

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-89571

(P2007-89571A)

(43) 公開日 平成19年4月12日(2007.4.12)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 B	4 B 0 6 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 8 5	
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 F	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2006-224432 (P2006-224432)	(71) 出願人	504300088
(22) 出願日	平成18年8月21日 (2006.8.21)		国立大学法人帯広畜産大学
(31) 優先権主張番号	特願2005-248762 (P2005-248762)		北海道帯広市稲田町西2線11番地
(32) 優先日	平成17年8月30日 (2005.8.30)	(74) 代理人	110000109
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	度会 雅久
			北海道中川郡幕別町札内泉町77-10
		(72) 発明者	鈴木 宏志
			北海道帯広市西18条南2丁目2番地56
		Fターム(参考)	4B064 AG31 CA02 CC01 DA15

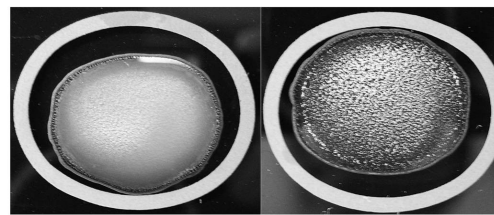
(54) 【発明の名称】 イヌのブルセラ症の血清学的診断法

(57) 【要約】

【課題】 イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原、及びこの抗原と固着したラテックスビーズ、抗原固着ラテックスビーズを用いるイヌ流産菌の診断方法及び診断用キットを提供すること。

【解決手段】 イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を製造する方法。イヌ流産菌を培養し、培養したイヌ流産菌から前記抗原を抽出し、抽出液に含まれる溶解成分を収集する。上記抗原をラテックスビーズに固着した抗原固着ラテックスビーズ。抗原固着ラテックスビーズと被験血清とを混合し、凝集像を観察することを含む、イヌ流産菌の感染診断方法。抗原固着ラテックスビーズを含むイヌ流産菌の感染診断用キット。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を製造する方法であって、
イヌ流産菌を培養し、
培養したイヌ流産菌から前記抗原を抽出し、
抽出液に含まれる溶解成分を収集することで、前記抗原を得る、前記方法。

【請求項 2】

イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原をラテックスビーズに固着することを含む、抗原固着ラテックスビーズの製造方法。

10

【請求項 3】

前記抗原が、分子量が10～30KDaの範囲の蛋白質である請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズからなる抗原固着ラテックスビーズ。

【請求項 5】

前記抗原が、分子量が10～30KDaの範囲の蛋白質である請求項4に記載の抗原固着ラテックスビーズ。

【請求項 6】

イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズと被験血清とを混合し、凝集像を観察することを含む、イヌ流産菌の感染診断方法。

20

【請求項 7】

前記抗原が、分子量が10～30KDaの範囲の蛋白質である請求項6に記載の感染診断方法。

【請求項 8】

イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズを含むイヌ流産菌の感染診断用キット。

【請求項 9】

血清希釈用生理食塩水、陽性対照血清、陰性対照血清、反应用黒色板、試薬混合用攪拌棒をさらに含む請求項8に記載の感染診断用キット。

30

【請求項 10】

前記抗原が、分子量が10～30KDaの範囲の蛋白質である請求項8または9に記載の感染診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はイヌのブルセラ症の血清学的診断法に用いるイヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原の製造方法、抗原固着ラテックスビーズの製造方法、及びイヌ流産菌の感染診断方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

イヌ流産菌に感染したイヌの血清中にはイヌ流産菌に対する抗体が産生されることが知られている。この抗体を検出することによってイヌ流産菌感染の有無を知ることができる。しかしながら、イヌ流産菌の全菌体を用いた抗原を使用した場合、イヌ流産菌に対する抗体以外の抗体にも反応するため、正確な診断ができない状況にある。(非特許文献1、2)

【非特許文献1】動物の感染症(近代出版)；犬のブルセラ病、p321-323。

【非特許文献2】獣医感染症カラーアトラス(文永堂出版)；ブルセラ、p249-260。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0003】

