

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	F 4 H 0 4 5
33/577		33/577	B
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 9 数)

(21)出願番号	特願2001 - 55687(P2001 - 55687)	(71)出願人	598081621 株式会社トランスジェニック 熊本県熊本市中央街2番11号 熊本サンニッ セイビル4階
(22)出願日	平成13年2月28日(2001.2.28)	(72)発明者	和田 勝 千葉県千葉市稲毛区園生町348 - 10
		(72)発明者	中路 敦子 熊本県熊本市画図町上無田480 - 1
		(72)発明者	坂本 珠美 熊本県熊本市蓮台寺1 - 13 - 8
		(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 鳥類のビテロジェニンの特異的に認識する抗体及び鳥類のビテロジェニン測定系

(57)【要約】

【課題】 鳥のビテロジェニンを認識する抗体の提供。
【解決手段】 鳥のビテロジェニンを認識する抗体、及び該抗体と鳥の体液中のビテロジェニンとを反応させることを特徴とする鳥のビテロジェニンの濃度測定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 鳥のピテロジェニンを特異的に認識する抗体。

【請求項 2】 鳥のリボピテリンを動物に免疫して得られた、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 鳥のホスピチンを動物に免疫して得られた、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】 モノクローナル抗体である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】 鳥がウズラである請求項 1 ~ 4 のいずれ 10 か 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体と鳥の体液中のピテロジェニンとを反応させることを特徴とする、鳥のピテロジェニンの濃度の測定方法。

【請求項 7】 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体と該鳥の体液中のピテロジェニンとを反応させ、該反応により測定されたピテロジェニンの濃度の上昇を指標として化学物質の毒性又は環境汚染を評価する方法。

【請求項 8】 化学物質が内分泌攪乱作用を有するものである請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 環境汚染が内分泌攪乱作用を有する化学物質によるものである請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】 鳥がウズラである請求項 6 ~ 9 のいずれ 20 か 1 項に記載の方法。

【請求項 11】 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、化学物質の毒性又は環境汚染の評価用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、鳥類のピテロジェ 30 ニンを認識する抗体、並びに該抗体を用いた化学物質の毒性又は環境汚染の評価方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、化学物質が原因であると考えられている動物の生殖異常が世界各地で観察されている。例えば、アメリカ合衆国、フロリダ州のアポプカ湖における生殖異常に関する報告が最もよく知られている。その調査報告によると、雄ワニのペニスが正常の 1/4 ~ 1/2 の大きさに萎縮した個体が多数発見され、その一方、雌ワニでは、正常に比べて卵巣の多卵性卵胞、多核卵の形成 40 が顕著であった。その原因は、湖畔に立地する化学工場から出された DDT 関連物質であるジコホルと呼ばれる物質によるものであることが判明し、ジコホルは女性ホルモンと同様の作用を有するものであることが分かってきた。

【0003】このように生物の内分泌系に作用し機能を障害する化学物質は、内分泌攪乱物質 (endocrine disruptors) (いわゆる環境ホルモン) と呼ばれ、これまでに有機塩素化合物、ビスフェノール A、有機金属化合物等 50 が内分泌攪乱作用をもつ物質として知られている。そし

て、これらの物質以外の様々な未知化合物の中にも同様の作用をもつ物質が存在するのではないかと疑われている。

【0004】本来の女性ホルモンであるエストロジェン化合物に類似の構造を持つ化学物質は、その生体内レセプターへの結合を示すことで、ある種のホルモン作用を惹起することが知られている。1950 年 ~ 1970 年に米国で DES (合成ホルモン剤) を服用した母親から生まれた子供に生殖器異常の多くを引き起こしたのもその例である。しかしながら、上述した化学物質は必ずしもエストロジェンと類似の構造でない場合も多く、内分泌攪乱物質として予測することは非常に困難であった。

【0005】従来、化学物質の内分泌攪乱作用を評価する方法として、試験管内において酵母にエストロジェン受容体を発現させ、当該化合物がその受容体に結合する度合を測定する方法、あるいは生体内においてマウス等に化学物質を投与し、その生殖機能等を解析する等の方法が採用されている。しかし、前者の試験管内における試験方法においては、化学物質の生体内での代謝物の影響を評価できない。また、後者の生体内における試験方法においては、観察及び解析に大量の動物を使用し、また、その解析に多大な労力を要する等、問題も多い。

【0006】ところで、近年内分泌攪乱物質と関連のある物質としてピテロジェニンが注目されている。ピテロジェニンは、卵黄に含まれるリンタンパク質の前駆体で、分子量は約 24 万、燐酸の他に、糖、脂肪及びカルシウムを含む水溶性のタンパク質であり、アイソタイプを有することが知られている。ピテロジェニンは、肝臓で大量に作られ、血中に分泌される。血中では分子量約 50 万の 2 量体として存在し、卵巣に摂取される。卵巣では 2 種類の卵黄リンタンパク質、すなわちリボピテリンとホスピチンに分解される。これらは卵内で成長する胚にとって、重要な栄養源となっている。例えば、チキンピテロジェニンについて、チキンピテロジェニンが分子量 260kDa のチキンピテロジェニン I、分子量 246kDa のチキンピテロジェニン II、分子量 210kDa のチキンピテロジェニン III のアイソタイプを含み、この中でチキンピテロジェニン II が主要アイソタイプであること、各ピテロジェニンともリボピテリン (分子量 120,000 のリボピ 50 テリン-I と分子量 32,000 のリボピテリン-II が存在する) 部分と分子量 44,000 のホスピチン部分を含むことが報告されている (Biochimica et Biophysica Acta, 124 (1995) 384-394)。ピテロジェニンは、卵生の生物、すなわち鳥類、両生類、魚類、昆虫類などで検出される。メスの肝臓ではエストロジェンによってピテロジェニン遺伝子の転写が促進され、このタンパク質の合成が増加する。正常のオスではほとんど合成されないが、大量のエストロジェン投与により誘導される。

