

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4084808号  
(P4084808)

(45) 発行日 平成20年4月30日(2008.4.30)

(24) 登録日 平成20年2月22日(2008.2.22)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
<b>C O 7 K</b> 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18
<b>G O 1 N</b> 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 S
<b>G O 1 N</b> 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577 B
<b>C 1 2 P</b> 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08

請求項の数 12 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2005-70007 (P2005-70007)  
 (22) 出願日 平成17年3月11日(2005.3.11)  
 (65) 公開番号 特開2006-246820 (P2006-246820A)  
 (43) 公開日 平成18年9月21日(2006.9.21)  
 審査請求日 平成17年3月11日(2005.3.11)

微生物の受託番号 FERM P-20278  
 微生物の受託番号 FERM P-20279  
 微生物の受託番号 FERM P-20281

(73) 特許権者 000211307  
 中国電力株式会社  
 広島県広島市中区小町4番33号  
 (73) 特許権者 507030863  
 株式会社セシルリサーチ  
 兵庫県姫路市白浜町甲770番地  
 (74) 代理人 110000176  
 一色国際特許業務法人  
 (72) 発明者 川端 豊喜  
 広島県広島市中区小町4-33 中国電力  
 株式会社内  
 (72) 発明者 柳川 敏治  
 広島県広島市中区小町4-33 中国電力  
 株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アカフジツボ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】

アカフジツボ付着期幼生には特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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。

【請求項2】

FERM P-20278、FERM P-20279、及びFERM P-20281からなる群から選ばれるいずれかの受託番号で寄託されていることを特徴とする請求項1に記載のハイブリドーマ。

【請求項3】

アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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。

【請求項4】

FERM P-20278、FERM P-20279、及びFERM P-20281からなる群から選ばれるいずれかの受託番号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3に記載のモノクローナル抗体又はそのフラグメント。

【請求項5】

アカフジツボ付着期幼生の検出用試薬であって、

アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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を有効成分として含有する検出用試薬。

【請求項6】

10

20

前記モノクローナル抗体が、FERM P-20278、FERM P-20279、及びFERM P-20281からなる群から選ばれるいずれかの受託番号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 5 に記載の検出用試薬。

【請求項 7】

アカフジツボ付着期幼生の検出器であって、

アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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が固定化されていることを特徴とする検出器。

【請求項 8】

前記モノクローナル抗体が、FERM P-20278、FERM P-20279、及びFERM P-20281からなる群から選ばれるいずれかの受託番号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 7 に記載の検出器。

10

【請求項 9】

アカフジツボ付着期幼生の検出キットであって、

アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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を含むことを特徴とする検出キット。

【請求項 10】

前記モノクローナル抗体が、FERM P-20278、FERM P-20279、及びFERM P-20281からなる群から選ばれるいずれかの受託番号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 9 に記載の検出キット。

20

【請求項 11】

アカフジツボ付着期幼生の検出方法であって、

試料に、アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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を加えることを特徴とする検出方法。

【請求項 12】

前記モノクローナル抗体が、FERM P-20278、FERM P-20279、及びFERM P-20281からなる群から選ばれるいずれかの受託番号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 11 に記載の検出方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アカフジツボ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、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、並びに、アカフジツボ付着期幼生の検出用試薬、検出器、検出キット、及び検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

フジツボ類の種の判別や同定は、従来、形態学的手法に基づいて専門家により行われていた。しかしながら、フジツボ類の付着期幼生は形態が非常に似ており、専門家においても種の判別や同定が困難とされている。そのため、フジツボ類の付着期幼生に励起光を照射して種固有の蛍光分布パターンを解析することにより、フジツボ類の付着期幼生の種を判別する方法の開発がなされている（特許文献 1 参照）。

40

【特許文献 1】特開 2004 - 12467 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、アカフジツボ付着期幼生を特異的かつ容易に検出することができる、検出用試薬、検出器、検出キット、及び検出方法、並びに、それらに使用するモノクローナル抗体又はそのフラグメント、及び前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供

50

することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、アカフジツボの付着期幼生（キプリス幼生）を腹腔内に注射することにより免疫したマウスの脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞とを融合し、得られたハイブリドーマから、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期幼生に反応しないが、アカフジツボ付着期幼生に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定し、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明に係るハイブリドーマは、アカフジツボ付着期幼生には特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期幼生には反応しないモノクローナル抗体を産生することを特徴とする。

【0006】

また、本発明に係るモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期幼生には反応しないことを特徴とする。

