

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5577018号
(P5577018)

(45) 発行日 平成26年8月20日(2014.8.20)

(24) 登録日 平成26年7月11日(2014.7.11)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 C
C O 7 K 16/18	(2006.01)	C O 7 K	16/18
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53 S

請求項の数 12 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2007-326553 (P2007-326553)	(73) 特許権者	000211307 中国電力株式会社
(22) 出願日	平成19年12月18日(2007.12.18)		広島県広島市中区小町4番33号
(65) 公開番号	特開2009-148170 (P2009-148170A)	(73) 特許権者	507030863 株式会社セシルリサーチ
(43) 公開日	平成21年7月9日(2009.7.9)		兵庫県姫路市白浜町甲770番地
審査請求日	平成21年6月12日(2009.6.12)	(74) 代理人	110000176 一色国際特許業務法人
審査番号	不服2012-10210 (P2012-10210/J1)	(72) 発明者	川端 豊喜 広島県広島市中区小町4番33号 中国電力株式会社内
審査請求日	平成24年6月1日(2012.6.1)	(72) 発明者	柳川 敏治 広島県広島市中区小町4番33号 中国電力株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イガイ付着期幼生に特異的なモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ムラサキイガイ付着期幼生及びミドリイガイ付着期幼生に反応し、ムラサキイガイD型幼生及びミドリイガイD型幼生には反応しないモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメント。

【請求項2】

ムラサキイガイ付着期幼生及びミドリイガイ付着期幼生の足に反応することを特徴とする請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメント。

【請求項3】

マガキ付着期幼生、アサリ付着期幼生、及びバカガイ付着期幼生にも反応しないことを特徴とする請求項1または2に記載のモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメント。

【請求項4】

甲殻類プランクトンやフジツボ付着期幼生にも反応しないことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメント。

【請求項5】

受託番号FERM P-21416で寄託されているハイブリドーマから産生されることを特徴とする請求項4に記載のモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメント。

10

20

【請求項 6】

ムラサキイガイ付着期幼生及びミドリイガイ付着期幼生を特異的に検出する検出用試薬であって、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメントを有効成分として含有する検出用試薬。

【請求項 7】

ムラサキイガイ付着期幼生及びミドリイガイ付着期幼生を特異的に検出する検出方法であって、

試料に、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメントを添加することを特徴とする検出方法。

10

【請求項 8】

ムラサキイガイ付着期幼生及びミドリイガイ付着期幼生を特異的に検出する検出キットであって、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメントを含むことを特徴とする検出キット。

【請求項 9】

ムラサキイガイ付着期幼生及びミドリイガイ付着期幼生を特異的に検出する検出器であって、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又はその抗体結合部位を含むフラグメントが固定化されていることを特徴とする検出器。

20

【請求項 10】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項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を作製する方法であって、

ムラサキイガイ付着期幼生で免疫したヒト以外の哺乳類動物由来の脾臓細胞とミエローマ細胞とを融合したハイブリドーマから、ムラサキイガイ付着期幼生及びミドリイガイ付着期幼生に反応するが、ムラサキイガイD型幼生及びミドリイガイD型幼生には反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選定する工程を含むことを特徴とするハイブリドーマの作製方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項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。

30

【請求項 12】

受託番号 F E R M P - 2 1 4 1 6 で寄託されていることを特徴とする請求項 11 に記載のハイブリドーマ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ又はその作製方法、イガイ付着期幼生に特異的なモノクローナル抗体又はそのフラグメント、並びに、イガイ付着期幼生の検出用試薬、検出方法、検出キット、及び検出器に関する。

40

【背景技術】

【0002】

二枚貝類の一種であるムラサキイガイは、受精後1~2日目に無摂餌のままムラサキイガイD型幼生になり、その後、約3週~約1ヶ月間摂餌しながらムラサキイガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）に成長する。

【0003】

現在までに、ムラサキイガイの幼生を同定する方法として、特異的なモノクローナル抗体が利用されているが、これまで、付着期幼生とD型幼生の両方に反応するモノクローナ

50

ル抗体しか得られていなかった（例えば、非特許文献1参照）。従って、捕獲したムラサキイガイ幼生の中から、付着期幼生を迅速かつ簡便に同定することができなかった。

【非特許文献1】Silvia Lorenzo Abalde, et al., Aquaculture, vol.219, p.545-559 (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、イガイ付着期幼生に反応し、イガイD型幼生に反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーム、その抗体及びそのフラグメント、並びに、その利用方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

これまで、ムラサキイガイ付着期幼生とD型幼生の両方に反応するモノクローナル抗体しか得られておらず、当業者にとっても、ムラサキイガイ付着期幼生に特異的に反応する抗体が得られるかどうか、不明であった。まして、同じイガイ科であっても、Mytilus属に属するイガイとPerna属に属するイガイの両方の属の付着期幼生に特異的に反応し、両方のD型幼生には反応しないモノクローナル抗体が得られるかどうかは全くわからなかった。

【0006】

本発明者らは、ムラサキイガイ付着期幼生を抗原とすることで、Mytilus属に属するイガイの付着期幼生だけでなく、Perna属に属するイガイの付着期幼生をも認識し、両者のD型幼生は認識しないモノクローナル抗体が得られることを見出し、本発明に至った。

20

【0007】

すなわち、本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、イガイ付着期幼生に反応し、イガイD型幼生には反応しないモノクローナル抗体又はそのフラグメントである。ここで、前記イガイは、ムラサキイガイ又はミドリイガイであることが好ましい。前記モノクローナル抗体又はそのフラグメントは、イガイ付着期幼生の足に反応することが好ましく、マガキ付着期幼生、アサリ付着期幼生、及びバカガイ付着期幼生にも反応しないことが好ましく、甲殻類プランクトンやフジツボ付着期幼生にも反応しないことが好ましい。なお、前記モノクローナル抗体又はそのフラグメントとしては、例えば、受託番号FERM P-21416で寄託されているハイブリドームから産生されるモノクローナル抗体又はそのフラグメント等が挙げられる。

30

【0008】

また、本発明にかかる検出用試薬は、イガイ付着期幼生を特異的に検出する検出用試薬であって、前記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有効成分として含有する。

【0009】

さらに、本発明にかかる検出方法は、イガイ付着期幼生を特異的に検出する検出方法であって、試料に、前記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添加することを特徴とする。