【0007】内分泌攪乱作用を有する化学物質の存在下で魚類などを飼育すると、雌特有の卵黄蛋白前駆物質で

あるビテロジェニンが雄の生体中にも誘導されることが知られている (Steroids 1980 Mar;35(3):315-328、Le Menn Fら)。従って、ビテロジェニンの濃度を測定することによって化学物質が有する内分泌攪乱作用を評価しようとする試みがなされてきた。しかしながら、ビテロジェニンは不安定な物質であるため、高速液体クロマトグラフィーなどの機器分析によっては正確に測定することに大きな問題があった。

【0008】本発明者は、先にコイのビテロジェニンを特異的に認識する抗体を開発し、その抗体を用いてコイの体液中のビテロジェニンを測定することにより、化学物質の毒性(特に内分泌攪乱作用の強度)を評価し、ある地域における内分泌攪乱物質の汚染状況を把握することを可能にする測定系を開発した。水生環境に棲息する生物だけではなく陸生環境に棲息する生物における内分泌攪乱化学物質のスクリーニング手法の確立が、広く地球上の化学物質の汚染状況を把握するためにも望まれていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、鳥類、特にウズラのビテロジェニンに対する抗体、並びに該抗体を用いた化学物質の毒性又は環境汚染の評価方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、体液中に存在する卵巣に由来する他の関連タンパク質には反応せず、ビテロジェニンにのみ特異的に反応する抗体を作製し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、鳥、特にウズラのビテロジェニンに対する抗体である。

【0011】さらに、本発明は、前記抗体を用いて鳥、特にウズラの体液中のビテロジェニンを検出することを特徴とする化学物質の毒性又は環境汚染を評価する方法である。化学物質としては、例えば内分泌攪乱作用を引き起こすものが挙げられ、環境汚染としては、当該化学物質が原因で生じる内分泌攪乱作用によるものが挙げられる。さらに、本発明は、前記抗体を含む、化学物質の毒性又は環境汚染を評価するためのキットである。

【0012】すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 鳥のビテロジェニンを特異的に認識する抗体、
(2) 鳥のリボピテリンを動物に免疫して得られた、(1)の抗体、(3) 鳥のホスピチンを動物に免疫して得られた、(1)の抗体、(4) モノクローナル抗体である(1)～(3)のいずれかの抗体、(5) 鳥がウズラである(1)～(4)のいずれかの抗体、
(6) (1)～(4)のいずれかの抗体と鳥の体液中のビテロジェニンとを反応させることを特徴とする、鳥のビテロジェニンの濃度の測定方法、(7) (1)～(4)のいずれかの抗体と該鳥の体液中のビテロジェニンとを反応させ、該反応により測定されたビテロジェニ

ンの濃度の上昇を指標として化学物質の毒性又は環境汚染を評価する方法、(8) 化学物質が内分泌攪乱作用を有するものである(7)の方法、(9) 環境汚染が内分泌攪乱作用を有する化学物質によるものである(7)の方法、(10) 鳥がウズラである(6)～(9)のいずれかの方法、及び(11) (1)～(5)の抗体を含む、化学物質の毒性又は環境汚染の評価用キット。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明は、鳥類の雌特有の卵黄蛋白であるビテロジェニンを特異的に認識することができる抗体に関するものであり、該抗体を鳥類の体液中のビテロジェニンと反応させることにより、ビテロジェニンを簡便かつ高感度に測定することを可能とするものである。その結果、本発明により化学物質の毒性(特に内分泌攪乱作用の強度)を評価し、ある地域における内分泌攪乱物質の汚染状況を把握することが可能となる。鳥の種類は問わないが、入手及び飼育の簡便性、分布等を考慮するとウズラが好ましい。

【0014】そこで、本発明では、鳥類のビテロジェニンに対する抗体を作製するとともに、該抗体を用いて、簡便かつ正確で、高速液体クロマトグラフィーなどに比べて高感度なビテロジェニンの測定法を確立する。そして、本発明の抗体を用いて化学物質が有する毒性(内分泌攪乱作用)の強度を検討する。この強度は、内分泌攪乱作用を有する化学物質により生体内のビテロジェニン濃度が有意に上昇するか否かを測定することにより評価することができる。

