明細書

微生物検出用抗体

[技術分野]

本発明は、種々の微生物、特に細菌の検出に有用な抗体、それを用いた微生物検出方法、微生物検出用試薬キット及び微生物検出用特異的抗体の作製法に関する。

本発明は、医薬品工業、特に細菌を中心とする微生物感染症のための診断薬の製造に有効に利用される。

[背景技術]

微生物感染症の診断は通常感染部位などでの原因菌の検出か、血清、体液中の原因菌に対する抗体の検出により確定される。特に、この診断は原因菌の検出が患者への迅速な治療を可能にする意味で重要である。

感染症原因菌の検出には原因菌の分離培養を経て、その生化学的性状をもとに菌の同定を行う培養同定法、原因菌特異的遺伝子をもとに PCR 法などにより増幅し検出する遺伝子診断法、原因菌の表面抗原マーカーとの抗体の特異反応を利用して原因菌検出を行う免疫的手法に大別できるが、培養同定法、遺伝子診断法は検出結果を得るまでに時間がかかり、短時間にしかも高感度に原因菌を検出し、迅速かつ適切な患者への治療につながる点で免疫法による診断が汎用されている。

従来免疫法による感染症原因菌の検出には、菌種によって様々なマーカー抗原と抗体の組み合わせが使われている。

例えばクラミジア（Chlamydia）属の場合、属特異的抗原であるリポ多糖（LPS）の抗原決定基としての存在が知られており(Stephens,R.ら：J.Immunol., 128: 1083-89, 1982、Caldwell.M.D.:Inf.Immun.,44:306-14,1984)、様々な診断用キットにおいて特にクラミジア トラコマチス（Chlamydia trachomatis）の検出用試薬抗体に利用されている。

また、Chlamydia 属の外膜主要蛋白質(MOMP;Major Outer Membrane

Protein)に対するモノクローナル抗体について Ellena M. Peterson ら: Infection and Immunity, 59(11), 4147-4153, 1991 及び Byron E. Batteiger ら: Infection and Immunity, 53(3), 530-533, 1986 がそれぞれ報告している。

特開昭 63-298 号公報は、約 43 キロダルトンのマイコプラズマ ニューモニア (Mycoplasma pneumoniae) の膜抗原蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法をベースとする免疫検出法が記載されている。

また、特開昭 62-148859 号公報 (特公平 6-64065 号公報) には、ヘモフイルス インフルエンザ (Haemophilus influenzae) の外膜蛋白質に対するポリクローナル抗体の作製法と作製した抗体を用いた診断方法について記載されている。

英国特許出願 2172704 号明細書には、ナイセリア ゴノロエ (Neisseria gonorrhoeae) 株 BS4 (NCTC 11922)の外膜小胞のコール酸ナトリウム抽出液から単離された約 20 キロダルトンの蛋白質について記載されており、この物質を用いてハイブリドーマを調製することが開示されており、また EP 419238A1 号には Neisseria gonorrhoeae 培養菌体を免疫源として作製され、約 14 キロダルトンの蛋白質に結合可能なモノクローナル抗体とその作製方法について記載されている。また、同じ Neisseria gonorrhoeae についてカナダ特許出願 1220147 号明細書には LPS に対するモノクローナル抗体を用いる検出法について記載されている。

しかし、これらの抗体および検出法では、微生物に対する種特異性が十分ではなく、また同一種に存在する複数の表面抗原による血清型の全てをカバーし検出することが困難であるなどの問題点がある。

またこれらの従来の技術に用いられているマーカー抗原は各種微生物細胞において普遍的に存在する同一機能分子 (例えば、同一機能の蛋白質、LPS あるいは表面多糖成分) が微生物の進化の過程で菌種ごとに変化してきた分子をマーカーとして検出するというような統一的なものでなく、1つの分子を基準として菌種間で抗原性の差を検出しようという発想に基づ

いた免疫診断法はいまだに知られていない。

[発明の開示]

本発明は、理想的な微生物の検出・免疫診断法を可能とする統一マーカー抗原としてそれぞれの微生物について同一の分子に対する抗体、特に検出したい全ての微生物について細胞内の同一機能成分分子を用いて微生物の進化の過程で変化が生じてきた部分に対する抗体、該抗体を用いた特異的でかつほぼ全ての血清型をカバーできる微生物検出方法、微生物検出用試薬キット及び微生物検出用特異抗体の作製方法を提供しようとするものである。

本発明者らは、全ての微生物において同一の機能が保存されている蛋白質を有用な抗原蛋白質として見出した。通常、このような蛋白質の構造変化は極めて少ないと予想される。しかし驚くべきことに、該蛋白質の抗原エピトープは微生物の種あるいは属特異的であり、該蛋白質に対する抗体は、微生物の種あるいは属特異的な識別に用いることが可能な多様性を持つと共に、対象となる微生物についてはその全ての血清型を検出しうるものであることが見出されたのである。

本発明者らは全ての微生物細胞に存在し、しかもそのアミノ酸構造が微生物間である程度の相違点をもつ細胞内分子、特にリボソーム蛋白質の一種であるリボソーム蛋白質L7/L12(Ribosomal Protein L7/L12)に着目した。Ribosomal Protein L7/L12は蛋白質合成に必須なリボソーム蛋白質としてその存在が知られている分子量約13キロダルトンの蛋白質であり、特に大腸菌、枯草菌などいくつかの微生物でその全アミノ酸配列の解析が進んでおり、微生物間で50%～65%程度のアミノ酸配列の相同性が確認されている。

本発明者らはこの分子が微生物間で類似しているにもかかわらずその一部に各微生物固有のアミノ酸配列等の構造部分を持つことに着目し、該蛋白質に対する抗体を利用することで様々な微生物に特異的でかつ同一菌種内の全ての血清型について検出が可能であることを見いだした。具体的に

は例えば Haemophilus influenzae、ストレプトコッカス ニューモニア（Streptococcus pneumoniae）及び Neisseria gonorrhoeae についてその特異抗体を用いた微生物種の免疫法診断技術の開発を試みた結果、個々の微生物において当該蛋白質特異的な抗体が取得でき、当該抗体を用いることによりそれぞれの菌について特異的な検出が可能であるということを見いだしたことにより本発明を完成した。

従って本発明は、次のとおりの微生物検出用抗体、それを用いる微生物検出方法及び微生物検出用試薬キット及び微生物検出用特異的抗体の作製法に関する。

1)微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であって、当該微生物に特異的に反応する抗体、

2)微生物のリボソーム蛋白質が Ribosomal Protein L7/L12 である、1)に記載の抗体、

3)微生物が性行為感染症 (STD, Sexually transmitted disease) 原因微生物である 1)または 2)に記載の抗体、

4)微生物が呼吸器系感染症の原因微生物である 1)または 2)に記載の抗体、

5)呼吸器系感染症の原因微生物のが Haemophilus influenzae である 4) に記載の抗体、

6)呼吸器系感染症の原因微生物が Streptococcus pneumoniae である 4)に記載の抗体、

7)性行為感染症(STD, Sexually transmitted disease)微生物が Neisseria gonorrhoeae である 3)に記載の抗体、

8) Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体であって、配列表配列番号：22 のアミノ酸配列において 115 番目のアラニンを含む 5 から 30 アミノ酸の長さの連続する部分アミノ酸配列を認識する抗体である 7)に記載の抗体、

9)各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いる微生物検出方法、

10)各種の微生物について 1)から 8)のいずれかに記載の抗体を用いる微生

物検出方法、

11)各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いる微生物検出用試薬キット、

12)各種の微生物について 1)から 8)のいずれかに記載の抗体を用いる微生物検出用試薬キット、

13)遺伝子操作手法によりあるいは微生物からの単離精製により得られた微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質、その部分ペプチド、またはその部分ペプチドに相当する合成ペプチドを免疫源とする 1)から 8)のいずれかに記載の抗体の作製方法。

以下本発明について詳細に説明する。

配列表において配列番号 1 及び 2 は Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 3 及び 4 はヘリコバクター ピロリ (Helicobacter pylori) の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 5 及び 6 は Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 7 及び 8 は Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 9 及び 10 はナイセリア メニンギチヂス (Neisseria meningitidis) の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 11 及び 12 は Haemophilus influenzae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得に用いた PCR のプライマー DNA である。配列番号 13 及び 14 は Streptococcus pneumonoiae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得に用いた PCR のプライマー DNA である。配列番号 15 及び 16 は Neisseria gonorrhoeae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得に用いた PCR のプライマー DNA である。配列番号 17 及び 18 は Haemophilus influenzae から取得した Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 19 及び 20 は Streptococcus pneumoniae から取得した Ribosomal Protein L7/L12 遺伝

子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 21 及び 22 は Neisseria gonorrhoeae から取得した Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。

なお、配列表に記載されたアミノ酸配列の左端および右端はそれぞれアミノ基（以下、N末）およびカルボキシル基末端（以下、C末）であり、また塩基配列の左端および右端はそれぞれ5'末端および3'末端である。

また、本発明で述べられる遺伝子操作の一連の分子生物学的な実験は通常の実験書の記載方法によって行うことができる。前記の通常の実験書としては、例えばMolecular Cloning, A labolatory manual, Cold Spring Harber Laboratory Press, Sambrook, J. ら(1989)を挙げることができる。

本発明において微生物は、細菌、酵母、カビ、放線菌、リケッチア類などの微生物類全般をさすが、特に微生物感染症の診断において問題となるのは細菌の場合が多い。

本発明において、「微生物に特異的に反応する抗体」とは、微生物の種あるいは属に特異的に反応する抗体をさすが、微生物感染症の診断においては微生物の種に特異的に反応する抗体が特に有用となる。

本発明において、STD の原因微生物とは、淋菌 (Neisseria gonorrhoeae)、クラミジア (Chlamydia trachomatis)、カンジダ菌 (Candida albicans)、梅毒菌 (Treponema pallidum)、ウレアプラズマ菌 (Ureaplasma urealyticum) などをさすがこれらの微生物に限定されるものではない。

本発明において、呼吸器系感染症の原因微生物とは、インフルエンザ菌 (Haemophilus influenzae)、肺炎球菌 (Streptococcus pneumoniae)、肺炎クラミジア (Chlamydia pneumoniae)、肺炎マイコプラズマ (Mycoplasma pneumoniae)、肺炎かん菌 (Klebsiella pneumoniae)、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)、緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa)、A群溶連菌 (Streptococcus sp. GroupA) 結核菌 (Mycobacterium tuberculosis)、レジオネラ菌 (Legionella pneumophila)、アスペルジルス属真菌 (Aspergillus spp.) などをさすがこれらの微生物に限定されるものではな

い。

本発明において抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体をさし、該リボソーム蛋白質の全長あるいはその部分ペプチドを用いて作成することができる。抗体を作成するためのペプチドの長さは特に限定されないがRibosomal Protein L7/L12蛋白質に対する抗体の場合、この蛋白質を特徴づけられる長さがあれば良く、好ましくは5アミノ酸以上、特に好ましくは8アミノ酸以上のペプチドを用いれば良い。このペプチドあるいは全長蛋白質をそのまま、またはKLH (keyhole-limpet hemocyanin)やBSA (bovine serum albumin)といったキャリア蛋白質と架橋した後必要に応じてアジュバントとともに動物へ接種せしめ、その血清を回収することでRibosomal Protein L7/L12蛋白質を認識する抗体（ポリクローナル抗体）を含む抗血清を得ることができる。また抗血清より抗体を精製して使用することもできる。接種する動物としてはヒツジ、ウマ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット等であり、特にポリクローナル抗体作製にはヒツジ、ウサギなどが好ましい。また、ハイブリドーマ細胞を作製する公知の方法によりモノクローナル抗体を得ることも可能であるが、この場合はマウスが好ましい。また該蛋白質の全長またはアミノ酸5残基以上、望ましくは8残基以上の部分ペプチドをGST（グルタチオン－S－トランスフェラーゼ）などと融合させたものを精製して、または未精製のまま、抗原として用いることもできる。成書(Antibodies a laboratory manual, E.Harlow et al., Cold Spring Harbor Labolatory)に示された各種の方法ならびに遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて、細胞に発現させた遺伝子組み換え抗体によっても作製することができる。

