

(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2004-91453

(P2004-91453A)

(43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 16/44</b>	CO7K 16/44	4B064
<b>C12P 21/08</b>	C12P 21/08	4H045
<b>GO1N 33/53</b>	GO1N 33/53	
<b>GO1N 33/577</b>	GO1N 33/577	Q
		B

審査請求 未請求 請求項の数 3 書面 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2002-291666 (P2002-291666)	(71) 出願人	598118503 正山 征洋 福岡県春日市上白水1217-1
(22) 出願日	平成14年8月29日 (2002.8.29)	(72) 発明者	田中 宏幸 福岡県福岡市東区箱崎2-16-47-202
特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年3月5日 日本薬学会第122年会組織委員会発行の「日本薬学会第122年会講演要旨集」に発表		(72) 発明者	正山 征洋 福岡県春日市上白水1217-1
		Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA50 FA72

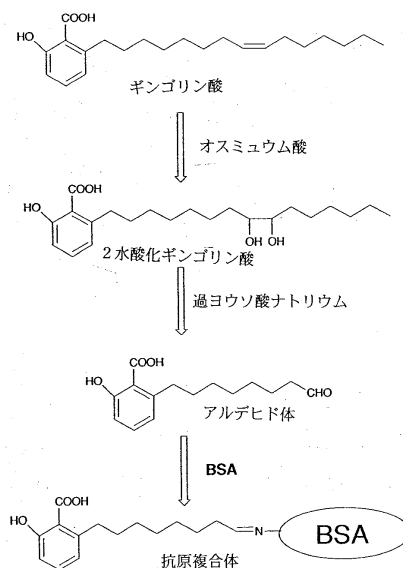
(54) 【発明の名称】モノクローナル抗体及びその製造方法並びにモノクローナル抗体を用いた抗原の定量方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】イチヨウ由来の接触性アレルギー惹起成分であるギンゴリン酸とその関連化合物に対する抗体とこれを用いた分析方法を提供する。

【解決手段】ギンゴリン酸及び関連化合物に対する抗体は、ギンゴリン酸の一部を切断し、アルデヒド体を得てEDCを用いたカルボジイミド法により、アルデヒド体のカルボキシル基とウシ血清アルブミン(BSA)等のタンパク質のリジン残基と結合して抗原性を付与した後、動物に免疫した。免疫後脾臓細胞を単離し、ポリエチレングリコールを用いてミエローマ細胞と融合する。HAT培地で融合細胞(ハイブリドーマ)のみを選抜する。ハイブリドーマを限界希釈法でクローニングする。これらの中から、アルデヒド体-ヒト血清アルブミン(HSA)複合体を用いて選抜し、抗ギンゴリン酸モノクローナル抗体(MAb)を生産するハイブリドーマを単離する。定量分析法は、標識化免疫定量法により行われる。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ギンゴリン酸 ( G A ) に対するモノクローナル抗体 ( M A b ) 。

**【請求項 2】**

G A をオスミウム酸で酸化し 2 水酸化体を得、このものを過ヨウ素酸酸化してアルデヒド体を得る ( G a l ) 。本化合物をタンパク質と共有結合させたものを抗原として抗体を作成する抗体の製造方法。

**【請求項 3】**

タンパク質と共有結合した G a l を吸着させたウエルに G A 関連化合物溶液を添加し、更に請求項 1 に記載の M A b を加えてインキュベートした後にウエルを洗浄し、標識化免疫定量法を用いて G A 関連化合物溶液中の G A 関連化合物を定量する M A b を用いた抗原の定量方法。

10

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明に属する技術分野】**

本発明はイチヨウ葉その他のアレルギー惹起成分である G A に対する M A b を生産するハイブリドーマに関する。

**【0002】****【従来技術】**

細胞融合技術は、ケーラーとミルスタインの報告 ( Nature , 495 - 497 頁、1975 年 ) 以来急速に発展した。哺乳動物の脾細胞と癌細胞であるミエローマ細胞を融合させた雑種細胞をハイブリドーマと称する。ハイブリドーマは用いた脾細胞が産生する抗体産生能を有することから、多くの蛋白質やペプチドの様な高分子化合物に対する抗体の生産に用いられてきた。

20

**【0003】**

一方、本出願人は通常は抗原とは成りえないイチヨウ葉をはじめとする植物の接触アレルギー惹起成分に対する M A b を産生するハイブリドーマを作製する。G A はアレルギーを引き起こす植物成分で、その含量はアレルギー惹起のマーカーとなる重要な成分である。