【0015】本発明の抗体は、ビテロジェニンを免疫原として用いて作製することもできるし、ビテロジェニンを構成する糖タンパク質であるリボピテリン又はホスピチンを免疫原として用いることもできる。このようにして作製した抗体は、ビテロジェニンのリボピテリン部分を認識する抗体及びホスピチン部分を認識する抗体を含み、それぞれ卵巣でビテロジェニンから分解されたりボピテリン、ホスピチンをも認識する。また、ビテロジェニンが分解してできるリボピテリン、ホスピチンを認識せず、完全な構造を有するビテロジェニンのみを認識する抗体も含まれる。いずれの抗体もビテロジェニンの測定に用いることができる。これらのビテロジェニン中の認識する部分が異なる抗体を用いれば、血中の完全なビテロジェニンだけでなく分解産物であるリボピテリンやホスピチンの濃度も正確に求めることができ、より正確にビテロジェニンの産生量を求めることが可能になる。また、血中でのビテロジェニンの動態の解析も可能になる。尚、本明細書中で免疫原として用いた抗原に従って、抗リボピテリン抗体、抗ビテロジェニン抗体と称しているが、これは抗体の反応性を限定する意図ではなく、抗リボピテリン抗体がビテロジェニンを認識するこ

と、及び抗ピテロジェニン抗体がピテロジェニンを構成するいずれかの部分等タンパク質を認識し得ることはピテロジェニンの構造から理解される。本発明の抗体を作製するにあたり、動物を免疫するための免疫原として、及び鳥類のピテロジェニンを特異的に認識する抗体の評価のためにピテロジェニン、リボピテリン及びホスピチンを当業者に知られた糖タンパク質の精製法を用いて調製することができる。例えば、これらのタンパク質は以下のようにして調製することができる。

【0016】リボピテリンは、卵黄に含まれているリボタンパク質である。従って、鳥類の卵黄から各種の分離精製方法により、分離・精製することができる。この際、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。例えば、ウズラ卵黄より遠心分離及び塩析を利用して卵黄顆粒(yolk granule)画分を得て、卵黄顆粒画分からゲルろ過クロマトグラフィーによりリボピテリンを精製することができる。リボピテリンは、分子量により同定することが可能である。精製されたりボピテリンは、ピテロジェニンを特異的に認識する抗体を作製するための免疫原として用いられる。

【0017】ピテロジェニンは、卵黄に含まれるリンタンパク質の前駆体であり、肝臓で大量に作られ血中に分泌されるので、鳥類から採取した血液から各種の分離精製方法により、分離・精製することができる。この際、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。例えば、ウズラから採取した血液を遠心分離にかけて血清を調製し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより粗ピテロジェニン分画を回収し、さらにヘパリンカラムやレクチンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりピテロジェニン以外の糖タンパク質を除去し、ピテロジェニンを精製することができる。ピテロジェニンは、公知のチキンピテロジェニンの分子量との比較、抗リボピテリン抗体との反応性、チキンピテロジェニンとの配列の相同性等により同定することができる。

【0018】精製されたピテロジェニンは、免疫原として、又は鳥のピテロジェニンを特異的に認識する抗体の評価などに用いられる。免疫原をマウス、モルモット、ウサギ、ヤギ等の動物の皮下、筋肉内、腹腔内、静脈等に複数回接種する。免疫の間隔は特に限定されないが、例えば1～2週間おきに、2～5回免疫すればよい。1回の接種免疫原量も限定されないが、例えば被免疫動物がウサギの場合、1回にウサギ1羽当たり、10～500 µg接種すればよい。この際、フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント、BCG、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチン等の公知のアジュバントとともに免疫することが望ましい。十分に免

疫した後に動物から採血し、ポリクローナル抗体を得ることができる。

【0019】血液を遠心分離し血清を得て、該血清からリボピテリンを認識する抗体を精製することができる。この際、硫酸分画法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知の免疫グロブリン精製の技術を用いることができる。例えば、Protein Gカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりIgGを精製し、次いでウズラオス血清成分を固定化したアフィニティークラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより非特異抗体を吸収し、ウズラリボピテリンに対する特異抗体を精製することができる。

【0020】得られた抗血清または精製抗体は、固相酵素免疫測定法(ELISA)等の酵素免疫測定法(EIA)、放射線免疫測定法(RIA)、ウエスタンブロッティング等により特異性検定や抗体価を測定し、評価することができる。この際、抗原として免疫原として用いたウズラリボピテリンを用いることもできるし、ウズラピテロジェニンをを用いることもできる。

【0021】モノクローナル抗体も例えば、ケーラーとミルステインの方法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975)等の公知の方法により作製し得る。例えば、ウズラリボピテリンで免疫したマウスの脾細胞またはリンパ節細胞とマウスのミエローマ細胞との細胞融合により得られるハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマの培養上清又は該ハイブリドーマを腹腔内に投与したマウスの腹水から調製することができる。被免疫動物は、マウスに限定されずラット、モルモット等も利用可能である。ミエローマ細胞は、一般に被免疫動物と同種の動物より得られたものを用いるが、異種間でも可能な場合がある。また、免疫されていない動物の脾細胞またはリンパ節をin vitroで免疫して、感作細胞を得ることもできる。ハイブリドーマのスクリーニングは、種々の免疫化学的方法で実施することができ、例えばELISA法、ウエスタンブロット法等が利用できる。ハイブリドーマ上清またはマウス腹水からのモノクローナル抗体の調製は、当業者に知られた免疫グロブリン精製法を用いればよく、例えば、硫酸分画法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等により行うことができる。

【0022】このようにして得られた抗体を用いて、鳥類体液(例えば、血漿、血清など)中の鳥類ピテロジェニンの濃度を測定(定量)することができる。測定は、ELISAなどの酵素免疫測定法(EIA)、放射線免疫測定法(RIA)、蛍光抗体法、凝集反応を利用した方法、イムノクロマトグラフィー法等の当業者に知られた方法により行うことができる。この際、抗体は、完全抗体であっても、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv等の抗原結合部位を有するフラグメントであってもよい。