本発明のマーカー抗原として用いることができるRibosomal Protein L7/L12蛋白質に対する抗体は、以下の3つの方法あるいはその他の類似の方法によって取得することができるが、これらの方法に限定されるものではない。

a) Ribosomal Protein L7/L12の遺伝子配列およびアミノ酸配列が既知の微生物については、他の微生物における該蛋白質のアミノ酸配列との類似

性が少ない領域についてアミノ酸数5個から30個ほどのペプチド断片を合成し、それを免疫原としてポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体を作製することにより目的の抗体を取得することができる。

また、既知の該遺伝子の両端部位におけるDNA配列をプローブとしたPCR手法による遺伝子増幅、相同部分配列を鋳型プローブとしたハイブリダイゼーション法など通常の遺伝子操作手法を用いることにより該遺伝子の全長配列を取得することができる。

その後他の蛋白質遺伝子とのフュージョン遺伝子などを構築し、大腸菌等を宿主として公知の遺伝子導入手法により宿主内に該当フュージョン遺伝子を挿入し大量に発現させた後にフュージョン蛋白質として用いた蛋白質に対する抗体アフィニティーカラム法などにより発現蛋白質を精製することにより目的とする蛋白質抗原を取得することができる。この場合Ribosomal Protein L7/L12の全長蛋白質が抗原となるため微生物間で保存されているアミノ酸部分に対する抗体を取得しても本発明の目的に合致しない。従って、本法によって取得した抗原に対しては公知の手法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得し、該当する微生物とのみ反応する抗体を産生するクローンを選択することにより目的の抗体を取得することができる。

b) Ribosomal Protein L7/L12のアミノ酸配列が未知の微生物については1つにはRibosomal Protein L7/L12のアミノ酸配列が菌種間で50～60%相同であることより、そのアミノ酸配列の相同部分の配列を基にしてPCR法による特定配列部分の遺伝子増幅や相同部分配列を鋳型プローブとしたハイブリダイゼーション法など通常の遺伝子操作手法を用いることにより該蛋白質遺伝子を容易に取得することができる。

その後他の蛋白質遺伝子とのフュージョン遺伝子などを構築し、大腸菌等を宿主として公知の遺伝子導入手法により宿主内に該フュージョン遺伝子を挿入し大量に発現させた後にフュージョン蛋白質として用いた蛋白質に対する抗体アフィニティーカラム法などにより発現蛋白質を精製することにより目的とする蛋白質抗原を取得することができる。この場

合 Ribosomal Protein L7/L12 の全長蛋白質が抗原となるため微生物間で保存されているアミノ酸部分に対する抗体を取得しても本発明の目的に合致しない。従って、本法によって取得した抗原に対しては公知の手法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得し、該当する微生物とのみ反応する抗体を産生するクローンを選択することにより目的の抗体を取得することができる。

c) あるいは Ribosomal Protein L7/L12 のアミノ酸配列が未知な場合の別な方法として、既知の Ribosomal Protein L7/L12 のアミノ酸配列のうち微生物間で保存されている共通配列部分に相当する 5～30 アミノ酸の合成ペプチドを作製し、そのペプチド配列に対し公知の方法でポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を作製し、該抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトによって目的の微生物細胞破砕液を精製することにより高度に精製された Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を取得することができる。

蛋白質の精製度が不足している場合は公知の精製手法であるイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過などの手法により精製した後作製した抗体によるウェスタンブロットなどの方法により Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の溶出画分を同定し精製蛋白質を得ることができる。得られた精製 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原を基にして公知の方法によりハイブリドーマあるいはポリクローナル抗体を取得し b)と同様に目的の微生物に特異的に反応するハイブリドーマあるいはポリクローナル抗体を選択することにより目的の抗体を取得することができる。

前記 a)～c)などの方法によって取得した本発明における各種微生物特異的な抗体は例えばポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術である ELISA 法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに捕捉(capture)抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなど既知の全ての免疫測定手法に利用することにより種々の目的の微生物に特異的な検出用試薬

キットを提供することができる。

抗体を用いる微生物検出方法とは、例えばポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術であるELISA法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともにcapture抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなどの既知の免疫測定手法を利用する検出方法に相当する。

また、特に抗体を用いる有用な微生物検出方法として特表平7-509565号公報に記載されているシリコン、窒化珪素などにより形成された光学薄膜上で抗体反応をおこない光干渉原理等により検出するいわゆるオプティカルイムノアッセイ（OIA, Optical Immunoassay）などが高感度な検出方法として有用である。

また該検出方法において必要となる微生物からの細胞内マーカー抗原の抽出方法としては、トリトンX-100(Triton X-100)、ツイーン-20(Tween-20)をはじめとする種々の界面活性剤を用いた抽出試薬による処理法、適当なプロテアーゼなどの酵素を用いる酵素処理法、物理的方法による微生物細胞の破砕をはじめ既知の細胞構造の破砕手法が用いられうるが、界面活性剤等の組み合わせにより微生物ごとに試薬による最適な抽出条件を設定することが望ましい。

また、本発明における、抗体を用いる微生物検出用試薬キットとは、当該検出方法を用いた検出用試薬キットに相当する。

例えば、肺炎、気管支炎、髄膜炎などの原因菌として診断意義の高いHaemophilus influenzaeの特異的抗体を取得する場合、本菌のRibosomal Protein L7/L12蛋白質のアミノ酸配列及びDNA配列はデータベース等の記載により公知である。Haemophilus influenzaeのRibosomal Protein L7/L12のアミノ酸配列及びDNA配列を配列表配列番号：1及び2に示す。

従って本菌の場合同様にRibosomal Protein L7/L12蛋白質のアミノ酸配列が公知である、例えば配列表配列番号：3及び4に示すHelicobacter pyloriの同蛋白質などとのアミノ酸配列を比較しその相同性の低い部分に

ついて5～30アミノ酸の合成ペプチドを合成しそのペプチドに対する Haemophilus influenzae 特異的なポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を作製することができる。

特にポリクローナル抗体の場合、免疫した動物の抗血清を Protein A カラム等で精製し IgG 画分を取得した後、さらに動物の免疫に用いた合成ペプチドによるアフィニティー精製を実施することが望ましい。

さらに Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の DNA 配列から N 末端、C 末端の配列を元にした PCR プライマー、例えば配列表配列番号：11 及び 12 に示す PCR プライマーを設計し、その相同性を利用して、公知の方法に従い、Haemophilus influenzae の培養菌体より抽出したゲノム DNA を材料として PCR 法などにより増幅してくる DNA 断片を取得し、その断片の DNA シークエンス情報を解析することにより Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の全長遺伝子を取得することができる。

取得した Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子は、例えば GST などとフュージョン蛋白質遺伝子を構成し、適当な発現用プラスミドを用いて発現ベクターを構築後、大腸菌等を形質転換して該蛋白質を大量発現させうる。形質転換した大腸菌を適当量培養し、回収した菌体破砕液を GST を用いたアフィニティカラムで精製することにより、Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と GST とのフュージョン蛋白質が得られる。この蛋白質をそのまま、あるいは GST 部分をプロテアーゼなどにより切断後、抗原蛋白質として公知の手法により、複数のハイブリドーマを確立し、Haemophilus influenzae 菌体あるいは菌体破砕液または Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に特異的な反応を示す抗体を選択することにより目的の特異的モノクローナル抗体を取得することも可能である。

また Haemophilus influenzae と同様に呼吸器感染症原因菌として診断意義の高い Streputococcus pneumoniae についても Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質のアミノ酸配列及び DNA 配列はデータベース等の記載により

公知である。Streputococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 のアミノ酸配列及び DNA 配列を配列表配列番号：5 及び 6 に示す。

従って本菌の場合も Haemophilus influenzae の場合と同様に Streputococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の DNA 配列から N 末端、C 末端の配列を元にした PCR プライマー、例えば配列表配列番号：13 及び 14 に示す PCR プライマーを設計し、以後全く同様の手法を用いて Streputococcus pneumoniae 特異的なポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を取得することが可能である。

Streputococcus pneumoniae 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 AMSP-2 を日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成 11 年 7 月 28 日に受託番号：FERM BP-6807 として国際寄託した。

また例えば淋病の原因菌であり STD の代表的な原因菌としてその診断意義が認知されている Neisseria gonorrhoeae の場合、その DNA、アミノ酸配列の大部分は最近米国オクラホマ大学で Neisseria gonorrhoeae ゲノムプロジェクトにおいて決定され、該菌の DNA 配列がインターネット上で公開されている。

公知の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の DNA 配列の一部配列を用いて類似配列 DNA 断片の有無を検索したところ Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子に該当する DNA 配列が存在し、その全 DNA 配列情報を取得できた。この Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列表配列番号：7 及び 8 に示す。

従って Haemophilus influenzae と Streputococcus pneumoniae の場合と同様に Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の DNA 配列から N 末端、C 末端の配列を元にした PCR プライマー、例えば配列表配列番号：15 及び 16 に示す PCR プライマーを設計し、以後全く同様の手法により Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質全部あるいは一部を抗原とする Neisseria gonorrhoeae 特異的な目的の抗体を得ることが可能である。

特に、Neisseria gonorrhoeae については同じ Neisseria 属に属する

Neisseria meningitidis の Ribosomal Protein L7/L12 の蛋白質遺伝子に該当する遺伝子配列がインターネット上で公開されており容易に入手可能である。この Neisseria meningitidis の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の全塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列表配列番号：9 及び 10 に示す。ここで Neisseria gonorrhoeae と Neisseria meningitidis の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の全塩基配列を比較するとアミノ酸配列の異なる部分はN末端から 115 番目のアミノ酸が Neisseria gonorrhoeae はアラニンであるのに対して Neisseria meningitidis の場合はグルタミン酸であるただ 1 個のアミノ酸の違いだけである。従って、Neisseria gonorrhoeae を種特異的に検出することができる Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗体は該当する Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の N 末端から 115 番目のアラニン及びそれを含むアミノ酸領域をエピトープとして認識する抗体であると断定できる。

本発明に基づき作製された抗体は、公知の測定手法であるポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術である ELISA 法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに capture 抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなど既知の全ての免疫測定手法に利用できる。

また本発明に基づき作製された抗体は全ての免疫測定手法において当該抗原蛋白質を固相あるいは液相中で捕獲する capture 抗体として機能しうると同時にパーオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素を公知の方法により修飾することによりいわゆる酵素標識抗体としても機能しうる。

[発明を実施するための最良の形態]

以下の例は本発明を具体的に説明するためのものであって本発明について何らその範囲を限定するものではない。

[実施例 1]

Haemophilus influenzae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子のクローニング

