

(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2008-222590

(P2008-222590A)

(43) 公開日 平成20年9月25日(2008.9.25)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|----------------|-------------|
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | 4B064 |
| A61K 39/395 (2006.01) | A61K 39/395 R | 4C085 |
| A61P 31/04 (2006.01) | A61P 31/04 | 4H045 |
| A61P 15/06 (2006.01) | A61P 31/04 171 | |
| A61P 15/08 (2006.01) | A61P 15/06 | |
| 審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2007-60015 (P2007-60015)

(22) 出願日 平成19年3月9日(2007.3.9)

(71) 出願人 504300088

国立大学法人帯広畜産大学

北海道帯広市稲田町西2線11番地

(74) 代理人 110000109

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

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA01

4C085 AA14 BA17 BB36 CC02 CC07

CC23 DD23

4H045 AA11 BA10 CA40 DA50 EA29

FA72 GA26

(54) 【発明の名称】 ブルセラ属菌感染による流産および不妊の防止法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ブルセラ属菌に対する治療および/または感染予防に有効な抗体の提供。

【解決手段】ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体に対する抗体。ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体が、熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質である。熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質がheat shock cognate protein 70 (Hsc70)である。家畜、ペット動物またはヒトに用いられる該抗体を用いたブルセラ属菌感染予防および/または治療剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体に対する抗体。

【請求項 2】

ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体が、熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質がheat shock cognate protein 70 (Hsc70)である請求項 2 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】

ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)への感染予防および/または阻害に用いられる請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体を有効成分として含有する流産または不妊の予防および/または治療剤。

【請求項 7】

家畜、ペット動物またはヒトに用いられる請求項 6 に記載の予防および/または治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ブルセラ属菌感染による流産および不妊の防止に有用な、抗体およびこの抗体を用いる流産または不妊の予防および/または治療剤に関する。特に本発明は、家畜およびヒトに流産を引き起こすブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体に対するモノクローナル抗体を用いた細菌感染による流産および不妊を防止する方法に関連する発明である。

【背景技術】

【0002】

ブルセラ属菌はヒト、家畜、ペット動物および野生動物に広く感染し、流産・不妊を引き起こす。これまで感染機構が不明であったため、菌感染による流産・不妊を予防する方法は存在しなかった。(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】

【0003】

ブルセラ属菌は細胞内寄生菌であるため抗生物質による治療が困難とされ、有用な治療法および感染予防法の開発が期待されていた。

【0004】

そこで本発明の目的は、ブルセラ属菌に対する治療および/または感染予防に有効な手段を提供することにある。

【0005】

本発明者らはブルセラ属菌の感染機構を解明し、それを基盤とした感染予防法の構築を試みた。その結果、ブルセラ属菌は胎盤の栄養膜巨細胞に特異的に感染することを見出し、栄養膜巨細胞上に存在する菌に対する受容体を同定した。この受容体に対するモノクローナル抗体を投与することによって、ブルセラ属菌感染による流産および不妊を防止できることを見いだして本発明を完成させた。

【課題を解決するための手段】

【0006】

10

20

30

40

50

本発明は、以下のとおりである。

- [1]ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体に対する抗体。
- [2]ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体が、熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質である[1]に記載の抗体。
- [3]熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質がheat shock cognate protein 70 (Hsc70)である[2]に記載の抗体。
- [4]モノクローナル抗体である[1]~[3]のいずれかに記載の抗体。
- [5]ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)への感染予防および/または阻害に用いられる[1]~[4]のいずれかに記載の抗体。
- [6][1]~[4]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する流産または不妊の予防および/または治療剤。
- [7]家畜、ペット動物またはヒトに用いられる[6]に記載の予防および/または治療剤。

10

【発明の効果】

【0007】

流産・不妊は家畜およびペット動物の生産者に経済的打撃を与えているが、本発明によれば、家畜およびペット動物の流産・不妊を防止でき、経済効率を高めることができる。本発明のモノクローナル抗体はブルセラ属菌の細胞内感染を阻止するため抗生物質を用いた治療が容易になると期待される。ヒトの流産・不妊治療への応用可能もあると考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0008】

[発明の経緯]

本発明者らは、ブルセラ属菌(ウシ流産菌、*Brucella abortus*)の胎盤における感染機構を解明するためにマウスを用いた感染流産モデルを確立した。このマウスモデルを用いて解析したところ、以下の成果が得られた。

- 1) ウシ流産菌は胎盤中に存在する栄養膜巨細胞に特異的に感染する。
- 2) 栄養膜巨細胞への感染能を欠くウシ流産菌変異株は流産を引き起こさない。

【0009】

以上の結果から、ウシ流産菌の栄養膜巨細胞への感染が流産の引き金になるものと考えられる。ウシ流産菌は栄養膜巨細胞へ特異的に感染することがら、栄養膜巨細胞上にウシ流産菌に対する受容体が存在するものと予測された。この受容体を同定するために以下の方法を試みた。