【0023】例えば、ELISAにおいては、抗ウズラリボ

ビテリン抗体をマイクロタイタープレート等の担体に物理吸着や化学結合により固相化する。固相化量は、特に限定されないが、担体がマイクロタイタープレートの場合、1ウェル当たり数ngから数十 μ gが望ましい。固相化は固相化すべき抗体を適切なバッファーに溶解し、担体と接触させ行うことができる。例えば、マイクロタイターウェルを用いる場合、抗体溶液をマイクロタイタープレートのウェルに分注し一定時間置くことにより固相化することができる。基質を固相化した後は、アッセイ中の非特異的結合を防ぐためにウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、卵白アルブミン等を含んだブロッキング溶液を用いてブロッキングを行うのが好ましい。次いで、固相化担体とサンプルを反応させ、洗浄後、標識した抗ウズリボビテリン抗体を反応させる。標識は、 β -D-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼやグルコースオキシダーゼ等の酵素を用いて行うことができる。また、この際、抗体をビオチンで標識し、さらに酵素標識ストレプトアビジンを結合させることもできる。次いで、酵素に対応した基質を反応させ、発色を測定することによりサンプル中のウズラビテロジェニンを定量することができる。ELISAにおいては、多数のウェル（例えば、96穴）を有するマイクロタイタープレートに基質を固相化させ、ウェル中で抗原抗体反応を行わせることにより一度に大量測定が可能になる。また、用いる抗体および試料の使用量を非常に少なくすることも可能である。さらに、全自動EIA測定装置などの自動測定機器を用いる事も可能になる。

【0024】本発明においては、前記のようにして測定された鳥類ビテロジェニンの濃度の上昇を指標として化学物質の毒性又は環境汚染を評価することができる。この際、内分泌攪乱化学物質の存在しない環境下ではビテロジェニンがほとんど合成されないオスを用いるのが望ましい。

【0025】例えば、オスのウズラを評価対象となる化学物質の存在下で飼育した後又は該化学物質を投与した後、血液などを採取し、試料中に含まれるビテロジェニンを本発明の抗体と反応させてビテロジェニン濃度を測定する。得られた測定値の大小により、化学物質の毒性（例えば内分泌攪乱作用の強度）を評価することができる。すなわち、評価対象となる化学物質（例えばフタル酸エステル）の存在下で又は該化学物質を投与してオスのウズラを飼育し、経時的に血清中のビテロジェニン濃度を測定し、対照のウズラから得られた血清中のビテロジェニン濃度と比較する。その結果、ビテロジェニン濃度が対照と比較して高い場合は、評価対象となる化学物質は、内分泌攪乱作用を有すると判断される。

【0026】また、ある濃度のエストロゲン存在下で飼育したときのビテロジェニン濃度と、評価対象となる化学物質存在下で飼育したときのビテロジェニン濃度と

を比較することにより、評価対象となる化学物質の内分泌攪乱作用の強度をエストロゲンと相対化して評価することが可能である。すなわち、ある濃度（例えば100ppm）のエストロゲン存在下で飼育したときのビテロジェニン濃度が、内分泌攪乱作用の強度が不明であってエストロゲンと同濃度（例えば100ppm）である化学物質の存在下で飼育したときのビテロジェニン濃度よりも10分の1である場合は、当該化学物質の内分泌攪乱作用はエストロゲンに対して10倍強いと判断することができる。

【0027】さらに、内分泌攪乱作用を有する化学物質による環境汚染状態を以下のようにして評価することができる。評価対象となる地域に生息する雄のウズラの体液中のビテロジェニンを本発明の抗体と反応させてビテロジェニンの濃度を測定することにより、内分泌攪乱作用を有する化学物質によるその環境の汚染状態を評価することができる。その測定結果が対照と比較して高い場合には、何らかの内分泌攪乱作用を有する化学物質によって、その環境が汚染されていると判断できる。なお、ビテロジェニン濃度は、前記の方法により測定することができる。

【0028】本発明の抗体は、1M～10Mの公知緩衝液（pH 7～8）で希釈して0.01 μ g/ml～1 μ g/mlの濃度にし、化学物質の毒性若しくは環境汚染の評価用キットとして用いることができる。緩衝液としては、リン酸緩衝液、マクラーレン緩衝液、トリス緩衝液、ペロナール緩衝液、グリシン緩衝液等が挙げられる。また、本発明の抗体を担体に固定化して使用することもできる。担体としては、セファロースなどが挙げられる。例えば、本発明の抗体を担体に結合させ、緩衝液中に分散させ、あるいはカラムに詰めることにより使用することができる。

【0029】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

実施例1 ウズリボビテリン-Iの精製

ウズリボビテリン-Iは、以下の方法で精製した。ウズラ卵黄250mgに氷冷水1mLを添加し、4 にて3,100rpmで10分間遠心分離した後、上清を除き、沈殿に2%（0.68M）NaCl、25mM Tris/HCl バッファー1mLを重層静置し卵黄顆粒（yolk granule）を溶解させた。次いでこの卵黄顆粒溶解液をゲルろ過ベースバッファー（25mM Tris/HCl pH7.4、0.15M NaCl）で平衡化したShodex-KW803カラム（昭和電工株式会社製）に添加し、同バッファーで流速0.5mL/minの条件で溶出し、250 μ L/チューブずつ分取した。分子量120,000のピーク分画を回収し、再度同カラムを用いて分画した。7%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行い銀染色でバンドを検出したところ、分子量120,000の位置に単一バンドが認められ、ウズリボビテリンであることが確認できた（図1）。図1の