Haemophilus influenzae ATCC9334(IID984) 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）をチョコレート寒天培地上に適当量植菌した後、CO_2 インキュベーター中で 37℃、CO_2 0.5 %条件で 24 時間培養する。生育したコロニーを最終的に 5×10^9 CFU/ml 前後になるように TE Buffer(和光純薬工業社製)に懸濁する。このうち約 1.5ml を微量遠心チューブに移し取り 10000rpm で 2 分間遠心し、上澄みを棄てる。沈殿部分を 567 μl の TE Buffer に再懸濁する。さらに 30μl の 10%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)と 3μl の 20mg/ml Proteinase K 溶液を加えて良く混合し、37℃で 1 時間インキュベートする。次に 10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl 溶液を 80μl 追添し、よく混合した後 65℃で 10 分間インキュベートする。次に、体積比 24/1 のクロロホルム- イソアミルアルコール混合液を 700μl 加えよく撹拌する。この溶液を微量遠心機で 12000rpm、5 分間（4℃コントロール下）遠心処理した後、水層画分を新しい微量遠心管に移す。そこに 0.6 倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振って DNA の沈殿を形成する。白い DNA 沈殿をガラス棒ですくって 1ml の 70%エタノール（-20 ℃冷却したもの）が入った別の微量遠心管に移す。

次に 10000rpm で 5 分間遠心処理し、上澄みを静かに除去した後さらに 1ml の 70%エタノールを加えて再び 5 分間遠心する。再び上澄みを除去した後沈殿を 100μl の TE Buffer に溶解し DNA 溶液を得た。このゲノム DNA 溶液の濃度を Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press の E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA に従って定量した。

このゲノム DNA のうち 10ng を用いて PCR(polymerase chain reaction)を行った。PCR は Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製、コード R001A）を用い

た。 酵素に添付のバッファーを5μl、酵素に添付の dNTP mixture 4μl と配列表配列表番号：11に示した合成オリゴヌクレオチドA及び配列表配列表番号：12に示したオリゴヌクレオチドBをそれぞれ200pmol加え、最終容量50μlとした。

この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用いて、95℃ 1分、50℃ 2分、72℃ 3分を5サイクル行った後、95℃ 1分、60℃ 2分、72℃ 3分を25サイクル行った。このPCR産物の一部を1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約400bpのcDNAが増幅されていることを確認した。さらに制限酵素 BamHI および XhoI で切断処理後、1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色後約370bp のバンドをゲルから切り出して Suprec01（宝酒造社製）で精製後、市販のベクターである pGEX-4T-1 （Pharmacia 社製）に組み込んだ。同ベクターは目的の遺伝子断片を適当な制限酵素サイトに組み込むことによりGST蛋白質とのフュージョン蛋白質を発現しうる目的分子の発現ベクターとして機能することができる。

具体的には、ベクター pGEX-4T-1と先のDNAとをそのモル比が1:3となるように混ぜ合わせて、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen社製）にてベクターにDNAを組み込んだ。DNAが組み込まれたベクター pGEX-4T-1を大腸菌 One Shot Competent Cells（Invitrogen社製）に遺伝子導入し、アンピシリン（Sigma 社製）を50μg/ml含むL-Broth（宝酒造社製）半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth 液体培地 2mlに植え付け、8時間程度37℃で振盪培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ（Promega社製）を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約370bp のDNAが切り出されてくることで該PCR産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれているDNAの塩基配列決定を行った。

挿入DNA断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の蛍光シー

クエンサーを用いて実施した。シークエンスサンプルの調製は PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems 社製)を用いて行った。0.5ml 容のマイクロチューブに 9.5μl の反応ストック液、 4.0μl の 0.8pmol/μl の T7 プロモータープライマー(GIBCO BRL 社製)および 6.5μl の 0.16μg/μl のシークエンス用鋳型 DNA を加えて混合し、100μl のミネラルオイルを重層後、96℃30 秒、55℃ 15 秒および 60℃ 4 分を 1 サイクルとする PCR 増幅反応を 25 サイクル行い、4℃で 5 分間保温した。反応後、80μl の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を 3 回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。 100μl の水層に 10ml の 3M 酢酸ナトリウム(pH5.2) および 300μl のエタノールを加えて攪拌後、室温、14,000rpm にて 15 分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を 75%エタノールで 洗浄後、真空下に 2 分間静置して乾燥させ、シークエンス用サンプルとした。シークエンスサンプルは、4μl の 10mM の EDTA を含むホルムアミドに溶解して 90℃、2 分間で変性後、氷中で冷却してシークエンスに供した。

得られた 5 個のクローンの内 1 個の配列に PCR に用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の微生物、例えば Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子配列と非常に類似した DNA 配列が見いだされた。その構造遺伝子部分の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号：17 及び 18 のような配列であった。この遺伝子断片は、明らかに Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の遺伝子をコードするものである。

[実施例 2]

Haemophilus influenzae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の大腸菌での大量発現と精製

発現ベクターを組み込んだ大腸菌を LB 培地中で 50ml 37℃1 晩培養した。2 倍濃度の TY 培地 500ml を 37℃で 1 時間温めておいた。1 晩培養した大腸菌液 50ml を 500ml の前述の培地に入れた。1 時間後、100mM イソプロピル

β-D(-)-チオガラクトピラノシド(IPTG) 550μl 入れ4時間培養後回収し、250ml ずつ遠心チューブにいれて 7000rpm、10分間遠心した。上澄みを棄てて 50mM トリス塩酸(Tris-HCl) pH7.4、25% スクロース(Sucrose)を含む Lysis バッファー 25ml ずつに溶解した。

さらに、10%ノニデット P-40(NP-40) 1.25ml、1M $MgCl_2$ 125μl を加えてプラステイックチューブに移した。1分間×5回氷冷中で sonication を実施し、12000rpm、15分間遠心後上澄みを回収した。

次に、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)でコンディショニングしたグルタチオンアガロースカラムに前記の上澄み液を吸着させた。

次に、20mM Tris バッファー pH7.4、4.2mM $MgCl_2$、1mM ジチオスレイトール(DTT)を含む洗浄液でカラムを2ベッドボリューム分洗浄した。その後 5mM のグルタチオンを含む 50mM Tris バッファー pH9.6 で溶出し、分画したフラクション中の蛋白質含有量を色素結合法（ブラッドフォード法；Biorad社）で検出し、メインフラクションを取得した。得られた精製 GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の純度は電気泳動法により確認したところ約 75%であり免疫源として充分な純度を確保できた。

[実施例 3]

Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 の蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製

まずマウスの免疫については Haemophilus influenzae の GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原 100μg を 200μl の PBS に溶解後フロイントのコンプリートアジュバントを 200μl 加え混合、エマルジョン化した後 200μl を腹腔内に注射した。

さらに、2週間後、4週間後、6週間後に同様のエマルジョン抗原を腹腔内に注射し、さらに 10 週間後、14 週間後に2倍濃度の抗原エマルジョン液を腹腔内注射し最終免疫から3日後に脾臓を取り出し、細胞融合に供した。

無菌的に取り出したマウスの脾細胞 10^8個に対し骨髄腫細胞 2×10^7個を

ガラスチューブに取り良く混合した後 1500rpm で 5 分間遠心し上澄みを棄て、その後細胞をよく混合した。

細胞融合に使用した骨髄腫細胞は、NS-1 系の細胞株を用い 10%ウシ胎児血清(FCS)を含む RPMI1640 培地で培養し、細胞融合の 2 週間前から 0.13mM のアザグアニン、0.5 μg/ml の MC-210、10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養後、さらに 10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養したものを用いた。混合した細胞サンプルに 37℃に保温した 50ml の RPMI1640 培地を 30ml 加え 1500rpm で遠心、上澄み除去後 37℃に保温した 50%ポリエチレングリコールを 1ml 加え激しく攪拌しながら 2 分間処理後、37℃に保温した 10ml の RPMI1640 培地を加え液を滅菌ピペットで吸引、排出しながら約 5 分間激しく攪拌混合した。

1000rpm で 5 分間遠心、上澄み除去後さらに 30ml の HAT 培地を加え細胞濃度が 5×10^6 個/ml になるように調整し攪拌均一化後、96 穴プレート型培養プレートに 0.1ml ずつ分注し 7%CO_2 条件下、37℃で培養し、1 日目、1 週間目、2 週間目に HAT 培地を 0.1ml ずつ加えた。

次に目的の抗体を生産している細胞をスクリーニングするために ELISA 法による評価を実施した。0.05%のアジ化ソーダ含む PBS 中に溶解した Haemophilus influenzae の GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質及び GST 蛋白質をそれぞれ 10μg/ml 濃度で希釈した液を 100μl ずつ 96 穴プレートの別々に分注し 4℃で 1 晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS 中)200μl 添加し室温で 1 時間反応してブロッキングした。上澄み除去後洗浄液(Tween20 0.02%, PBS)で洗浄し、その上に融合細胞の培養液 100μl を加え室温で 2 時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した。これに、50ng/ml のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体液を 100μl 加え室温、1 時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 TMB 溶液(KPL 社) を 100μl ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を 100μl 添加して反応を停止し、450nm の吸光を測定した。

この結果、GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質にのみ反

応しGST蛋白質には反応しない陽性ウェルが見いだされRibosomal Protein L7/L12蛋白質に対する抗体が含まれていることが判明した。

そこで陽性ウェル中の細胞をそれぞれ回収し24穴プラスティックプレート中、HAT培地で培養した。培養した融合培地を細胞数が約20個/mlになるようにHT培地で希釈し50μlを、HT培地に懸濁した6週齢のマウス胸腺細胞10^6個と96穴培養プレート中で混合後、7%CO_2条件下、37℃で2週間培養した。培養上澄み中の抗体活性を前述のELISA法にて同様に検定し、Ribosomal Protein L7/L12蛋白質との反応陽性の細胞を回収した。

さらに、同様の希釈検定、クローニング操作を繰り返し、ハイブリドーマHIRB-1～5の計5クローンを取得した。

[実施例4]

Haemophilus influenzaeのRibosomal Protein L7/L12蛋白質と反応するモノクローナル抗体のNeisseria gonorrhoeaeおよび他の微生物との反応試験

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞を用いて定法に従ってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的にはRPMI1640培地（10%FCS入り）を用いて継代培養した細胞をあらかじめ2週間前に0.5mlのプリスタンを腹腔内に注射したBalb/Cマウスの腹腔内に5×10^6個(PBS中）注射し、3週間後腹水を回収し、その遠心上澄みを取得した。

取得した抗体含有液をProtein Aカラム（5mlベッド，Pharmacia社）に吸着させ、PBSで3ベッドボリューム洗浄し、pH3のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。

この5株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体を用いてELISA法により評価した。

抗体の評価にはサンドイッチアッセイ法を用い、作製したモノクローナル抗体はパーオキシダーゼと化学的に結合させることにより酵素標識抗体

として使用した。

すなわち酵素標識は、ホースラディッシュパーオキシダーゼ（Sigma グレードVI）を用い結合には試薬S-アセチルチオ酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドを使用しAnalytical Bio-chemistry 132(1983), 68-73 に述べられている方法に従って行った。ELISA 反応においては0.05%のアジ化ソーダ含む PBS中に溶解した市販の抗 Haemophilus influenzae ポリクローナル抗体（Biodesign 社、ウサギ）を10μg/ml濃度で希釈した液を 100μlずつ96穴プレートの別々に分注し4℃で1晩吸着させた。

上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS中)200μl 添加し室温で1時間反応しブロッキングする。上澄み除去後洗浄液（Tween20 0.02%、PBS)で洗浄し、その上に各種微生物の培養液に0.3 %濃度のTriton X-100により室温で5分間抽出操作をほどこした抗原液を 100μl を加え室温で2時間反応後上澄みを除去し、さらに洗浄液で洗浄後、5μg/mlの各ペルオキシダーゼ標識抗 Ribosomal Protein L7/L12 抗体液を100μl 加え室温、1時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 TMB溶液(KPL社）を 100μl ずつ加え室温で20分反応、発色後1Nの硫酸を 100μl 添加して反応を停止し，450nm の吸光を測定した。