【0007】

本発明に係るアカフジツボ付着期幼生の検出用試薬は、アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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を有効成分として含有する。

【0008】

また、本発明に係るアカフジツボ付着期幼生の検出器は、アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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が固定化されていることを特徴とする。

【0009】

さらに、本発明に係るアカフジツボ付着期幼生の検出キットは、アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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を含む。

【0010】

本発明に係るアカフジツボ付着期幼生の検出方法は、試料に、アカフジツボ付着期幼生に特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期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を加えて、試料中のアカフジツボ付着期幼生に作用させる工程を含む。

【0011】

ここで、前記アカフジツボ付着期幼生には特異的に反応し、タテジマフジツボ付着期幼生やイワフジツボ付着期幼生には反応しないモノクローナル抗体としては、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-20278、FERM P-20279、及びFERM P-20281等で寄託されているハイブリドーマ細胞株から産生されるモノクローナル抗体を挙げることができる。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、アカフジツボ付着期幼生を特異的かつ容易に検出することができる、検出用試薬、検出器、検出キット、及び検出方法、並びに、それらに使用するモノクローナル抗体又はそのフラグメント、及び前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ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】

【0013】

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), Co

10

20

30

40

50

Id 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.などの標準的なプロトコル集に記載の方法、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ルを用いる。

#### 【0014】

==モノクローナル抗体又はそのフラグメントの製造方法==

本発明に係るモノクローナル抗体は、アカフジツボ以外のフジツボ類（特に、タテジマフジツボ及びイワフジツボ）の付着期幼生、又はそれらの付着期幼生をそれぞれ超音波装置、ホモジナイザー等で処理した溶解物（以下、「粗抽出液」と称する。）には反応しないが、アカフジツボ付着期幼生又はその粗抽出液に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ（以下、「本発明に係るハイブリドーマ」と称する。）から得ることができる。本発明に係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、公知の手法により行うことができる。具体的には、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上述のモノクローナル抗体を得ることができるが、上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、サルなど）の腹腔内に投与し、腹水を回収することにより上述のモノクローナル抗体を得ることとしてもよい。なお、モノクローナル抗体の精製は、上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、又は上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など）、ゲル濾過等の方法、又はこれらの方法を適宜組み合わせた方法により行うことができる。

#### 【0015】

上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-20278、FERM P-20279、及びFERM P-20281等で寄託されている細胞株を用いることができる。

#### 【0016】

本発明に係るフラグメントとしては、上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')<sub>2</sub>フラグメントなどを用いることができる。これらのフラグメントは、公知の手法、例えば、タンパク質分解酵素などを用いた方法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')<sub>2</sub>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。

#### 【0017】

===ハイブリドーマの作製===

本発明に係るハイブリドーマは、例えば、以下の方法により作製することができる。まず、アカフジツボ付着期幼生又はその粗抽出液を抗原として用い、適当な量の抗原（アジュバンドを使用してもよい。）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、サルなど）の静脈内、皮下、腹腔内等に（1～複数回）投与して免疫する。その後、免疫した動物から抗体産生細胞を採取し、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から、アカフジツボ以外のフジツボ類（特に、タテジマフジツボ及びイワフジツボ）の付着期幼生又はそれらの粗抽出液には反応性を示さないが、アカフジツボ付着期幼生又はその粗抽出液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、本発明に係るアカフジツボ付着期幼生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を得ることができる。

#### 【0018】

前記抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）などの融合促進剤を含む培養培地で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを一緒に培養することにより行うことができるが、エレクトロポレーション等の電気刺激を利用して行うこともできる。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などの補助剤を培養培地に含ませることとしてもよい。

【0019】

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、末梢血細胞など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、摘出した組織を破砕、濾過、遠心分離等することにより得ることができる。また、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培地など）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ることとしてもよい。

【0020】

上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）、ウェスタンブロット法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、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法等を用いることができる。本発明に係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、アカフジツボ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。

【0021】

なお、上述のハイブリドーマのスクリーニングでは、最低限アカフジツボ、タテジマフジツボ、及びイワフジツボの付着期幼生又はそれらの粗抽出液との反応性を調べればよいが、さらに、アカフジツボ、タテジマフジツボ、及びイワフジツボ以外のフジツボ類の付着期幼生、二枚貝類の付着期幼生（例えば、アサリ、ムラサキイガイなど）、その他の幼生（例えば、アルテミアノープリウス幼生など）若しくはプランクトン（例えば、フジツボ類以外の甲殻類プランクトンなど）又はそれらの粗抽出液との反応性を調べることでより好ましい。これにより、アカフジツボ付着期幼生又はその粗抽出液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、海水など）中からアカフジツボ付着期幼生を特異的に回収したり、検出、すなわち、アカフジツボ付着期幼生の存在の有無の確認、アカフジツボ付着期幼生の同定、アカフジツボ付着期幼生の量の測定等を行ったりすることができるようになる。