30

【0010】

- 1) マウス栄養膜巨細胞をラットに免疫し、栄養膜巨細胞を認識するモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体の作製は一般的に用いられている常法に従って行われた。
- 2) 1920種のモノクローナル抗体を作製した。この抗体を栄養膜巨細胞の培養液に加え、ウシ流産菌の感染を阻害する抗体を選別した。
- 3) 選別の結果、ウシ流産菌の栄養膜巨細胞への感染を高率に阻害するモノクローナル抗体を1種類分離することができた(R2 25と命名)。
- 4) この菌の感染を阻害するモノクローナル抗体がどのような蛋白質と反応するか調べたところ、heat shock cognate protein 70 (Hsc70)という熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質であることが判明した。

40

以上の結果から、Hsc70がウシ流産菌に対する受容体であると考えられた。

【0011】

本発明は、ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体に対する抗体に関する。ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)の宿主細胞側受容体は、より詳しくは、熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質である。さらに、熱ショック蛋白質Hsp70ファミリーに属する蛋白質は、heat shock cognate protein 70 (Hsc70)である。

【0012】

50

本発明の抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましいが、ポリクローナル抗体であることもできる。

【0013】

以下、Hsc70に対するモノクローナル抗体について説明する。

Hsc70に対するモノクローナル抗体のサブクラスはIgG1であり、牛のHsc70にも反応する。

【0014】

抗体の製造法は以下のとおりである。詳細は実施例に示す。

1) Hsc70に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、10%Briclone(細胞増殖因子、大日本製薬が販売)を含むダルベッコ変法イーグル培地に37℃、炭酸ガス培養器で培養する。

2) 細胞が80%程度飽和状態になったところで、培養上清液を2,500rpm、10分間遠心分離することによって集める。

3) 集めた上清液中に含まれるIgGを、プロテインGカラムを用いて精製する。またこのとき、上清液中に飽和硫酸アンモニウムを最終濃度が50%になる様に加え塩析し、沈殿物を、プロテインGカラムを用いて精製しIgGを得ることもできる。

4) 精製したモノクローナル抗体は80℃で凍結保存する。

【0015】

本発明の抗体は、ブルセラ属菌(*Brucella* spp.)への感染予防および/または阻害に用いられる。

【0016】

例えば、本発明の抗体を有効成分として含有する流産または不妊の予防および/または治療剤を提供することができる。

【0017】

予防および/または治療剤として用いる場合には、(1)投与量は、例えば、マウスの場合には200μg/マウスとし、(2)投与経路は、例えば、腹腔内接種とし、(3)投与時期は、例えば、感染する24時間以上前(予防の場合)とすることができる。また、キャリアーとともに接種できるが、通常は、生理食塩水あるいはリン酸緩衝液に懸濁して接種することが適当である。

【0018】

本発明の予防および/または治療剤は、家畜またはヒトに用いられる。家畜およびペット動物としては、例えば、牛、豚、山羊、羊、犬等を挙げることができる。

【実施例】

【0019】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0020】

[実験方法]

1) 栄養膜巨細胞を認識するモノクローナル抗体の作製:

a) 栄養膜巨細胞をアジュバント(TiterMax Gold)と混合しWister系ラットに0.1ml腹腔に接種し免疫する。

b) 2週間後に再度、0.1ml腹腔に接種し免疫する。

c) 2週間後に免疫ラットから脾臓を摘出、破碎する。

d) 破碎液中に含まれるBリンパ球とマウスミエローマ細胞株P3 X63 Ag8.653を常法(PEG法)により融合させる。

e) 融合細胞の中で栄養膜巨細胞に反応するモノクローナル抗体を免疫蛍光染色法により選別し、プロテインGカラムを用いて精製する。

【0021】

2) ウシ流産菌の感染を阻害する抗体の分離:

栄養膜巨細胞に反応するモノクローナル抗体を栄養膜巨細胞の培養液に加え、これにブルセラ属菌を感染させ、菌の感染を阻害する抗体を選別する。菌の細胞内における増殖の

10

20

30

40

50

測定は申請者らが報告した方法を用いた (Watarai, M., Makino, S I. and Shirahata, T . (2002) An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside triphosphate binding domain. *Microbiology* 148: 1439 1446.)。

【 0 0 2 2 】

3) モノクローナル抗体R2 25の分離：

1920個のモノクローナル抗体の中から、ウシ流産菌の感染を阻害する抗体を分離し、これをR2 25と命名した。

【 0 0 2 3 】

4) モノクローナル抗体R2 25と反応する蛋白質の同定：

栄養膜巨細胞の外膜蛋白質の外膜蛋白質をSDS PAGEで分離した後、蛋白質をPVDF膜に転写した。モノクローナル抗体R2 25と反応する蛋白質を切り出し、質量解析(LC MS/MS)を行うことによって、切り出した蛋白質のアミノ酸配列を部分的に決定した。MASCOTデータベース検索により検出されたアミノ酸配列がHsc70と一致することが判明した。

【 0 0 2 4 】

[結果]