その結果、表1に示すように酵素標識抗体としてハイブリドーマHIRB-2由来のモノクローナル抗体を用いた場合、試験した Haemophilus influenzae の全ての株を10^6個/ml の感度で検出すると同時に他の Neisseria 属やその他の微生物について10^8個/mlの高濃度でも反応性を示さずRibosomal Protein L7/L12蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いることで Haemophilus influenzae 特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。

[表1]

		10^6個/ml 検出結果	
Haemophilus influezae		ATCC9327	+
Haemophilus influezae		ATCC9334	+

Haemophilus influezae	ATCC9007	+
Haemophilus influezae	ATCC9332	+
Haemophilus influezae	ATCC8142	+
Haemophilus influezae	ATCC9833	+

	10^8個/ml 検出結果	
Neisseria meningitides	ATCC13090	−
Neisseria lactamica	ATCC30011	−
Neisseria mucosa	ATCC35611	−
Neisseria sicca	ATCC9913	−
Branhamella catarrharis	ATCC25240	−
Neisseria gonorrhoeae	ATCC9793	−
Escherichia coli	ATCC25922	−
Klebsiella pneumoniae	ATCC13883	−

（＋；ポジティブ、－；ネガティブ）

[実施例 5]

Streptococcus pneumoniae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子のクローニング、同蛋白質の大腸菌での大量発現と精製および同蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製。

Streptococcus pneumoniae IID555 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）を血液寒天培地上に適当量植菌した後、インキュベーター中、37℃で 48 時間培養する。生育したコロニーを最終的に 5×10^9CFU/ml 前後になるように TE Buffer に懸濁する。内約 1.5ml を微量遠心チューブに移し取り 10000rpm で 2 分間遠心し、上澄みを棄てる。沈殿部分を 567μl の TE Buffer に再懸濁する。さらに 30μl の 10%SDS と 3μl の 20mg/ml

Proteinase K溶液を加えて良く混合し、37℃で1時間インキュベートする。次に 10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl 溶液を 80μl 追添し、よく混合した後 65℃で 10 分間インキュベートする。次に、体積比 24/1 のクロロホルム-イソアミルアルコール混合液を 700μl 加えよく攪拌する。この溶液を微量遠心機で 12000rpm、5 分間（4℃コントロール下）遠心処理した後、水層画分を新しい微量遠心管に移す。そこに 0.6 倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振って DNA の沈殿を形成する。白い DNA 沈殿をガラス棒ですくって 1ml の 70%エタノール（-20℃冷却したもの）が入った別の微量遠心管に移す。

次に 10000rpm で 5 分間遠心処理し、上澄みを静かに除去した後さらに 1ml の 70%エタノールを加えて再び 5 分間遠心する。再び上澄みを除去した後沈殿を 100μl の TE buffer に溶解し DNA 溶液を得た。このゲノム DNA 溶液の濃度を Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Pr の E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA に従って定量した。

このゲノム DNA のうち 10ng を用いて PCR を行った。PCR は Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製、コード R001A）を用いた。酵素に添付のバッファーを 5μl, 酵素に添付の dNTP mixture 4μl と配列表配列番号：13 に示した合成オリゴヌクレオチド C および、配列表配列番号：14 に示した合成オリゴヌクレオチド D をそれぞれ 200pmol を加え、最終容量 50μl とした。

この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 を用いて、95℃ 1 分、50℃ 2 分、72℃ 3 分を 5 サイクル行った後、95℃ 1 分、60℃ 2 分、72℃ 3 分を 25 サイクル行った。この PCR 産物の一部を 1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約 400bp の cDNA が増幅されていることを確認した。さらに制限酵素 BamHI および XhoI で切断処理後、1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色後約 370bp のバンドをゲルから切り出して Suprec01（宝酒造社製）で精製後、市販のベクターである pGEX-

6P-1（Pharmacia 社製）に組み込んだ。同ベクターは目的の遺伝子断片を適当な制限酵素サイトに組み込むことにより GST 蛋白質とのフュージョン蛋白質を発現しうる目的分子の発現ベクターとして機能することができる。具体的にはベクター pGEX-6P-1 と先の DNA とをそのモル比が 1:5 となるように混ぜ合わせて、T4 DNA リガーゼ（Invitrogen 社製）にてベクターに DNA を組み込んだ。DNA が組み込まれたベクター pGEX-6P-1 を大腸菌 One Shot Competent Cells（Invitrogen 社製）に遺伝子導入し、アンピシリン（Sigma 社製）を 50μg/ml 含む L-Broth（宝酒造社製）半固型培地のプレートに蒔き、12 時間程度 37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含む L-Broth 液体培地 2ml に植え付け、8 時間程度 37℃で振とう培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ（Promega 社製）を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約 370bp の DNA が切り出されてくることで該 PCR 産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれている DNA の塩基配列決定を行った。

挿入 DNA 断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems 社製の蛍光シークエンサーを用いて実施した。シークエンスサンプルの調製は PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems 社製）を用いて行った。0.5ml 容のマイクロチューブに 9.5μl の反応ストック液、4.0μl の 0.8pmol/μl の T7 プロモータープライマー（GIBCO BRL 社製）及び 6.5μl の 0.16μg/μl のシークエンス用鋳型 DNA を加えて混合し、100μl のミネラルオイルを重層後、96℃ 30 秒、55℃15 秒および 60℃ 4 分を 1 サイクルとする PCR 増幅反応を 25 サイクル行い、4℃で 5 分間保温した。反応後、80μl の滅菌精製水を加えて撹拌し、遠心分離後、その水層を 3 回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。100μl の水層に 10μl の 3M 酢酸ナトリウム（pH5.2）および 300μl のエタノールを加えて撹拌後、室温、14,000rpm にて 15 分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を 75%エタノールで洗浄後、真空下に 2 分間静置して乾燥させ、シークエンス用サンプルとした。シークエンスサンプルは、4μl の 10mM

の EDTA を含むホルムアミドに溶解して 90℃、2 分間で変性後、氷中で冷却してシークエンスに供した。

得られた 7 個のクローンの内 1 個の配列に PCR に用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の微生物、例えば Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子配列と非常に類似した DNA 配列が見いだされた。その構造遺伝子部分の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号：19 及び 20 のような配列であった。この遺伝子断片は、明らかに Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の遺伝子をコードするものである。

発現ベクターを組み込んだ大腸菌を 2 倍濃度の YT 培地中で 50ml 37℃1 晩培養した。2 倍濃度の YT 培地 450ml を 37℃で 1 時間温めておいた。1 晩培養した大腸菌培養液 50ml を 450ml の前述の培地に入れた。37℃ 1 時間培養後、500mM の IPTG を 100μl 入れ、25℃ 4 時間培養後回収し、250ml ずつ遠心チューブにいれて 5000rpm、20 分遠心した。上澄みを棄てて 50mM Tris-HCl pH7.4、25% Sucrose を含む Lysis バッファー 25ml ずつに溶解した。

さらに 10% NP-40 1.25ml、1M $MgCl_2$ 125μl を加えてプラステイックチューブに移した。1 分間×5 回氷冷中で sonication を実施し、12000rpm、15 分間遠心後上澄みを回収した。

次に PBS でコンディショニングしたグルタチオンセファロース（Pharmacia 社製）カラムに前記の上澄み液を吸着させた。次に PBS でカラムを 3 ベットボリューム分洗浄した。その後 10mM のグルタチオンを含む 50mM Tris-HCl 8.0 で溶出し、分画したフラクション中の蛋白質含有量を色素結合法（ブラッドフォード法；BioRad 社）で検出し、メインフラクションを取得した。メインフラクションを 3L PBS に対して 3 回透析を行った。

得られた GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の 1mg/ml 溶液 10ml に 500mM Tris-HCl pH7.0、1.5M NaCl、10mM EDTA、10mM DTT を含む Cleavage バッファー 1ml を加え、さらに 2u/μl の PreScission Protease（Pharmacia 社製）を 100μl 添加して 4℃で反応させることによ

りGST部分をRibosomal Protein L7/L12蛋白質部分から切り離した。

次にPBSでコンディショニングしたグルタチオンセファロースカラムに反応液を通し、通過液を回収し、さらにPBSを1ベッドボリューム流し、これも回収した。取得した精製Ribosomal Protein L7/L12蛋白質の純度は電気泳動法により確認したところ約90%であり免疫源として充分な純度を確保できた。

まずマウスの免疫については Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12蛋白質抗原100μgを200μlのPBSに溶解後フロイントのコンプリートアジュバントを200μl加え混合、エマルジョン化した後200μlを腹腔内に注射した。さらに2週間後、4週間後、6週間後に同様のエマルジョン抗原を腹腔内に注射し、さらに10週間後、14週間後に2倍濃度の抗原エマルジョン液を腹腔内注射し最終免疫から3日後に脾臓を取り出し、細胞融合に供した。

無菌的に取り出したマウスの脾細胞10^8個に対し骨髄腫細胞2×10^7個をガラスチューブに取り良く混合した後1500rpmで5分間遠心し上澄みを棄て、その後細胞をよく混合した。

細胞融合に使用した骨髄腫細胞はNS-1系の細胞株を用い10%FCSを含むRPMI1640培地で培養し、細胞融合の2週間前から0.13mMのアザグアニン、0.5μg/mlのMC-210、10%FCSを含むRPMI1640培地で1週間培養後、さらに10%FCSを含むRPMI1640培地で1週間培養したものを用いた。混合した細胞サンプルに37℃に保温した50mlのRPMI1640培地を30ml加え1500rpmで遠心、上澄み除去後37℃に保温した50%ポリエチレングリコールを1ml加え激しく撹拌しながら2分間処理後、37℃に保温した10mlのRPMI1640培地を加え液を滅菌ピペットで吸引、排出しながら約5分間激しく撹拌混合した。

1000rpmで5分間遠心、上澄み除去後さらに30mlのHAT培地を加え細胞濃度が5×10^6個/mlになるように調整し撹拌均一化後、96穴プレート型培養プレートに0.1mlずつ分注し7%CO_2条件下、37℃で培養し、1日目、1週間目、2週間目にHAT培地を0.1mlずつ加えた。

次に目的の抗体を生産している細胞をスクリーニングするために ELISA 法による評価を実施した。0.05%のアジ化ソーダ含む PBS 中に溶解した Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を 10 μg/ml 濃度に希釈した液を 100μl ずつ 96 穴プレートの別々に分注し 4℃で 1 晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS 中)200 μl 添加し室温で 1 時間反応しブロッキングする。上澄み除去後洗浄液 (Tween20 0.02%、PBS) で洗浄し、その上に融合細胞の培養液 100μl を加え室温で 2 時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、50ng/ml のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体液を 100μl 加え室温、1 時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 TMB 溶液(KPL 社)を 100μl ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を 100μl 添加して反応を停止し、450nm の吸光を測定した。

この結果 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に反応する陽性ウェルが見いだされ Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体が含まれていることが判明した。

そこで陽性ウェル中の細胞をそれぞれ回収し 24 穴プラスティックプレート中、HAT 培地で培養した。培養した融合培地を細胞数が約 20 個/ml になるように HT 培地で希釈し 50μl を、HT 培地に懸濁した 6 週齢のマウス胸腺細胞 10^6個と 96 穴培養プレート中で混合後、7%CO_2条件下、37℃で 2 週間培養した。培養上澄み中の抗体活性を前述の ELISA 法にて同様に検定し、Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質との反応陽性の細胞を回収した。

さらに同様の希釈検定、クローニング操作を繰り返し、ハイブリドーマ AMSP-1～4 の計 4 クローンを取得した。

[実施例 6]

Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と反応するモノクローナル抗体の Streptococcus pneumoniae 及び他の微生物との反応試験