レーン1は分子量マーカー、レーン2は卵黄顆粒画分、レーン3はリポビテリン-Iを示す。この画分のウズラリポビテリン-Iの純度は95%であり、250mgのウズラ卵黄から700 μ gのリポビテリン-Iを精製することが出来た。

【0030】実施例2 抗ウズラリポビテリン-I抗体の作製

0.5mg/mLの抗原(ウズラリポビテリン-I)を、等量のフロイント完全アジュバントと混合してエマルジョンを作製した後、約2.5kgのウサギ(Japanese White)の背中皮下に500 μ L/羽(ウズラリポビテリン-I 250 μ g/羽)ずつ投与した。以後、隔週で500 μ L/羽(ウズラリポビテリン-I 70 μ g/羽)の量で追加免疫を行い、初回免疫から4回免疫した後、耳静脈より採血を行い、抗血清を分離しウズラリポビテリンを固相化したマイクロタイタープレートを用いた固相酵素免疫測定法(ELISA)により抗体価の確認を行った。

【0031】次に、得られた抗ウズラリポビテリン抗血清からの抗ウズラリポビテリン-I抗体を精製した。得られた抗血清からプロテインGカラム(アマシャム社製)を用いて(平衡化バッファー:PBS、溶出バッファー0.1M Glycine/HCl, pH3.0)IgGを精製した。次いで、ウズラオス血清をゲルに結合させたウズラオス血清アフィニティーカラムを用いて、ウズラメス血清とウズラオス血清に共通して含まれる物質に対する抗体を吸収除去し、非吸着画分を得た(精製抗ウズラリポビテリン-I抗体画分)。

【0032】抗血清及び抗ウズラリポビテリン-I抗体の抗体価は、ウズラリポビテリンを固相化したマイクロタイタープレートを用いた固相酵素免疫測定法(ELISA)により測定した。また、オスのウズラの血清、メスのウズラの血清及び後述の精製ピテロジェニンをSDS-PAGE用サンプルバッファーで希釈し、7%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより分離し(サンプル添加量5 μ L)、1次抗体液として抗ウズラリポビテリン抗体(0.1mg/mL)、2次抗体液としてホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ウサギIgG抗体(Biorad社製、2500倍希釈)を用いたウエスタンブロットにより抗ウズラリポビテリン抗体の反応性を調べた(図3)。図3左はSDS-PAGEの銀染色像であり、図3右はウエスタンブロットの結果を示す。レーン1は分子量マーカー、レーン2はウズラオス血清、レーン3はウズラメス血清、レーン4は精製ピテロジェニンをそれぞれ抗原として用いた。抗ウズラリポビテリン抗体はピテロジェニンが合成されるメスウズラの血清とは反応し分子量120,000の位置にバンドが認められたが、ピテロジェニンが合成されないオスウズラの血清とは反応しなかった。

【0033】実施例3 ウズラピテロジェニンの精製
ウズラオス血清及びウズラメス血清を7%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより分離し、銀染色法によりバンドを染色して解析した。オス血清とメス血清のSD

S-PAGE分離パターンを比較したところ、メス血清のみで250kDa付近に2本のバンドが認められた。チキンピテロジェニンの分子量(チキンピテロジェニンI:260kDa、チキンピテロジェニンII:246kDa、チキンピテロジェニンIII:210kDa)との比較によりメス血清のみに認められる250kDa付近の2本のバンドがウズラピテロジェニンのバンドであると推測した。

【0034】ウズラピテロジェニンは、以下の方法で精製した。ウズラメスより採取した血清200 μ Lにゲルろ過ベースバッファー(25mM Tris/HCl pH7.4, 0.15M NaCl)1800 μ Lを加えて10倍希釈液とし、0.45 μ mフィルターを用いて前処理を行った。このようにして調製したウズラメス血清10倍希釈液200 μ Lを、ゲルろ過ベースバッファーで平衡化したShodex-KW803カラム(昭和電工株式会社製)に添加し、同バッファーで流速0.5mL/minの条件で溶出し、250 μ L/チューブずつ分取した。ゲルろ過による200 μ Lのウズラメス血清10倍希釈液200 μ Lの分離を8回行い(総ウズラメス血清10倍希釈液1600 μ L)、各フラクションをプールした。この際、同カラムを用いてゲルろ過用分子量標準物質(アマシャム社製、カタログ番号17-0441-01)を同条件で流し、タンパク質の分子量と分離時間の関係を求めておいた。次いで、7%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行い、各プールフラクションに含まれるタンパク質の分子量を求めた。ゲルろ過分子量標準物質を用いた分離の結果と、各フラクションのSDS-PAGE像を基にして、分子量640kDa~440kDaのフラクションを回収し、粗ピテロジェニン画分(粗Vg画分)とした。粗Vg画分について7%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行い銀染色でバンドを検出したところ、320kDa及び270kDaのピテロジェニン画分並びに1000kDa以上のタンパク質及び180kDaのタンパク質が含まれていた(図2)。図2のレーン1は分子量マーカー、レーン2はオスのウズラ血清、レーン3はメスのウズラ血清及びレーン4は、粗Vg画分を示している。

