

(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2002 - 275200

(P2002 - 275200A)

(43)公開日 平成14年9月25日(2002.9.25)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 0 7 K 16/12	ZNA	C 0 7 K 16/12	ZNA 4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 5
G 0 1 N 33/53		33/577	B 4 H 0 4 5
33/577		C 1 2 P 21/08	
// C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/569	F

審査請求 未請求 請求項の数 40 L (全 8 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 80599(P2001 - 80599)

(22)出願日 平成13年3月21日(2001.3.21)

(71)出願人 591167430

株式会社関西新技術研究所
大阪府大阪市中央区平野町4丁目1 - 2

(72)発明者 竹田 多恵

東京都世田谷区太子堂3 - 35 - 31 国立小児
病院小児医療研究センター内

(72)発明者 中尾 浩史

東京都世田谷区太子堂3 - 35 - 31 国立小児
病院小児医療研究センター内

(74)代理人 100109737

弁理士 岡崎 豊野

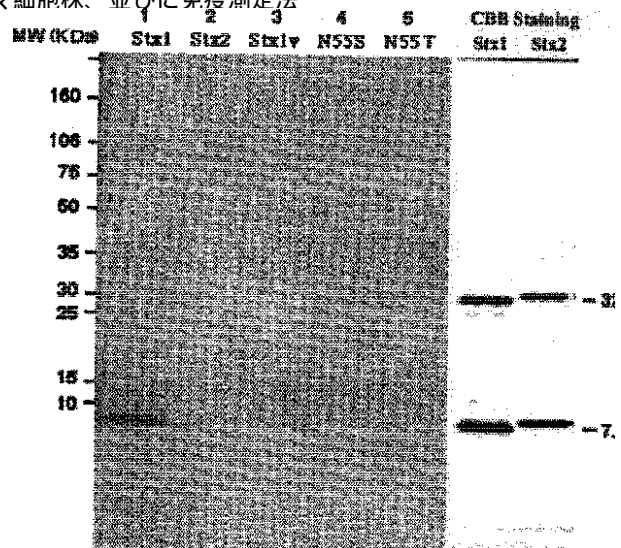
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 大腸菌O157:H7の産生するベロ毒素 (S t x) 1 に対し中和活性を有するモノクローナル抗体、及びこれを産生するハイブリドーマ細胞株、並びに免疫測定法

(57)【要約】

【課題】 Stx1型の毒性発現を中和抑制しうるモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を用いる免疫測定法を提供する。

【手段】 モノクローナル抗体は、大腸菌0157:H7の産生するベロ毒素Stx1のBサブユニット上の55番目のアスパラギンを特異的に認識することにより、Stx1に対する中和活性を有する。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株VTx1-2等により産生される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌0157:H7の産生するベロ毒素(Stx)1のBサブユニット上の55番目のアスパラギンを特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項2】 受託番号FERM P-18249で表されるハイブリドーマ細胞株VTx1-2により産生されることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。

【請求項4】 請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を用いてStx1を特異的に測定することを特徴とする免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、腸管出血性大腸菌0157:H7の産生するベロ毒素(Stx)1のBサブユニットに特異的なモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、並びに該モノクローナル抗体を用いてStx1を高感度に定量及びモニタリングする免疫測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】Stxは毒素活性を担うAサブユニット1分子と、細胞レセプターへの結合活性を担うBサブユニット5分子からなるベロ毒素として知られている。AサブユニットはRNA N-グリコシダーゼ活性によって真核生物の60Sリボソームを失活させ細胞の蛋白合成を阻害し、Bサブユニットは細胞表面に存在する糖脂質であるGb3に特異的に結合する。Stxは、志賀赤痢菌の産生する志賀毒素とアミノ酸配列が同一のStx1及び、アミノ酸配列の相同性が約55%であり生物学的性状はStx1と類似しているが、物理化学的性状や免疫学的性状は全く異なるStx2に分類される。Stxを産生する腸管出血性大腸菌感染症は激しい腹痛と著しい腸管出血を特徴とし、さらに溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症を伴い、後遺症や死亡の原因となるため、最近特に注目され大きな問題となっている。

