの酢酸緩衝液 (pH 5.0) で40 μ g/mLに希釈したボスカリド - BSA結合体を5 μ L/分で120秒送液し、チップ表面に固相化した。さらに、1 mol/Lのエタノールアミン (pH 8.5) を5 μ L/分で350秒送液し、チップ表面をブロックした。ボスカリドとの反応性は、以下の条件で調べた。即ち、ランニング緩衝液には、75 mmol/Lの塩化ナトリウム、5%のメタノール、0.1%のBSAを含む50 mmol/Lのリン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた。測定の前に、ランニング緩衝液を20 μ L/分で60秒送液し、リンスした。次に、10%メタノールに溶解したボスカリドと0.2%のBSAを添加した100 mmol/Lのリン酸濃度のPBSで15 μ g/mLに希釈したBSC7抗体を等量混合し、装置にセットして順次20 μ L/分で180秒間送液し、競合反応状態をモニターした。その後、ランニング緩衝液に置き換え、さらに3 mol/Lのグアニジン塩酸塩を添加した1 mol/Lの酢酸を送液し、さらに0.2% SDSを送液して、チップ表面のボスカリド - BSA結合体に結合したBSC7を解離、除去した。再び、ランニング緩衝液を送液し、次の測定に供した。測定の結果は図3に示した通りで、12~80 ng/mLの濃度範囲でボスカリドと反応した。また、表2に示した通り、直接競合ELISAと同様にボスカリド以外の殺菌剤とは全く反応しなかった。

30

40

【0097】

【表 2】

殺菌剤	交差反応性(%)	殺菌剤	交差反応性(%)
ボスカリド	100	フルアジナム	<0.4
			
ベナラキシル	<0.4	フェンヘキサミド	<0.4
			
テクロフタラム	<0.4	ペシシクロシ	<0.4
			

10

20

【0098】

実施例 10 BSC7抗体およびBSC72抗体のアミノ酸配列の決定

BSC7抗体およびBSC72抗体について、その重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を調べた。即ち、Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Life Technologies社)を使用し、BSC7およびBSC72からmRNAを抽出した。その後、5' / 3' RACE Kit, 2nd generation version 10 (Roche社製)を使用して、5' RACE法により軽鎖および重鎖の遺伝子(DNA)断片を増幅した。5' RACE法で使用したプライマー(配列番号1~4)を表3に記載した。次に、増幅したこれらのDNA断片をpGEM-T Easy Vector (Promega社)のTA-クローニングサイトに挿入してクローニングした。その後、そのDNA断片の塩基配列を公知のシーケンサーで調べた。結果は、アミノ酸配列として表4に記載した。

30

【0099】

【表 3】

配列番号	塩基配列 (5' → 3')	用途
1	TATGCAAGGCTTACAAYCMCW ^{*1}	重鎖、SP1 ^{*2}
2	CWCAAKTTTTYTTGTCCACCKTGGTGC ^{*1}	重鎖、SP2 ^{*2}
3	ACACTCWCASGRGACARACTCTT ^{*1}	軽鎖、SP1
4	ACACTCWCASGRGACARACTCTTYTC ^{*1}	軽鎖、SP2
5	GTGACTTGACATATGCAGGTTGAGCTCCAGCA	重鎖
6	AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGTAGAGACAGTGACCAGAG	重鎖
7	GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGGCTGTTGTGACTCAGGAAT	軽鎖
8	CTACTCGAGGGGCTGGCCTAGGACACTCAG	軽鎖
13	AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAG	重鎖
14	GTGACTTGACATATGCAGGTTGAGCTCCAGCA	重鎖
15	GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGGCTGTTGTGACTCAGGAAT	軽鎖
16	CTACTCGAGGGGCTGGCCTAGGACACTCAG	軽鎖