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞を用いて定法にした

がってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には RPMI1640 培地(10%FCS 入り)を用いて継代培養した細胞を $25cm^2$ 培養フラスコ中で 2×10^5 個/ml、3.3×10^5 個及び 5×10^5 個/ml 程度に無血清培地にて希釈し全容を 5ml とした。7%CO_2、37℃で 3～5 日間増殖させ、細胞の増殖がみられたフラスコの内、元の細胞数が最も少ないものを選択し、最終的に 2×10^5 個/ml 希釈のものが 3～4 日間で 2×10^6 個/ml に増殖するようになるまで同様の操作を繰り返し無血清培地に馴化させた。次に細菌培養用 96 穴プレート中でクローニングを行い、増殖が早く抗体価の高い細胞を選択した。選択した細胞を 24 穴プレートで増殖させたものを $25cm^2$ 培養フラスコ中で 2×10^5 個/ml 程度となるように無血清培地で希釈し全容 10ml とした。これを 7%CO_2、37℃で 3～4 日間培養し 1×10^6 個/ml まで増殖させた後、$75cm^2$ 培養フラスコにて同様に増殖させ 1×10^6 個/ml、100ml を大量培養用ボトルに移した。これに無血清培地 100ml を加え、攪拌しながら 37℃で 2 日培養後、無血清培地 200ml 加えさらに 2 日培養した。この培養液を 4 本に分け各々 100ml の無血清培地を添加し、2 日培養し各々 400ml の無血清培地を添加後さらに約 6 日培養した後、培養液を回収し 10000rpm15 分の遠心により目的とする抗体を含む培養上清を取得した。培養上清は 0.1%アジ化ソーダ添加後 4℃で保存した。取得した抗体含有液 100ml を PBS で 5 倍に希釈後 ProteinG カラム(5ml ベッド,Pharmacia 社)に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH3 のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。この 4 株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体は特表平 7-509565 号公報に記載されている OIA 法により評価した。

すなわち OIA 法は窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に capture 用抗体を反応させた反応用基材を作製し、これに抗原物質すなわち微生物の抽出液を一定時間反応させた後、捕捉された抗原と酵素標識した抗体（増幅試薬）とをさらに反応させ、最後に基質溶液を加えて生じた薄膜沈殿による光干渉色の濃さにより、抗原抗体反応を視覚的に判定できる方法である。

作製したモノクローナル抗体は OIA 法の窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に固相化する capture 抗体として使用し、評価した。また detect 抗体としては参考例に記載した種々の微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と非特異的に反応しうる AMGC-1 モノクローナル抗体をパーオキシダーゼで酵素標識したものを使用した。すなわち酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ(Sigma グレード VI)を用い結合には試薬 S-アセチルチオ酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Biochemistry132(1983),68-73 に述べられている方法に従って行った。

OIA 反応においては 0.05%アジ化ナトリウムを含む PBS 中のモノクローナル抗体を 10μg/ml 濃度に 0.1M HEPES pH8.0 で希釈した液を 50μl ずつ窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に添加し室温で 30 分反応させた後、蒸留水で洗浄した後、使用した。

その上に各種微生物の懸濁液に 0.5%濃度の Triton X-100 により室温で 5 分間抽出操作をほどこした抗原液を 15μl 加え室温で 10 分間反応後、20μg/ml のペルオキシダーゼ標識 AMGC1 抗体を 15μl 加え室温 10 分間反応を実施し、蒸留水で洗浄した後、基質溶液（KPL 社）を 15μl ずつ加え、室温で 5 分反応し、蒸留水で洗浄後検出シグナルの濃さを光干渉色の強さとして目視で判定した。

その結果表 2 に示すように capture 抗体としてハイブリドーマ AMSP-2 由来のモノクローナル抗体を用いた場合、試験した Streptococcus pneumoniae の全ての株を 10^6 個/ml の感度で検出すると同時に他の微生物について 10^8 個/ml の高濃度でも反応性を示さず Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いることで Streptococcus pneumoniae 特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。

Streptococcus pneumoniae 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 AMSP-2 を日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成 11 年 7 月 28 日に受託番号：FERM BP-6807 として国際寄託した。

[表 2]

		10^6個/ml 検出結果
Streptococcus pneumoniae	ATCC27336	+
Streptococcus pneumoniae	IID554	+
Streptococcus pneumoniae	IID555	+
Streptococcus pneumoniae	IID556	+
Streptococcus pneumoniae	IID557	+
Streptococcus pneumoniae	IID558	+
Streptococcus pneumoniae	IID559	+
Streptococcus pneumoniae	IID1603	+

		10^8個/ml 検出結果
Escherichia coli	ATCC25922	−
Enterococcus faecalis	ATCC19433	−
Haemophilus influenzae	ATCC10211	−
Klebsiella pneumoniae	ATCC13883	−
Neisseria gonorrhoeae	IID821	−
Neisseria lactamica	ATCC23970	−
Neisseria meningitidis	ATCC13090	−
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853	−
GroupB streptococcus	ATCC12386	−
Staphylococcus aureus	ATCC25923	−
Streptococcs pyogenes	ATCC19615	−

（＋；ポジティブ、－；ネガティブ）

[実施例 7]

Neisseria gonorrhoeae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子のクローニング、同蛋白質の大腸菌での大量発現、精製および同蛋白質の対するモノクローナル抗体の作製。

Neisseria gonorrhoeae IID821 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）をチョコレート寒天培地上に適当量植菌した後、CO_2インキュベーター中で37℃、CO_2 0.5%条件で24時間培養した。生育したコロニーを最終的に5×10^9CFU/ml前後になるようにTE Bufferに懸濁する。そのうち約1.5 mlを微量遠心チューブに移し取り10000rpmで2分間遠心し、上澄みを棄てた。沈殿部分を 567μl のTE bufferに再懸濁した。さらに、30μlの10% SDSと 3μl の20mg/ml Proteinase K溶液を加えて良く混合し、37℃で1時間インキュベートした。

次に10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl溶液を80μl追添しよく混合した後65℃で10分間インキュベートした。次に、体積比24/1のクロロホルム-イソアミルアルコール混合液を 700μl 加えよく撹拌した。この溶液を微量遠心機で12000rpm、5分間（4℃コントロール下）遠心処理した後、水層画分を新しい微量遠心管に移した。そこに0.6倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振ってDNA の沈殿を形成した。白いDNA 沈殿をガラス棒ですくって1mlの70%エタノール (-20℃に冷却したもの）が入った別の微量遠心管に移した。

次に、10000rpmで5分間遠心処理し、上澄みを静かに除去した後さらに1mlの70%エタノールを加えて再び5分間遠心した。再び上澄みを除去した後沈殿を 100μl のTE bufferに溶解しDNA溶液を得た。このゲノムDNA溶液の濃度をMolecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory PressのE5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNAに従って定量した。 このゲノムDNAのうち10ngを用いてPCRを行った。PCRはTaq ポリメラーゼ（宝酒造社製、コードR001A） を用いた。酵素に添付のバッファーを5μl 、酵素に添付のdNTP mixture 4μlとHaemophilus influenzaeなどの菌のRibosomal Protein L7/L12 DNA配列との類似性によりインターネット情報（オクラホマ大、Neisseria gonorrhoeae ゲノムプロジェクト公開 ゲノムDNA情報）より取得したNeisseria gonorrhoeaeのRibosomal Protein L7/L12 DNA配列をも

とに設計した配列表配列番号：15に示した合成ヌクレオチドE及び配列表配列番号：16に示したオリゴヌクレオチドFをプローブとしてそれぞれ200 pmolを加え、最終容量50μlとした。

この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用いて、95℃ 1分、50℃ 2分、72℃ 3分を5サイクル行った後、95℃ 1分、60℃ 2分、72℃ 3分を25サイクル行った。このPCR産物の一部を1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約400bp のcDNAが増幅されていることを確認した。さらに制限酵素 BamHIおよびXhoIで切断処理後、1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色後約 370bpのバンドをゲルから切り出して Suprec01(宝酒造社製)で精製後、市販のベクターである pGEX-4T-1 (Pharmacia製)に組み込んだ。 具体的にはベクター pGEX-4T-1と先のDNAとをそのモル比が1:3となるように混ぜ合わせて、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen社製）にてベクターにDNAを組み込んだ。DNAが組み込まれたベクター pGEX-4T-1 を大腸菌 One Shot Competent Cells（Invitrogen社製）に遺伝子導入し、アンピシリン（Sigma社製）を50μg/ml含むL-Broth（宝酒造社製）半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含むL-Broth液体培地 2mlに植え付け、8時間程度37℃で振盪培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ（Promega社製）を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoIにて消化して、約370bp のDNAが切り出されてくることで該PCR産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれているDNAの塩基配列決定を行った。

挿入DNA断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems社製の蛍光シークエンサーを用いて実施した。シークエンスサンプルの調製は PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社製）を用いて行った。0.5ml 容のマイクロチューブに 9.5μlの反応ストック液、4.0μlの0.8pmol/μl のT7プロモータープライマー

(GIBCO BRL 社製)および 6.5μl の 0.16μg/μl のシークエンス用鋳型 DNA を加えて混合し、100μl のミネラルオイルを重層後、96℃ 30 秒、55℃ 15 秒および 60℃ 4 分を 1 サイクルとする PCR 増幅反応を 25 サイクル行い、4℃で 5 分間保温した。反応後、80μl の滅菌精製水を加えて撹拌し、遠心分離後、その水層を 3 回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。 100μl の水層に 10μl の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 及び 300μl のエタノールを加えて撹拌後、室温、14000rpm にて 15 分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を 75%エタノールで洗浄後、真空下に 2 分間静置して乾燥させ、シークエンス用サンプルとした。シークエンスサンプルは、4μl の 10mM の EDTA を含むホルムアミドに溶解して 90℃、2 分間で変性後、氷中で冷却してシークエンスに供した。得られた 5 個のクローンの内 1 個の配列に PCR に用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の微生物、例えば Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子配列と非常に類似した DNA 配列が見いだされた。
その構造遺伝子部分の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号：21 及び 22 に示すような配列であった。この遺伝子断片は明らかに Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の遺伝子をコードするものである。

このように構築した Neisseria gonorrhoeae の GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質発現ベクターを用いて実施例 2 に記載の方法と同様の方法により精製した Neisseria gonorrhoeae の GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を取得した。

さらに、実施例 3 記載の方法に従い Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対するモノクローナル抗体に生産するハイブリドーマ GCRB-3 株を取得した。

[実施例 8]

Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と反応するモノクローナル抗体の Neisseria gonorrhoeae 及び他の微生物との反応試験

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞 GCRB-3 を用いて定法にしたがってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には、RPMI1640 培地 (10% FCS 入り)を用いて継代培養した細胞をあらかじめ 2 週間前に 0.5ml のプリスタンを腹腔内に注射した Balb/C マウスの腹腔内に 5×10^6個(PBS 中)注射し、3 週間後腹水を回収し、その遠心上澄みを取得した。取得した抗体含有液を ProteinA カラム (5ml ベッド,Pharmacia 社製) に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収してハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。この GCRB-3 ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体を用いて ELISA 法により評価した。

抗体の評価にはサンドイッチアッセイ法を用い、作製したモノクローナル抗体はパーオキシダーゼと化学的に結合させることにより酵素標識抗体として使用した。すなわち酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ (Sigma グレードＶＩ) を用い結合には試薬 S-アセチルチオ酢酸Ｎ- ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Bio-chemistry132 (1983), 68-73 に述べられている方法に従って行った。ELISA 反応においては 0.05%のアジ化ソーダを含む PBS 中に溶解した市販の抗淋菌ポリクローナル抗体 (ヴァイロスタット社、ウサギ) を 10μg/ml 濃度で希釈した液を 100 μl ずつ 96 穴プレートの別々に分注し 4℃で 1 晩吸着させた。