**【0004】****【発明が解決しようとする課題】**

接触アレルギーを引き起こす植物中の G A の含有量は極めて低含量なので、その検出は容易ではない。このため前処理を必要とせず、再現性があり、かつ高感度なアッセイ系が要求される。これに対応出来るのは M A b 以外にない。

30

**【0005】****【課題を解決するための手段】**

本発明者等は、上述の問題点を解決すべく研究を重ねた結果、細胞融合により G A に対する、M A b を産生するハイブリドーマを得、本ハイブリドーマを培養することによって抗 G A 抗体を大量に生産することに成功した。本抗体を用いることによって高感度、再現性良好な、かつ前処理を必要としないアッセイ系を完結した

**【0006】****【発明実施の形態】**

抗 G A M A b を生産するハイブリドーマは以下の様に作成する。すなわち、( 1 ) 抗原として G a l - B S A 複合体を免疫した動物の抗体産生脾臓細胞を作成する。( 2 ) ミエローマ細胞を培養増殖し調整する。( 3 ) 上記 2 種の細胞をポリエチレングリコールを媒体として融合する。( 4 ) 得られたハイブリドーマを H A T 培地にて選抜する。( 5 ) 抗 G A M A b 生産ハイブリドーマを選抜する。( 6 ) 選抜ハイブリドーマをクローニングする。これらの行程について詳細に説明する。

40

**【0007】****( 抗体産生細胞の調整 )**

G a l - B S A 複合体を動物に免疫する。免疫法としてはフロイントのコンプリートアジ

50

ユバンドを併用する手法がとられる。動物としてはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジなどが例示される。抗体産生細胞としては脾臓、リンパ節、抹消血液等から分離した細胞が使用される。

## 【0008】

(骨髄腫細胞の調整)

細胞融合に使用する骨髄腫細胞は特に限定されず、各種の哺乳動物の細胞株が利用可能であるが、抗体産生細胞の調整に用いた動物と同種の細胞株を使用するのが好ましい。用いる細胞株は細胞融合の後に、未融合の骨髄腫細胞が選択培地で生存できず、ハイブリドーマのみが増殖可能なようにすることによって、未融合細胞と融合細胞を選別することを考慮して、特定の薬剤抵抗性を有するものが好ましい。例えば8-アザグアニン抵抗性の細胞は、HAT培地中で生育できない性質を有するため好んで用いられる。具体的には、マウス骨髄腫細胞株、PA1, P3-X63-Ag8, P3-X63-Ag8-UI, P3-NSI/1-Ag4-1, X63-Ag8-6.5.3., SP2/0-Ag14, FO, S194/5XOXO, BU.1, MPC11-45.6., TG.1.7等が用いられる。

10

## 【0009】

(融合細胞)

細胞融合は通常MEM培地、RMI1640培地、IMDM培地等のe-RDF培地中で、骨髄腫細胞と抗体産生細胞を混合(混合比は通常1:4-1:10)することにより行われる。融合促進剤としては平均分子量1000-6000のポリエチレングリコール(PEG)が使用できる。PEGの使用濃度は通常30-50%である。

20

## 【0010】

(ハイブリドーマの選択的増殖)

融合を終えた細胞は、10%FCS含有e-RDF培地などで適当に希釈し、遠心分離する。沈査を選択培地(例えばHAT培地)で浮遊し、96穴ウエルマイクロプレートに接種した後に、5%炭酸ガス培養装置で培養する。選択培地で生育してくる細胞はハイブリドーマである。

## 【0011】

(抗体産生ハイブリドーマの検索)

抗体産生ハイブリドーマの検索は常法に従えばよく、特に限定されない。例えばハイブリドーマの増殖した培養液を採取し、Gal-HSAと反応させ、酵素、蛍光物質、発光物質などでラベルした2次抗体との反応により検索できる。

30

## 【0012】

(クローニング)

抗体産生ハイブリドーマを含むことを確認した培養ウエル中の細胞を限界希釈法などによりクローニングを行い、MAb産生ハイブリドーマを得る。以上の操作により抗GA MAb産生ハイブリドーマ9Fを得た。このハイブリドーマはGAに対する特異的なMAbを産生する新規な細胞である。

## 【0013】

(抗GA MAbの調整)