^{*1} Y = C, T ; M = A, C ; K = G, T ; W = A, T ; S = G, C ; R = A, G

^{*2} SP1, 2 は、5' / 3' RACE Kit, 2nd generation version 10 記載用語

【0100】

【表 4】

配列番号	アミノ酸配列 (N末端→C末端)	
9	QAVVTQESALITSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA RFGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYNYWVFGGGTKLSVLGQP	BSC7軽鎖
10	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFSTYYIQWIKRPGQGLEWIGAIYPGDGTRYTQ KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGGPYGYGFAYWGQGTLVTVSA	BSC7重鎖
11	QAVVTQESALITSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPA RFGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYNYWVFGGGTKLSVLGQP	BSC72軽鎖
12	QVQLQQSGAEVARPGTSVKLSCKASGYTFSSYSIQWIKRPGQGLEWIGAIYPGNGDTGYTQ KFKGKATLTADGSSSTAYMQLSLTSDSAVYYCATYYGSPFTYWGQGTLVTVST	BSC72重鎖

【0101】

実施例 11 BSC72抗体の重鎖および軽鎖可変領域の一本鎖抗体(BSC72 scFv)発現ベクターならびにBSC7抗体の重鎖および軽鎖可変領域の一本鎖抗体(BSC7 scFv)発現ベクターの構築

BSC72抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をペプチドリンカー (Gly₄Ser)₃で結合した一本鎖抗体のC末端にヒスチジントグが結合したタンパク質を発現させるため、大腸菌用発現ベクターを構築した。配列の明らかになったBSC72抗体の重鎖および軽鎖のDNAを鋳型とし、プライマーには重鎖に配列番号 5、6 (表 3) を、軽鎖に配列番号 7、8 (表 3) を用いてPCRを行い、それらのDNA断片を増幅した。特に、配列番号 6 にはペプチドリンカーのN側、配列番号 7 にはC側に対応する塩基配列を15 bpを重複させて付加している。その際、重複していないペプチドリンカーの領域は、利用コドンを変えてある。これらのDNA断片を精製し、お互いの相同配列を利用したPCRによって2つのDNA断片を結合し、BSC72 scFvのDNAを作製した。次に、このDNAを制限酵素XhoIおよびNdeIで消化し、これを、同様に消化したpET - 23b (+) (Novagen社) にライゲーション反応により結合させ、ヒスチジントグを結合したBSC72 scFv発現ベクターを構築した。

また、BSC7抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をペプチドリンカー (Gly₄Ser)₃で結合した一本鎖抗体のC末端にヒスチジントグが結合したタンパク質を発現させるため、大腸菌用発現ベクターを構築した。配列の明らかになったBSC7抗体の重鎖および軽鎖のDNAを鋳型とし、プライマーには重鎖に配列番号 13、14 (表 3) を、軽鎖に配列番号 15、16 (表 3) を用いてPCRを行い、それらのDNA断片を増幅した。特に、配列番号 14 にはペプチドリンカーのN側、配列番号 15 にはC側に対応する塩基配列を15 bpを重複させて付加

している。その際、重複していないペプチドリンカーの領域は、利用コドンを変えてある。これらのDNA断片を精製し、お互いの相同配列を利用したPCRによって2つのDNA断片を結合し、BSC7 scFvのDNAを作製した。次に、このDNAを制限酵素XhoIおよびNdeIで消化し、これを、同様に消化したpET - 23b (+) (Novagen社) にライゲーション反応により結合させ、ヒスチジntagを結合したBSC7 scFv発現ベクターを構築した。