【0022】

==モノクローナル抗体又はそのフラグメントの使用==

本発明に係るモノクローナル抗体は、アカフジツボ以外のフジツボ類（特に、タテジマフジツボ及びイワフジツボ）の付着期幼生又はそれらの粗抽出液には反応性を示さないが、アカフジツボ付着期幼生又はその粗抽出液に対して特異的に反応性を示すことから、本発明に係るモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、アカフジツボ付着期幼生の特異的な検出に有用であると考えられる。

【0023】

また、本発明に係るモノクローナル抗体又はフラグメントは、アカフジツボ付着期幼生を回収するのに有用であると考えられる。アカフジツボ付着期幼生の回収は、モノクロー

10

20

30

40

50

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係るモノクローナル抗体又はそのフラグメントをアカフジツボ附着期幼生に作用させ、その後、磁石を用いて本発明に係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、アカフジツボ附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。

【0024】

本発明に係るアカフジツボ附着期幼生の検出は、試料（例えば、海水又はそれを超音波装置、ホモジナイザー等で処理した溶解物など）に、本発明に係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アカフジツボ附着期幼生又はその溶解物と反応させ、前記モノクローナル抗体又はそのフラグメントが結合しているアカフジツボ附着期幼生やその溶解物を免疫学的手法により解析することにより行うことができる。

10

【0025】

従って、本発明に係るモノクローナル抗体又はそのフラグメントを含む試薬、キット、又は器具は、アカフジツボ附着期幼生の検出用試薬、検出キット、及び検出器として有用であるといえる。

【0026】

なお、本発明に係るアカフジツボ附着期幼生の検出用試薬は、本発明に係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、アジ化ナトリウムなど）、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、ゲラチン、スキムミルクなど）、免疫学的手法によりアカフジツボ附着期幼生を検出するのに必要な物質（例えば、標識物質など）、安定剤（例えば、BSA、ヤギ血清など）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。

20

【0027】

本発明に係るアカフジツボ附着期幼生の検出器は、本発明に係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、濾紙などの紙、ガラス、繊維、ニトロセルロースなどの変性セルロース、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、ディッシュなど）に固定化されている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、アジ化ナトリウムなど）、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、ゲラチン、スキムミルクなど）、免疫学的手法によりアカフジツボ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、発色増強剤など）、安定剤（例えば、BSA、ヤギ血清など）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。

30

【0028】

本発明に係るアカフジツボ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、本発明に係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、本発明に係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の二次抗体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、金コロイド粒子など）、重金属（例えば、金、白金など）、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、ファロイジンなど）、着色ラテックス粒子等の標識物質で標識された、本発明に係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、ガラスやシリカなどの無機繊維からなる濾紙、ニトロセルロースなど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、試料中にアカフジツボ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。その原理としては、アカフジツボ附着期幼生又はその溶解物を

40

50

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、浸したりすると、試料中のアカフジツボ附着期幼生又はその溶解物と、第一の部分に含まれる標識された上述の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上述のモノクローナル抗体又はそのフラグメントに補足され、その位置で標識物質によりアカフジツボ附着期幼生の検出が可能となる。これに対して、アカフジツボ附着期幼生又はその溶解物を含まない試料においては、試料中に含まれる抗原と反応しなかった、第一の部分に含まれる標識された上述のモノクローナル抗体又はそのフラグメントが、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上述の二次抗体に補足され、標識物質の標識によりアカフジツボ附着期幼生が存在しなかったことが明らかになる。このように、第二の部分

10

**【 0 0 2 9 】**

一方、本発明に係るアカフジツボ附着期幼生の検出キットは、本発明に係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、本発明に係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、アジ化ナトリウムなど）、非特異的な反応を抑制するための物質（例えば、ブロッカー、ゲラチン、スキムミルクなど）、免疫学的手法によりアカフジツボ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、発色増強剤など）、安定剤（例えば、BSA、ヤギ血清など）等の抗原の検出キットに含ませる一般的な物質、若しくは上述のような本発明に係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。

