

(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2019-158627

(P2019-158627A)

(43) 公開日 令和1年9月19日(2019.9.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	F 4 C 0 8 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
CO 7 K 14/30 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
CO 7 K 16/12 (2006.01)	CO 7 K 14/30	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	CO 7 K 16/12	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-46234 (P2018-46234)  
 (22) 出願日 平成30年3月14日 (2018.3.14)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(71) 出願人 598041566  
 学校法人北里研究所  
 東京都港区白金5丁目9番1号

(74) 代理人 100098556  
 弁理士 佐々 紘造

(74) 代理人 100184767  
 弁理士 佐々 健太郎

(72) 発明者 花木 秀明  
 東京都港区白金五丁目9番1号学校法人北里研究所内

(72) 発明者 松井 秀仁  
 東京都港区白金五丁目9番1号学校法人北里研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイコプラズマ・ニューモニエの特異抗原検出法、及び検出デバイス

(57) 【要約】

【課題】 その抗体が高感度にマイコプラズマ・ニューモニエを検出できる、マイコプラズマ・ニューモニエ特異的な抗原タンパク質を発見し、その抗体を作成・利用して、簡便かつ迅速なマイコプラズマ・ニューモニエの測定方法と測定デバイスを提供すること。

【解決手段】 マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN295、MPN314、MPN479、MPN574のいずれか1でコードされるタンパク質のうち、1又は2以上を検出することを特徴とするマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法、及びその抗体用い、免疫学的手法でマイコプラズマ・ニューモニエを検出する方法である。免疫学的手法としてはELISA又はイムノクロマトグラフィックアッセイを用いることができる。またこれらタンパク質を抗原とするワクチンを提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の ( i ) 又は ( i i ) のタンパク質のうち、1 又は 2 以上を検出することを特徴とするマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法。

( i ) マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子 M P N 2 9 5、M P N 3 1 4、M P N 4 7 9、M P N 5 7 4 のいずれか 1 でコードされるタンパク質

( i i ) ( i ) のタンパク質のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつマイコプラズマ・ニューモニエ特異的で、抗原性を有するタンパク質

## 【請求項 2】

以下の ( i ) 又は ( i i ) の抗体のうち、1 種類又は 2 種類以上を用い、免疫学的手法でマイコプラズマ・ニューモニエを検出する方法。

( i ) マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子 M P N 2 9 5、M P N 3 1 4、M P N 4 7 9、M P N 5 7 4 のいずれか 1 でコードされるタンパク質に対する抗体

( i i ) マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子 M P N 2 9 5、M P N 3 1 4、M P N 4 7 9、M P N 5 7 4 のいずれか 1 でコードされるタンパク質のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつマイコプラズマ・ニューモニエ特異的で、抗原性を有するタンパク質に対する抗体

## 【請求項 3】

免疫学的手法が Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 又はイムノクロマトグラフィックアッセイである、請求項 2 のマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法。

## 【請求項 4】

免疫学的手法が、サンドイッチ法を利用したものである、請求項 2 又は 3 のマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 の検出方法で、マイコプラズマ・ニューモニエを検出する、マイコプラズマ・ニューモニエ検出デバイス。

## 【請求項 6】

マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子 M P N 2 9 5、M P N 3 1 4、M P N 4 7 9、M P N 5 7 4 のいずれか 1 でコードされるタンパク質、又はマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子 M P N 2 9 5、M P N 3 1 4、M P N 4 7 9、M P N 5 7 4 のいずれか 1 でコードされるタンパク質のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつマイコプラズマ・ニューモニエ特異的で、抗原性を有するタンパク質、又はこれらの部分ペプチド、を抗原とするワクチン。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新たに見出したマイコプラズマ・ニューモニエ特異抗原を利用したマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法及び検出デバイスに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、非定型肺炎患者からのマイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae* : *M. pneumoniae*) の分離率が上昇している。マイコプラズマ・ニューモニエは、特に小児に対して肺炎や気管支炎を引き起こす起因菌の一種であり、培地上で自己増殖可能な最も小さい微生物である。この病原体は、細胞壁を持たないため細胞壁合成阻害剤である - ラクタム系抗菌薬が効かない。小児の上気道感染症には頻りに経口の - ラクタム系抗菌薬が使用されるが、上記のようにマイコプラズマ・ニューモニエには効果がなく、重症化・難治性化する場合も認められる。このことから、マイコプラズマ・ニューモニエを原因菌とする上気道感染症を診断することは非常に重要である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 3 】