【0003】腸管出血性大腸菌感染症は1982年に米国で初めて報告され、以来カナダ、ヨーロッパ各国、日本など主に先進国での集団発症が相次いでいるが、その治療法は未だ確立されていない。本菌感染症は、菌の感染よりも菌の産生する特異な毒素であるStxが主原因であるため、第一に本菌感染症であることを迅速に診断し、毒素の影響を抑えるための適切な処置をとることが必要である。しかしながら、現在の診断手法はいずれも検出感度や操作性のうえで問題があり、十分ではない。また、治療法として抗菌薬の投与、毒素の遊離抑制や吸着、中和などの処置が考えられるが、特に抗菌薬投与についてはその効果や、使用の是非が問題となっている。

【0004】Stxに対してヒトは免疫寛容であり、ほとんどの場合ヒト患者血清中に抗Stx抗体は検出されない

ため、Stxに対するワクチン及び治療薬の開発は非常に困難な状況にある。

【0005】一方、Nakaoら[Nakao H. et al. "Monoclonal antibody to shiga toxin 2 which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity", Infect. Immun. 67, 5717-22 (1999)]は、Bサブユニットのレセプター側表面を認識するモノクローナル抗体は毒素の標的細胞への結合を阻害することにより、細胞毒性を抑制することが可能であることをStx2型において報告している。

【0006】Stx1型においても同様に、毒素のBサブユニットのレセプター側表面を認識するモノクローナル抗体は毒素の細胞毒性を中和、抑制する能力を有すると考えられる。このため、Stx1型についても、0157:H7感染症におけるワクチンや治療薬の開発への応用が期待される。

【0007】しかしながら、抗Stx1型モノクローナル抗体の細胞毒性の中和に関わるエピトープは、未だ報告されていない。従って、Stx1型の細胞毒性の中和に関わるエピトープ部位を決定することにより、前述のStx2型の報告とのエピトープ部位の比較検討が可能となり、Stx1型毒素のみならず、両型の毒素活性を中和できるペプチドワクチンの開発が期待できる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、腸管出血性大腸菌感染症の診断においては、0157抗原とともに主要病原因子であるStxの確認が必要である。一般に、主要病原因子を確認するための迅速診断法として、遺伝子学的手法及び免疫学的手法に基づいた検出法が用いられる。たとえば、Polymerase Chain Reaction(PCR)や各種ハイブリダイゼーションを応用した遺伝子学的手法等は、検出感度や特異性において優れているが、熟練を要することと、判定までに数時間を要することから、一次医療機関での使用、普及は困難である。

【0009】一方、免疫学的手法としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素免疫測定法(ELISA)などがよく用いられ、簡易診断法としてラテックス凝集法やイムノクロマト法も開発されている。特に近年、迅速測定法として普及してきたイムノクロマト法では検体(水様便、血便)に濾紙片を入れたのち約5~10分で結果判定が可能であり、現場で簡便かつ迅速に判定できる方法として一次医療機関においても利用されているが、感度が低い事、ならびに非特異反応が見られること等の問題点を有している。

【0010】0157抗原やStx、あるいは血清中の0157抗体を測定するELISA法も開発され上市されているが、一次医療機関での使用においては操作が煩雑である事から、簡便かつ、優れた測定系の開発にはより高特異性、かつ高親和性のモノクローナル抗体を開発する必要がある。

【0011】本発明は、上記のような技術的課題に鑑みなされたものであり、その目的は、Stx1のBサブユニット上の55番目のアスパラギン(Asn55)を特異的に認識しStx1型の毒性発現を中和抑制しうるモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、及び該モノクローナル抗体を用いる免疫測定法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】一般に、生物に対して毒性を示す抗原に対するモノクローナル抗体を製造する場合においては、その製造過程において目的となる抗原を変性させることにより、毒性を失活させ免疫を行う。