【0102】

実施例12 大腸菌中でのBSC72 scFvまたはBSC7 scFvの発現

実施例11において構築したBSC72 scFv発現ベクターを用いて、大腸菌Rosetta(DE3)株を形質転換した。この形質転換体を50 µg/mLのアンピシリン、34 µg/mLのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地に塗布し、37 °Cで17時間培養した。次いで、形成したコロニーを、上記抗生物質を含むLB液体培地5 mLに植菌し、37 °Cで14時間振とう培養した。この培養液1 mLを同じLB液体培地100 mLに植菌し、37 °Cで振とう培養した。培養により600 nmにおける濁度が0.3に達した時点で、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを最終濃度0.4 mmol/Lになるように添加し、20 °Cで20時間培養した。培養終了後、遠心分離 (6000 rpm、15分、4 °C) により大腸菌を回収した。これを300 mmol/Lの塩化ナトリウムを添加した50 mmol/Lのリン酸緩衝液 (pH 7.0) (以下、大腸菌用リン酸緩衝液という) 25 mLに懸濁し、再び遠心分離 (6000 rpm、15分、4 °C) により大腸菌を回収し、0.5%のtween - 20を添加した大腸菌用リン酸緩衝液5 mLに再懸濁した。その後、超音波処理により大腸菌を破碎し、大腸菌用リン酸緩衝液5 mLを加えて再び遠心 (15000 rpm、20分、4 °C) して上清を回収した。さらに、TALON Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories社製) を用いたアフィニティー精製により、上清からヒスチジntag結合BSC72 scFvを精製した。

また、実施例11において構築したBSC7 scFv発現ベクターを用いて、大腸菌Rosetta(DE3)株を形質転換した。この形質転換体を50 µg/mLのアンピシリン、34 µg/mLのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地に塗布し、37 °Cで17時間培養した。次いで、形成したコロニーを、上記抗生物質を含むLB液体培地5 mLに植菌し、37 °Cで14時間振とう培養した。この培養液1 mLを同じLB液体培地100 mLに植菌し、37 °Cで振とう培養した。培養により600 nmにおける濁度が0.3に達した時点で、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを最終濃度0.4 mmol/Lになるように添加し、20 °Cで20時間培養した。培養終了後、遠心分離 (6000 rpm、15分、4 °C) により大腸菌を回収した。大腸菌用リン酸緩衝液25 mLに懸濁し、再び遠心分離 (6000 rpm、15分、4 °C) により大腸菌を回収し、0.5%のtween - 20を添加した大腸菌用リン酸緩衝液5 mLに再懸濁した。その後、超音波処理により大腸菌を破碎し、大腸菌用リン酸緩衝液5 mLを加えて再び遠心 (15000 rpm、20分、4 °C) して上清を回収した。さらに、TALON Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories社製) を用いたアフィニティー精製により、上清からヒスチジntag結合BSC7 scFvを精製した。

【0103】

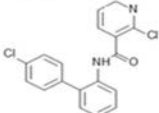
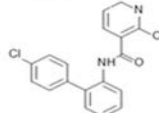
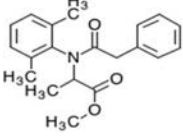
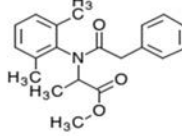
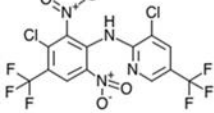
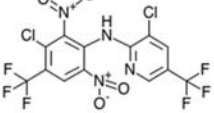
実施例13 BSC72 scFvまたはBSC7 scFvのボスカリドとの反応性の確認

上述の間接競合ELISAを用いて、作製したBSC72 scFvとボスカリドや関連の殺菌剤との反応性を調べた。但し、HRP標識抗マウスIgG (H+L) ウサギ抗体は、HRP標識抗ヒスチジntag ウサギ抗体 (Bethyl Laboratories社製) に変更し、20000倍に希釈して使用した。その結果、BSC72 scFvは、2.4 ~ 40 ng/mLの測定範囲でボスカリドと反応した (図4)。一方、表5に示した通り、実験に供試した2種類のアニリド系殺菌剤化合物 (ペナラキシル、フルアジナム) とは、全く反応しなかった。

同様に、上述の間接競合ELISAを用いて、作製したBSC7 scFvとボスカリドや関連の殺菌剤との反応性を調べた。但し、HRP標識抗マウスIgG (H+L) ウサギ抗体は、HRP標識抗ヒスチジntag ウサギ抗体 (Bethyl Laboratories社製) に変更し、20000倍に希釈して使用した。その結果、BSC7 scFvは、50 ~ 1500 ng/mLの測定範囲でボスカリドと反応した (図5)。一方、表5に示した通り、実験に供試した2種類のアニリド系殺菌剤化合物 (ペナラキシル、フルアジナム) とは、全く反応しなかった。