マイコプラズマ肺炎の診断は、補体結合反応（CF）、受身凝集反応（PA）、蛍光抗体法や遺伝子的検査、そして培養法などが実施されている。しかし、抗体の上昇には数週間の時間を要するため、CFやPAの結果は治療終了後での確定診断ではない。さらに、近年では遺伝子検出技術を用いた診断方法が実施されてきているが、特別な機器や熟練した操作技術が必要であることから、実施可能な医療施設は限られているのが現状である。また病原体自身の検出が最も確実な診断法であるが、その増殖には数週間の時間を要するため培養法は、治療を目的とした診断方法としては適していない。

## 【 0 0 0 4 】

現在、上記問題点を解決するために、マイコプラズマ・ニューモニエ特異的な抗原を、抗原抗体反応を利用し検出することで、マイコプラズマ・ニューモニエを短時間で検出する方法が検討あるいは実用化されている。

例えば、GenBank ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000912.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000912.1)) 記載のマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN1からMPN688のうちMPN141 (P1) より合成されるP1タンパクに特異的なモノクローナル抗体を使用した検出方法が特許文献1において記載されている。

また、特許文献2ではGenBank ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000912.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000912.1)) 記載のマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN1からMPN688のうちMPN539 (rpIL) より合成される50sリボソームタンパクL7/L12に特異的な抗体を用いた検出方法が記載されている。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 1 3 - 7 2 6 6 3 号 公 報

【 特許文献 2 】 特開 2 0 0 9 - 1 3 1 1 7 4 号 公 報

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 6 】

本発明の目的は、その抗体が高感度にマイコプラズマ・ニューモニエを検出できる、マイコプラズマ・ニューモニエ特異的な抗原タンパク質を発見し、その抗体を作成・利用して、簡便かつ迅速なマイコプラズマ・ニューモニエの測定方法と測定デバイスを提供することである。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 7 】

本発明者は、上記目的を達成するために、マイコプラズマ・ニューモニエのゲノム情報を利用して、マイコプラズマ・ニューモニエ特異的な抗原タンパク質を見出すことで、本発明に到達した。すなわち、本発明は以下のとおりである。

## 【 0 0 0 8 】

1. 以下の ( i ) 又は ( i i ) のタンパク質のうち、1又は2以上を検出することを特徴とするマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法。

( i ) マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN 2 9 5、MPN 3 1 4、MPN 4 7 9、MPN 5 7 4のいずれか1でコードされるタンパク質

( i i ) ( i ) のタンパク質のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつマイコプラズマ・ニューモニエ特異的で、抗原性を有するタンパク質

2. 以下の ( i ) 又は ( i i ) の抗体のうち、1種類又は2種類以上を用い、免疫学的手法でマイコプラズマ・ニューモニエを検出する方法。

( i ) マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN 2 9 5、MPN 3 1 4、MPN 4 7 9、MPN 5 7 4のいずれか1でコードされるタンパク質に対する抗体

( i i ) マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN 2 9 5、MPN 3 1 4、MPN 4

10

20

30

40

50

79、MPN574のいずれか1でコードされるタンパク質のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつマイコプラズマ・ニューモニエ特異的で、抗原性を有するタンパク質に対する抗体

3. 免疫学的手法がEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 又はイムノクロマトグラフィックアッセイである、前記2のマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法。

4. 免疫学的手法が、サンドイッチ法を利用したものである、前記2又は3のマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法。

5. 前記1~4のいずれか1の検出方法で、マイコプラズマ・ニューモニエを検出する、マイコプラズマ・ニューモニエ検出デバイス。

6. マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN295、MPN314、MPN479、MPN574のいずれか1でコードされるタンパク質、又はマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN295、MPN314、MPN479、MPN574のいずれか1でコードされるタンパク質のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され、かつマイコプラズマ・ニューモニエ特異的で、抗原性を有するタンパク質、又はこれらの部分ペプチド、を抗原とするワクチン。

【発明の効果】

【0009】

本発明のマイコプラズマ・ニューモニエの検出方法や検出デバイスを用いることで、今までと異なる抗原タンパク質、あるいはそれに対する抗体を用いて、マイコプラズマ・ニューモニエの検出を短時間で行うことが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】新たに見出した4つの抗原に対する抗体を用い、ELISA法で各種菌体を測定して、各抗原のマイコプラズマ・ニューモニエ特異性を調べた結果を示している。