40

【0010】

また、本発明にかかる検出キットは、イガイ付着期幼生を特異的に検出する検出キットであって、前記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含む。

【0011】

さらに、本発明にかかる検出器は、イガイ付着期幼生を特異的に検出する検出器であって、前記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が固定化されていることを特徴とする。

【0012】

また、本発明にかかるハイブリドーム作製方法は、前記いずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドームを作製する方法であって、ムラサキイガイ付着期幼生で

50

免疫したヒト以外の哺乳類動物由来の脾臓細胞とミエローマ細胞とを融合したハイブリドーマから、イガイ付着期幼生に反応するが、D型幼生には反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選定する工程を含む。

【0013】

さらに、本発明にかかるハイブリドーマは、前記いずれかに記載のモノクローナル抗体モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。このようなハイブリドーマとしては、例えば、受託番号FERM P-21416で寄託されているハイブリドーマ等が挙げられる。

【0014】

なお、本明細書において、ペディベリジャー幼生とは、付着期幼生とも称し、足を有する幼生のことをいう。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、イガイ付着期幼生に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、その抗体及びそのフラグメント、並びに、その利用方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

上記知見に基づき完成した本発明を実施するための形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd.等の標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

【0017】

==モノクローナル抗体又はそのフラグメント==

本発明にかかるモノクローナル抗体は、イガイ付着期幼生に反応するが、イガイD型幼生に反応しないことを特徴とする。ここで、イガイは二枚貝類のイガイ目イガイ科に属する貝の総称であって、イガイ (*Mytilus coruscus*)、ムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*)、ミドリイガイ (*Perna viridis*)、モエギイガイ (*Perna canaliculatus*) 等を含む。なお、モノクローナル抗体が幼生に反応するというとき、その幼生の形状は、whole-mountであっても、組織切片であっても、粗抽出液(超音波装置、ホモジナイザー等で処理した溶解物)であっても、当業者が抗体反応に用いる形状であれば、特に限定されない。また、その幼生に対して行う処理(固定、溶解、抽出等)も、当業者が抗体反応に用いるために通常行う処理であれば、特に限定されない。

【0018】

この抗体は、イガイ以外の二枚貝類(特に、マガキ、アサリ、及びバカガイ)付着期幼生には反応しない方が好ましく、甲殻類プランクトンやフジツボ付着期幼生にも反応しない方が好ましい。それによって、捕獲したプランクトンの中に、多種類の水生動物が混在していても、イガイ付着期幼生のみを同定できる。

【0019】

本発明にかかるフラグメントとしては、前述のモノクローナル抗体の一部からなり、可変領域を含む抗原結合部位であれば特に制限されるものではないが、例えば、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント等を用いることができる。これらのフラグメントは、例えば、前述のモノクローナル抗体をタンパク質分解酵素によって部分消化することにより得ることができる。なお、タンパク質分解酵素としては、FabフラグメントやF(ab')₂フラグメントを得ることができるものであればどのようなものであってもよいが、例えば、ペプシン、フィシン等の分解酵素を用いることができる。

10

20

30

40

50

【0020】

==モノクローナル抗体の製造方法==

本発明のモノクローナル抗体は、イガイ付着期幼生に反応するが、イガイD型幼生に反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ（以下、「本発明にかかるハイブリドーマ」と称する。）から得ることができる。

【0021】

本発明にかかるハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の製造は、常法に従って行うことができる。例えば、該ハイブリドーマを適当な培養培地で培養し、培養上清を回収することにより行ってもよいが、前述のハイブリドーマを哺乳類動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、イヌ、サル等）の腹腔内に投与し、腹水を回収することにより行ってもよい。なお、モノクローナル抗体の精製は、前述のハイブリドーマの培養上清又は培養したハイブリドーマを超音波装置、ホモジナイザー等で処理した溶解物、又は前述のハイブリドーマを腹腔内に投与した哺乳類動物から採取した腹水を、常法、例えば、硫酸塩析、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィーやアフィニティークロマトグラフィー等）、ゲル濾過等の方法、又はこれらの方法を適宜組み合わせる方法により行うことができる。

10

【0022】

前述のハイブリドーマとしては、例えば、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おいて受託番号FERM P-21416で寄託されている細胞株N12-1-2bを用いることができる。

20

【0023】

===ハイブリドーマの作製===

本発明にかかるハイブリドーマは、常法により作製することができる。以下に一例を示す。

【0024】

まず、ムラサキイガイ付着期幼生を集める。具体的には、ムラサキイガイ付着期幼生が含まれているムラサキイガイ幼生集団を飼育ビーカーから取り出し、顕微鏡観察によって、眼点及び足が形成されている個体を選別し、収集を行なう。

【0025】

次に、ムラサキイガイ付着期幼生又はその粗抽出液等を抗原として用い、適当な量の抗原（アジュバントを使用してもよい。）を哺乳類動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、イヌ、サル等）の静脈内、皮下、腹腔内等に（1～複数回）投与して免疫する。

30

【0026】

その後、免疫した動物から抗体産生細胞を採取し、採取した抗体産生細胞と骨髄腫細胞（ミエローマ細胞）と融合させてハイブリドーマを作製する。得られたハイブリドーマの中で、ムラサキイガイやミドリイガイ等のイガイD型幼生には反応性を示さないが、ムラサキイガイやミドリイガイ等のイガイ付着期幼生には反応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を選定することにより、本発明のハイブリドーマを得ることができる。

40

【0027】

前記抗体産生細胞とミエローマ細胞は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等の細胞融合促進剤を用いて細胞融合することができるが、エレクトロポレーション等の電気刺激を利用して細胞融合することもできる。なお、細胞融合の効率を高めるために、ジメチルスルホキシドやレシチン等の補助剤を細胞融合促進剤に含ませてもよい。

【0028】

前記抗体産生細胞としては、例えば、脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、末梢血細胞等を用いることができる。これらの細胞は、動物から脾臓、リンパ節、胸腺、又は末梢血を摘出し、摘出した組織を破碎、濾過、遠心分離等することにより得ることができる。ま

50

た、前記ミエローマ細胞としては、各種動物由来の細胞株を用いてもよいが、それ自身薬剤に対して抵抗性を示さないが、融合すると薬剤に対して抵抗性を示す細胞株を用いることが好ましい。これにより、細胞融合した後、薬剤を添加した培養培地（例えば、HAT培地等）で培養することにより、細胞融合によって得られたハイブリドーマの選択が容易となる。なお、融合させる抗体産生細胞とミエローマ細胞は、同種の動物由来の細胞を用いることが望ましいが、異なる種の動物由来の細胞を用いてもよい。