上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS 中)200μl 添加し室温で 1 時間反応しブロッキングした。上澄み除去後洗浄液 (Tween20 0.02%、PBS)で洗浄し、その上に各種微生物の培養液に 0.3%濃度の Triton X-100 により室温で 5 分間抽出操作をほどこした抗原液を 100μl を加え室温で 2 時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、 5μg/ml のペルオキシダーゼ標識抗 Ribosomal Protein L7/L12 抗体液を 100μl 加え室温、1 時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 TMB 溶液 (KPL 社) を 100μl ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を 100 μl 添加して反応を停止し、450nm の吸光を測定した。

その結果、表 3 に示すように酵素標識抗体としてハイブリドーマ GCRB-3

由来のモノクローナル抗体を用いた場合、試験したNeisseria gonorrhoeaeの全ての株を 10^6個/ml の感度で検出すると同時に他のNeisseria 属やその他の微生物について 10^8個/ml の高濃度でも反応性を示さずRibosomal Protein L7/L12蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いることでNeisseria gonorrhoeae特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。

[表3]

		10^6個/ml 検出結果
Neisseria gonorrhoeae	ATCC9793	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC19424	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC27628	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC27629	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC27630	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC27631	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC27632	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC27633	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC35541	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC35542	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC43069	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC43070	+
Neisseria gonorrhoeae	ATCC49226	+

		10^8個/ml 検出結果
Neisseria meningitides	ATCC13090	−
Neisseria lactamica	ATCC30011	−

Neisseria mucosa	ATCC35611	−
Neisseria sicca	ATCC9913	−
Branhamella catarrharis	ATCC25240	−
Haemophilus influenzae	ATCC10211	−
Escherichia coli	ATCC25922	−
Klebsiella pneumoniae	ATCC13883	−

（＋；ポジティブ、－；ネガティブ）

［実施例９］

Neisseria 属特異的抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質モノクローナル抗体の取得

Neisseria gonorrhoeae IID821 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）をチョコレート寒天培地上に適当量植菌した後、CO_2 インキュベーター中、CO_2 濃度 0.5%条件で 37℃で 24 時間培養する。生育したコロニーを最終的に 5×10^9CFU/ml 前後になるように TE Buffer に懸濁する。そのうち約 1.5ml を微量遠心チューブに移し取り 10000rpm で 2 分間遠心し、上澄みを棄てる。沈殿部分を 567μl の TE Buffer に再懸濁する。さらに 30μl の 10%SDS と 3μl の 20mg/ml Proteinase K 溶液を加えて良く混合し、37℃で１時間インキュベートする。 次に 10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl 溶液を 80μl 追添し、よく混合した後 65℃で 10 分間インキュベートする。次に、体積比 24/1 のクロロホルム-イソアミルアルコール混合液を 700μl 加えよく攪拌する。この溶液を微量遠心機で 12000rpm、5 分間(4℃コントロール下)遠心処理した後、水層画分を新しい微量遠心管に移す。そこに 0.6 倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振って DNA の沈殿を形成する。白い DNA 沈殿をガラス棒ですくって 1ml の 70%エタノール（-20℃に冷却したもの）が入った別の微量遠心管に移す。

次に 10000rpm で 5 分間遠心処理し、上澄みを静かに除去した後さらに 1ml の 70%エタノールを加えて再び 5 分間遠心する。再び上澄みを除去した後沈殿を 100μl の TE Buffer に溶解し DNA 溶液を得た。このゲノム DNA 溶液の濃度を Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press の E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA に従って定量した。

このゲノム DNA のうち 10ng を用いて PCR を行った。PCR は Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製、コード R001A）を用いた。酵素に添付のバッファーを 5μl，酵素に添付の dNTP mixture 4μl と他菌の Ribosomal Protein L7/L12 DNA 配列との類似性により、インターネット情報(オクラホマ大、Neisseria gonorrhoeae ゲノムプロジェクト公開ゲノム DNA 情報)より取得した Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 DNA 配列をもとに設計した配列表配列番号：15 に示した合成オリゴヌクレオチド E および、配列表配列番号：16 に示した合成オリゴヌクレオチド F をプローブとしてそれぞれ 200pmol を加え、最終容量 50μl とした。

この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 を用いて、95℃ 1 分、50℃ 2 分、72℃ 3 分を 5 サイクル行った後、95℃ 1 分、60℃ 2 分、72℃ 3 分を 25 サイクル行った。この PCR 産物の一部を 1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約 400bp の cDNA が増幅されていることを確認した。さらに制限酵素 BamHI および XhoI で切断処理後、1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色後約 370bp のバンドをゲルから切り出して Suprec01（宝酒造社製）で精製後、市販のベクターである pGEX-6P-1（Pharmacia 社製）に組み込んだ。同ベクターは目的の遺伝子断片を適当な制限酵素サイトに組み込むことにより GST 蛋白質とのフュージョン蛋白質を発現しうる目的分子の発現ベクターとして機能することができる。具体的にはベクター pGEX-6P-1 と先の DNA とをそのモル比が 1:5 となるように混ぜ合わせて、T4 DNA リガーゼ（Invitrogen 社製）にてベクターに

DNA を組み込んだ。DNA が組み込まれたベクター pGEX-6P-1 を大腸菌 One Shot Competent Cells (Invitrogen 社製) に遺伝子導入し、アンピシリン (Sigma 社製) を 50μg/ml 含む L-Broth (宝酒造社製) 半固型培地のプレートに蒔き、12 時間程度 37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含む L-Broth 液体培地 2ml に植え付け、8 時間程度 37℃で振とう培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ (Promega 社製) を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約 370bp の DNA が切り出されてくることで該 PCR 産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれている DNA の塩基配列決定を行った。

挿入 DNA 断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems 社製の蛍光シークエンサーを用いて実施した。シークエンスサンプルの調製は PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製)を用いて行った。0.5ml 容のマイクロチューブに 9.5 μl の反応ストック液、4.0μl の 0.8pmol/μl の T7 プロモータープライマー (GIBCO BRL 社製) 及び 6.5μl の 0.16μg/μl のシークエンス用鋳型 DNA を加えて混合し、100μl のミネラルオイルを重層後、96℃ 30 秒、55℃ 15 秒及び 60℃ 4 分を 1 サイクルとする PCR 増幅反応を 25 サイクル行い、4℃で 5 分間保温した。反応後、80μl の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を 3 回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。100μl の水層に 10μl の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および 300μl のエタノールを加えて攪拌後、室温、14000rpm にて 15 分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を 75%エタノールで洗浄後、真空下に 2 分間静置して乾燥させ、シークエンス用サンプルとした。シークエンスサンプルは、4μl の 10mM の EDTA を含むホルムアミドに溶解して 90℃、2 分間で変性後、氷中で冷却してシークエンスに供した。

得られた 4 個のクローンの内 1 個の配列に PCR に用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の微生物、例えば Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子配列と非常に類似した DNA 配列が見い

だされた。その構造遺伝子部分の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号：21 及び：22 のような配列であった。この遺伝子断片は、明らかに Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の遺伝子をコードするものである。

発現ベクターを組み込んだ大腸菌を 2 倍濃度の YT 培地中で 50ml 37℃1 晩培養した。2 倍濃度の YT 培地 450ml を 37℃で 1 時間温めておいた。1 晩培養した大腸菌培養液 50ml を 450ml の前述の培地に入れた。37℃1 時間培養後、500mM の IPTG を 100μl 入れ、25℃ 4 時間培養後回収し、250ml ずつ遠心チューブにいれて 5000rpm、20 分遠心した。上澄みを棄てて 50mM Tris-HCl pH7.4、25%Sucrose を含む Lysis バッファー 25ml ずつに溶解した。

さらに 10% NP-40 1.25ml、1M $MgCl_2$ 125μl を加えてプラステイックチューブに移した。1 分間×5 回氷冷中で sonication を実施し、12000rpm、15 分間遠心後上澄みを回収した。

次に PBS でコンディショニングしたグルタチオンセファロース(Pharmacia 社製)カラムに前記の上澄み液を吸着させた。次に PBS でカラムを 3 ベットボリューム分洗浄した。その後 10mM のグルタチオンを含む 50mM Tris-HCl 8.0 で溶出し、分画したフラクション中の蛋白質含有量を色素結合法（ブラッドフォード法；BioRad 社）で検出し、メインフラクションを取得した。メインフラクションを 3L PBS に対して 3 回透析を行った。

得られた GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の 1mg/ml 溶液 10ml に 500mM Tris-HCl pH7.0、1.5M NaCl、10mM EDTA、10mM DTT を含む Cleavage バッファー 1ml を加え、さらに 2u/μl の PreScission Protease (Pharmacia 社製) を 100μl 添加して 4℃で反応させることにより GST 部分を Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質部分から切り離した。

次に PBS でコンディショニングしたグルタチオンセファロースカラムに反応液を通し、通過液を回収し、さらに PBS を 1 ベッドボリューム流し、これも回収した。取得した精製 Ribosomal Protein L7/L12 の純度は電気泳動法により確認したところ約 90%であり免疫源として充分な純度を確保で

きた。

まずマウスの免疫については Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原 100μg を 200μl の PBS に溶解後フロイントのコンプリートアジュバントを 200μl 加え混合、エマルジョン化した後 200μl を腹腔内に注射した。さらに 2 週間後、4 週間後、6 週間後に同様のエマルジョン抗原を腹腔内に注射し、さらに 10 週間後、14 週間後に 2 倍濃度の抗原エマルジョン液を腹腔内注射し最終免疫から 3 日後に脾臓を取り出し、細胞融合に供した。

無菌的に取り出したマウスの脾細胞 10^8 個に対し骨髄腫細胞 2×10^7 個をガラスチューブに取り良く混合した後 1500rpm で 5 分間遠心し上澄みを棄て、その後細胞をよく混合した。

細胞融合に使用した骨髄腫細胞は NS-1 系の細胞株を用い 10%FCS を含む RPMI1640 培地で培養し、細胞融合の 2 週間前から 0.13mM のアザグアニン、0.5μg/ml の MC-210、10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養後、さらに 10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養したものを用いた。混合した細胞サンプルに 37℃に保温した 50ml の RPMI1640 培地を 30ml 加え 1500rpm で遠心、上澄み除去後 37℃に保温した 50%ポリエチレングリコールを 1ml 加え激しく撹拌しながら 2 分間処理後、37℃に保温した 10ml の RPMI1640 培地を加え液を滅菌ピペットで吸引、排出しながら約 5 分間激しく撹拌混合した。

1000rpm で 5 分間遠心、上澄み除去後さらに 30ml の HAT 培地を加え細胞濃度が 5×10^6 個/ml になるように調整し撹拌均一化後、96 穴プレート型培養プレートに 0.1ml ずつ分注し 7%CO_2 条件下、37℃で培養し、1 日目、1 週間目、2 週間目に HAT 培地を 0.1ml ずつ加えた。

次に目的の抗体を生産している細胞をスクリーニングするために ELISA 法による評価を実施した。0.05%のアジ化ソーダ含む PBS 中に溶解した Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を 10μg/ml 濃度で希釈した液を 100μl ずつ 96 穴プレートの別々に分注し 4℃で 1 晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS 中)200μl 添加し

室温で 1 時間反応しブロッキングする。上澄み除去後洗浄液（Tween20 0.02%、PBS）で洗浄し、その上に融合細胞の培養液 100μl を加え室温で 2 時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、50ng/ml のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体液を 100μl 加え室温、1 時間反応を実施し、 上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 TMB 溶液(KPL 社)を 100μl ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を 100μl 添加して反応を停止し、450nm の吸光を測定した。

この結果 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に反応する陽性ウェルが見いだされ Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体が含まれていることが判明した。