【図2】イムノクロマトグラフィックアッセイで測定する際の検出デバイスであるテストストリップの構成例を示している。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明のタンパク質は、新たに見出された、マイコプラズマ・ニューモニエ特異的な抗原タンパク質で、GenBank ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC\\_000912.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_000912.1)) 記載のMycoplasma pneumoniae M129株のMPN295、MPN314、MPN479、MPN574遺伝子でそれぞれコードされるタンパク質である。これらタンパク質を検出することで、マイコプラズマ・ニューモニエの有無を調べることができる。これらタンパク質は、抗原抗体反応を利用し免疫学的手法で検出するのが、簡便かつ迅速で好ましいが、質量分析などその他のタンパク質分析方法で検出することもできる。タンパク質の検出には、複数のペプチド断片や、特徴的なペプチド配列を検出することで、タンパク質の存在を明らかにする場合も、含まれる。検出されるタンパク質は、配列表と厳密に一致する必要はなく、同じマイコプラズマ・ニューモニエでも菌株ごとに配列がやや異なる可能性があり、菌株間の違いの範囲内で同一のタンパク質と判断できるのであれば、それらを検出することも含まれる。また、マイコプラズマ・ニューモニエの検出に使われる既存のタンパク質、例えばP1タンパク質やL7/L12リボソームタンパク質も合わせて測定・検出すれば、特異性や感度を高められる可能性がある。

【0012】

タンパク質に対する抗体は、それぞれのタンパク質の抗体であればどのようなものを用いてもよく、ポリクローナル抗体を用いても、モノクローナル抗体を用いてもよいが、品質の均一性の観点から、モノクローナル抗体を用いることがより好ましい。抗体は、1種類または2種類以上用いてもよい。ここでの種類は、異なるタンパク質に対する抗体であれば、当然、異なる種類の抗体といえ、さらに同じタンパク質に対するものであっても、ものとして異なれば、異なる種類の抗体といえる。ポリクローナル抗体は免疫感作すること

10

20

30

40

50

に、異なる種類の抗体と考える。

【0013】

マイコプラズマ・ニューモニエを、抗体を用いて、免疫学的手法で検出する方法としては、例えばE L I S A (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) やイムノクロマトグラフィックアッセイが挙げられる。

【0014】

E L I S A やイムノクロマトグラフィックアッセイは、抗原を2つの抗体で挟みこむサンドイッチ法タイプのもを用いてもよい。この場合、挟み込む2つの抗体の組み合わせは、ともに、マイコプラズマ・ニューモニエ特異的であれば特に制限はないが、モノクローナル抗体を用いるときは、エピトープが重ならないか、近くにないような組み合わせとすることが好ましい。さらに、既存の、マイコプラズマ・ニューモニエ特異的タンパク質に対する抗体と組み合わせ用いてもよく、例えば、MPN 295でコードされるタンパク質に対する抗体と、抗P1抗体を組み合わせ用いてもよい。

10

【0015】

検出デバイスは、例えば、あらかじめ固相化抗体がコーティングされたプレートのwellにサンプルを入れ1次反応を行い、次に洗浄後酵素標識第二抗体を入れ、酵素反応を行うE L I S A用のデバイスや、膜状にあらかじめ金属コロイド等で標識された抗体と、膜状の移動先にキャプチャー抗体が敷かれていて、検体の液滴を膜状の金属コロイド標識抗体上に滴下するのみで、マイコプラズマ・ニューモニエの有無を判定できる、イムノクロマトグラフィックアッセイを利用した検出デバイスが挙げられる。

20

【0016】

本発明における、マイコプラズマ・ニューモニエ由来特異抗原に対する抗体を用いたイムノクロマトグラフィックアッセイは、抗原抗体反応の高い特異性や感度と、クロマトグラフィーの優れた分離技術が融合した方法である。そのデバイスは安価で操作も簡便であり、特別な装置も試薬も不要である。また、短時間で診断結果が得られるため外来診療の現場で検査する事ができ、その結果を用いて適切な抗菌薬治療を行うことが可能となる。

【0017】

本発明で見出された特異抗原を、マイコプラズマ・ニューモニエ予防のためのワクチンとして使用することもできる。本発明により見出された特異抗原を1ないし2以上用い、この抗原を不活化した後、アジュバントと組み合わせ免疫に使用できる。特異抗原の種類、組み合わせ等により、より免疫原性の高いものを選別して使用することが好ましい。

30

【0018】

次に、マイコプラズマ・ニューモニエ特異抗原を見出し、これに対する抗体を作成し、これを利用して抗原を検出して、マイコプラズマ・ニューモニエの有無を調べる方法を示す。

【0019】

マイコプラズマ・ニューモニエ特異抗原は、ゲノム情報を利用し他菌種と相同性が低いタンパク質で、かつ、マイコプラズマ・ニューモニエにおいて発現量が高いタンパク質を選定する。選定されたタンパク質を製造あるいは入手して、マウスに接種しポリクローナル抗体を作成し、これを用いたE L I S Aにて他菌種との交差反応性およびマイコプラズマ・ニューモニエとの反応性を比較して、マイコプラズマ・ニューモニエに極めて特異性の高いタンパク質を絞り込み、最適候補を見出すことができる。