【0013】本発明者らは変性剤としてホルマリンを使用することにより精製Stxを失活させ、これを免疫原として用いて動物を免疫し、免疫動物の抗体産生細胞とミエローム細胞を融合させてハイブリドーマ細胞株を調製した。次いで、これらハイブリドーマ細胞株を適切に選択することによって、Stx1のBサブユニットのレセプター表面のAsn55を特異的に認識しStx1に対する中和活性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を樹立した。

【0014】請求項1のモノクローナル抗体は、上記の課題を解決するために、大腸菌0157:H7の産生するベロ毒素(Stx)1のBサブユニット上の55番目のアスパラギンを特異的に認識することを特徴としている。

【0015】請求項2のモノクローナル抗体は、上記の課題を解決するために、受託番号FERM P-18249で表されるハイブリドーマ細胞株VTx1-2により産生されることを特徴としている。

【0016】請求項3のハイブリドーマ細胞株は、上記の課題を解決するために、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴としている。

【0017】上記の構成によれば、前記モノクローナル抗体が、Stx1のBサブユニットのレセプター表面のAsn55を特異的に認識するので、Stx1型の毒性発現を中和抑制することができる。

【0018】請求項4の免疫測定法は、上記の課題を解決するために、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を用いてStx1を特異的に測定することを特徴としている。

【0019】上記の構成によれば、上記免疫測定法が、上記モノクローナル抗体を用いてStx1を特異的に測定することで、高感度かつ特異的にStx1を測定することができる。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明の一実施の形態について、図面に基づいて説明すれば以下のとおりである。

【0021】本実施の形態のモノクローナル抗体は、以下に示す製造方法により得ることができる。まず、粗Stx1を各種のクロマトグラフィーを用いることにより、電

気泳動上で純品となるまで精製する。精製Stx1は、ホルマリンにより失活させトキシド化する事により、免疫原とすることができる。

【0022】上記のように調製したトキシド化Stx1を免疫原とし、アジュバントと乳化したのち動物を免疫する。免疫する動物としては、たとえば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ等を挙げる事ができる。免疫は、たとえば、動物の腹腔内、及び後足肉趾内にトキシド化Stx1 0.5~5 μ gを、2~3週間間隔にて3~4回投与することにより行う。

【0023】最終免疫より3日後に前記免疫動物より抗体産生細胞を回収する。抗体産生細胞は、脾臓細胞、リンパ節由来B細胞などであって良い。この抗体産生細胞をミエローム細胞と常法に従って細胞融合させる。ミエローム細胞としてはマウス、ラット、ヒト由来の細胞株が挙げられる。細胞融合法としてはポリエチレングリコール法、電気的融合法などが挙げられる。

【0024】細胞融合によって得られたハイブリドーマの選択は、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)、エンザイムイムノアッセイ(ELISA)、フルオロイムノアッセイ(FIA)などによって行う。すなわち、Stx1とハイブリドーマ培養上清を反応させ、抗Stx1抗体を産生しているハイブリドーマのウエルを選択し、該ウエル中のハイブリドーマを限界希釈法にてモノクローン化し、抗体産生ハイブリドーマ細胞を樹立する。

【0025】モノクローナル抗体の調製は、例えば次のようにして行う事ができる。あらかじめプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)を投与したマウスの腹腔内に、樹立した抗体産生ハイブリドーマ細胞株を移植して培養する。10~14日後にモノクローナル抗体を含む腹水を回収する。この腹水から、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、あるいはアフィニティークロマトグラフィー等により、モノクローナル抗体を容易に回収できる。

【0026】上記のようにして得られたモノクローナル抗体を用いて、試料中のStx1を測定することができる。このような測定法としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)、エンザイムイムノアッセイ(ELISA)、フルオロイムノアッセイ(FIA)等を用いることができる。本発明のモノクローナル抗体は、これら方法において通常用いられる操作に従って適宜用いることができる。

【0027】また、抗体の標識が必要である場合には、放射性同位元素、酵素、蛍光物質等、当分野で周知のものを用い、常法通り行って良い。

【0028】上記モノクローナル抗体の認識するエピートープは、Stx1型の細胞毒性を中和しうるペプチド配列を提供する。

【0029】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものでは

ない。

〔実施例1〕(Stx1の精製)