【0029】

前述のハイブリドーマの選定は、常法のスクリーニングやクローニングにより行うことができる。ハイブリドーマのスクリーニングには、例えば、酵素免疫測定法（EIA：Enzyme ImmunoAssay、ELISA：Enzyme-Linked Immunosorbent Assays）、放射線免疫測定法（RIA：Radio Immuno Assay）、ウエスタンブロッティング等を用いることができ、ハイブリドーマのクローニングには、例えば、限界希釈法、軟寒天法、フィブリング法、蛍光励起セルソーター法等を用いることができる。本発明にかかるハイブリドーマの選定において、上記スクリーニング及びクローニングを繰り返し行うことにより、イガイ付着期幼生又はその粗抽出液に対して特異性の高いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することが可能となる。

【0030】

なお、前述のハイブリドーマのスクリーニングでは、最低限ムラサキイガイ幼生（ペディベリジャー幼生、D型幼生）及びミドリイガイ幼生（ペディベリジャー幼生、D型幼生）との反応性を調べればよいが、さらに、他の二枚貝類の付着期幼生、フジツボ付着期幼生（キブリス幼生）、甲殻類プランクトン等の他の幼生若しくはプランクトンとの反応性を調べることをより好ましい。これにより、イガイ付着期幼生に対してより特異性の高いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができ、このハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を用いることにより、様々な幼生又はプランクトンを含む試料（例えば、海水等）中からイガイ付着期幼生を特異的に検出することが可能となり、また、様々な幼生又はプランクトンを含む試料（例えば、海水等）中からイガイ付着期幼生を特異的に検出することが可能になる。すなわち、イガイ付着期幼生の存在の有無の確認、イガイ付着期幼生の同定、イガイ付着期幼生の量の測定等を行うことができるようになる。

【0031】

＝モノクローナル抗体又はそのフラグメントの使用＝

本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、イガイD型幼生には反応性を示さないが、イガイ付着期幼生に対して特異的に反応性を示す。従って、二枚貝であるイガイの発生段階特異的な検出に有用であると考えられる。

【0032】

また、本発明にかかるモノクローナル抗体は、イガイ以外の二枚貝類（特に、マガキ、アサリ、及びバカガイ）の付着期幼生には反応性を示さない方が好ましい。このようなモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、類似の生物間におけるイガイ付着期幼生の特異的な検出にも有用であると考えられる。

【0033】

さらに、本発明にかかるモノクローナル抗体又はフラグメントは、イガイ付着期幼生を効率的に選択して回収するのに有用であると考えられる。イガイ付着期幼生の回収は、モノクローナル抗体又はそのフラグメントとの親和性を利用して行うことができる。例えば、磁性体を結合させた本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントをイガイ付着期幼生に作用させ、その後、磁石を用いて本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントを回収することにより行うことができる。なお、前記磁性体としては、例えば、鉄、酸化鉄等を用いることができる。その他、イガイ付着期幼生の回収において、FACS（Fluorescence Activated Cell sort）、panning等の方法を用いてもよい。

【0034】

本発明にかかるイガイ付着期幼生の検出は、試料（例えば、海水若しくは川水又はそれ

10

20

30

40

50

を超音波装置、ホモジナイザー等で処理した溶解物等)に、本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントを加えて試料中のイガイ附着期幼生由来の抗原と反応させることにより、その抗原を同定することにより行うことができる。

【0035】

従って、イガイ附着期幼生に特異的に反応し、イガイD型幼生には反応しないモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、イガイ附着期幼生の検出用試薬、検出キット、及び検出器として利用可能である。

【0036】

なお、本発明にかかるイガイ附着期幼生の検出用試薬は、本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントを含むものであればどのようなものでもよく、例えば、緩衝液(例えば、リン酸塩、炭酸塩、塩酸塩等の塩の溶液)、防腐剤(例えば、アジ化ナトリウム等)、非特異的な反応を抑制するための物質(例えば、ブロックエース、ゼラチン、スキムミルク等)、免疫学的手法によりイガイ附着期幼生を検出するのに必要な物質(例えば、標識物質等)、安定剤(例えば、BSA、ヤギ血清等)等の、抗体又はそのフラグメント以外に抗原の検出用試薬に含ませる一般的な物質が1又は2以上、さらに含まれていてもよい。

【0037】

本発明にかかるイガイ附着期幼生の検出器は、本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントが媒体(例えば、濾紙等の紙、ガラス、繊維、ニトロセルロース等の変性セルロース、ナイロン、プラスチック等から成るフィルター、メンブレン、プレート、ディッシュ等)に固定化されているものを含めばどのようなものでもよく、例えば、緩衝液(例えば、リン酸塩、炭酸塩、塩酸塩等の塩の溶液)、防腐剤(例えば、アジ化ナトリウム等)、非特異的な反応を抑制するための物質(例えば、ブロックエース、ゼラチン、スキムミルク等)、免疫学的手法によりイガイ附着期幼生を検出するのに必要な物質(例えば、標識物質、発色基質、二次抗体、発色増強剤等)、安定剤(例えば、BSA、ヤギ血清等)等の、抗体又はそのフラグメント以外に抗原の検出器に含ませる一般的な物質が1又は2以上、さらに含まれていてもよい。

【0038】

本発明にかかるイガイ附着期幼生の検出器の一例としては、試料を滴下する部分又は試料を浸す第一の部分と、本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントが固定化された第二の部分と、本発明にかかるモノクローナル抗体が産生されたホストの動物種の免疫グロブリンに特異的に反応する抗免疫グロブリン抗体等が固定化された第三の部分とを有し、第二の部分が第一の部分と第三の部分との間に備えられ、第一の部分には、金属コロイド粒子(例えば、金コロイド粒子等)、重金属(例えば、金、白金等)、蛍光物質(例えば、FITC(フルオレセインイソチオシアネート)、ローダミン、ファロイジン等)、着色ラテックス粒子等の標識物質で標識された、本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントを含むクロマトグラフ媒体を挙げることができる。前記クロマトグラフ媒体としては、例えば、ガラスやシリカ等の無機繊維からなる濾紙、ニトロセルロース等の変性セルロース等を用いることができる。このようなクロマトグラフ媒体を用いることにより、試料中にイガイ附着期幼生が存在するかどうかを検出することが可能になる。