20

**【 0 0 3 0 】**

なお、前記標識物質としては、例えば、蛍光物質（例えば、FITC、ローダミン、ファロイジンなど）、金属コロイド粒子（例えば、金コロイド粒子）、重金属（例えば、金、白金など）、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）など）、放射性同位元素（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ など）、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など）、ピオチン、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、上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/Nitro tetrazolium blue）、pNPP（para-nitrophenylphosphate）などを用いることができる。前記発色増強剤としては、上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、硫酸などを用いることができ、前記二次抗体としては、例えば、本発明に係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)などを用いることができる。

30

**【 0 0 3 1 】**

また、上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）、ウェスタンブロット法、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。

40

**【 0 0 3 2 】**

以上のように、本発明に係るアカフジツボ附着期幼生の検出方法、検出用試薬、検出器、又は検出キットを用いることにより、アカフジツボ附着期幼生の存在の有無の確認、アカフジツボ附着期幼生の同定、アカフジツボ附着期幼生の分離及び量の測定が可能となる。

**【 実施例 】**

50

## 【 0 0 3 3 】

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。

## 【 0 0 3 4 】

## [ 実施例 1 ]

本発明のモノクローナル抗体を得るために、室内飼育により得られたアカフジツボ (*Megabalanus rosa* (Pilsbry)) キブリス幼生を抗原として用いた。

## 【 0 0 3 5 】

7 週齢のBALB/c Jc1マウスの腹腔内に抗原を 5 回注射し (1~4 回目の注射 : 幼生 50~200 個 / 150~200  $\mu$ l PBS、5 回目の注射 (最終免疫) : 幼生 300 個 / 200  $\mu$ 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 60 日目に 4 回目の投与を、4 回目の投与から 59 日目に 5 回目の投与を行った。)、マウスを免疫した。

## 【 0 0 3 6 】

最終免疫から 3 日後に、マウスから脾臓を摘出し、10% の FBS 及び 1% の抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic ; GIBCO 社製) を含む RPMI 1640 (GIBCO 社製) 培地中で滅菌ステンレスメッシュにより裏漉しし、細胞を分散・懸濁させて浮遊細胞 (脾臓細胞) を得た。この脾臓細胞を 10% の FBS を含む RPMI 1640 培地 (FBS<sup>+</sup>培地) で洗浄・遠心した後、RPMI 1640 培地 (FBS<sup>-</sup>培地) で 3 回遠心・洗浄し、脾臓細胞 (10<sup>8</sup> cells 程度) を回収した。

## 【 0 0 3 7 】

次に、ミエローマ細胞 (5 × 10<sup>7</sup> cells) と脾臓細胞 (10<sup>8</sup> cells 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<sup>-</sup>培地 1 ml とを混合した溶液をゆっくりと添加して攪拌し、さらに 1 分間緩やかに攪拌した。その後、FBS<sup>-</sup>培地 2 ml 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。

## 【 0 0 3 8 】

細胞融合後、さらに FBS<sup>-</sup>培地 (37 ) 8 ml を 1 分間かけてゆっくりと添加し、続いて遠心分離 (1000 rpm × 5 分間) して上澄みを吸引除去した。これに FBS<sup>+</sup>培地 10 ml を添加して懸濁し、FBS<sup>+</sup>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) × 0.5 を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO) ) が入った分室シャーレ 5 枚にそれぞれ 2 ml 播種し、37 , 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 5~7 日間培養した。

## 【 0 0 3 9 】

培養後、凍結したアカフジツボキブリス幼生 700 個体に、50mM Tris-HCl (pH7.5) を 700  $\mu$ l 加え、ホモジナイズ・超音波 (数秒 × 5 回) 処理を行い、5000 rpm × 20 分間遠心することにより得られたアカフジツボキブリス幼生粗抽出液 (タンパク質濃度 ; 5.74 mg/ml) を抗原として用い、それを吸着させたニトロセルロースメンブランを各シャーレ (培養液) 上にのせ (1 日間)、HRP 標識 2 次抗体を用いて反応させた。反応後、化学発光させて X 線フィルムに焼き付け、各セル内の細胞の抗体産生の確認を行った。

## 【 0 0 4 0 】

この確認において、アカフジツボキブリス幼生粗抽出液に対して陽性反応を示した細胞株のうち、シングルコロニーのハイブリドーマをピックアップし、選択培地 (マウス胸腺細胞由来のフィーダー細胞を添加した HT 培地 (100  $\mu$ M ヒポキサンチン及び 16  $\mu$ M チミジンを含む RPMI 1640 培地) ) の入った 96 穴ウェルプレートに移植し、ハイブリドーマの培養を行った。培養後、各ウェル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。