Stx1の精製は、Noda ら[Noda, M. et al., "Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin", *Microb Pathog*, 2, 339-49 (1987)]の報告に基づいて実施した。Stx1を産生するレコンピナント株を培養し、集菌した菌体を超音波破碎することによって粗毒素溶液を調製した。次いで硫酸分画、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー、クロマトフォーカシングカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製Stx1を調製した。精製Stx1は Native PAGE 及び SDS PAGE により電気泳動を行い、純度検定を行った。

〔実施例2〕(抗Stx1モノクローナル抗体の作製)

(1) 免疫原の調製

精製したStx1を0.4%ホルマリン溶液中、37℃でインキュベーションすることにより変性させトキシド化した。

(2) マウスの免疫

トキシド化した精製Stx1抗原によるマウスの免疫は、Ribi Adjuvant System, R-730をアジュバントとして行った。即ち、抗原溶液とアジュバントを1:1容量に混合して十分に乳化させ、次いで、これらの乳化液をBALB/cマウス(7~8週齢、雌)の腹腔内(150µl)及び後足肉趾内(50µl)に投与し、マウスを免疫、感作した。約1週間後より尾静脈より採血し、ELISA法により血中抗体価を測定した。追加免疫を約2~3週間間隔で行い、追加免疫より1週間経過後に血中抗体価を測定し、抗体価の推移を観察した。

(3) 細胞融合

Stx1に対する高い抗体産生が認められたマウス尾静脈内にトキシド化した精製Stx1を5µg投与し、最終免疫を行った。最終免疫より3日後にマウスより脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。対数増殖期にあるミローマ細胞(P3-X63-Ag8.653)と脾臓細胞を1:5になるように混合し、ポリエチレングリコール(PEG)法にて細胞融合を行った。融合後の細胞をHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン)添加の10%FCS含有RPMI1640培地中に懸濁させ1~5×10⁵細胞/ウエルになるように96ウエル培養プレートに播種し、37℃及び5%CO₂下で培養した。

(4) 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング及びクローニング

細胞融合より7~10日後に、クローンの増殖が見られたウエルの培養上清を用いて抗体価を測定した。抗体価の測定はエンザイム免疫アッセイ(ELISA)によって行った。

【0030】マイクロタイタープレート(CORNING社

製)の各ウエルに0.5 µg/mlの精製Stx1のPBS(-)希釈溶液(50µl)を加え、室温で2時間静置して固定化した。対照としてStx1を含まない対照溶液(50µl)を用いて同様の処理を行った。0.05%Tween 20を含むPBS(-)(300µl)で各ウエルを3回洗浄のち、PBS(-)で調製した1%ゼラチン(BIO-RAD)溶液(300µl)をウエルに添加し、37℃で2時間静置してブロッキングを行った。ウエルを0.05%Tween 20を含むPBS(-)(300µl)で3回洗浄後、1次抗体を含む試料溶液(50µl)を各ウエルに添加し、37℃、1時間静置して抗原抗体反応を行わせた。

【0031】次に0.05%Tween 20を含むPBS(-)(300µl)で各ウエルを3回洗浄のち、プレート上の固相化Stx1抗原に結合した1次抗体を検出するために0.1%ゼラチンを含有するPBS(-)にて3000倍希釈に調製した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識2次抗体(BIO-RAD)溶液(50µl)を加えて、室温で1時間反応させた。

【0032】ウエルを0.05%Tween 20を含むPBS(-)(300µl)で3回洗浄した後、0.4%(w/v)の0-フェニレンジアミンと0.014%(v/v)の30%過酸化水素水を含む100mMクエン酸ナトリウム溶液(pH4.5)(50µl)を各ウエルに加え、室温で発色反応を行った。10分後に2M硫酸(50µl)を加えて反応停止し、マイクロプレートリーダー(Model 3550, BIO-RAD)にて直ちに490nmの吸光度を測定した。Stx1抗原を固定化した各ウエルの吸光度と対照の吸光度の差を、その抗原に対する試料抗体の結合活性とした。