【0039】

その原理としては、イガイ附着期幼生又はその溶解物を含む試料をクロマトグラフ媒体の第一の部分に滴下したり、試料に第一の部分に浸したりすると、試料中のイガイ附着期幼生又はその溶解物は、第一の部分に含まれる標識されたモノクローナル抗体又はそのフラグメントと反応して複合体を形成し、液が媒体中を広がるのを利用して、その複合体は第二の部分へと移動し、第二の部分において固定化された前述のモノクローナル抗体又はそのフラグメントに捕捉されてその位置で標識物質によりイガイ附着期幼生の検出が可能となる。第一の部分からくるフリーの抗体は、第三の部分へと移動し、第三の部分において固定化された抗免疫グロブリン抗体に捕捉され、第三の部分で発色が生じる。この第三の部分での発色は、検出のポジティブコントロールとなる。これに対して、イガイ附着期

10

20

30

40

50

幼生由来の抗原を含まない試料を第一の部分に滴下したり、試料に第一の部分を浸したりすると、第一の部分に含まれる標識されたモノクローナル抗体又はそのフラグメントが、第二の部分を素通りして第三の部分へと移動し、第三の部分において固定化された抗免疫グロブリン抗体に捕捉され、第三の部分でのみ発色が生じる。このように、第二の部分にシグナルが現れたか否かによって、試料中にイガイ付着期幼生が存在するかどうかを判定することが可能となる。

【0040】

一方、本発明にかかるイガイ付着期幼生の検出キットは、本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントを含むものであればどのようなものでもよく、本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメント以外に、例えば、緩衝液（例えば、リン酸塩、炭酸塩、塩酸塩等の塩の溶液）、防腐剤（例えば、アジ化ナトリウム等）、非特異的な反応を抑制するための物質（例えば、ブロックエース、ゼラチン、スキムミルク等）、免疫学的手法によりイガイ付着期幼生を検出するのに必要な物質（例えば、標識物質、発色基質、二次抗体、発色増強剤等）、安定剤（例えば、BSA、ヤギ血清等）等の抗原の検出キットに含ませる一般的な物質、若しくは前述のような本発明にかかるモノクローナル抗体又はそのフラグメントが媒体に固定化されている検出器、又はこれらのうち2以上を組み合わせたものが含まれていてもよい。

【0041】

なお、標識物質としては、例えば、蛍光物質（例えば、FITC、ローダミン、ファロイジン等）、金等のコロイド粒子、重金属（例えば、金、白金等）、色素タンパク質（例えば、フィコエリトリン（PE）、フィコシアニン（PC）等）、放射性同位元素（例えば、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等）、酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等）、ビオチン、ストレプトアビジン等の物質を用いることができるがこれらに制限されるものではなく、公知の標識物質を用いてもよい。また、発色基質としては、前述の酵素に対する発色基質であれば特に制限されるものではなく、例えば、ジアミノベンジジン（DAB）、o-フェニレンジアミン(o-Phenylenediamine)、過酸化水素水、BCIP/Nitro-TB（5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/Nitrotetrazolium blue）、pNPP（para-nitrophenylphosphate）等を用いることができる。発色増強剤としては、前述の基質の発色を増強させることができるものであればどのようなものでもよく、例えば、硫酸等を用いることができ、二次抗体としては、例えば、本発明にかかるモノクローナル抗体が産生されたホストの動物種の免疫グロブリンに特異的に反応する抗免疫グロブリン抗体、抗Ig(H+L)、抗Ig(Fc)等を用いることができる。

【0042】

また、前述の免疫学的手法としては、EIA（Enzyme Immunoassay）、蛍光免疫測定法、ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）、RIA（Radioimmuno assay）、ウエスタンブロットティング、ラテックス凝集法、イムノクロマト法、サンドイッチ法等の公知の方法を用いることができる。

【0043】

以上のように、本発明にかかるイガイ付着期幼生の検出方法を用いることにより、イガイ付着期幼生の同定やイガイ付着期幼生の分離及び量の測定が可能となるが、検出キットや検出器を用いることにより、より容易にイガイ付着期幼生を同定することができるようになる。

【実施例】

【0044】

以下に本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0045】

<実施例1>

本発明のモノクローナル抗体を得るために、以下の飼育方法により得られたムラサキイガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）を抗原として用いた。

10

20

30

40

50

【0046】

[ムラサキイガイ付着期幼生の飼育方法]

ムラサキイガイ親貝を水槽内で維持し、親貝の放卵・放精によって受精した卵を回収した。受精卵をろ過海水にて洗浄後、ろ過海水を満たしたビーカー等の容器に収容し、エアレーションを行なった。ろ過海水には抗生物質（終濃度ペニシリン3mg/L ストレプトマイシン 6.6mg/L）を添加し、餌として植物プランクトン（ハプト藻 *Isochrysis galbana*）を与えた。成長初期は飼育容器内の海水を毎日交換して給餌し、その後、2~3日に1回の頻度で海水の交換を行った。約3週~約1ヶ月後、顕微鏡観察によって、眼点及び足が形成されている個体を選別し、付着期幼生（ペディベリジャー幼生）の収集を行ない、以下のように抗原として用いた。

10

【0047】

7週齢のBALB/cマウスの腹腔内に上記抗原を6回注射し（1~5回目の注射：幼生300個/100~150 μ l PBS、6回目の注射（最終免疫）：幼生1000個/200 μ l PBS；1回目の投与から22日目に2回目の投与を、2回目の投与から24日目に3回目の投与を、3回目の投与からおおよそ半年後に4回目の投与を、4回目の投与から半月後に5回目の投与を、5回目の投与からおおよそ80日目に6回目の投与を行った。）、マウスを免疫した。

【0048】

最終免疫から3日後に抗体価が上がったマウスを解剖して脾臓を摘出し、摘出した脾臓を10%のFBS（Fetal Bovine Serum；GIBCO）及び1%の抗生物質（Antibiotic-Antimycotic；GIBCO）を含むRPMI1640（GIBCO）培地中で滅菌ステンレスメッシュにより裏漉した後、分散・懸濁することにより浮遊細胞を得た。この浮遊細胞を10%のFBSを含むRPMI1640培地（FBS⁺培地）で洗浄・遠心した後、RPMI1640培地（FBS⁻培地）で3回遠心・洗浄し、脾臓細胞（ 10^8 個程度）を回収した。