【0035】次いで、粗Vg画分にNaClを添加し、最終NaCl濃度を0.5Mに調整した。これをレクチンカラムバインディングバッファー(20mM Tris/HCl pH7.4, 0.5M NaCl)15mLであらかじめ平衡化しておいたゲル容量1mLのレクチンカラム Hi Trap WheatGerm Lectin(アマシャム社製、カタログ番号17-5107-01)にアブライし、非吸着画分を回収した。続いて、レクチンカラム溶出バッファー(0.5M N-acetylglucosamine, 20mM Tris/HCl pH7.4, 0.5M NaCl)で吸着画分を溶出した。SDS-PAGEにより分子量180kDaのタンパク質が吸着画分として除かれていることを確認した。

【0036】レクチンカラム非吸着画分をさらに、ヘパリンカラムバインディングバッファー(20mM Tris/HCl pH7.4)15mLであらかじめ平衡化しておいたヘパリンカラムHi Trap Wheat Germ Lectin(アマシャム社製、カタログ番号17-0406-01)にアブライし、非吸着画分を回

収した。続いて、ヘパリンカラム溶出バッファー（20mM Tris/HCl pH7.4, 0.2M NaCl）で吸着画分を溶出した。SDS-PAGEにより分子量1000kDa以上のタンパク質が吸着画分として除かれていることを確認した。この非吸着画分は、抗リポビテリン抗体と反応した。分子量及び抗リポビテリン抗体との反応性により、該分画が精製ウズラピテロジェニン画であることを確認した。図3に精製ピテロジェニンのSDS-PAGEの結果を示す（図3左、第4レーン）。

【0037】実施例4 抗ウズラピテロジェニンモノクローナル抗体の作製

ウズラピテロジェニン100 μ L（50 μ g）をフロイント完全アジュバントと共に5週齢、雌のBALB/cマウスに免疫し、2週間毎に2回、同抗原25 μ gをフロイント不完全アジュバントとともに投与し追加免疫を行った。さらに2週間後、同抗原25 μ gを投与し、その3日後に脾臓細胞を摘出した。摘出された脾臓細胞はケラーらの方法（Kohler et al., Nature, vol. 256, p495-497 (1975)）によりマウスミエローマ細胞（P3U1）と融合し、炭酸ガスインキュベーター中で37 $^{\circ}$ Cで培養した。増殖してきたハイブリドーマの培養上清をウズラメス血清を固相化（5 μ g/mL濃度に希釈したものをウェル当たり50 μ L添加して固相化）したマイクロタイタープレートを用いたELISAにてスクリーニングし、抗ウズラピテロジェニンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択した。選択されたハイブリドーマを限界希釈法によって1細胞/ウェルで、96ウェルプレートに播き、ウェル中に単一コロニーとして発育したハイブリドーマのみクローンとし、この限界希釈法を2度繰り返すことによりクローニングを行った。この結果、4つのクローン1F2、10H5、2D3及び1G7が得られた。オスのウズラの血清及びメスのウズラの血清をSDS-PAGE用サンプルバッファーで300倍に希釈し、7%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより分離し（サンプル添加量5 μ L）、1次抗体液として抗ウズラピテロジェニンモノクローナル抗体（0.1mg/mL）、2次抗体液としてHRP標識抗マウス血清（2500倍希釈）を用いたウエスタンブロットにより抗ウズラモノクローナル抗体の反応性を調べた（図4）。図4のレーン1は分子量マーカーであり、レーン2、4、6、8はオスのウズラ血清、レーン3、5、7、9はメスのウズラ血清を抗原として用い、レーン2及び3、4及び5、6及び7並びに8及び9は、1次抗体としてそれぞれクローン1F2、10H5、2D3及び1G7の産生するモノクローナル抗体を用いた。各モノクローナル抗体ともピテロジェニンを合成しないオスの血清とは反応せず、合成するメスの血清では250kDa付近にバンドが認められた。

【0038】実施例5 抗ウズラリポビテリン抗体を用いたウズラピテロジェニンの測定

検量線作成用サンプルは、2000ng/mL精製ウズラピテロジェニン溶液を1mg/mLBSA, Tween-PBSバッファーで倍々

希釈して作製した。96ウェルマイクロタイタープレート（NUNC社製）の各ウェルに、抗ウズラリポビテリン抗体溶液（0.01mg/mLの濃度でPBSバッファーに溶解）を50 μ L添加し、室温で1時間置き抗体を固相化した。洗浄バッファー（Tween-PBS）で3回洗浄した後に、各ウェルを1mg/mL BSA、0.5% Tween 20添加PBSを用いて室温で1時間ブロッキングし、さらに洗浄バッファーで3回洗浄し、抗ウズラリポビテリン抗体固相化プレートを得た。