そこで陽性ウェル中の細胞をそれぞれ回収し 24 穴プラスティックプレート中、HAT 培地で培養した。培養した融合培地を細胞数が約 20 個/ml になるように HT 培地で希釈し 50μl を、HT 培地に懸濁した 6 週齢のマウス胸腺細胞 10^6 個と 96 穴培養プレート中で混合後、7%CO_2 条件下、37℃で 2 週間培養した。培養上澄み中の抗体活性を前述の ELISA 法にて同様に検定し、Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質との反応陽性の細胞を回収した。

さらに同様の希釈検定、クローニング操作を繰り返し、ハイブリドーマ AMGC-5～8 の計 4 クローンを取得した。

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞を用いて定法にしたがってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には RPMI1640 培地(10%FCS 入り)を用いて継代培養した細胞を 25cm^2 培養フラスコ中で 2×10^5 個/ml、3.3×10^5 個及び 5×10^5 個/ml 程度に無血清培地にて希釈し全容を 5ml とした。7%CO_2、37℃で 3～5 日間増殖させ、細胞の増殖がみられたフラスコの内、元の細胞数が最も少ないものを選択し、最終的に 2×10^5 個/ml 希釈のものが 3～4 日間で 2×10^6 個/ml に増殖するようになるまで同様の操作を繰り返し無血清培地に馴化させた。次に細菌培養用 96 穴プレート中でクローニングを行い、増殖が早く抗体価の高い細胞を選択した。選択した細胞を 24 穴プレートで増殖させたものを 25cm^2 培養フラスコ中で 2×10^5 個/ml 程度となるように無血清培地で希釈し

全容 10ml とした。これを 7%CO_2、37℃で 3～4 日間培養し 1×10^6 個/ml まで増殖させた後、75cm^2 培養フラスコにて同様に増殖させ 1×10^6 個/ml、100ml を大量培養用ボトルに移した。これに無血清培地 100ml を加え、攪拌しながら 37℃で 2 日培養後、無血清培地 200ml 加えさらに 2 日培養した。この培養液を 4 本に分け各々 100ml の無血清培地を添加し、2 日培養し各々 400ml の無血清培地を添加後さらに約 6 日培養した後、培養液を回収し 10000rpm15 分の遠心により目的とする抗体を含む培養上清を取得した。培養上清は 0.1%アジ化ソーダ添加後 4℃で保存した。取得した抗体含有液 100ml を PBS で 5 倍に希釈後 ProteinG カラム（5ml ベッド、Pharmacia 社）に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH3 のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。

この 4 株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体は特表平 7-509565 号公報に記載されている OIA 法により評価した。

すなわち OIA 法は窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に capture 用抗体を反応させた反応用基材を作製し、これに抗原物質すなわち微生物の抽出液を一定時間反応させた後、捕捉された抗原と酵素標識した抗体（増幅試薬）とをさらに反応させ、最後に基質溶液を加えて生じた薄膜沈殿による光干渉色の濃さにより、抗原抗体反応を視覚的に判定できる方法である。

作製したモノクローナル抗体は OIA 法の窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に固相化する capture 抗体として使用した。また detect 抗体としては参考例に記載した種々の微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と非特異的に反応しうる AMGC-1 モノクローナル抗体をパーオキシダーゼで酵素標識したものを使用した。すなわち酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ(Sigma グレード VI)を用い結合には試薬 S-アセチルチオ酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Biochemistry132(1983),68-73 に述べられている方法に従って行った。

OIA 反応においては 0.05%アジ化ナトリウムを含む PBS 中のモノクローナ

ル抗体を 10μg/ml 濃度に 0.1M HEPES pH8.0 で希釈した液を 50μl ずつ窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に添加し室温で 30 分反応させた後、蒸留水で洗浄した後、使用した。

その上に各種微生物の懸濁液に 0.5%濃度の Triton X-100 により室温で 5 分間抽出操作をほどこした抗原液を 15μl 加え室温で 10 分間反応後、20μg/ml のペルオキシダーゼ標識 AMGC1 を 15μl 加え室温 10 分間反応を実施し、蒸留水で洗浄した後、基質溶液 (KPL 社) を 15μl ずつ加え、室温で 5 分反応し、蒸留水で洗浄後検出シグナルの濃さを光干渉色の強さとして目視で判定した。

その結果表 4 に示すように capture 抗体としてハイブリドーマ AMGC-8 由来のモノクローナル抗体を用いた場合、10^8 個/ml の菌濃度で試験した Neisseria 属の全ての株を検出すると同時に他の微生物については反応性を示さず、Neisseria 属の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いることで Neisseria 属特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。

[表 4]

		10^8 個/ml 検出結果
Neisseria gonorrhoeae	IID821	+
Neisseria lactamica	ATCC23970	+
Neisseria meningitidis	ATCC13090	+
Escherichia coli	ATCC25922	−
Enterococcus faecalis	ATCC19433	−
Haemophilus influenzae	ATCC10211	−
Klebsiella pneumoniae	ATCC13883	−
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853	−

GroupB streptococcus	ATCC12386	−
Staphylococcus aureus	ATCC25923	−
Streptococcus pneumoniae	ATCC27336	−
Streptococcus pyogenes	ATCC19615	−

(＋；ポジティブ、－；ネガティブ)

[実施例 10]

Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化アフィニティカラムを用いた Haemophilus influenzae Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と特異的に反応するポリクローナル抗体の取得。

0.5%濃度の Triton X-100 で処理した Haemophilus influenzae 菌体抽出液の遠心上清を抗原として使用した。抗原 100μg を含む生理食塩水溶液約 1.2ml にフロイントのアジュバンド 1.5ml を加えエマルジョン化した後、4匹の SPF Japanese White Rabbit に皮下注射し免疫した。2 週間おきに 5～6回免疫し、抗体価を確認した。

抗体価の確認は ELISA 法により実施した。0.05%のアジ化ソーダ含む PBS 中に溶解した Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を 10μg/ml 濃度に希釈した液を 100μl ずつ 96 穴プレートに分注し 4℃で 1 晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS 中)200μl 添加し室温で 1 時間反応しブロッキングする。上澄み除去後洗浄液(0.02% Tween20、PBS)で洗浄し、その上に正常ウサギ血清と免疫後のウサギ抗血清を段階希釈したもの 100μl を加え室温で 2 時間反応後、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、50ng/ml のペルオキシダーゼ標識抗ラビット IgG 抗体液を 100μl 加え室温、1 時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 OPD 溶液(Sigma 社)を 100μl ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を 100μl 添加して反応を停止し，492nm の吸光を測定した。

抗体価上昇を確認できたものにつき、大量採血を実施した。耳動脈から血液をガラス製遠心管に採取し、37℃ 1 時間放置後、4℃ 一晩静置した。

その後 3000rpm 5分間遠心し、上清を回収した。
得られた抗血清4ロットは4℃で保存した。

次に Haemophilus influenzae 及び Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を固定化したアフィニティカラムを調製した。カラムは HiTrap NHS-activated (1ml、Pharmacia 社製) を使用した。1mM HCl 6ml でカラムを置換した後、直ちに 1mg/ml に調製した Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の PBS 溶液 1ml を注入し 25℃で 15 分放置、これを 5 回繰り返し、Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の PBS 溶液計 5ml をカラムに注入した。その後、ブロッキング試薬として Buffer A(0.5Mエタノールアミン、0.5M NaCl、pH8.3)を 6ml、Buffer B(0.1M酢酸、0.5M NaCl、pH4)を 6ml、Buffer A 6ml を注入し、25℃15 分放置後、さらに Buffer B を 6ml、Buffer A を 6ml、Buffer B を 6ml 流した。その後 PBS6ml で平衡化した。

この Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化アフィニティカラムを使用して、Haemophilus influenzae の Triton X-100 処理した菌体の上清を抗原として得られた抗血清中のポリクローナル抗体の精製を行った。まず該抗血清を PBS で 5 倍に希釈し、0.45μm のフィルターを通した後、流速 0.5ml/min で Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化カラムに吸着させた。その後 0.1M グリシン pH2.1 でカラムから溶出し、直ちに 1M Tris-HCl pH9.0 で中和した後、抗体価測定法と同様の ELISA 法により目的とする抗体の溶出画分を回収した。次にこの画分を PBS で平衡化した Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化アフィニティカラムを通過させ、Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に反応する抗体を吸収除去させ非吸着の通過画分を回収した。

こうして精製したポリクローナル抗体は実施例 6 と同様に OIA 法により評価した。

精製した抗体は OIA 法の capture 抗体として使用した。また detect 抗体としては参考例に記載した AMGC-1 モノクローナル抗体をパーオキシダーゼ

で酵素標識したものを使用した。酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ(Sigma グレード VI)を用い結合には試薬 S-アセチルチオ酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Bio-chemistry132 (1983),68-73 に述べられている方法に従って行った。

OIA 反応においては 0.05%アジ化ナトリウムを含む PBS 中の精製ポリクローナル抗体を 10μg/ml 濃度に 0.1M HEPES pH8.0 で希釈した液を 50μl ずつシリコンウエハー上に添加し室温で 30 分反応させた後、蒸留水で洗浄した後、使用した。

その上に各種微生物の懸濁液に 0.5%濃度の Triton X-100 により室温で 5 分間抽出操作をほどこした抗原液を 15μl を加え室温で 10 分間反応後、20μg/ml のペルオキシダーゼ標識 AMGC1 を 15μl 加え室温 10 分間反応を実施し、蒸留水で洗浄した後、基質溶液 (KPL 社) を 15μl ずつ加え、室温で 5 分反応し、蒸留水で洗浄後青色の濃さを目視で判定した。

その結果表 5 に示すように capture 抗体として APHI2-2 の精製ポリクローナル抗体を用いた場合、10^8 個/ml の菌濃度で試験した Haemophilus influenzae を検出すると同時に他の微生物について反応性を示さず、Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化アフィニティカラムで精製したポリクローナル抗体を用いることで Haemophilus influenzae 特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。

[表 5]

		10^8個/ml 検出結果
Haemophilus influenzae	ATCC10211	+
Escherichia coli	ATCC25922	−
Enterococcus faecalis	ATCC19433	−
Klebsiella pneumoniae	ATCC13883	−

Neisseria gonorrhoeae	IID821	−
Neisseria lactamica	ATCC23970	−
Neisseria meningitidis	ATCC13090	−
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853	−
GroupB Streptococcus	ATCC12386	−
Staphylococcus aureus	ATCC25923	−
Streptococcus pneumoniae	ATCC27336	−
Streptococcus pyogenes	ATCC19615	−

（＋；ポジティブ、－；ネガティブ）

[参考例 1]

各種の微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と非特異的に反応するモノクローナル抗体の取得。

オプティカルイムノアッセイや ELISA での微生物検出の際、一般的には capture 抗体と detect 用標識抗体で抗原をはさんで検出するいわゆるサンドイッチアッセイ法がその検出感度の高さから特に有用であるが、その場合対象微生物由来の抗原物質と特異的に反応する抗体が必要であると同時にその特異的抗体とは異なる抗原エピトープを認識するもう１種の抗体が必要である。

種々の微生物由来の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と非特異的に反応する抗体は、Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と特異的に反応する抗体とのサンドイッチアッセイを構成しうる抗体として非常に有用である。

幸い Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質は種々の微生物でアミノ酸配列が相同である領域が存在するため、ここでは、Neisseria gonorrhoeae から種々の微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と交差反応するモノクローナル抗体の取得を試み、一つの微生物から取得した特異性のない抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗体を種々の微生物のサンドイッチアッセイに共通して利用することが可能であることを見出した。

まず、Neisseria gonorrhoeae から Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子をクローニングし、同蛋白質の大腸菌での大量発現、精製および同蛋白質の対するモノクローナル抗体を作製した。