## 【 0 0 4 1 】

( 1 ) 上記抗原 (アカフジツボキブリス幼生粗抽出液 ; 100  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l を、96 穴イワキ ELISA プレートの各ウェルに加え、4 で一晩、抗原をウェル底面に吸着させた。

( 2 ) ( 1 ) 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) )

10

20

30

40

50

200  $\mu$ l で洗浄した。

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

(4) 各ウェルをTTBS (0.05% Tween20を含むTBS) 200  $\mu$ l で3回洗浄した。

(5) 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  $\mu$ l を各ウェルに加え、1時間反応させた。

(6) 各ウェルをTTBS 200  $\mu$ l で4回洗浄した。

(7) 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  $\mu$ l を加えて1時間反応させた。

(8) 各ウェルをTTBS 200  $\mu$ l で5回洗浄した。

(9) 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  $\mu$ l を加え、1時間振盪することにより発色させた。

(10) 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。

#### 【0042】

上述の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。)、アカフジツボキ  
20  
プリス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のクローン(KA4-5b6P-1(3)a、KA4-5b(5)a、KF1-6a4(1)6P-3、及び10E3-1A11-2(3)b) を得た。

#### 【0043】

##### [実施例2]

次に、実施例1により得られた4個のハイブリドーマクローン(KA4-5b6P-1(3)a、KA4-5b(5)a、KF1-6a4(1)6P-3、及び10E3-1A11-2(3)b) の各培養上清に含まれるモノクローナル抗体が、アカフジツボキプリス幼生に対して特異的に反応するか否かを調べるため、アカフジツボキプリス幼生、タテジマフジツボ(Balanus amphitrite Darwin) キプリス幼生、イワフジツボ(Chthamalus challengerii Hoek) キプリス幼生、フジツボ類以外の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)、及び二枚貝幼生(アサリベディベリジャー幼生、ムラサキイガイベディベリジャー幼生) の粗抽出液(タンパク質の濃度; 100  $\mu$ 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。ELISAの結果(OD<sub>405</sub>値) を表1に示す。

#### 【0044】

##### [表1]

10

20

30

ハイブリドーマ	アカフジツボ キブリス幼生	タテジマフジツボ キブリス幼生	イワフジツボ キブリス幼生	コホポーター類 (姫路沿岸採取)	アルテミア ノープリウス幼生	アサリ ハテハベリジヤー幼生	ムラサキガイ ハテハベリジヤー幼生
KA4-5b6P-1(3)a	1.855	0.226	0.253	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
KA4-5b(5)a	1.853	0.172	0.177	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
KF1-6a4(1)6P-3	1.828	0.125	0.169	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
10E3-1A11-2(3)b	1.696	0.405	1.476	<0.001	0.029	<0.001	0.001

## 【 0 0 4 5 】

表1に示すように、ハイブリドーマクローンKA4-5b6P-1(3)a、KA4-5b(5)a、及びKF1-6a4(1)6P-3の上清は、アカフジツボキブリス幼生の粗抽出液に対して反応性を示し、タテジマフジツボやイワフジツボ等のアカフジツボ以外のフジツボ類のキブリス幼生の粗抽出液、二枚貝類、及びフジツボ類以外の甲殻類プランクトンの粗抽出液には反応性を示さな

10

20

30

40

50

った。また、ハイブリドーマクロン10E3-1A11-2(1)bの上清は、全てのフジツボ類のキプリス幼生の粗抽出液に対して反応し、フジツボ類以外の幼生やプランクトンの粗抽出液に対してほとんど反応性を示さないことが明らかになった。

【 0 0 4 6 】

[ 実施例 3 ]

次に、実施例 1 により得られたハイブリドーマクロンの培養上清の特異性を調べるために、ハイブリドーマクロンKF1-6a4(1)6P-3及びKA4-5b6P-1(3)aの培養上清（原液、又は 4, 8, 16, 32, 若しくは 64 倍に原液を希釈したもの）を用いて、各幼生及びプランクトンの粗抽出液との反応性を実施例 1 に記載のELISA法と同様に確認した。表 2 にKF1-6a4(1)6P-3の培養上清を用いた場合のELISAの結果（OD<sub>405</sub>値）を、表 3 にKA4-5b6P-1(3)aの培養上清を用いた場合のELISAの結果（OD<sub>405</sub>値；平均値及び標準誤差）を、表 4 にKF1-6a4(1)6P-3の培養上清を用いた場合のELISAの結果（OD<sub>405</sub>値）をそれぞれ示す。