【0033】抗体産生が確認されたウエルのハイブリドーマを選び培養面積を拡大し、継続した抗体産生が見られたハイブリドーマを限界希釈法によってクローニングした。以上の方法によりStx1に高い特異性を示すモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマVTx1-2を樹立した。

【0034】該ハイブリドーマVTx1-2は平成13年3月9日に工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号としてFERM P-18249を取得している。

(4) アイソタイプ分析と交差反応性

精製Stx1を固相化抗原とし、マウスタイパーキット(BIO-RAD)を用いて樹立したハイブリドーマVTx1-2が産生するモノクローナル抗体のアイソタイプ分析を行った。結果は、表1に示すようにIgG1()であった。

【0035】また、該モノクローナル抗体VTx1-2はStx2と交差反応性を示さず、Stx1に特異であることを各々の毒素を抗原としたELISA法により確認した。結果を表2に示す。表2の結果より、該モノクローナル抗体を用いたStx1測定系は高い特異性を示すことがわかった。

【0036】

【表1】

抗体名	II鎖				I鎖			
	G1	G2a	G2b	G3	M	A	ル	ス
VTxI-2	2.465	0.193	0.098	0.201	0.143	0.264	1.753	0.207

【0037】

* * 【表2】

モノクローナル抗体VTxI-2の交差反応性		
抗原	Stx1	Stx2
抗体価 (OD ₄₉₀)	1.229	0.072

【0038】(5)モノクローナル抗体の大量調製と精製

BALB/cマウス腹腔内へプリスタン〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(和光純薬)〕(0.5ml)を投与し、2~3週間飼育した。予め、対数増殖期に維持しておいたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマVTxI-2を回収し、FCS不含のRPMI1640中に 1×10^7 細胞/0.5mlになるよう懸濁した。この細胞をプリスタン前投与のBALB/cマウス腹腔中に移植し、10~14日後に腹部より注射器で腹水を回収した。採取した腹水をポアサイズ0.22 μ mのフィルターを用いてる過後、ろ液をプロテインG-セファロースカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、モノクローナル抗体を調製した。

* [実施例3] (抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2の毒素中和活性の評価)

ヒト、及び動物由来の種々のStxに対する、抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2の中和スペクトルについて評価を行った。

【0039】該モノクローナル抗体の存在下に、各種毒素を作用させたvero細胞の生存率を測定した。該モノクローナル抗体非存在下のvero細胞の生存率に対し、有意に高い生存率を示す場合に中和活性を有するもの判定した。表3に結果を示すように該モノクローナル抗体は、Stx1の毒素活性のみを中和した。

20 【0040】

* 【表3】

抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2のStx中和スペクトル			
Strain	Origin	Toxin type	Neutralization Assay
E. coli O157 V50	Human	Stx2vh	—
E. coli O157 V354	Human	Stx2vh	—
E. coli O157 V601	Human	Stx2vh	—
E. coli O157:H7 TK040	Human	Stx2, Stx2vx1	—
E. coli O157:H7 TK051	Human	Stx2vx1	—
E. coli O157:H7 O91:H21	Human	Stx2vha, Stx2vhb	—
E. coli O22:H7- KY019	Cow	Stx2vhb, Stx2vx2	—
E. coli O27:H21 TK906	Pig	Stx2vhb, Stx2vx3	—
Recombinant E. coli VS-1		Stx1	+
Recombinant E. coli VS-4		Stx1v	—
Recombinant E. coli		Stx2	—
Recombinant E. coli		Stx2vp1	—

【0041】[実施例4] (抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2のエピトープ解析)

(1)ウエスタンブロッティングによる解析

ウエスタンブロッティングにより、本発明のモノクローナル抗体である、抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2の認識部位の確認を行った(図1)。この結果、VTxI-2はSt

x1 のBサブユニットを特異的に認識しており(図1, レーン1精製Stx1)、Stx2、及びStx1vに対しては結合しない事が明らかとなった(図1, レーン2, 3)。