20

【0049】

次に、ミエローマ細胞株P3U1（ 5×10^7 個）と脾臓細胞（ 10^8 個程度）を混合し、その後遠心して上清を除去し、細胞ペレット（沈殿）を作製した。これに1gのPEG4000（ポリエチレングリコール；MERCK社Article No.9727）とFBS⁻培地1mlとを混合した溶液を1分間かけてゆっくりと添加しながら攪拌し、さらに1分間緩やかに攪拌した。その後、FBS⁻培地2mlをゆっくり加えながら1分間攪拌して、細胞融合を行った。

【0050】

細胞融合処理後、さらにFBS⁻培地（37[°]C）8mlを1分間かけてゆっくりと添加し、続いて遠心分離（1000rpm \times 5分間）して上澄みを吸引除去した。これにFBS⁺培地10mlを添加して懸濁し、FBS⁺HAT培地（10%のFBS、1%の抗生物質、及びHAT supplement medium（SIGMA；粉末1バイアルを50倍に希釈したものを使用） \times 0.5を含むRPMI1640培地（GIBCO））が入った分室シャーレ5枚にそれぞれ2ml播種し、37[°]C、5% CO₂の条件下で5日間培養した。

30

【0051】

各セル内で明瞭な増殖が確認されたハイブリドーマ細胞のコロニーをピックアップし、HT培地（10%の細胞増殖因子（conditioned medium from J774A.1 cells, HYBRIMAX；SIGMA）、100 μ Mヒポキサンチン及び16 μ Mチミジンを含むRPMI1640培地）の入った96穴ウェルプレートに移し、ハイブリドーマの培養を行った。その後、明瞭なハイブリドーマの増殖が確認されたウェルについて、その培養上清を採取し、ELISA法により抗体の産生を確認した。なお、特に記載がない過程については室温にて処理（反応を含む）を行った。

40

【0052】

（1）上記「室内飼育方法」によって得られたムラサキイガイ付着期幼生30000個体に600 μ lの50mM Tris-HCl（pH 7.5）を加え、氷中でホモジナイズ・超音波（数秒 \times 5回）処理を行い、5000rpm \times 20分間遠心することにより、ムラサキイガイ付着期幼生粗抽出液（タンパク質濃度：39.5mg/ml）を調製した。

（2）（1）で得られたムラサキイガイ付着期幼生粗抽出液（100 μ g/ml）50 μ lを、96穴イワキELISAプレートの各ウェルに加え、4[°]Cで抗原をウェル底面に吸着させた。

（3）（2）で吸着処理した各ウェルをTBS（0.5 M NaCl及び20 mM Tris-HCl（pH7.5））

50

200 μ l で洗浄した。

(4) 各ウェルを1% BSAを含むTBS 100 μ l で1時間ブロッキングした。

(5) 各ウェルをTTBS (0.05% Tween20を含むTBS) 200 μ l で3回洗浄した。

(6) ハイブリドーマを培養することにより得られた培養上清(1次抗体) 50 μ l を各ウェルに加え、1時間反応させた。

(7) 各ウェルをTTBS 200 μ l で4回洗浄した。

(8) 各ウェルに2次抗体(アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG (H+L) ヤギ抗体; ZYMED laboratory) 溶液(TBSで1000倍に希釈した溶液) 50 μ l を加えて1時間反応させた。

(9) 各ウェルをTTBS 200 μ l で5回洗浄した。

(10) 各ウェルに基質(アルカリフォスファターゼ基質キット; BIO-RAD) 溶液 100 μ l を加え、1時間振盪することにより発色させた。

(11) マイクロプレートリーダー(BIO-RAD Model550; 405nm) を用いて、各ウェルの溶液の吸光度を測定した。

【0053】

前述のELISA法により高い抗体産生能が確認されたハイブリドーマについて、段階的に希釈した培養液をさらにELISA法により抗体価を測定し、抗体産生能が高いハイブリドーマをピックアップするという操作を3回繰り返して行い(2回目及び3回目の培養は、HTを含まない、10% FBS、1% 抗生物質、及び10% 細胞増殖促進成分(conditioned medium from J774A.1 cells, HYBRIMAX, SIGMA) を含むRPMI1640を用いた。)、ムラサキイガイ

附着期幼生粗抽出液に対してより高い抗体産生能を示すハイブリドーマクローン(N12-1-2b)を得た。

【0054】

<実施例2>

次に、実施例1により得られた1つのハイブリドーマの培養上清に含まれるモノクローナル抗体が、ムラサキイガイ附着期幼生(ペディベリジャー幼生)に対して特異的に反応するか否かを調べるため、ムラサキイガイ幼生(附着期幼生、D型幼生)、ミドリイガイD型幼生、ムラサキイガイ以外の二枚貝類(アサリ、バカガイ、マガキ等)の附着期幼生(ペディベリジャー幼生)、甲殻類プランクトン(コペポダ類、アルテミア(*Artemia salina*)ノープリウス幼生)、イワフジツボ(*Chthamalus challenger* Hoek)キプリス幼生、アカフジツボキプリス幼生の粗抽出液(タンパク質の濃度; 100 μ g/ml)との反応性を、実施例1に記載のELISA法と同様に確認した。なお、各粗抽出液は、各幼生又はプランクトンを50mM Tris-HCl (PH7.5)に加えてホモジナイズ・超音波(数秒×5回)処理し、5000rpm×20分間の遠心を行うことにより調製した。

【0055】

ELISAの結果(OD₄₀₅値)を表1及び表2に示す。

10

20

30

【表 1】

抗原	ハイブリドーマNo. N12-1-2b
ムラサキイガイ ペディベリジャー幼生 粗抽出液	1.674
アサリ ペディベリジャー幼生 粗抽出液	0.008
バカガイ ペディベリジャー幼生 粗抽出液	0.006
マガキ ペディベリジャー幼生 粗抽出液	<0.001
コペポーダ類 粗抽出液	<0.001
アルテミア ノープリウス幼生 粗抽出液	<0.001
イワフジツボ キプリス幼生 粗抽出液	0.029
アカフジツボ キプリス幼生 粗抽出液	0.016