ウエスタンブロッティングの結果(図1)。

レーン1は栄養膜巨細胞の外膜蛋白質をSDS PAGEで分離した後、CBBで染色した結果。レーン2は外膜蛋白質をPVDF膜に転写した後R2 25と反応させた。70kDaの蛋白質(Hsc70)と反応している。

【 0 0 2 5 】

モノクローナル抗体によるウシ流産菌の栄養膜巨細胞への感染阻害(図2)。

R2 25は我々が分離したHsc70に対するモノクローナル抗体で、濃度依存的に菌の感染を阻害する。Rat IgGは対照の抗体で、変化は認められない。*は有為差を示す(P<0.01)。

【 0 0 2 6 】

このモノクローナル抗体を妊娠3.5日後のマウスに投与し、その24時間後にウシ流産菌を腹腔内接種したところ、菌感染による流産が防止された(図3)。モノクローナル抗体のみを投与したマウスに流産は認められず、抗体が妊娠に与える影響はないものと考えられる。WTはウシ流産菌野生株、*は有為差を示す(P<0.01)。

【 0 0 2 7 】

[考察]

胎盤中の栄養膜巨細胞上に発現するHsc70はウシ流産菌に対する受容体として働き、Hsc70に対するモノクローナル抗体はウシ流産菌の栄養膜巨細胞への感染を阻害する。この感染阻害効果により、菌感染によって引き起こされる流産も阻害されることが明らかとなった。

【 0 0 2 8 】

上記実験はマウスモデルで解析した結果であるが、牛で同様の効果が得られると期待される。何故なら、牛の場合においても、ウシ流産菌は胎盤中の栄養膜巨細胞へ感染することが他の研究者らの報告(Anderson TD, Cheville NF. (1986) Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus* infected trophoblasts in experimental placentitis. *Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum*. *American Journal of Pathology*, 124: 226 237.)により示されている。本発明者らが分離したモノクローナル抗体は牛のHsc70にも反応することが分かっているため、牛においても同様の効果が期待できる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 2 9 】

畜産あるいはペット動物のブルセラ属菌感染による流産および不妊の防止の分野に特に有用である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 】 ウエスタンブロッティングの結果を示す。

10

20

30

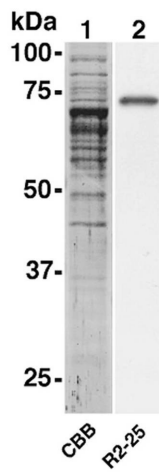
40

50

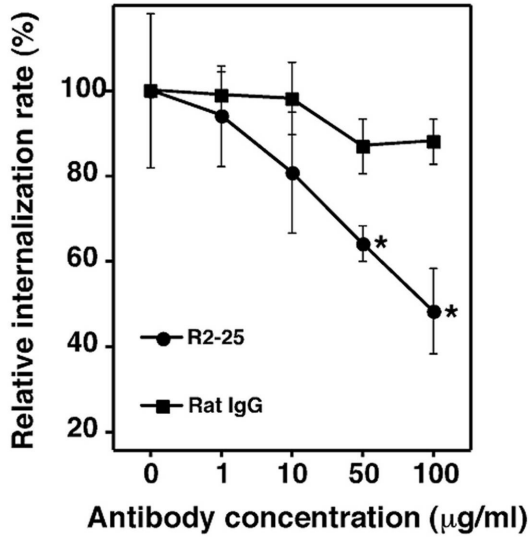
【図2】本発明のモノクローナル抗体によるウシ流産菌の栄養膜巨細胞への感染阻害を示す結果である。

【図3】本発明のモノクローナル抗体による、菌感染による流産防止効果の確認結果を示す。

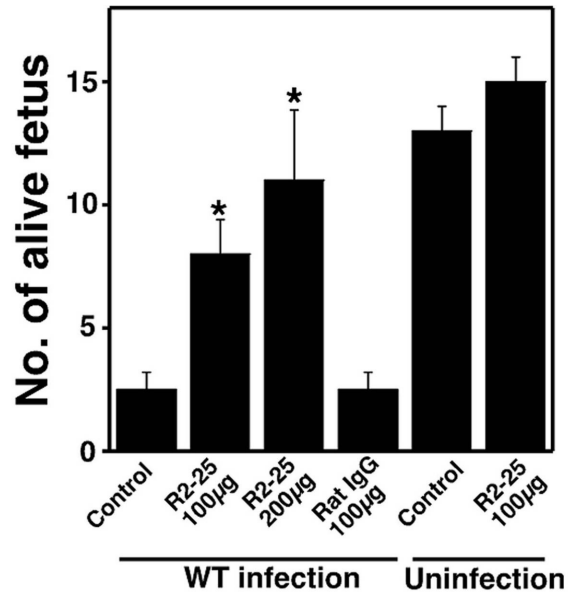
【図1】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード(参考) |
|-------------|-------|-----------|---------|-------------|
| A 6 1 P | 15/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 15/08 |
| C 1 2 P | 21/08 | (2006.01) | A 6 1 P | 15/00 1 7 1 |
| | | | C 1 2 P | 21/08 |