そこで本発明の第1の目的は、イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を提供することにある。

さらに本発明の第2の目的は、診断に用いるために、ラテックスビーズと固着した上記抗体特異的抗原を提供することにある。

さらに本発明の第3の目的は、ラテックスビーズと固着した上記抗体特異的抗原を用いるイヌ流産菌の診断方法及び診断用キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、以下の通りである。

10

(1) イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を製造する方法であって、イヌ流産菌を培養し、培養したイヌ流産菌から前記抗原を抽出し、抽出液に含まれる溶解成分を収集することで、前記抗原を得る、前記方法。

(2) イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原をラテックスビーズに固着することを含む、抗原固着ラテックスビーズの製造方法。

(3) 前記抗原が、分子量が10～30KDaの範囲の蛋白質である(1)または(2)に記載の方法。

(4) イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズからなる抗原固着ラテックスビーズ。

(5) 前記抗原が、分子量が10～30KDaの範囲の蛋白質である(4)に記載の抗原固着ラテックスビーズ。

20

(6) イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズと被験血清とを混合し、凝集像を観察することを含む、イヌ流産菌の感染診断方法。

(7) 前記抗原が、分子量が10～30KDaの範囲の蛋白質である(6)に記載の感染診断方法。

(8) イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズを含むイヌ流産菌の感染診断用キット。

(9) 血清希釈用生理食塩水、陽性対照血清、陰性対照血清、反应用黒色板、試薬混合用攪拌棒をさらに含む(8)に記載の感染診断用キット。

30

(10) 前記抗原が、分子量が10～30KDaの範囲の蛋白質である(8)または(9)に記載の感染診断用キット。

【発明の効果】

【0005】

優良盲導犬等の繁殖・育成に用いるイヌがイヌ流産菌に感染していた場合、人工繁殖およびその育成は成功しない。本発明によりイヌの人工繁殖の効率を高め、優良な盲導犬の育成をすることが可能となる。また、イヌ流産菌はヒトへも感染する病原性の高い細菌であり、ヒトへの感染のリスクを回避することも可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

40

[抗原製造方法]

本発明は、イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を製造する方法に関する。この製造方法は、(1) イヌ流産菌を培養する工程、(2) 培養したイヌ流産菌を含む溶液から前記抗原を抽出する工程、及び(3) 抽出液に含まれる溶解成分を収集する工程を含む。

【0007】

、

イヌ流産菌培養工程

イヌ流産菌の培養は、イヌ流産菌をブルセラ培地に接種し、37℃で一晩培養することで行うことができる。ブルセラ培地とは、Becton Dickinson社製の培地で栄養要求性が高い

50

ブルセラ属菌の培養用に開発された培地である。ブルセラ属菌のみが発育するような選択性のある培地ではなく、動物組織の分解産物を含み栄養価が高い培地である。

【0008】

抗原抽出工程

培養したイヌ流産菌を含む溶液中のイヌ流産菌から目的抗原を抽出する。目的抗原の抽出方法には、いくつかの方法があり、例えば、加熱処理方法、超音波破碎方法、サルコシン抽出方法、SDS抽出方法、デオキシコール酸ナトリウム抽出方法などがある。但し、加熱処理方法が目的抗原の純度が高くかつ抗原量も多いことから好ましい。抗原抽出には、培養した溶液は、そのまま用いることもできるが、培養した溶液から遠心分離等を用いてイヌ流産菌を集菌し、集菌後、例えば、生理食塩水に懸濁した後に、抗原抽出を行うこともできる。

10

【0009】

加熱処理は、例えば、オートクレーブを用い、105℃で行うことができる。加熱処理時間は、例えば、5～30分間とすることができる。超音波破碎方法は、基本的には加熱処理による抗原抽出とほぼ同様であるが、オートクレーブを用いて加熱処理した菌体を超音波破碎機を用いて、例えば、10分間処理する。

【0010】

サルコシン抽出方法は、菌体を0.5% n-ラウロイルサルコシンを含む蒸留水に懸濁し、例えば、30分間、室温で処理することで行うことができる。SDS抽出方法は、菌体を2% SDSを含む蒸留水に懸濁し、例えば、2時間、65℃で処理することで行うことができる。デオキシコール酸ナトリウム抽出方法は、菌体を、1%デオキシコール酸ナトリウムを含む蒸留水に懸濁し、例えば、20分間、100℃で処理することで行うことができる。