【 0 0 4 7 】

[ 表 2 ]

	KF1-6a4(1)6P-3の培養上清					
	原液	4倍希釈	8倍希釈	16倍希釈	32倍希釈	64倍希釈
アカフジツボキプリス 幼生粗抽出液	1.828	1.75	1.15	0.701	0.347	0.124
タジマフジツボキプリス 幼生粗抽出液	0.125					
イワフジツボキプリス 幼生粗抽出液	0.169					

[ 表 3 ]

10

20

30

	KA4-5b6P-1(3)aの培養上清					
	原液	2倍希釈	4倍希釈	8倍希釈	16倍希釈	32倍希釈
アカフジツボキブリス 幼生粗抽出液 平均値(S.D.)	1.982 (0.09)	1.940 (0.08)	1.812 (0.06)	1.583 (0.13)	1.310 (0.04)	0.973 (0.01)
イワフジツボキブリス 幼生粗抽出液 平均値(S.D.)	0.341 (0.03)	0.113 (0.01)	0.067 (0.01)	0.037 (0.02)	0.026 (0.02)	0.031 (0.03)

10

[ 表 4 ]

20

抗原(粗抽出液) の種類	KF1-6a4(1)6P-3の培養上清(抗体)希釈系列					
	原液	4倍希釈	8倍希釈	16倍希釈	32倍希釈	64倍希釈
アカフジツボ キブリス幼生	1.828	1.75	1.15	0.701	0.347	0.124
タテジマフジツボ キブリス幼生	0.125	0.074	0.039	0.027	0.011	0.007
イワフジツボ キブリス幼生	0.169	0.099	0.07	0.03	0.007	<0.001
コホーダ類 (姫路沿岸採取)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
アルテミア ノープリウス幼生	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
アサリ ペディベリジャー幼生	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ムラサキガイ ペディベリジャー幼生	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

30

40

## 【 0 0 4 8 】

表 2 ~ 4 に示すように、ハイブリドーマクローンKF1-6a4(1)6P-3及びKA4-5b6P-1(3)aの培養上清(モノクローナル抗体)のアカフジツボキブリス幼生に対する反応特異性は、タテジマフジツボキブリス幼生やイワフジツボキブリス幼生に対するものに比べ、少なくとも32倍以上高いことが明らかになった。

## 【 0 0 4 9 】

50

## [ 実施例 4 ]

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アカフジツボキプリス幼生自体に特異的に反応するかどうかを調べるために、ハイブリドーマクローンKA4-5b6P-1(3)aのモノクローナル抗体を用いて、アカフジツボキプリス幼生、アカフジツボノープリウス幼生(5期)、タテジマフジツボキプリス幼生、ムラサキイガイペディベリジャー幼生、野外プランクトン(主にコペポータ)等の幼生又はプランクトンに対する免疫染色を以下のように行い、倒立顕微鏡で各幼生を観察した。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。

## 【 0 0 5 0 】

( 1 ) アカフジツボキプリス幼生、タテジマフジツボキプリス幼生、アカフジツボノープリウス幼生(5期)、ムラサキイガイペディベリジャー幼生、野外プランクトン(主にコペポータ)等をそれぞれ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  $\mu$ lで洗浄した後、PBST(0.05% Tween20を含むPBS) 200  $\mu$ lにてさらに洗浄した。

( 3 ) 各ウェルに1% BSAを含むPBST200  $\mu$ lを注入し、4 で8時間ブロックした。

( 4 ) 各ウェルにKA4-5b6P-1(3)a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  $\mu$ lを加え、4 で一晩反応させた。

( 5 ) 各ウェルをPBST 200  $\mu$ 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  $\mu$ lを加えて4 で8時間反応させた。

( 7 ) 各ウェルをPBST 200  $\mu$ 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  $\mu$ lを加えて発色させた。

## 【 0 0 5 1 】

その結果、ハイブリドーマクローンKA4-5b6P-1(3)aのモノクローナル抗体は、アカフジツボキプリス幼生の胸肢基部組織に特異的に反応し、タテジマフジツボキプリス幼生には反応しないことが明らかになった。

## 【 0 0 5 2 】

また、ムラサキイガイペディベリジャー幼生、野外プランクトン(主にコペポータ)には反応しないが、アカフジツボノープリウス幼生(5期)の前側角基部周辺に弱い反応性を示すことが明らかになった。このことから、ハイブリドーマクローンKA4-5b6P-1(3)aが産生するモノクローナル抗体は、アカフジツボキプリス幼生以外にアカフジツボノープリウス幼生にもやや反応性を示すのではないかと考えられた。