10

20

30

【 0 0 5 6 】

まず、表 1 では、ムラサキイガイ付着期幼生と他種の二枚貝やプランクトンとの間で、抗体反応性を比較した。ハイブリドーマN12-1-2bの上清は、ムラサキイガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）の粗抽出液に対して非常に強い反応性を示したが、形態学的に非常に似ているマガキ、アサリ、バカガイ等のムラサキイガイ以外の二枚貝類のペディベリジャー幼生の粗抽出液や、二枚貝類以外の幼生（イワフジツボキプリス幼生、及びアカフジツボキプリス幼生）や甲殻類プランクトン（コペポーダ類、アルテミア（*Artemia salina*）ノープリウス幼生）の粗抽出液に対しては反応性を示さなかった。

【表 2】

抗原	ハイブリドーマNo. N12-1-2b
ムラサキイガイ ペディベリジャー幼生 粗抽出液	0.649
ムラサキイガイ D型幼生 粗抽出液	0.029
ミドリイガイ D型幼生 粗抽出液	0.041

10

【 0 0 5 7 】

表 2 では、ムラサキイガイ付着期幼生と、他の発生段階のイガイ幼生との間で、抗体反応性を比較した。ハイブリドーマN12-1-2bの上清は、ムラサキイガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）の粗抽出液に対して非常に強い反応性を示したが、発生段階が異なるムラサキイガイD型幼生や、同じイガイ科のミドリイガイD型幼生の粗抽出液に対しては反応性を示さなかった。

20

【 0 0 5 8 】

< 実施例 3 >

次に、実施例 1 により得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体がムラサキイガイ付着期幼生をwhole-mountで認識するかどうかを調べるために、ハイブリドーマN12-1-2bのモノクローナル抗体を用いて、ムラサキイガイ幼生（付着期幼生、D型幼生）及びミドリイガイ（付着期幼生、D型幼生）に対する免疫染色を以下のように行った。また、以下において、特に記載がない過程については室温にて処理（反応を含む）を行った。

30

【 0 0 5 9 】

(1) ムラサキイガイ（付着期幼生、D型幼生）及びミドリイガイ（付着期幼生、D型幼生）をそれぞれ96穴プレートに入れ、5% ホルマリンを用いて固定した。

(2) 各ウェルをPBS 200 μ l で洗浄した後、PBST（0.05% Tween20を含むPBS）200 μ l にてさらに洗浄した。

(3) 各ウェルに1% BSAを含むPBST200 μ l を注入し、4 時間で8時間ブロッキングした。

【 0 0 6 0 】

(4) 各ウェルにN12-1-2bのモノクローナル抗体（1次抗体；1% BSAを含むPBSTで8倍に希釈した溶液）200 μ l を加え、4 で一晩反応させた。なお、コントロールには、一次抗体としてマウス抗アカフジツボ付着期幼生抗体（特開2006-246820に記載のハイブリドーマKF1-6a4(1)6P-3（受託番号FERM P-20279）の培養上清）を用いた。

40

【 0 0 6 1 】

(5) 各ウェルをPBST 200 μ l で4回洗浄した。

(6) 各ウェルに2次抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG（H+L）ヤギ抗体；1% BSAを含むPBSTで400倍に希釈した溶液）200 μ l を加えて4 時間で8時間反応させた。

【 0 0 6 2 】

(7) 各ウェルをPBST 200 μ l で4回洗浄した。

(8) 各ウェルに基質（アルカリフォスファターゼ基質キット；BIO-RAD）溶液 200 μ l を加えて発色させた。

【 0 0 6 3 】

50

図1及び図2に示すように、ハイブリドーマN12-1-2bが産生するモノクローナル抗体は、ムラサキイガイ付着期幼生の足及びミドリイガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）の面盤根元及び足に反応したが、ムラサキイガイD型幼生及びミドリイガイD型幼生には反応しなかった。

【0064】

<実施例4>

次に、ハイブリドーマN12-1-2bから産生されたモノクローナル抗体が、ムラサキイガイ付着期幼生のどの抗原に特異的に反応するのかを確認するため、ムラサキイガイ付着期幼生の各粗抽出液に対し、ハイブリドーマN12-1-2bから産生されたモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。また、ムラサキイガイ付着期幼生に類似した他の幼生に発現している抗原には、反応性を示さないことを確認するため、ムラサキイガイD型幼生、ミドリイガイD型幼生、アカフジツボ付着期幼生の粗抽出液についてもウエスタンブロッティングを行った。

【0065】

(1) タンパク量を5 μ gに調整した各種抽出液にてSDS電気泳動（ポリアクリルアミド7.5%）を行った。

(2) PVDF膜を電気泳動ゲルと同様の大きさに切り、100%メタノールに数秒、次に10mM CAPS緩衝液を浸透させて親水化処理を行った。

(3) セミドライ式ブロッティング装置に10mM CAPS緩衝液を浸透させたろ紙、メンブレン及びSDS電気泳動後のゲルをセットし、2mA/cm²で2時間通電した。

(4) ブロッティング済みのPVDF膜をTBSで10分間洗浄した。

(5) PVDF膜を3%スキムミルク入りのTBSで室温にて1時間ブロッキングした。

(6) TBSで洗浄後、ハイブリドーマN12-1-bを培養することによって得られた培養上清（一次抗体）を1%スキムミルク入りのTBSで2倍希釈し、室温で1時間又は4 で一晩反応させた。

(7) 蒸留水で洗浄後、TTBS中に10分間、2回置いた。

(8) PVDF膜を二次抗体（アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG ヤギ抗体：BioRAD）溶液（1%スキムミルク入りのTBSで3000倍希釈）と1時間反応させた。

(9) 蒸留水で洗浄後、TTBS中に10分間、2回置いた。

(10) 蒸留水で洗浄後、BCIP/NBT アルカリフォスファターゼ基質溶液（SIGMA）にて染色を行った。

【0066】

図3に示すように、ハイブリドーマN12-1-2bが産生するモノクローナル抗体は、ムラサキイガイ付着期幼生における約125kDa、約120kDa、約118kDaのタンパク質に特異的に反応した。一方、このモノクローナル抗体は、ムラサキイガイD型幼生、ミドリイガイD型幼生、及びアカフジツボ付着期幼生由来の抗原には反応しなかった。

【0067】

以上のことから、ハイブリドーマN12-1-2bは、イガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）に特異的に反応するモノクローナル抗体を産生することが明らかになり、このハイブリドーマ細胞株が産生するモノクローナル抗体を用いることにより、イガイ付着期幼生を特異的に検出したり、回収したりすることができることが明らかになった。そこで、このハイブリドーマ細胞株を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寄託した（N12-1-2b：受託番号FERM P-21416）。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】本発明の一実施例において、ハイブリドーマN12-1-2bから産生されたモノクローナル抗体の、ムラサキイガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）及びムラサキイガイD型幼生に対する反応性を、免疫染色法により調べた結果を示す図である。