Neisseria gonorrhoeae IID821 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）をチョコレート寒天培地上に適当量植菌した後、CO_2 インキュベーター中で 37℃、CO_2 0.5%条件で 24 時間培養する。生育したコロニーを最終的に 5×10^9CFU/ml 前後になるように TE Buffer に懸濁する。 内約 1.5ml を微量遠心チューブに移し取り 10000rpm で２分間遠心し、上澄みを棄てる。沈殿部分を 567μl の TE Buffer に再懸濁する。さらに 30μl の 10%SDS と 3μl の 20mg/ml Proteinase K 溶液を加えて良く混合し、37℃で 1 時間インキュベートする。 次に 10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl 溶液を 80μl 追添しよく混合した後 65℃で 10 分間インキュベートする。次に、体積比 24/1 のクロロホルム-イソアミルアルコール混合液を 700μl 加えよく攪拌する。この溶液を微量遠心機で 12000rpm、5 分間（4℃ コントロール下）遠心処理した後、水層画分を新しい微量遠心管に移す。そこに 0.6 倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振って DNA の沈殿を形成する。白い DNA 沈殿をガラス棒ですくって 1ml の 70%エタノール （-20℃冷却したもの）が入った別の微量遠心管に移す。

次に 10000rpm で 5 分間遠心処理し、上澄みを静かに除去した後さらに 1ml の 70%エタノールを加えて再び 5 分間遠心する。再び上澄みを除去した後沈殿を 100μl の TE Buffer に溶解し DNA 溶液を得た。このゲノム DNA 溶液の濃度を Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press の E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA に従って定量した。

このゲノム DNA のうち 10ng を用いて PCR を行った。PCR は Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製、コード R001A）を用いた。酵素に添付のバッファーを 5μl、酵素に添付の dNTP mixture 4μl と Haemophilus influenzae などの菌の Ribosomal Protein L7/L12 DNA 配列との類似性によりインターネット

情報（オクラホマ大、Neisseria gonorrhoeae ゲノムプロジェクト公開ゲノム DNA 情報）より取得した Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 DNA 配列をもとに設計した配列表配列番号：15 に示した合成オリゴヌクレオチド E および、配列表配列番号：16 に示した合成オリゴヌクレオチド F をプローブとしてそれぞれ 200pmol を加え、最終容量 50μl とした。

この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 を用いて、95℃ 1 分、50℃ 2 分、72℃ 3 分を 5 サイクル行った後、95℃ 1 分、60℃ 2 分、72℃ 3 分を 25 サイクル行った。この PCR 産物の一部を 1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約 400bp の cDNA が増幅されていることを確認した。さらに制限酵素 BamHI 及び XhoI で切断処理後、1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色後約 370bp のバンドをゲルから切り出して Suprec01（宝酒造社製）で精製後市販のベクターである pGEX-4T-1（Pharmacia 製）に組み込んだ。具体的にはベクター pGEX-4T-1 と先の DNA とをそのモル比が 1:3 となるように混ぜ合わせて、T4 DNA リガーゼ（Invitrogen 社製）にてベクターに DNA を組み込んだ。DNA が組み込まれたベクター pGEX-4T-1 を大腸菌 One Shot Competent Cells（Invitrogen 社製）に遺伝子導入し、アンピシリン（Sigma 社製）を 50 μg/ml 含む L-Broth(宝酒造社製)半固型培地のプレートに蒔き、12 時間程度 37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含む L-Broth 液体培地 2ml に植え付け、8 時間程度 37℃で振とう培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ（Promega 社製）を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約 370bp の DNA が切り出されてくることで該 PCR 産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれている DNA の塩基配列決定を行った。

挿入 DNA 断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems 社製の蛍光シークエンサーを用いて実施した。シークエンスサンプルの調製は

PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製)を用いて行った。0.5ml 容のマイクロチューブに 9.5μl の反応ストック液、4.0μl の 0.8pmol/μl の T7 プロモータープライマー（GIBCO BRL 社製）及び 6.5μl の 0.16μg/μl のシークエンス用鋳型 DNA を加えて混合し、100μl のミネラルオイルを重層後、96℃ 30 秒、55℃ 15 秒及び 60℃ 4 分を 1 サイクルとする PCR 増幅反応を 25 サイクル行い、4℃ で 5 分間保温した。反応後、80μl の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を 3 回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。100μl の水層に 10μl の 3M 酢酸ナトリウム（pH5.2）および 300μl のエタノールを加えて攪拌後、室温 14000rpm にて 15 分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を 75%エタノールで洗浄後、真空下に 2 分間静置して乾燥させ、シークエンス用サンプルとした。シークエンスサンプルは、4μl の 10mM の EDTA を含むホルムアミドに溶解して 90℃2 分間で変性後、氷中で冷却してシークエンスに供した。得られた 5 個のクローンの内 1 個の配列に PCR に用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の微生物、例えば Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子配列と非常に類似した DNA 配列が見いだされた。その構造遺伝子部分の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号：21 及び 22 に示すような配列であった。この遺伝子断片は明らかに Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の遺伝子をコードするものである。

このように構築した Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 GST フュージョン蛋白質発現ベクターを用いて実施例 2 に記載の方法と同様の方法により精製した Neisseria gonorrhoeae の GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を取得した。さらに、実施例 3 記載の方法と同様の方法により Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対するモノクローナル抗体に生産するハイブリドーマ AMGC1 株を取得した。前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞 AMGC1 株を用いて定法にしたがってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には RPMI1640 培地（10%FCS 入り）を用いて継代培養した細胞を

25cm^{2}培養フラスコ中で 2×10^5個/ml、3.3×10^5個及び 5×10^5個/ml 程度に無血清培地にて希釈し全容を 5ml とした。7%CO_2、37℃で 3～5 日間増殖させ、細胞の増殖がみられたフラスコの内、元の細胞数が最も少ないものを選択し、最終的に 2×10^5個/ml 希釈のものが 3～4 日間で 2×10^6個/ml に増殖するようになるまで同様の操作を繰り返し無血清培地に馴化させた。次に細菌培養用 96 穴プレート中でクローニングを行い、増殖が早く抗体価の高い細胞を選択した。選択した細胞を 24 穴プレートで増殖させたものを 25cm^{2}培養フラスコ中で 2×10^5個/ml 程度となるように無血清培地で希釈し全容 10ml とした。これを 7%CO_2、37℃で 3～4 日間培養し 1×10^6個/ml まで増殖させた後、75cm^{2}培養フラスコにて同様に増殖させ 1×10^6個/ml、100ml を大量培養用ボトルに移した。これに無血清培地 100ml を加え、攪拌しながら 37℃で 2 日培養後、無血清培地 200ml 加えさらに 2 日培養した。この培養液を 4 本に分け各々 100ml の無血清培地を添加し、2 日培養し各々 400ml の無血清培地を添加後さらに約 6 日培養した後、培養液を回収し 10000rpm15 分の遠心により目的とする抗体を含む培養上清を取得した。培養上清は 0.1%アジ化ソーダ添加後 4℃で保存した。取得した抗体含有液 100ml を PBS で 5 倍に希釈後 Protein A カラム（5ml ベッドボリューム、Pharmacia 社製）に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH3.0 のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。このハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体を用いて ELISA 法により評価した。

抗体の評価には各種の微生物由来の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を抗原として感作した 96 穴プレートを用い、作製したモノクローナル抗体を反応させたあと 2 次抗体として抗マウス IgG のホースラディッシュペルオキシダーゼ標識（MBL 社製、Code330）を反応させ最後に酵素反応発色試薬により検出した。ELISA 反応においては 0.05%のアジ化ソーダ含む PBS 中に溶解した Neisseria gonorrhoeae、Haemophilus influenzae、Streptococcus pneumoniae のリコンビナント Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を 1μg/ml 濃度に希釈した液を 100μl ずつ 96 穴プレートの別々に

分注し 4℃で 1 晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液（PBS 中）200μl 添加し室温で 1 時間反応しブロッキングする。上澄み除去後洗浄液（0.02%Tween20、PBS）で洗浄し、その上に AMGC1 抗体の 0.1 から 1 μg/ml 液 100μl を加え室温で 2 時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、5μg/ml の抗マウス IgG のホースラディッシュペルオキシダーゼ標識（MBL 社製、Code330）抗体液を 100μl 加え室温、1 時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 TMB 溶液（KPL 社）を 100μl ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を 100μl 添加して反応を停止し、450nm の吸光を測定した。

その結果表 6 に示すようにハイブリドーマ AMGC1 由来のモノクローナル抗体を用いた場合、この抗体が Neisseria gonorrhoeae、Haemophilus influenzae 及び Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と反応できることを確認できた。

[表 6]

(AMGC1 抗体と各微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質検出結果)

Neisseria gonorrhoeae	+
Haemophilus influenzae	+
Streptococcus pneumoniae	+

(+；ポジティブ)

ここで取得された AMGC1 抗体はオプティカルイムノアッセイや ELISA での微生物検出などいわゆるサンドイッチアッセイ法による微生物検出において各微生物特異的な抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗体と組み合わせて用いる抗体として非常に有用である。

[産業上の利用可能性]

本発明によると各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗

体を用いて微生物の検出を行うことで微生物を特異的になおかつ同一種内の全ての血清型の微生物を精度よく検出することができる。

このような抗体として微生物のリボソーム蛋白質、Ribosomal Protein L7/L12 に対する抗体を用い、Haemophilus influenzae や Streptococcus pneumoniae 及び Neisseria gonorrhoeae の検出を精度良く行うことができる。

また、このような抗体を構成要素とする微生物検出用試薬キットを用いることで、微生物の検出をより汎用的に精度良く行うことができる。

また各種の微生物における同一機能の細胞内分子を抗原として用いることで、各種の微生物の検出に用いる特異的抗体を作製することができる。

[寄託された微生物への言及]

寄託した寄託機関

名称: 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名: 日本国茨城県つくば市東１丁目１－３

当該寄託機関に微生物を寄託した日付: 平成 11 年(1999)7 月 28 日

当該寄託機関が寄託について付した受託番号: FERM BP-6807

請求の範囲

１．微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であって、当該微生物に特異的に反応する抗体。

２．微生物のリボソーム蛋白質が Ribosomal Protein L7/L12 である、請求の範囲１に記載の抗体。

３．微生物が性行為感染症(STD、Sexually transmitted disease) 原因微生物である請求の範囲１または２に記載の抗体。

４．微生物が呼吸器系感染症原因微生物である請求の範囲 1 または 2 に記載の抗体。

５．呼吸器系感染症原因微生物が Haemophilus influenzae である請求の範囲４に記載の抗体。

６．呼吸器系感染症原因微生物が Streptococcus pneumoniae である請求の範囲４に記載の抗体。

７．性行為感染症(STD、Sexually transmitted disease) 原因微生物が Neisseria gonorrhoeae である請求の範囲３に記載の抗体。

８．Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体であって、配列表配列番号：２２のアミノ酸配列において 115 番目のアラニンを含む 5 から 30 アミノ酸の長さの連続する部分アミノ酸配列を認識する抗体であることを特徴とする請求の範囲７に記載の抗体。

９．各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いることを特徴とする微生物検出方法。

１０．各種の微生物について請求の範囲 1 から 8 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする微生物検出方法。

１１．各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いることを特徴とする微生物検出用試薬キット。

１２．各種の微生物について請求の範囲 1 から 8 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする微生物検出用試薬キット。

１３．遺伝子操作手法によりあるいは微生物からの単離精製により得られ

た微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質、その部分ペプチド、またはその部分ペプチドに相当する合成ペプチドを免疫源とすることを特徴とする請求の範囲 1 から 8 に記載の抗体の作製方法。

* C L M S *