(2) 変異毒素に対する中和活性の比較

VTxI-2の認識するエピトープ部位を明らかにするために、中和活性を有するStx1と中和活性を示さないStx1v、Stx2の各Bサブユニットのアミノ酸配列とを比較した。図2に示すように、Stx1とStx1vのBサブユニットのアミノ酸配列はThr1、Gly25、Asn55の3ヶ所のみが異なっていることから、VTxI-2の認識するエピトープは、これら3つのアミノ酸のいずれかを含む配列上に存在すると考えられた。

【0042】さらに詳細な解析を行うために、Stx1のBサブユニットの3つのアミノ酸をStx1vの相当するアミノ酸に置換した変異毒素3種(T1A: Thr1 Ala1, G25A: Gly25 Ala25, N55T: Asn55 Thr55)をSite-directed mutagenesis法を用いて調製した。調製した変異体は全て毒素活性を保持していた。

【0043】図3は、Stx1及びその各種変異毒素(T1A, G25A, N55T)に対する抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2の中和活性を示すグラフである。VTxI-2と3種の変異株との反応性を図3に示す細胞毒性の中和試験、及び図2に示すウエスタンブロットにより解析した結果、VTxI-2はT1A, G25Aについては中和活性を示したが、N55Tの毒素活性のみを中和できず(図3)、また、ウエスタンブロットではN55TのBサブユニットに結合しない事が明らかとなった(図1, レーン5, N55T)。また、VTxI-2は、Asn55をStx2の相当するアミノ酸Serに置換した変異毒素(N55S)のBサブユニットに対しても、結合しなかった(図1, レーン4, N55S)。

【0044】これらの結果より、Asn55がVTxI-2のエピトープを構成する重要なアミノ酸の一つであることが明らかとなった。Steinら[Stein, P.E., et al., "Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from E. coli.", Nature, 355, 748-750 (1992)]のStxの結晶構造解析の結果より、VTxI-2のエピトープと考えられるAsn55はBサブユニットが5量体を形成している際、最も外側の突出した領域にあり、細胞側に向いている事が報告されている。また、Lingら[Ling, H., et al., "Structure of the Shiga-like toxin 1 B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3." Biochemistry, 37, 1777-1788 (1998)]はAsn55が結合部位2(Site2)に有り、レセプター(Gb3: globotriaosyl-ceramide: Gala1-4-galb1-4-g*

*lucosyl-ceramide)のGlcとの結合に関与すると報告している。これらの報告と合わせるとVTxI-2はStx1の標的細胞との結合部位、またはその近傍に結合することにより、Stx1と標的細胞上のレセプターとの結合を阻害し、Stx1の細胞毒性を中和しているものと考えられる。

〔実施例5〕(ELISAによるStx1の測定)

抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2を用いて、本発明の免疫測定法としてのサンドイッチELISA法を構築し、その測定感度の検討を行った。VTxI-2はECLキット(Amersham Pharmacia Biotech社製)によりビオチン標識を行った。マイクロタイタープレートにVTxI-2(50 μ l)を添加し、室温で1時間静置させたのちブロッキングし、1次抗体固定化プレートを作成した。1次抗体固定化プレートの各ウエルに種々の濃度の精製Stx1(50 μ l)、あるいはPBS(-)(50 μ l)を添加して室温、1時間反応させた。次いで0.1%ゼラチンを含むPBS(-)で希釈したビオチン標識VTxI-2(50 μ l)を2次抗体として各ウエルに加え、室温で1時間反応させた。固相に結合した2次抗体を検出するために、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(KP1)を用いて発色反応を行い、酵素反応停止後に直ちに450nmにおける吸光度を測定した。結果を図4に示す。その結果、VTxI-2-VTxI-2の組合せによるサンドイッチ測定系では2ngのStx1の検出が可能であった。

【0045】

【発明の効果】本発明により、Stx1のBサブユニット上のAsn55を特異的に認識し、Stx1中和活性を有するモノクローナル抗体が提供された。本発明のモノクローナル抗体を利用することにより、腸管出血性大腸菌感染症における有効なワクチン、あるいは治療薬が開発できる。また、本発明のモノクローナル抗体はStx1を特異的に認識しており、高感度、高精度かつ迅速なStx1の免疫測定法を構築することができる。