【図2】本発明の一実施例において、ハイブリドーマN12-1-2bから産生されたモノクローナル抗体の、ミドリイガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）及びミドリイガイD型幼

10

20

30

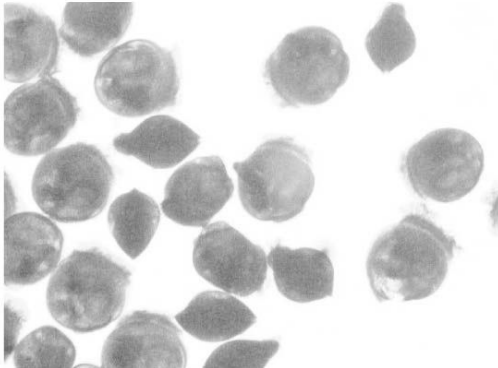
40

50

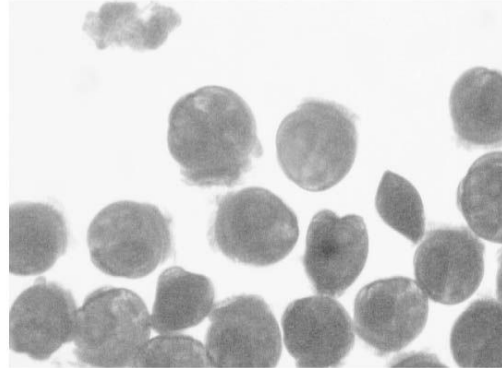
生に対する反応性を、免疫染色法により調べた結果を示す図である。

【図3】本発明の一実施例において、ハイブリドーマN12-1-2bから産生されたモノクローナル抗体の、ムラサキイガイ付着期幼生（ペディベリジャー幼生）、ムラサキイガイD型幼生、ミドリイガイD型幼生、及びアカフジツボ付着期幼生に対する反応性を、ウエスタンブロッティングにより調べた結果を示す図である。

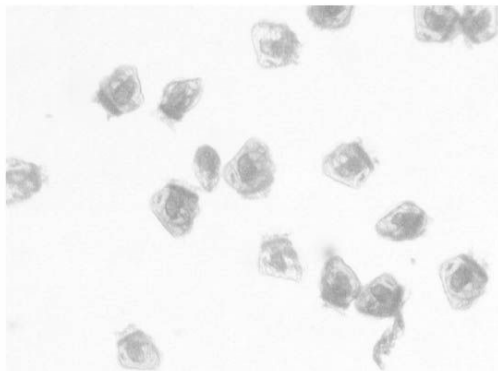
【図1】



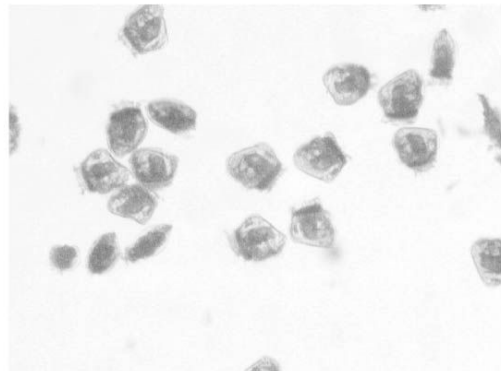
ムラサキイガイペディベリジャー幼生
反応有:足、反応無:面盤



ムラサキイガイペディベリジャー幼生
反応無(コントロール)

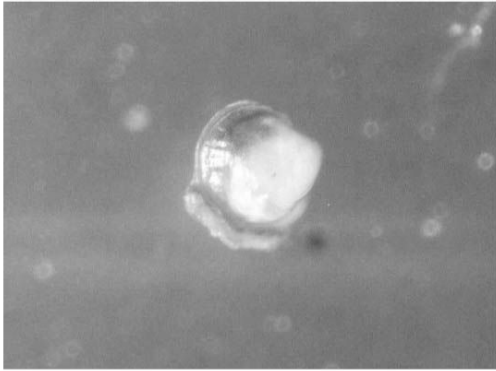


ムラサキイガイD型幼生
反応無

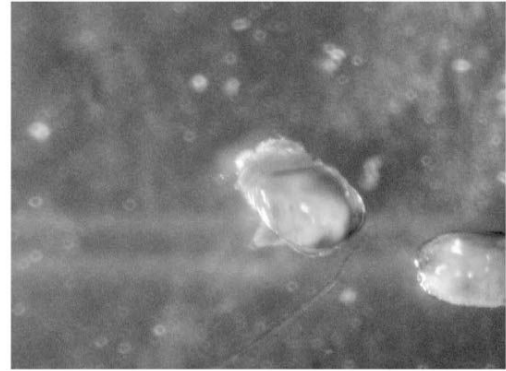


ムラサキイガイD型幼生
反応無(コントロール)

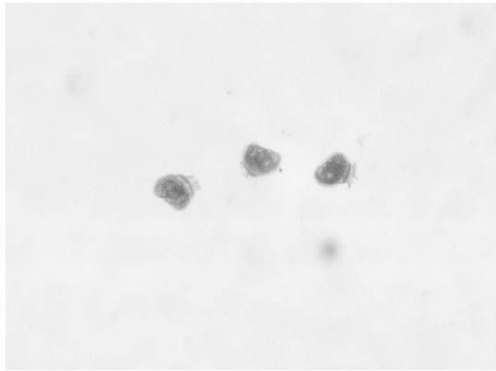
【図2】



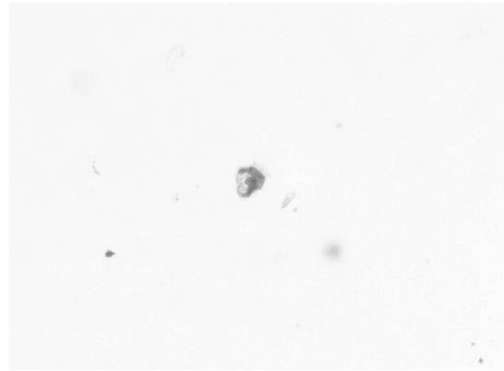
ミドリイガイペディベリジャー幼生
反応有:足及び面盤根元



ミドリイガイペディベリジャー幼生
反応無(コントロール)