【0039】抗ウズラリポビテリン抗体固相化プレートに上記検量線作成用サンプルを50 μ L添加し、室温で2時間反応させ、洗浄バッファーで3回洗浄した。次に、ビオチン標識抗ウズラリポビテリン抗体溶液（0.01mg/mLの濃度で1mg/mL BSA, Tween-PBSバッファーに溶解）を添加し、室温で1時間反応させたのち、洗浄バッファーで3回洗浄した。HRP標識ストレプトアビジン溶液（Zymed社製、1mg/mL BSA, Tween-PBSバッファーで4000倍希釈）を各ウェルに50 μ L添加し、室温で1時間反応させた後、洗浄バッファーで3回洗浄した。オルトフェニレンジアミン（OPD）溶液を添加し室温で10分間反応させ発色させ、2N H_2SO_4 で反応を停止させた後、マイクロプレートリーダを用いて各ウェルの吸光度を測定し検量線を作成した（図5）。

【0040】実施例6 抗ウズラリポビテリン抗体を用いたウズラピテロジェニン測定系によるウズラピテロジェニン濃度を上昇させる化学物質のスクリーニング
10週齢のオスウズラの腹腔内に、ごま油に溶解した被検物質を投与し、7日間、16時間明：8時間暗の照明条件下、室温20 $^{\circ}$ Cで飼育を行った。被検物質として、エストラジオール、ノニルフェノール、トリブチルスズ、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ベンゾフェノン、4-オクチルフェノール及びジエチルスチルベスチロールの8種類を用い、それぞれ体重当たりの用量で7段階の濃度を設定し、投与した。投与群是一群6羽とし、ごま油のみを投与したものを対照群とした。

【0041】7日間の飼育後、翼静脈（尺骨静脈）を注射針によって破り出血させ、これをヘマトクリット毛細管で吸引し採血した。採血血液から遠心分離により血清を採取し、測定用サンプルとした。サンプルは、上述の測定系を用いてピテロジェニン濃度を測定した。

【0042】被検物質のうち、エストラジオール、ノニルフェノール及びジエチルスチルベスチロールの3物質で用量依存的にウズラ血液中のピテロジェニンの濃度上昇が認められた（図6～8）。他の5物質では、ピテロジェニンの有意な上昇は認められなかった。この結果より、女性ホルモンであるエストラジオールはもとより、ジエチルスチルベスチロールやノニルフェノールといった環境ホルモン作用を有する化学物質の内分泌攪乱作用を検出できることが明らかとなった。

【0043】

【発明の効果】本発明により、鳥類、特にウズラのピテ

ロジェニンに対する抗体、並びに該抗体を用いた化学物質の毒性又は環境汚染の評価方法が提供される。本発明の抗体はピテロジェニンを特異的に認識するため、他のタンパク質の影響を受けず正確な測定を可能にする。従って、本発明の抗体は、化学物質の毒性の測定方法、環境汚染の評価方法に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】ウズラリポビテリンのSDS-PAGEの結果を示す図である。

【図2】ウズラピテロジェニンのSDS-PAGEの結果を示す図である。

【図3】ウズラピテロジェニンのSDS-PAGEの結果及び抗*

*リポビテリン抗体を用いたウエスタンブロットの結果を示す図である。

【図4】抗ウズラピテロジェニンモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットの結果を示す図である。