【図面の簡単な説明】

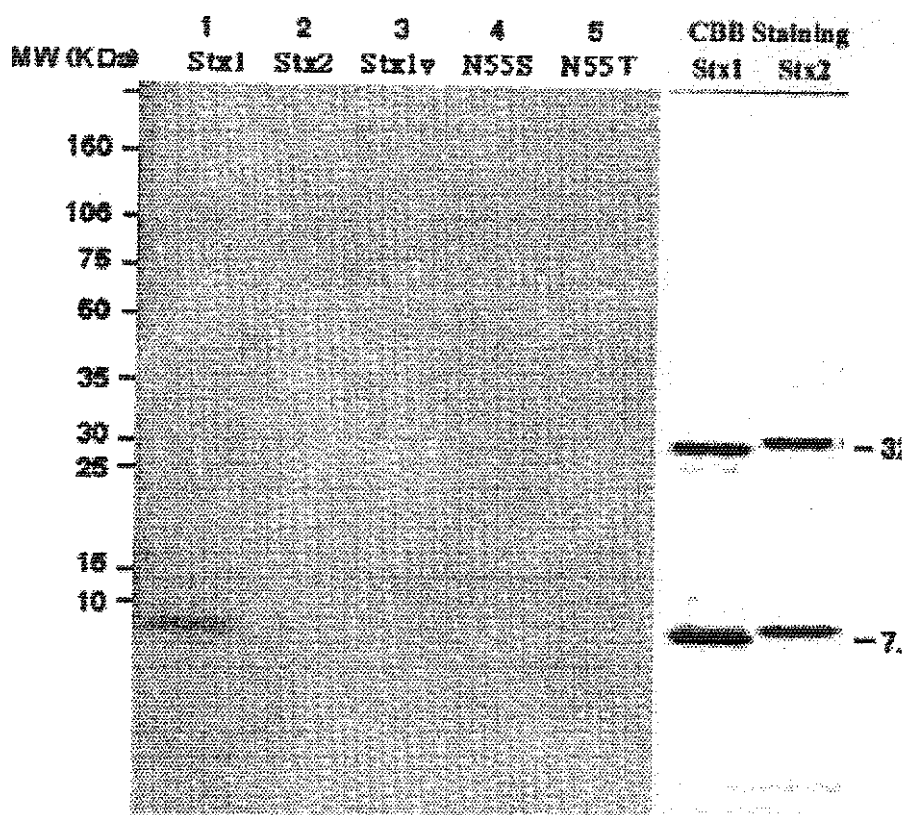
【図1】抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2のウエスタンブロット解析を示す説明図である。

【図2】Stx1, Stx2, Stx1vのBサブユニットのアミノ酸配列の比較を示す説明図である。

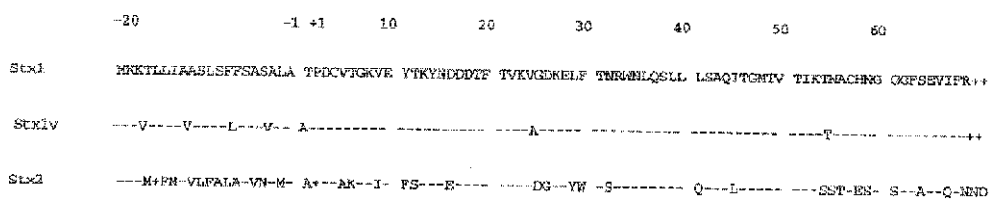
【図3】変異毒素に対する抗Stx1モノクローナル抗体VTxI-2の中和活性を示すグラフである。