20

【0011】

溶解成分収集工程

抽出処理後、抽出処理により得られた溶液から溶解成分を収集する。溶解成分の収集は、溶液に含まれている不溶性成分を除去することで行われる。例えば、抽出液を遠心分離し、上清を得ることで、溶解成分の収集を行うことができる。あるいは、抽出液を濾過することでも、溶解成分の収集を行うことができる。ただし、濾過に使用する濾材は、目的とする抗原が透過できるように適宜調整する。

【0012】

このようにして得られた抗原を含有する溶液は、そのまま抗原の供給用として用いることもできるが、さらに、精製に付することもできる。精製方法としては、例えば、透析を挙げることができる。精製した溶液または未精製の溶液は、凍結し、使用時まで保存することができる。

30

【0013】

後述する実施例1に示すように、上記抽出及び溶解成分の収集により、分子量が60 KDa以下の蛋白質が得られ、その中で、B. canis感染血清に特異的に反応する抗原蛋白質を探索したところ、分子量が10～30 KDaの範囲にある蛋白質が、B. canis感染血清に特異的に反応することが判明した。従って、本発明の製造方法においては、これら分子量が10～30 KDaの範囲にある抗原蛋白質が含まれるように、上記抽出及び溶解成分の収集を行うことが適当である。

40

【0014】

本発明は、イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズからなる抗原固着ラテックスビーズを包含する。抗原固着ラテックスビーズは、上記で得られたイヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原をラテックスビーズに固着することで製造できる。

【0015】

ラテックスビーズは、例えば、ラテックスビーズ(直径0.1mm)の10%溶液として販売されており、これをこのまま使用することができる。但し、ラテックスビーズの直径及び溶液の濃度は上記に限定されない。抗原とラテックスビーズとを溶液中で混合すると、ビーズ

50

表面に抗原が物理吸着する。ラテックスビーズに対する抗原の固着量は、抗原固着ラテックスビーズの使用目的により適宜決定できるが、例えば、1%ラテックスビーズ0.4ml中に抗原が約100 μ gが固着される程度の量とすることができる。

【0016】

本発明はイヌ流産菌の感染診断方法を包含し、この感染診断方法は、イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズ（本発明の抗原固着ラテックスビーズ）と被験血清とを混合し、凝集像を観察することを含む。抗原固着ラテックスビーズは、上記本発明の抗原固着ラテックスビーズである。本発明のイヌ流産菌の感染診断方法は、例えば、抗原固着ラテックスビーズの1%溶液0.05mlを、生理食塩水で10倍に希釈した被験血清0.05mlと判定板（例えば、黒色板）の上で混合し、所定時間経過後の凝集像を観察することで、凝集の有無により感染診断ができる。

10

【0017】

本発明は、イヌ流産菌の感染診断用キットを包含し、このキットは、イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を固着したラテックスビーズ（本発明の抗原固着ラテックスビーズ）を含む。より具体的には、本発明のキットは、本発明の抗原固着ラテックスビーズに加えて、血清希釈用生理食塩水、陽性対照血清、陰性対照血清、反应用黒色板、及び試薬混合用攪拌棒をさらに含むことができる。反应用黒色板は、黒色紙板、黒色ガラス板、黒色樹脂板等であることができる。

20

【実施例】

【0018】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

実施例 1

抗原製造法

以下の1)~10)に示すステップに従って、イヌ流産菌(*Brucella canis*)に対する抗体と特異的に結合する抗原を製造した。

- 1)イヌ流産菌をブルセラ培地500mlに接種し、37℃で一晩培養する。
- 2)5,000rpm、10分間、室温で遠心分離し、菌を集める。
- 3)生理食塩水100mlに懸濁し、2)と同様に遠心分離する。この作業を3回繰り返す（菌を生理食塩水を用いて洗浄する）。
- 4)集菌後、生理食塩水30mlに懸濁し、105℃、15分間、オートクレーブを用いて加熱処理する。
- 5)9,000rpm、10分間、室温で遠心分離し、上清を集める。
- 6)上清液を-20℃で60分間凍結する。
- 7)溶解後、3,000rpm、10分間、室温で遠心分離し、上清を集める。
- 8)上清を15%ポリエチレングリコール6000溶液を用いて16時間透析する。
- 9)生理食塩水を用いて16時間透析し、抗原液とする。
- 10)すぐに使用しない場合は-20℃で凍結保存する。