40

【0020】

この最適候補の抗原タンパク質の発現系を構築し、遺伝子組み換え抗原タンパク質を得て、これに対する抗体を作成し、その特異性、感度などを調べることができる。

抗体作成の際の免疫については、一般的な手法で実施できる。例えば、上記、遺伝子組み換え抗原タンパク質をPhosphate buffered saline (PBS)などの溶媒に溶解し、溶解後の抗原とアジュバンドをエマルジョン化し、免疫対象の皮下もしくは腹腔などに投与を行う。免疫の対象としては哺乳動物、鳥類などが適当であり、マウス、ラットなどが好ましい。さらに、アジュバンドとしては水酸化ナトリウム、水酸化アルミニウム、リン酸カル

50

シウム、リン酸アルミニウム、流動パラフィンなどがあるが、フロイントの完全アジュバントもしくはフロイントの不完全アジュバントを用いるのが好ましい。投与量については免疫対象動物ごとに適宜選択することが望ましいが、10~100 µg/ml程度が好ましい。

なお、免疫感作に用いる抗原は必ずしも、抗原タンパク質に限らず、その部分ペプチドを用いることもできる。

#### 【0021】

免疫した動物の脾臓ないしリンパ節を取り出し、これらの細胞と、ミエローマ細胞を細胞融合させ、さらに所定の方法でスクリーニング、クローニングすることで、目的の抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

#### 【0022】

クローニングされたハイブリドーマは、マウス腹水法で増殖させてもよいし、細胞培養で増殖させてもよい。増殖後の抗体はアフィニティークロマトグラフィーで精製純化することができる。

#### 【0023】

精製純化した抗体を使って、イムノクロマトグラフィックアッセイのデバイスを製造するには、標識抗体、クロマトグラフィー担体に相当するメンブレン、キャプチャー抗体などが必要となる。

標識抗体を製造する際の標識に用いる抗体担持体に特に制限はないが、着色ラテックス粒子、シリカ粒子、磁性粒子、金コロイド粒子、白金コロイド粒子などが好ましく、特に金コロイド粒子が好ましい。金コロイド粒子を用いる場合その粒径は20nm~80nm程度が好ましく、30~60nmがより好ましく、特に40nmが好ましい。

メンブレンとしては、ガラス繊維、ナイロン、ニトロセルロース、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)、セルロースアセテートなどの微多孔質物質が挙げられるが、特にニトロセルロースからなる微多孔質物質が好ましい。

#### 【0024】

本発明においては、サンプルである、検体浮遊液の処理については、患者などから採取された検体におけるマイコプラズマ・ニューモニエ菌体を単離し、抗原認識部位を露出、懸濁させるために、非イオン界面活性剤、緩衝液、無機塩類を含有させることが望ましい。

#### 【0025】

非イオン界面活性剤としては、Tween20(ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)、TritonX-100(ポリエチレングリコールモノ-p-イソオクチルフェニルエーテル)、Brij35(ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル)、Brij58(ポリオキシエチレン(20)セチルエーテル)、NP-40(ノニデットP40)などが挙げられる。

#### 【0026】

緩衝液としてはトリス塩酸緩衝液、トリシン緩衝液、ピシン緩衝液などを用いることができるがこれらに限定されない。また、濃度は10mMから200mM程度が好ましい。

#### 【0027】

含有させる無機塩類は特に限定されないが、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩などが挙げられる。さらに、その中では塩化ナトリウムがより好ましい。

#### 【0028】

この、界面活性剤等で処理したサンプルを、イムノクロマトグラフィックアッセイのデバイスに供して、マイコプラズマ・ニューモニエの有無を調べることができる。

#### 【実施例】

#### 【0029】

以下に、本発明を実施例で説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

#### 【0030】

実施例1

10

20

30

40

50

### 1. マイコプラズマ・ニューモニエ特異的な抗原タンパク質の絞り込み

GenBank ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000912.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000912.1)) 記載のマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子MPN1からMPN688について、BLAST検索により、他菌種と配列の相同性を確認しその相同性が低く、かつ、参考資料1を参照しマイコプラズマ・ニューモニエで発現量が高いタンパク質を選定した。選定したタンパク質を製造し、マウスに接種し、抗体を作製した。それら抗体を用いELISAにて他菌種との交差反応性およびマイコプラズマ・ニューモニエとの反応性を比較した。その結果、マイコプラズマ・ニューモニエ特異性が極めて高かったMPN295、MPN314、MPN479、MPN574より合成されるタンパク質を抗原として見出した。

参考資料1 : Tobias Maier, Alexander Schmidt et al., *Molecular Systems Biology* 51 1, (2011). Quantification of mRNA and protein and integration with protein turn over in a bacterium