【0104】

【表 5】

間接競合ELISAにおける scFv BSC72の交差反応性		間接競合ELISAにおける scFv BSC7の交差反応性	
殺菌剤	交差反応性(%)	殺菌剤	交差反応性(%)
ボスカリド	100	ボスカリド	100
			
ベナラキシル	< 0.15	ベナラキシル	< 0.4
			
フルアジナム	< 0.15	フルアジナム	< 0.4
			

【0105】

実施例 14 BSC7抗体のメタノール耐性

このように、新しく合成したボスカリドにカルボキシ基を導入した誘導体を出発材料に、ボスカリドと特異的に反応する新規のモノクローナル抗体BSC7抗体およびBSC72抗体を作製した。さらに、BSC72抗体を出発材料に新規の一本鎖抗体BSC72 scFvを創出した。また、BSC7抗体を出発材料に新規の一本鎖抗体BSC7 scFvを創出した。

そこで、代表例としてBSC7抗体を用いて直接競合ELISAにおけるメタノール耐性を調べた。実験は、ボスカリド溶液中のメタノール濃度を段階的に変えることで行った。結果は、図6に示した通り、吸光度は減少するもののボスカリドとの反応性の低下は軽微であり、堅牢な測定方法が構築できたことが判った。

【0106】

実施例 15 野菜中に残留するボスカリドの測定

堅牢な直接競合ELISAが構築できたことから、野菜中に残留するボスカリドが測定可能なことを添加回収試験によって確認した。まず、野菜を摩砕均一化して5 g分取し、所定の濃度でボスカリドを添加した。30分間静置後、25 mLのメタノールを添加して30分間激しく振とうした。遠心して残渣を除去し、上清1 mLを7.5 mLの蒸留水で希釈し、10%メタノール相当の測定試料を得た。この試料を用いて上記の直接競合ELISAを行い、検量線から元のボスカリド添加濃度を測定値として算出し、回収率を求めた。結果は、表6に示した通り、いずれも良好な回収率を得た。このように、今回作製した一連の抗ボスカリド抗体は、新規であるばかりでなく実用性が高く、殺菌剤ボスカリドの測定に大きな力を発揮することが期待される。

【0107】

10

20

30

【表 6】

ミカン			キャベツ		ホウレンソウ	
添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
0.5	86.7	2.04	NT	NT	NT	NT
1.0	103.4	5.44	108.8	9.76	100.1	9.68
2.0	119.9	4.15	NT	NT	NT	NT
3.0	NT	NT	115.5	9.56	103.8	13.39
5.0	NT	NT	112.9	7.36	NT	NT

キュウリ			トマト		ピーマン	
添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
3.0	116.2	5.59	108.7	13.30	NT	NT
5.0	113.9	12.44	121.9	16.05	119.5	13.20
7.0	124.4	12.13	123.9	8.91	NT	NT
10.0	NT	NT	NT	NT	121.9	16.05
15.0	NT	NT	NT	NT	123.9	8.91

10

【産業上の利用可能性】

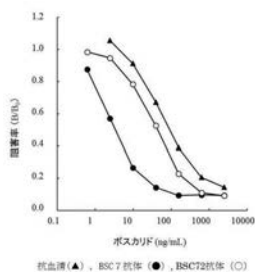
【0108】

本発明によるイムノアッセイは、食品中に残留する殺菌剤ボスカリドを、食品から抽出・希釈するのみで迅速・簡便・安価に測定することができる。

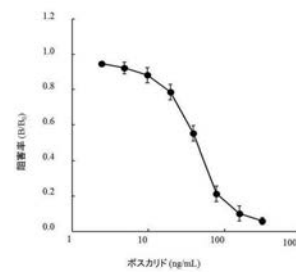
20

本出願は、日本で出願された特願2015-017356（出願日：平成27年1月30日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