30

【0019】

上記9)で得られた加熱抽出抗原をSDS-PAGEによって分離した後、メンブレンに転写し、一次抗体である*B. canis*感染血清と反応させた。結果を図2に示す。図2において、*B. canis*感染血清に特異的に反応した抗原蛋白質をHSE1(分子量28KDa)、HSE2(分子量25KDa)、HSE3(分子量18KDa)、HSE4(分子量16KDa)とそれぞれ名付けた。これら蛋白質のN末端部分のアミノ酸配列を部分的に解読し、データベースで検索したところ以下の結果が得られた。

40

HSE1: ribose ABC transporter (Genbank accession No. AAN34031.1)

HSE2: 解析不能

HSE3: superoxide dismutase [Cu-Zn] (Genbank accession No. AAN33888.1)

HSE4: 機能不明のブルセラ菌の蛋白質 (Genbank accession No. AAX74222.1)

【0020】

実施例 2

50

抗原固着ラテックスビーズの作製法

実施例1で得られた抗原を用いて、以下の1)～7)に示すステップに従って、抗原固着ラテックスビーズを作製した。

- 1)濃度300 μ g/mlに調整した抗原液0.4mlと1%ラテックスビーズ（積水化学）0.4mlを混合し、16時間、室温で攪拌する。
- 2)3,000 rpm、10分間、室温で遠心分離し、ラテックスビーズを集める。
- 3)洗浄バッファー1ml（1% BSA, 0.01% Tween20, 0.1% ポリエチレングリコール6000, 0.2% ショ糖をリン酸緩衝液に溶解したもの）に懸濁し、2)と同様に遠心分離する。この作業を3回繰り返す。
- 4)ラテックスビーズを洗浄バッファー1mlに懸濁し、室温で16時間放置する。
- 5)3,000 rpm、10分間、室温で遠心分離し、ラテックスビーズを集める。
- 6)洗浄バッファー0.4mlに懸濁し、診断薬とする。
- 7)ラテックスビーズは4℃で3ヶ月間保存可能であることが確認済みである。製品の性質上、半年以上は保存可能である。

10

【0021】

さらに、上記9)で得られた加熱抽出抗原をSDS-PAGEによって分離した後、透析・電気抽出用チューブ（Novagen社）を用いて4種類の蛋白質HSE1～4を抽出した。HSE1～4のそれぞれ1つを、上記と同様の方法でラテックスビーズに吸着させ、凝集反応を行ったところ、すべての抗原において凝集することが確認された。以上の結果から、HSE1～4のそれぞれ単体でも凝集用の抗原として有用であることが示された。

20

【0022】

実施例3

診断法

実施例2に記載した方法により作製した抗原固着ラテックスビーズを用いてイヌ流産菌の感染診断を行った。診断用ラテックスビーズ0.05mlと生理食塩水を用いて10倍希釈した被験血清0.05mlを付属の黒色板の上に滴下し、両液を付属の攪拌棒を用いて混合する。10分間室温に放置し、凝集像を観察する。試験例の結果を図1に示す。

【0023】

図1はラテックスビーズ抗原0.05mlと10倍希釈したイヌ血清0.05mlを混合し、室温で10分間放置した場合の反応例を示している。左がブルセラ症陰性の対照血清、右が陽性血清をそれぞれ示している。右は大きな凝集塊が認められ、陽性と判定される。一方、左には変化は認められない。

30

【0024】

イヌ流産菌と抗原性が交差すると言われている大腸菌、サルモネラ菌、黄色ブドウ球菌、連鎖球菌に対する抗血清を同様の方法で検討した結果、全く凝集反応が認められなかった。そのため、本診断薬はイヌ流産菌の感染血清に特異的に反応していると考えられる。