【0031】

### 2. 抗原タンパク質の作製

*M. pneumoniae*からDNAを抽出し、PCRにて前記タンパク質抗原をコードする目的の遺伝子を増幅した。その増幅産物をpETBlue2プラスミドベクターに組み込み、これを大腸菌Nova Blueに導入し発現プラスミドを構築した。この大腸菌を培養し、構築したプラスミドを抽出し、大腸菌Tuner(DE3)pLacIに導入し*Escherichia coli*でのタンパク質発現系を構築した。さらに、この大腸菌を培養して、抗原タンパク質を生産し、そのタンパク質をアフィニティーカラムで精製し遺伝子組み換え抗原タンパク質を得た。

【0032】

### 3. マウスへの免疫感作

0.2から1.0mg/mLに調製した遺伝子組み換え抗原タンパク質とFreund's Complete Adjuvant (FCA)を等量混合し、vortexした後、超音波破砕機 (sonics vibracell VC-505)でエマルジョンを作製した。その免疫源をBALB/cAJcl (日本クレア)のマウス皮下に100から500 $\mu$ lを2週間空けて2回投与し、その2週間後に1回の計3回投与を行った。その1週間後に、このマウスの抗体を含む血液を使ったELISAで抗体価が上昇していることを確認し、脾臓もしくはリンパ節を採取した。

【0033】

### 4. ミエローム細胞の培養

ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシンBを添加したRoswell Park Memorial Institute1640 (RPMI1640)培地に、Fetal Bovine Serum (FBS)を10%の割合で添加した培地でマウスミエローム細胞 (P3X63-Ag8.653)の培養を行った。

【0034】

### 5. ミエローム細胞及びマウス由来細胞の調製

マウスから採取した脾臓ないしリンパ節をハサミで細断し、無血清培地で洗いながらパーポリスマンで75 $\mu$ mのメッシュを通した。1,000rpm、5分間遠心処理し洗浄を行い、細胞数をカウントした。その後、脾臓細胞ないしリンパ節細胞：ミエローム細胞を5：1程度に調製し、1,000rpm、5分間遠心処理を行い、細胞ペレットを37 $^{\circ}$ 温水中で2分間インキュベートした。

【0035】

### 6. 細胞融合

37 $^{\circ}$ に保温した1mLのポリエチレングリコール1500 (PEG1500; Roche)を調製した細胞ペレットに1分かけてゆっくりと攪拌するように加え、その後1分間攪拌を継続した。さらに37 $^{\circ}$ に保温したペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシンB添加RPMI1640培地4.5mLを3分間穏やかに攪拌しながら加え、さらに同培地4.5mLを2分間穏やかに攪拌しながら加えた。1,000rpm、5分間遠心処理を行い細胞ペレットにペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシンBと、10%の割合でFBSを添加したGIT培地20mLを加え懸濁した後、1,000rpm、5分間遠心処理を行った。そして、hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) サプリメント (SIGMA)を添加した10%FBSを含むGIT培地にBM condimedH1 (Roche)を加えた

10

20

30

40

50

培地に細胞を浮遊させ、96wellプレートに分注し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で7日間から10日間程度培養を行った。

【0036】

#### 7. ハイブリドーマのスクリーニング(ELISA)

炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.3) で5 µg/mlに希釈したM. pneumoniae (ATCC29342) 菌体破砕液を、ELISA用96wellプレートに50 µl/well分注し冷蔵で一晩反応させた。そして、炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.3) で2回洗浄を行い、0.5%Bovine Serum Albumin (BSA) 添加炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.3) を100 µl/well添加し、室温で1時間反応させブロッキングを行った。続いて、ハイブリドーマを7日間から10日間程度培養後の培養上清を0.1%TritonX-100添加緩衝液で2倍希釈し、50 µl/well分注後室温で2時間反応させた。次に0.1%TritonX-100添加緩衝液にて4回洗浄を行い、同緩衝液で5,000倍希釈した酵素標識抗マウスIg抗体を室温で1.5時間反応させた。再度0.1%TritonX-100添加緩衝液にて4回洗浄を行い、TMB基質溶液を50 µl/well分注し15分反応後1Mリン酸を50 µl/well添加し反応を停止させた。続いてマイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定した。

10

【0037】

#### 8. ハイブリドーマのクローニング

ELISAで抗体産生の確認されたハイブリドーマは、限界希釈法によりクローニングを実施した。なお、培地は10%FBS、hypoxanthine-thymidine (HT) サプリメント (SIGMA) 添加GIT培地を使用した。

20

【0038】

#### 9. マウス腹水化

0.5mlの腹水誘導試薬プリスタンをハイブリドーマ接種の10日前および3日前にマウス腹腔内に接種し、 $1 \times 10^6$ から $10^7$ 個のハイブリドーマ細胞を接種した。そして、1から2週間後に腹水を回収した。

【0039】

#### 10. 抗体精製

抗体の精製にはAb-Rapid SPiN EX (Protenova) を使用した。カラムへの結合と洗浄にはPBSを、抗体の溶出には0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH4.0を、溶出したIgG抗体の中和には1MTrisを使用した。精製後のIgG抗体はPBSにて透析後-20℃で保存した。