上記で得られたハイブリドーマを適切な培地中で培養することにより、その培養上清から本発明MAbが得られる。大量に生産する方法としては骨髄腫細胞由来動物と同種の動物にプリスタン等の鉱物油を腹腔内投与後、ハイブリドーマを接種する。接種後、腹水を採取し、通常の抗体分離操作により抗GA MAbを得る。また、無血清培地で培養し、通常の手法で抗GA MAbを得る。

40

## 【0014】

(抗GA MAbのキャラクタリゼーション)

精製した抗GA-MAbのサブクラスはIgG1で、軽鎖は鎖であることを通常の方法で決定した。

## 【0015】

50

(発明の効果)

本抗体は特異性が高いので通常のELISAに用いることにより、再現性が高く、高感度、かつ前処理が不要な定量が可能である。

【0016】

【実施例】

(抗GA MA b産生ハイブリドーマの製造)

(抗原の調整)

GA 9.3 mgをジオキサン-ピリジン(8:1, 0.9 ml)に溶解し、オスミウム酸14 mgをジオキサン0.5 mlに溶解した溶液を滴下し、窒素気流中20時間室温で反応した。反応後16%硫酸ナトリウム液8 mlとメタノール2 mlを加えた。遠心を行い沈澱をクロロフォルム-メタノール(1:1; 1 ml)で洗浄する。上清と洗浄液をまとめて減圧下溶媒を留去する。残渣を薄層クロマトによりジエチルエーテル-石油エーテル-ギ酸(30:70:1)で展開し精製して2水酸化ギンゴリン酸を得た。本化合物2.6 mgをメタノールに溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム2.2 mgを1 mlの水に溶解した液を滴下し1時間室温で反応する。BSA(3 mg)を含むcarbonate buffer solution(pH 9.6, 1 ml)を上記反応液と混合し室温した5時間反応を行い免疫源を調整した(図1参照)。なおELISAで使用するGal-HSAについても同様な方法で作製した。

10

【0017】

(抗原中のハプテン数の検討)

得られたGal-BSA抱合体の微量をとり、過剰のシナピン酸を添加して混合する。混合物の少量をカセットのウエルに入れ、マルデイトフマスにて測定する(図2)。

20

【0018】

(免疫脾細胞の調整)

Gal-BSA抱合体50 µgをフロイント-コンプリート-アジュバントに乳濁化させ、BALB/C系マウスの腹腔内に投与した。以後、2週間後50 µgのGal-BSA抱合体溶液を投与し、最後にGal-BSA抱合体溶液を100 µg投与し免疫を完了した。4日後にマウスを麻酔下屠殺し、脾臓を摘出した。脾臓を細断した後、100メッシュのナイロン網でろ過し、脾臓細胞を得た。

30

【0019】

(ハイブリドーマの調整)

単離した免疫脾細胞に低張液(155 mM塩化アンモニウム)を加えて赤血球を溶血した後、e-RDF培地で細胞を3回洗う。マウス骨髄腫細胞もe-RDF培地で3回洗浄した。両細胞数を計測し脾細胞と骨髄腫細胞を10:1の割合として遠心をする。上清を捨て、沈殿した細胞を充分解きほぐし、ポロエチレングリコール(PEG)4,000を培地で希釈した50%液を1.0 ml滴下して融合を行った。37、30秒間静置した後、e-RDF培地5 mlを5分間かけて添加した。1,000 rpmで10分間遠心した。沈殿を10%FCS添加IMDMにより洗い、遠心して上清を捨てた。ヒポキサンチン $10^{-2}$  M、アミノプテリン $4 \times 10^{-7}$  Mおよびチミジン $1.5 \times 10^{-5}$  Mを加えた(HAT-)10%FCS添加e-RDF培地を用いて沈殿を再び浮遊させ、96ウエルマイクロプレートに100 µlずつ分注した。3日毎に同一培地を50 µl追加し、細胞の増殖を確認した。

40

【0020】

(抗体産生ハイブリドーマの検索)

ハイブリドーマが増殖したウエルの液を採取し、Gal-HSA抱合体を結合させた別のウエルに添加し、直接ELISAによりGAに対するMA b産生ハイブリドーマを検索した。即ち、96ウエルマイクロプレートにGal-HSA抱合体0.1 µg/100 µl/ウエルを分注し、37で1時間インキュベートしてウエルに吸着させた。このウエルに培養上清を100 µlずつ分注し抗原抗体反応を行った。0.05% Tween 20含有リン酸緩衝食塩水(T-PBS)で3回洗浄した。パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス

50

I g G 抗体 1 0 0 0 倍希釈液をウエルあたり 1 0 0  $\mu$  l 添加し、1 時間後に T P B S で洗淨した。0 . 0 0 3 % 過酸化水素、A B T S 0 . 3 m g / m l 含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。2 0 分後プレートリーダーを用いて 4 0 5 n m の波長で吸光度を測定した。発色したウエルの細胞を採取した。

【 0 0 2 1 】

( 抗 G A M A b 産生ハイブリドーマのクローニング )

抗体産生ハイブリドーマを限界希釈してウエルに分注した。抗体産生能を持ち、かつ増殖したハイブリドーマを同様に 3 回クローニングしてクローンを得た。

【 0 0 2 2 】

( 抗 G A M A b の調整 )

上記の抗体産生ハイブリドーマを無血清培地 ( 1 0  $\mu$  g / m l インスリン、3 5  $\mu$  g / m l トランスフェリン、2 0  $\mu$  M エタノールアミン、2 5 n M セレニウム添加 e R D F 培地 ) で 3 7  $^{\circ}$ C、炭酸ガス培養器で培養した。上清をプロテイン G F F カラムを用いて精製した。即ち、上清をトリス緩衝液で p H 7 に調整し、カラムに付す。カラムを 1 0 m M リン酸緩衝液で洗淨後、吸着している抗体を 1 0 0 m M クエン酸緩衝液で溶出する。得られた抗体溶液は水に対して 4 回透析し、最後に凍結乾燥して精製抗体を得た。

【 0 0 2 3 】

( 競合的 E L I S A による定量 )

G a l - H S A 抱合体溶液 ( 1  $\mu$  g / m l ) を 5 0  $\mu$  l ずつウエルに添加し 1 時間反応し吸着させる。比特異的結合を除去するために 5 % スキンミルク添加 P B S 溶液 3 0 0  $\mu$  l を加え 1 時間反応してブロッキングする。5 0  $\mu$  l の各種濃度の試料溶液を加え、さらに抗 G A M A b 溶液 ( 1  $\mu$  g / m l ) 5 0  $\mu$  l を添加して 1 時間インキュベートした。T P B S で 3 回洗淨し、1 0 0 0 倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス抗体 1 0 0  $\mu$  l を加え 1 時間反応した。1 時間後に T P B S で洗淨した。0 . 0 0 3 % 過酸化水素、A B T S 0 . 3 m g / m l 含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。1 5 分後に発色を 4 0 5 n m で測定。各濃度の G A の吸光度から検量線を作成した ( 図 3 ) 。

【 0 0 2 4 】

( 交差反応性の調査 )

G A および関連アルキールフェノールカルボン酸の植物固有の化合物を測定した。表 1 に見られる通り、接触性アレルギーを惹起するアルキールフェノールカルボン酸類に特異的に親和性を持つ抗体であることが明らかとなった。その他の成分には殆ど交差反応性を示さなかった ( 図 4 の構造式参照 ) 。

10

20

30

表1 抗体9Fのギンゴリン酸及び関連化合物に対するクロスリアクション。

化合物	クロスリアクション (%)	
ギンゴリン酸	100	
オリベトール酸	54.2	
デバリノール酸	9.98	
カンナビゲロール酸	<0.025	10
サリチル	<0.025	
フェニールサリチル	<0.025	
安息香酸	<0.025	
カフェイン	<0.025	
桂皮酸	<0.025	
タンニン酸	<0.025	
ジンジェラル	<0.025	
ホモゲンチジン酸	<0.025	20
安息香酸メチル	<0.025	
パラアミノ安息香酸メチル	<0.025	
ナリンジン	<0.025	
ニコチン酸	<0.025	
パラアミノ安息香酸	<0.025	
フェニールエタノール	<0.025	
バニリン酸	<0.025	30