【0025】

実施例4

実施例1では、加熱処理法により、目的抗原を抽出したが、加熱処理以外の抽出法によっても抗原を得た。各抽出方法は以下の通りである。

40

超音波破碎：基本的には加熱処理抽出と同様であるが、オートクレーブを用いて加熱処理した菌体を超音波破碎機を用いて10分間処理した。

サルコシン抽出抗原：菌体を0.5% n-ラウロイルサルコシンを含む蒸留水に懸濁し、30分間、室温で処理した。以降の精製作業は加熱処理抽出と同様である。

SDS抽出抗原：菌体を2% SDSを含む蒸留水に懸濁し、2時間、65℃で処理した。以降の精製作業は加熱処理抽出と同様である。

デオキシコール酸ナトリウム抽出抗原：菌体を1%デオキシコール酸ナトリウムを含む蒸留水に懸濁し、20分間、100℃で処理した。以降の精製作業は加熱処理抽出と同様である。

【0026】

50

得られた各抗原のウエスタンブロッティングによる解析を図3に示す。サルコシンおよびデオキシコール酸ナトリウム抽出抗原では70～75KDa付近に非特異抗原が認められるが、加熱抽出抗原では認められない。

【0027】

さらに、これらの抽出抗原を、実施例2と同様にしてラテックスビーズに固着させ、凝集反応を行なった。その結果、実施例1に示した加熱抽出抗原が、超音波破碎抗原、SDS抽出抗原に比べて、固着される抗原量が多く反応性が高かった。また、サルコシン抽出抗原、及びデオキシコール酸ナトリウム抽出抗原は非特異的な反応も認められた。これらの結果及び図3に示すウエスタンブロッティングの結果から、実施例1に示した加熱抽出法による抗原が最も優れていた。

10

【産業上の利用可能性】

【0028】

本発明はイヌのブルセラ症の血清学的診断の分野に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0029】

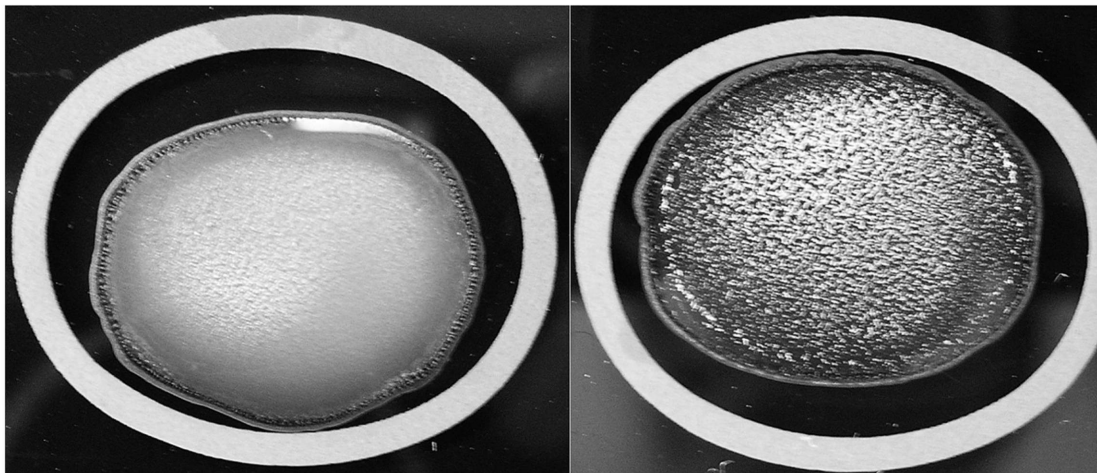
【図1】本発明の抗原固着ラテックスビーズを用いたイヌ流産菌の感染診断方法における、凝集前の像(左)と凝集像(右)を示す。

【図2】実施例1の9)で得られた加熱抽出抗原をSDS-PAGEによって分離した後、メンブレンに転写し、一次抗体であるB. canis感染血清と反応させた結果を示す。