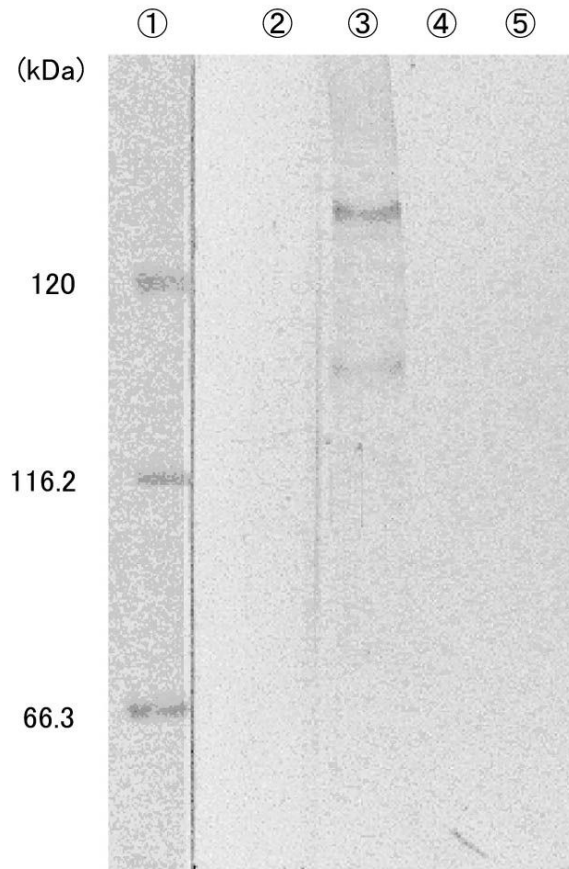


ミドリイガイD型幼生
反応無



ミドリイガイD型幼生
反応無(コントロール)

【 図 3 】



- ① マーカー
- ② ムラサキイガイD型幼生抽出液 (総タンパク量 $5\mu\text{g}$)
- ③ ムラサキイガイ付着期幼生抽出液(総タンパク量 $5\mu\text{g}$)
- ④ ミドリイガイD型幼生抽出液 (総タンパク量 $5\mu\text{g}$)
- ⑤ アカフジツボ付着期幼生抽出液 (総タンパク量 $5\mu\text{g}$)

フロントページの続き

特許法第30条第1項適用 (1)山陽新聞 平成19年6月20日付朝刊 (2)フジサンケイビジネスアイ 平成19年6月20日付朝刊 (3)日刊工業新聞 平成19年6月20日付朝刊 (4)電気新聞 平成19年6月20日付朝刊 (5)朝日新聞 広島地方版 平成19年6月23日付朝刊 (6)読売新聞 広島地方版 平成19年6月24日付朝刊 (7)中国新聞 平成19年6月28日付朝刊 (8)毎日新聞 広島地方版 平成19年7月10日付朝刊 (9)ホームページ「<http://www.energia.co.jp/press/07/p070619.html>」、掲載日:平成19年6月19日 (10)2007年電気化学秋季大会 講演要旨集,第99ページ、発行年月日:平成19年9月19日 (11)2007年電気化学秋季大会 講演要旨集,第100ページ、発行年月日:平成19年9月19日 (12)電気 現場技術,第46巻,第544号、発行年月日:平成19年9月10日 (13)産業新潮,第56巻,第10号、発行年月日:平成19年10月1日 (14)エネルギーフォーラム,第53巻,第634号、発行年月日:平成19年10月1日

微生物の受託番号 FERM P-21416

- (72)発明者 太田 真紀
兵庫県姫路市白浜町甲770番地 株式会社セシルリサーチ内
- (72)発明者 神谷 享子
兵庫県姫路市白浜町甲770番地 株式会社セシルリサーチ内
- (72)発明者 山下 桂司
兵庫県姫路市白浜町甲770番地 株式会社セシルリサーチ内

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 郡山 順

審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特開2006-246822(JP,A)
国際公開第2006/006319(WO,A1)
第10回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集,2007年 5月26日,p.72,
B-6
エネルギー総研レビュー,2007年 2月23日,No.7,p.10-11
電力中央研究所報告 調査報告:485024 ムラサキガイの生態と附着機構に関する文献
調査,昭和61年4月,1~17頁

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00, C07K 16/00-16/46, C12P 21/08, G01N 33/53

WPI

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

MEDLINE/CA/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	对贻贝粘附阶段幼虫特异的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP5577018B2	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	JP2007326553	申请日	2007-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	中国电力株式会社 索思乐研究株式会社		
申请(专利权)人(译)	中国电力株式会社 有限公司丝丝研究		
当前申请(专利权)人(译)	中国电力株式会社 有限公司丝丝研究		
[标]发明人	川端豊喜 柳川敏治 太田真紀 神谷享子 山下桂司		
发明人	川端 豊喜 柳川 敏治 太田 真紀 神谷 享子 山下 桂司		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.C C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.S C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA10 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
审查员(译)	铃木惠理子		
其他公开文献	JP2009148170A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种杂交瘤，其在粘附期（Pediveliger幼虫）产生特异于Mytilus coruscus幼虫的单克隆抗体，提供产生它的方法，以提供粘附期间特异于Mytilus coruscus幼虫的单克隆抗体或者提供其片段，以提供用于在粘附期检测贻贝幼虫的试剂，提供检测其的方法，提供用于检测其的试剂盒，并提供其检测器。解决方案：制备杂交瘤的方法包括将粘附期间的贻贝（Mytilus galloprovincialis）幼虫粗提物溶液给予小鼠腹腔，从免疫小鼠中分离脾细胞，将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤，然后鉴定杂交瘤，用于产生在粘附期与Mytilus coruscus幼虫反应的单克隆抗体，并且不与Mytilus coruscus D型幼虫反应。Z

ハイブリドーマNo.	N12-1-2b
抗原	
ムラサキイガイ ベディベリジャー幼生粗抽出液	1.674
アサリ ベディベリジャー幼生粗抽出液	0.008
バカガイ ベディベリジャー幼生粗抽出液	0.006
マガキ ベディベリジャー幼生粗抽出液	<0.001
コペボータ類粗抽出液	<0.001
アルテミア ノープリウス幼生粗抽出液	<0.001
イワフジツボ キブリス幼生粗抽出液	0.029
アカフジツボ キブリス幼生粗抽出液	0.016