30

【0040】

#### 11. ELISA法におけるマイコプラズマ・ニューモニエの検出

菌体破砕抗原は5 µg/ml (ここで、菌体破砕液のタンパク質濃度を菌体破砕抗原の濃度とする。以下同じ)、リコンビナントタンパク抗原は1 µg/mlとなるように炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.3) で希釈し、1ウェルあたり50 µl分注し、4℃で一晩静置した後室温で4時間振盪した炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.3) を1ウェルあたり100 µl分注し、室温で1分間振盪することを2回繰り返した。0.5%BSA添加炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.3) を1ウェルあたり100 µl分注し、室温で1時間振盪後、マイコプラズマ・ニューモニエ特異抗体を0.1%TritonX-100 + 1%BSA添加トリス緩衝液で500倍希釈し、1ウェルあたり50 µl分注し2時間反応させた。反応後、0.1%TritonX-100添加トリス緩衝液を1ウェルあたり100 µl分注し、室温で1分間振盪を4回繰り返し洗浄を行った。そして、HRP標識抗マウス抗体を0.1%TritonX-100 + 1%BSA添加トリス緩衝液で5,000倍希釈し、1ウェルあたり50 µl分注後室温で1.5時間反応させた。0.1%TritonX-100添加トリス緩衝液を1ウェルあたり100 µl分注し、室温で1分間振盪を4回繰り返す事で洗浄を行った。TMB試薬溶液を1ウェルあたり50 µl分注し室温で10~15分後、1Mリン酸を1ウェルあたり50 µl分注し反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (BIO-TEK社製) にて450nmの吸光度を測定した。これらの結果を図1に示した。

40

【0041】

図1の結果から、MPN295、314、479、574におけるマイコプラズマ・ニューモニエ特異抗体は、マイコプラズマ・ニューモニエ菌体抗原およびリコンビナントタンパク質に対して陽性反応を示した。マイコプラズマ・ニューモニエを除く他のマイコプラズマおよび

50

般細菌、真菌の菌体抗原などにはいずれも交差反応は示さなかった。すなわち、今回見出したタンパク質抗原は、マイコプラズマ・ニューモニエ特異性が極めて高いことが分かった。

#### 【0042】

##### 12. 抗体固相化メンブレンの作製

メンブレンはニトロセルロース膜 (MILLIPORE; HF180) を使用した。5%の2-プロパノールを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で、モノクローナル抗体を終濃度1mg/ml に調製したものをメンブレン上に線状に塗布し、室温で1時間乾燥させた。乾燥後、0.5%のカゼインナトリウムを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.8) 200ml にメンブレンを浸し、20分ゆっくりと振盪し、溶液を破棄した後洗浄操作 (精製水で5分ゆっくりと振盪) を2回行った。その後3%スクロース溶液に浸し、10分ゆっくりと振盪させ、溶液をしっかりと落とし室温で一晩乾燥させた。

10

#### 【0043】

##### 13. 検出デバイスであるテストストリップの作製 (図2)

上記ニトロセルロース膜担体の抗体を塗布した側と反対側に、基材となるバックグシートを張り合わせた。次に、ニトロセルロース膜の上流側 (コントロールライン側) に5mm重なるように吸収パッドを貼り付け、ニトロセルロース膜と吸収パッドの接合部をセロハンテープで固定した。最後に縦方向に沿って5mm幅に切断し、イムノクロマトグラフィックアッセイ用テストストリップとした。

20

#### 【0044】

##### 14. 金コロイド標識抗体の作製

精製後のモノクローナル抗体を20mM MOPS (pH7.0) で60  $\mu$ g/mL に調製した。金コロイド溶液 (田中貴金属工業: 平均粒子径40nm) 900  $\mu$ l に0.2M MOPS (pH7.0) を100  $\mu$ l 加え混和した後、前記精製後のモノクローナル抗体を100  $\mu$ l 加え混和後、室温で20分静置した。次に5% カゼインナトリウムを加えた20mM MOPS (pH7.0) を250  $\mu$ l 加え室温で20分間静置し、12,000  $\times$  g で5分間遠心分離した。上清を除去後、0.1% カゼインNaを加えた10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.2) を1ml 加え、12,000  $\times$  g で5分間遠心分離した。この操作を2回繰り返した後、0.1% カゼインNa添加10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.2) を200  $\mu$ l 加えしっかりと分散させ、金コロイド標識抗体溶液とした。