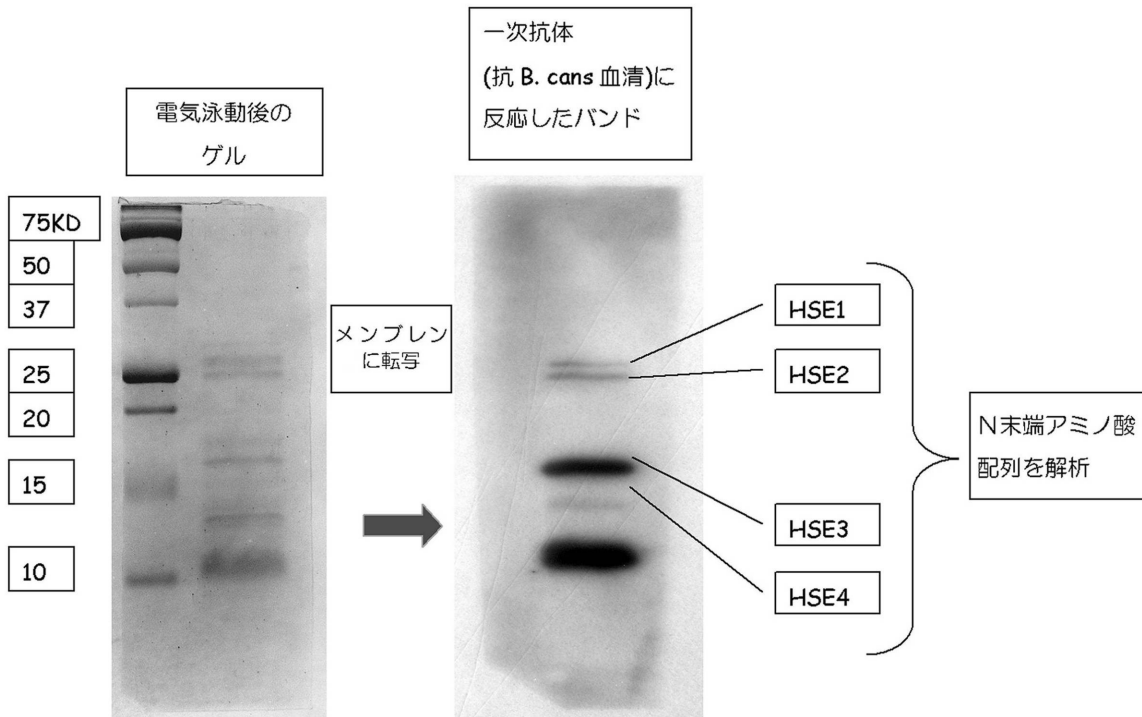
【図3】各抽出法により得られた抗原のウエスタンブロッティングによる解析結果を示す。

20

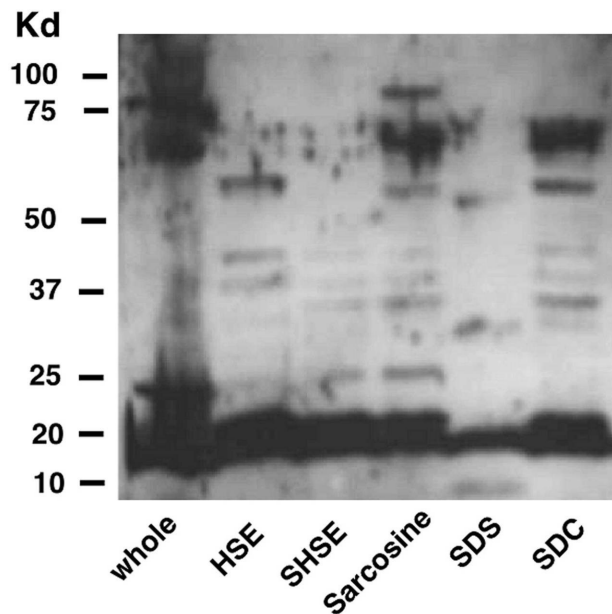
【図1】



【図 2】



【図 3】



whole:無処理全菌体、HSE:加熱抽出抗原、SHSE:超音波破碎抗原、
sarcosine: sarcosine 抽出抗原、SDS: SDS 抽出抗原、
SDC: デオキシコール酸ナトリウム抽出抗原