## 【 0 0 5 3 】

## [ 実施例 5 ]

次に、ハイブリドーマクローンから産生されたモノクローナル抗体が、アカフジツボキプリス幼生のどの抗原に特異的に反応するのか、また、その抗原はアカフジツボ成体においても発現しているのかどうかを確認するため、アカフジツボキプリス幼生及びアカフジツボ成体の各粗抽出液をSDS-PAGEにより分離してCBBにより染色し、また、ハイブリドーマクローンKF1-6a4(1)6P-3から産生されたモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。また、アカフジツボキプリス幼生及びアカフジツボ成体以外の幼生又は成体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、タテジマフジツボキプリス幼生及びタテジマフジツボ成体の粗抽出液についてもCBB染色及びウェスタンブロッティングを行った。その結果を図1に示す。なお、図1中の左側はCBB染色後の結果を示し、右側はウェスタンブロット法による結果を示す。また、図1中の「M」は分子量マーカー(図1中の左の矢印は、上から116.2kDa、66.3kDa、42.4kDa、及び30kDaをそれぞれ示す。)を、「A」はタテジマフジツボ成体粗抽出液(タンパク質量:5  $\mu$ g)を、「B」はアカフジツボ成体粗抽出液(タンパク質量:5  $\mu$ g)を、「C」はタテジマフジツボキプリス幼生粗抽出液(タンパク質量:5  $\mu$ g)を、「D」はアカフジツボキプリス幼生粗抽出液(タンパク質量:5  $\mu$ g)をそれぞれ示す。

## 【 0 0 5 4 】

図 1 に示すように、ハイブリドーマクローンKF1-6a4(1)6P-3から産生されたモノクローナル抗体は、アカフジツボ成体、タテジマフジツボ成体、及びタテジマフジツボキプリス幼生のどの抗原にも反応せず、アカフジツボキプリス幼生のおよそ30kDaの抗原（図 1 中の右側の矢印）に反応することが明らかになった。このことから、本発明に係るハイブリドーマ細胞株から産生されたモノクローナル抗体は、アカフジツボキプリス幼生のおよそ30kDaの抗原に反応するのではないかと考えられた。

## 【 0 0 5 5 】

以上の結果から、KA4-5b6P-1(3)a、KA4-5b(5)a、及びKF1-6a4(1)6P-3は、アカフジツボキプリス幼生に対する反応特異性が高いと考えられることから、これら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、アカフジツボキプリス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。

10

## 【 0 0 5 6 】

そこで、これら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（KA4-5b6P-1(3)a：受託番号FERM P-20281、KA4-5b(5)a：受託番号FERM P-20278、KF1-6a4(1)6P-3：受託番号FERM P-20279）。

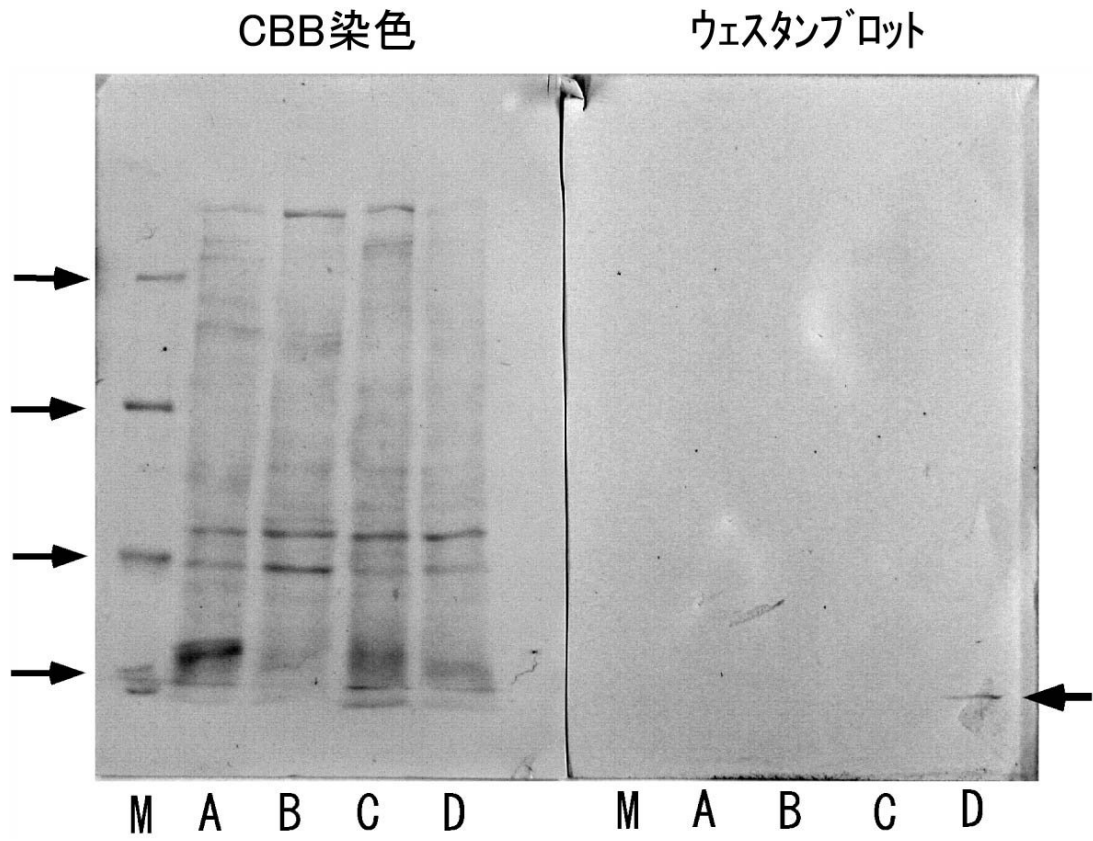
## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 5 7 】