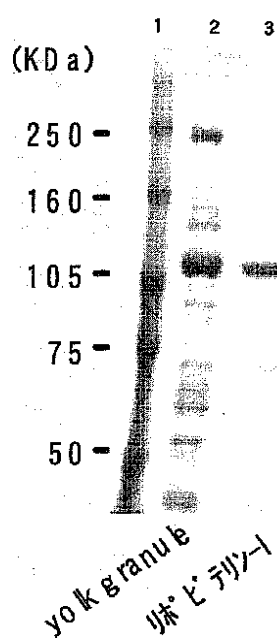
【図5】抗ウズラピテロジェニン抗体を用いたアッセイ系の検量線を示す図である。

【図6】エストラジオールのウズラ血中濃度への影響を示す図である。

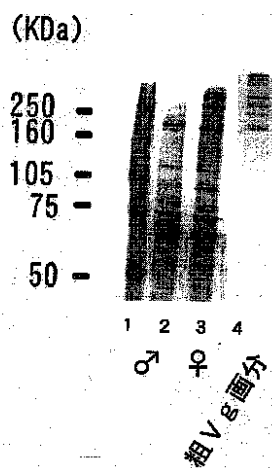
【図7】ノニルフェノールのウズラ血中濃度への影響を示す図である。

【図8】ジエチルstilベスチロールのウズラ血中濃度への影響を示す図である。

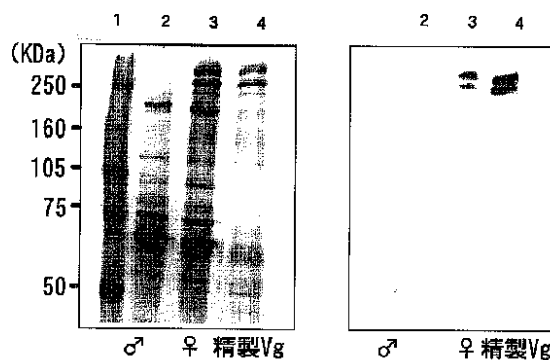
【図1】



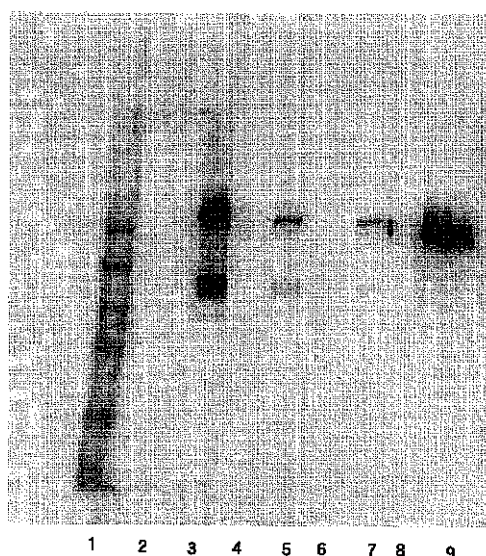
【図2】



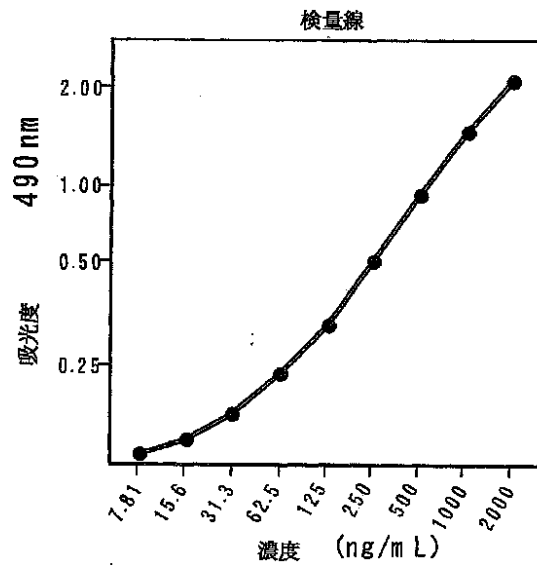
【図3】



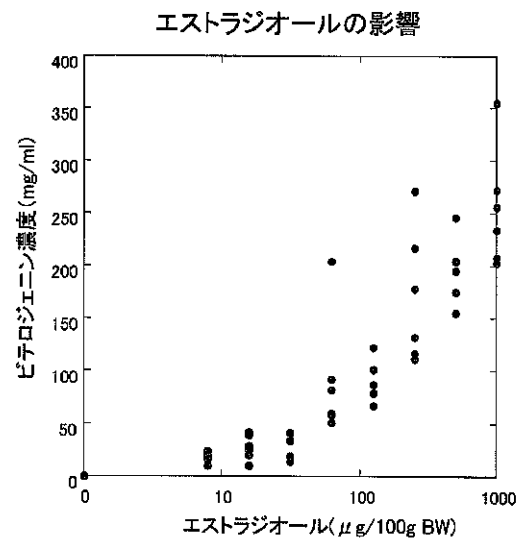
【図4】



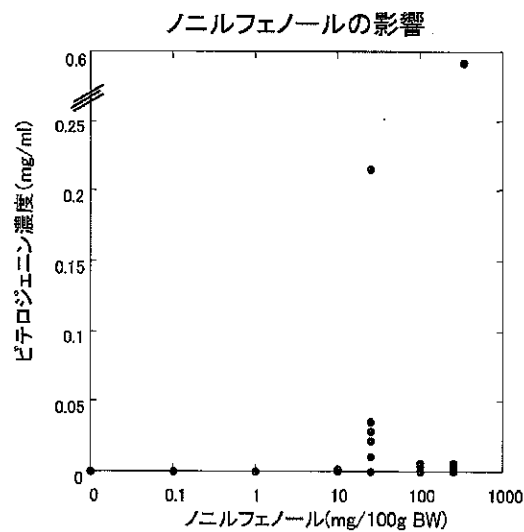
【図5】



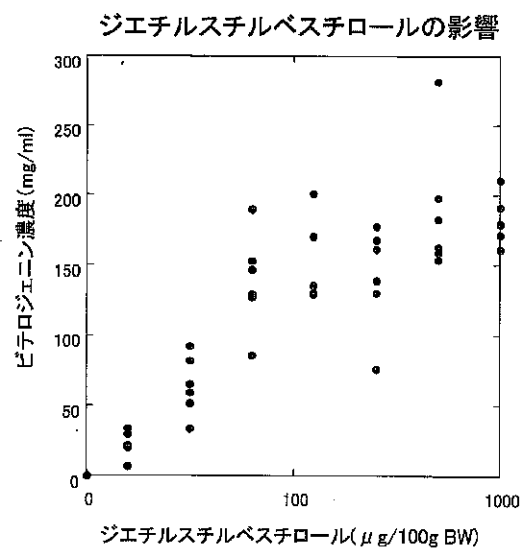
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 中道 直美
 熊本県熊本市長嶺東 1 - 7 - 1 - 201

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12
 DA13
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50
 FA72 GA22 GA26

专利名称(译)	特异性识别禽类禽类和禽类的卵黄蛋白原的抗体		
公开(公告)号	JP2002256000A	公开(公告)日	2002-09-11
申请号	JP2001055687	申请日	2001-02-28
申请(专利权)人(译)	转基因公司		
[标]发明人	和田勝 中路敦子 坂本珠美 中道直美		
发明人	和田 勝 中路 敦子 坂本 珠美 中道 直美		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.F G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA22 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种识别鸟卵黄蛋白原的抗体。用于识别鸟类卵黄蛋白原的抗体和用于测量鸟类卵黄蛋白原浓度的方法，其包括使抗体与鸟类体液中的卵黄蛋白原反应。

【图3】