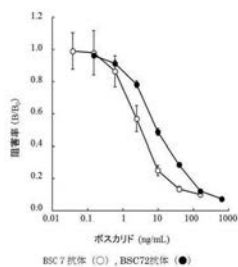
【図 1】



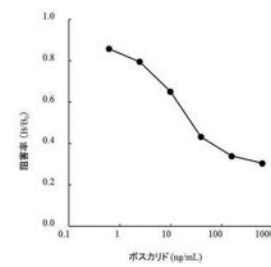
【図 3】



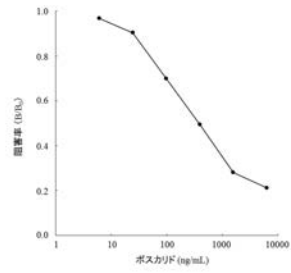
【図 2】



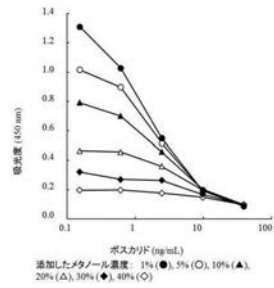
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

2016145201000001.app

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 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	J
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
C 0 7 D 213/82 (2006.01)	C 0 7 D 213/82	C S P

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 岩佐 精二

愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1 - 1 国立大学法人豊橋技術科学大学内

(72)発明者 岩佐 香代

愛知県豊田市八草町秋合 1 2 6 7 番 公益財団法人科学技術交流財団内

(72)発明者 三宅 司郎

京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地 公益財団法人京都高度技術研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA41 CA01 DA02 DA06 DA12 EA02 EA04 FA02 GA03

GA11 GA18 HA08 HA09 HA15

4B064 AG27 CC24 CE10 CE11 CE12 CE13 DA01

4B065 AA90X AA90Y AA91X AB04 AB05 BA02 BA03 BA08 CA25 CA46

4C055 AA01 BA02 BA39 CA02 CA34 CB04 CB11 DA01

4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74 GA21 GA23 GA26 HA32

专利名称(译)	抗凝血酶抗体和使用所述抗体测量吡啶酮胺的方法		
公开(公告)号	JP2016145201A	公开(公告)日	2016-08-12
申请号	JP2016014329	申请日	2016-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人豊桥技术科学大学 株式会社堀场制作所		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人豊桥技术科学大学 公益财团法人科学技术交流财团 公益财团法人京都高度技术研究所 株式会社堀场制作所		
[标]发明人	岩佐精二 岩佐香代 三宅司郎		
发明人	岩佐 精二 岩佐 香代 三宅 司郎		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/02 C12N15/09 C12N5/16 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/531 C07D213/82		
FI分类号	C07K16/44.ZNA C12N15/00.C C12N15/00.A C12N5/16 C12P21/08 G01N33/53.J G01N33/531.A C07D213/82.CSP C12N15/06.100 C12N15/13 C12N15/63.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/CE13 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AB04 4B065/AB05 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C055/AA01 4C055/BA02 4C055/BA39 4C055/CA02 4C055/CA34 4C055/CB04 4C055/CB11 4C055/DA01 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA21 4H045/GA23 4H045/GA26 4H045/HA32		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
优先权	2015017356 2015-01-30 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够诱导对有机溶剂具有高度抗性和高度特异性的抗硼杀螨醇的抗体的化合物，以及由该化合物诱导的抗体或其片段。一种使用抗体或其片段测量样品中的硼卡利特的方法，以及可用于这种测量的测量试剂盒。 解决方案：结构式（式中，R表示-OH，-R³⁹，-NH-R³⁹；或-O-R³⁹；R³⁹表示-（CH₂）_n-COOH，n为1〜10。（代表3的整数）及其抗免疫原性复合物的抗体或其片段，所述免疫原性复合物包含Boscalide衍生物和免疫学上可接受的载体。[选择图]无