## 【図面の簡単な説明】

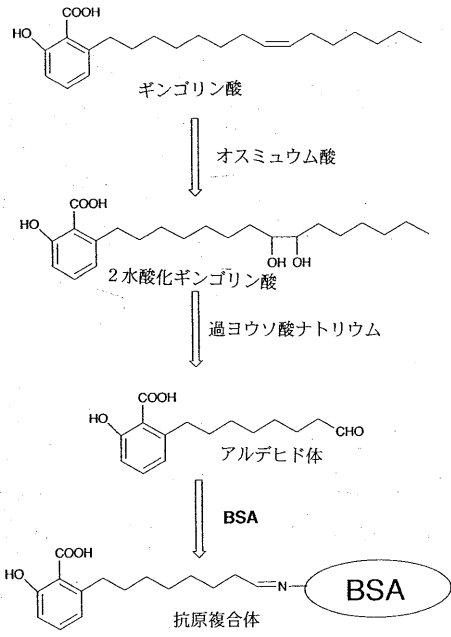
【図1】ハプテン-タンパクコンジュゲートの合成法。

【図2】実施例の抗原のハプテン数を調査したマルジマススペクトログラフ。

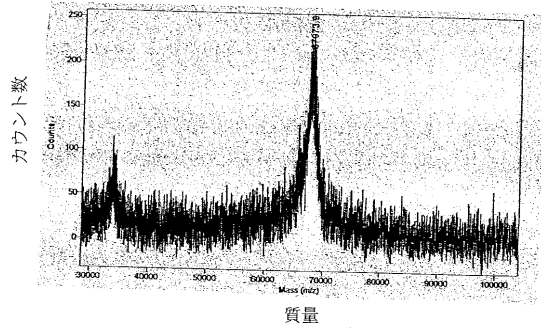
【図3】実施例の抗体9Fの検量線を示す片対数グラフ。

【図4】ギンゴリン酸及び関連化合物の構造式。

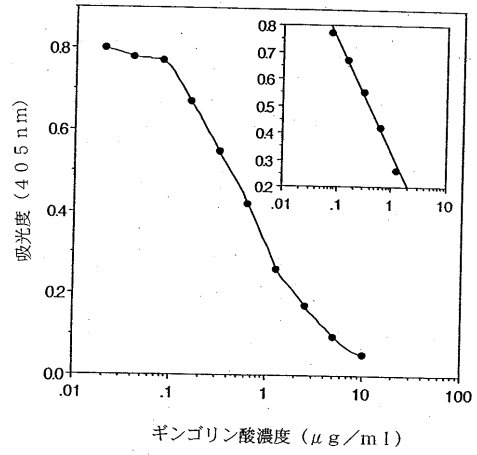
【 図 1 】



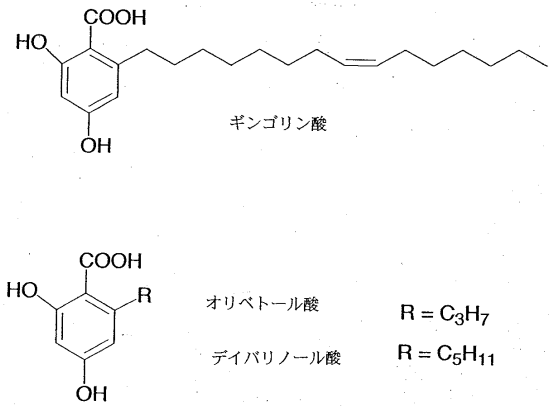
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



专利名称(译)	单克隆抗体，其生产方法和分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004091453A</a>	公开(公告)日	2004-03-25
申请号	JP2002291666	申请日	2002-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	正山 征洋		
申请(专利权)人(译)	正山 征洋		
[标]发明人	田中宏幸 正山征洋		
发明人	田中 宏幸 正山 征洋		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/44 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.Q G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供抗银杏酸的抗体及其分析方法，所述抗姜氨酸是诱导银杏及其相关化合物的接触过敏的成分。 解决方案：通过切割一部分银杏酸以获得醛，然后使用EDC，碳二亚胺法，醛基的羧基和诸如牛血清白蛋白（BSA）之类的碳二亚胺法制备抗银杏酸和相关化合物的抗体。与上述赖氨酸残基结合后，对动物进行免疫以赋予抗原性。分离免疫后的脾细胞，并使用聚乙二醇与骨髓瘤细胞融合。在HAT培养基中仅选择融合细胞（杂交瘤）。通过有限稀释法克隆杂交瘤。从这些中，使用醛-人血清白蛋白（HSA）复合物进行选择，并分离出产生抗姜油酸单克隆抗体（MAb）的杂交瘤。定量分析方法通过标记免疫测定法进行。

[选型图]图1