30

#### 【0045】

##### 15. イムノクロマトグラフィックアッセイによるマイコプラズマ・ニューモニエ抗原の検出

###### [ 抗原調製 ]

PPLO培地にstock菌液を加え、37  $^{\circ}$ C、好気条件下で約10日間培養を実施した。培養液を10,000  $\times$  g、20分遠心し上清を除去後、PBSで再浮遊させ25,000  $\times$  g、20分で遠心した。遠心後再度少量のPBSで再浮遊させた後、マイクロチューブに移し20,000  $\times$  g、20分遠心した。遠心後、菌体湿重量の9倍量程度のPBSで再浮遊させ、超音波破碎機 (sonics vibracell VC-505) で菌体を破碎し抗原とした。菌体は、感染患者 ( $10^5 \sim 10^8$  CFU/mL) と同程度のマイコプラズマ・ニューモニエ濃度となるよう実験時に調製し使用した。

40

#### 【0046】

###### [ 抗原の検出 ]

抗原は上記調製法に従い調製した。テストストリップは前記に記載の方法で作製したものを使用した。金コロイド標識抗体は前記に記載した方法で作製したものを使用した。抗原は0.1% Triton-X100、0.1M NaClを含む50mMのTris-HCl (pH8.0) 緩衝液にて50  $\mu$ g/mL に調製した。調製した抗原液を96wellマイクロプレートに50  $\mu$ l/well 加え、金コロイド標識抗体を10  $\mu$ l/well 添加後よく混和し、テストストリップの液体固相化メンブレン側の一端 (図2左側) を浸し15分反応させた。反応後、メンブレン上の抗体固相化ライン部 (図2テストライン) に赤い線が目視で確認出来たものを「+」、確認出来なかったものを「-」と判定した。

結果を表1に示した。

50

【 0 0 4 7 】

【 表 1 】

	試験菌株	判定	
		MPN314	MPN574
1	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC15531	+	+
2	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC29342	+	+
3	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M79 02-006	+	+
4	<i>Mycoplasma hominis</i>	—	—
5	<i>Mycoplasma orale</i>	—	—
6	<i>Mycoplasma salivarium</i>	—	—
7	<i>Mycoplasma fermentans</i>	—	—
8	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	—
9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	—	—
10	<i>Streptococcus mitis</i>	—	—
11	<i>Streptococcus mutans</i>	—	—
12	<i>Streptococcus salivarius</i>	—	—
13	<i>Streptococcus agalactiae</i>	—	—
14	<i>Streptococcus sanguis</i>	—	—
15	<i>Enterococcus faecalis</i>	—	—
16	<i>Escherichia coli</i>	—	—
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—
19	<i>Haemophilus influenzae</i>	—	—
20	<i>Legionella pneumophila</i>	—	—
21	<i>Candida albicans</i>	—	—
22	Negative Control (抗原なし)	—	—

10

20

【 0 0 4 8 】

表 1 の結果から、MP314およびMPN574のコードするマイコプラズマ・ニューモニエ特異抗原に対する抗体は、いずれのマイコプラズマ・ニューモニエに対しても陽性反応を示した。マイコプラズマ・ニューモニエを除く他のマイコプラズマおよび一般細菌、真菌などにはいずれも交差反応は示さなかった。

30

すなわち、今回見出したタンパク質抗原を用いて、イムノクロマトグラフィックアッセイで測定すれば、短時間に、きわめて特異的にマイコプラズマ・ニューモニエを検出できることが分かった。

【 0 0 4 9 】

また、抗MPN574タンパク質抗体を用いたイムノクロマト法で、菌体破碎抗原濃度を振って抗原を検出し、感度を調べた結果を表 2 に示した。

【 0 0 5 0 】

40

【表 2】

抗原濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Absorbance 525nm	目視判定
5.0000	1069.0	+
2.5000	961.2	+
1.2500	788.5	+
0.6250	543.4	+
0.1563	169.4	+
0.0391	48.9	+
0.0098	21.2	+
0.0024	12.6	+
0.0006	9.2	-
Negative Control	8.4	-

10

## 【0051】

表 2 の結果から、菌体破碎抗原濃度  $0.0024 \mu\text{g}/\text{mL}$  (およそ  $4 \times 10^4 \text{CFU}/\text{mL}$  に相当) で検出できていることから、マイコプラズマ・ニューモニエ感染患者 ( $10^5 \sim 10^8 \text{CFU}/\text{mL}$ ) の検体中濃度より十分に低い濃度で検出できており、感度についても、十分に高いことがわかった。