【 図 1 】本発明の一実施例において、各成体又は幼生の粗抽出液を分離してCBBにより染色した結果と、ハイブリドーマクローンKF1-6a4(1)6P-3から産生されたモノクローナル抗体が反応する抗原をウェスタンブロット法により調べた結果とを示す図である。

20

【図1】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 新原 さなえ  
兵庫県姫路市飾磨区英賀乙84-19
- (72)発明者 神谷 享子  
兵庫県姫路市飾磨区東堀32番地の32
- (72)発明者 岡田 佳子  
兵庫県姫路市千代田町586番地
- (72)発明者 山下 桂司  
兵庫県姫路市飾磨区都倉2丁目75番地

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 特開2003-212899(JP,A)  
第6回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, 2002, p.73 F-6  
Proc. R. Soc. Lond. B, 1998, Vol.265, p.1825-1830  
Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2000, Vol. 125, p.511-516  
Mar. Ecol. Prog. Ser., 2002, Vol.225, p.299-310  
Aquaculture, 2003, Vol.219, p.545-559

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07K 16/00-16/46  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
CAplus(STN)  
PubMed  
JSTPlus(JDream2)

专利名称(译)	对金合欢附着期幼虫特异的单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP4084808B2</a>	公开(公告)日	2008-04-30
申请号	JP2005070007	申请日	2005-03-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国电力株式会社 姬路的Ecotec		
申请(专利权)人(译)	中国电力株式会社 姬路的Ecotec有限公司		
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 新原さなえ 神谷享子 岡田佳子 山下桂司		
发明人	川端 豊喜 柳川 敏治 新原 さなえ 神谷 享子 岡田 佳子 山下 桂司		
IPC分类号	C12N5/10 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08		
FI分类号	C12N5/00.B C07K16/18 G01N33/53.S G01N33/577.B C12P21/08 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CD30 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
其他公开文献	JP2006246820A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于检测的试剂，检测器，检测试剂盒和检测方法，每种都能够特异且容易地检测Megabalanus rosa的粘附期中的幼虫并提供用于其的单克隆抗体或其片段和杂交瘤产生单克隆抗体。  
 ŽSOLUTION：通过注射幼虫骨髓细胞幼虫，将免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合而得到的杂交瘤中鉴定出产生单克隆抗体的特异性与Megabalanus rosa粘附期特异性反应的杂交瘤。Megabalanus rosa粘附于腹腔的时期。Ž

幼虫粘附性	0.001	0.001	0.001	0.001
7月	0.001	0.001	0.001	0.001
7月	0.001	0.001	0.001	0.001
幼虫粘附性	0.001	0.001	0.001	0.001
幼虫粘附性	0.253	0.177	0.193	1.976
幼虫粘附性	0.28	0.172	0.15	0.45
幼虫粘附性	1.65	1.63	1.83	1.66
幼虫粘附性	0.44-5.8P-10a	0.44-5.8P-10a	0.44-5.8P-10a	0.44-5.8P-10a