【図4】VTxI-2-VTxI-2の組合せを用いたサンドイッチ測定系によりStx1を測定した結果を示すグラフである。

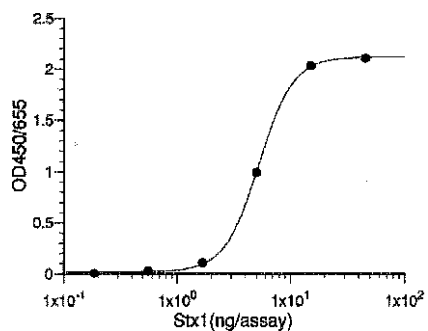
【図1】



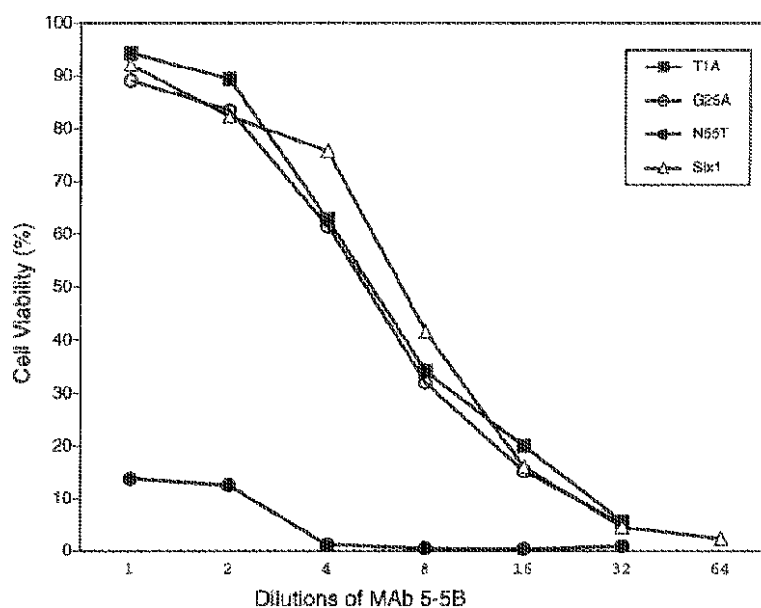
【図2】



【図4】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
G 0 1 N 33/569		(C 1 2 P 21/08	
(C 1 2 P 21/08		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 5/00	B

(72)発明者 高木 陽子
 京都府京都市下京区中堂寺南町17 京都リ
 サーチパーク 株式会社関西新技術研究所
 内

(72)発明者 片岡 千和
 京都府京都市下京区中堂寺南町17 京都リ
 サーチパーク 株式会社関西新技術研究所
 内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA15
 4B065 AA26Y AA92X AB05 CA25
 CA46
 4H045 AA11 AA30 CA11 DA76 EA29
 EA52 FA72

专利名称(译)	一种单克隆抗体，具有针对由大肠杆菌O157：H7产生的Verotoxin (Stx) 1的中和活性，产生该单克隆抗体的杂交瘤细胞系，以及免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2002275200A	公开(公告)日	2002-09-25
申请号	JP2001080599	申请日	2001-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社BLOOD		
申请(专利权)人(译)	关西新技术研究所		
[标]发明人	竹田多惠 中尾浩史 高木陽子 片岡千和		
发明人	竹田 多惠 中尾 浩史 高木 陽子 片岡 千和		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/12 C12N5/10 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/569 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/12.ZNA G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08 G01N33/569.F C12R1/91 C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA15 4B065/AA26Y 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够中和Stx1型毒性表达的的单克隆抗体，一种产生该单克隆抗体的杂交瘤以及使用该单克隆抗体的免疫测定方法。意思是：该单克隆抗体通过特异性识别大肠杆菌O157：H7产生的毒素毒素Stx1的B亚基上的第55个天冬酰胺而具有针对Stx1的中和活性。单克隆抗体由杂交瘤细胞系VTxl-2等产生。

抗体、及びこれを産生するハイブリドーマ細胞株、並びに免疫測定法

(57)【要約】

【課題】 Stx1型の毒性発現を中和抑制しうるモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を用いる免疫測定法を提供する。

【手段】 モノクローナル抗体は、大腸菌O157:H7の産生するベロ毒素Stx1のBサブユニット上の55番目のアスパラギンを特異的に認識することにより、Stx1に対する中和活性を有する。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株VTxl-2等により産生される。