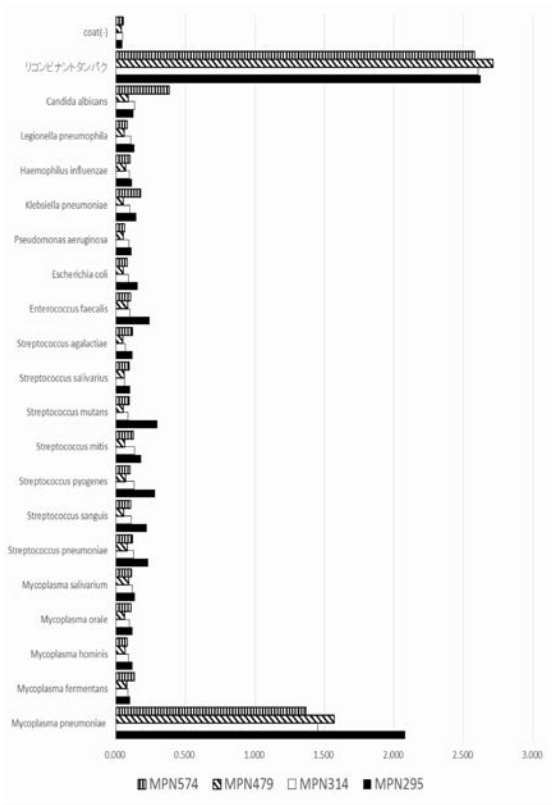
20

## 【産業上の利用可能性】

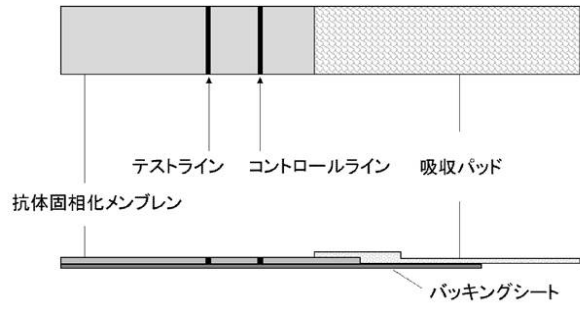
## 【0052】

本発明によれば簡便かつ迅速にマイコプラズマ・ニューモニエを検出することができ、外来診療の現場で検査可能で、その結果を用いて適切な抗菌薬治療を行うことが可能になる。

【 図 1 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 37/04</b>	<b>(2006.01)</b>		A 6 1 K	39/00		H
C 1 2 N 15/06	(2006.01)		A 6 1 P	37/04		
			C 1 2 N	15/06	1 0 0	

(72)発明者 杉村 允

東京都港区白金五丁目9番1号学校法人北里研究所内

Fターム(参考) 4C085 AA03 BB11 DD62 EE01

4H045 AA11 CA40 DA76 DA86 EA06 EA31 EA50 FA74

专利名称(译)	肺炎支原体特异抗原的检测方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019158627A</a>	公开(公告)日	2019-09-19
申请号	JP2018046234	申请日	2018-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所		
申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所		
[标]发明人	花木秀明 松井秀仁		
发明人	花木 秀明 松井 秀仁 杉村 允		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 C07K14/30 C07K16/12 A61K39/00 A61P37/04 C12N15/06		
FI分类号	G01N33/569.F G01N33/53.D G01N33/53.N C07K14/30 C07K16/12 A61K39/00.H A61P37/04 C12N15/06.100		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA06 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

通过找到一种可以敏感检测肺炎支原体的抗体的抗原蛋白，并通过制备和使用该抗原，提供一种简便，快速地测定肺炎支原体的方法和装置。  
 解决方案：提供了一种检测肺炎支原体的方法 检测由肺炎支原体基因MPN295，MPN314，MPN479和MPN574中的至少一个编码的一种或至少两种蛋白质的方法，以及使用检测到的蛋白质的抗体通过免疫技术检测肺炎支原体的方法。免疫技术可以包括使用ELISA或免疫色谱测定法。还提供了一种使用该蛋白作为抗原的疫苗。

(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 特許2019-158627A (P2019-158627A) 令和1年9月19日 (2019.9.19)
(5) Int. Cl.	F I	(43) 公開日
GO1N 33/569 (2006.01)	GO1N 33/569	特許出願公開番号 特許2019-158627A (P2019-158627A) 令和1年9月19日 (2019.9.19)
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	テーマコード (参考) 4C085 4H045
C07K 14/30 (2006.01)	GO1N 33/53	
C07K 16/12 (2006.01)	C07K 14/30	
A61K 39/00 (2006.01)	C07K 16/12	
	審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2018-46234 (P2018-46234)	(71) 出願人 598041566	
(22) 出願日 平成30年3月14日 (2018.3.14)	学校法人北里研究所 東京都港区白金5丁目9番1号	
(特許庁注：以下のものは登録商標) I. T W E E N	(74) 代理人 100098556 弁理士 佐々 祐造 100184767 弁理士 佐々 健太郎	
	(72) 発明者 花木 秀明 東京都港区白金五丁目9番1号学校法人北里研究所内	
	(72) 発明者 松井 秀仁 東京都港区白金五丁目9番1号学校法人北里研究所内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 マイコプラスマ・ニューモニエの特異抗原検出法、及び検出デバイス		