

(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2004-91454

(P2004-91454A)

(43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/44	C O 7 K 16/44	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	S

審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 8 頁)

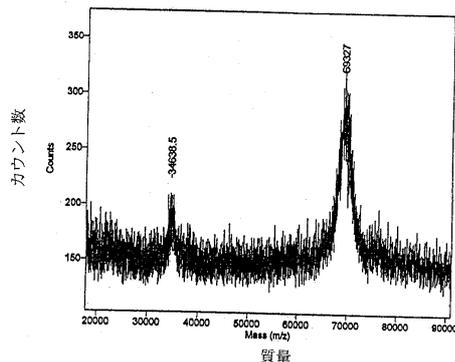
(21) 出願番号 特願2002-291667 (P2002-291667)	(71) 出願人 598118503 正山 征洋 福岡県春日市上白水1217-1
(22) 出願日 平成14年8月29日 (2002.8.29)	(72) 発明者 田中 宏幸 福岡県福岡市東区箱崎2-16-47-2 O2
特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年3月5日 日本薬学会第122年会組織委員会発行の「日本薬学会第122年会講演要旨集」に発表	(72) 発明者 正山 征洋 福岡県春日市上白水1217-1
	Fターム(参考) 4B064 AG26 CA10 CA20 CC24 CE12 DA13 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA50 FA72 GA21

(54) 【発明の名称】 抗体及びその製造方法並びに抗体を用いた抗原の定量方法

(57) 【要約】

【課題】 そのままでは抗原性がないペオニフロリン (P F) とその関連化合物に対する抗体を作成することにより、簡便で、高感度なかつ再現性の高い抗原の定量分析方法を提供する。

【解決手段】 P F 及び関連化合物に対する抗体は、P F の糖部の一部を切断し、E D C を用いたカルボジミド法により、P F のカルボキシル基とウシ血清アルブミン (B S A) 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。H A T 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、P E - ヒト血清アルブミン (H S A) 複合体を用いて選抜し、抗 P E モノクローナル抗体 (M A b) を生産するハイブリドーマを単離する。定量分析法はタンパク質と共有結合した抗原を吸着させたウエル内に、P F 及び関連化合物、抗体を加えてインキュベートした後にウエルを洗浄し、標識化免疫定量法により行われる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ペオニフロリン (P F) 及び関連化合物に対する抗体。

【請求項 2】

前記 P F 及び関連化合物は P F , アルピフロリン , オキシペオニフロリン , ベンゾイルペオニフロリンである請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

P F を構成する糖の一部を切断し , 切断された末端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 4】

タンパク質と共有結合した P F 関連化合物を吸着させたウエルに P F 関連化合物溶液を添加し , 更に請求項 1 に記載の抗体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 P F 関連化合物溶液中の P F 関連化合物を定量する抗体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】**

本発明は芍薬の主有効成分である P E に対する M A b を生産するハイブリドーマに関する。

【0002】

20

【従来の技術】

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。

【0003】

一方、本出願人は通常は抗原とは成りえない芍薬の配糖体に対する M A b を生産するハイブリドーマを作製する。P E は有用な薬理活性を有する芍薬の主要な配糖体である。

【0004】

30

【発明が解決しようとする課題】

芍薬中の P F の含有量は少なく、その検出は容易ではない。ましてや漢方薬中の含有量を精査するためには前処理等に多大な労力を要する。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。

【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 P F に対する、M A b を生産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 P F 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

40

【0006】

【実施の形態】 抗 P E 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 P F - 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 P F 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。

【0007】

(抗体産生細胞の調整)

50

P F - 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ュ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、H A T 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、P A I , P 3 - X 6 3 - A g 8 , P 3 - X 6 3 - A g 8 - U I , P 3 - N S I / 1 - A g 4 - 1 , X 6 3 - A g 8 - 6 . 5 . 3 . , S P 2 / 0 - A g 1 4 , F O , S 1 9 4 / 5 X X O , B U . 1 , M P C 1 1 - 4 5 . 6 . , T G . 1 . 7 等が用いられる。

10

【0009】

(融合細胞)

細胞融合は通常M E M 培地、R M I 1 6 4 0 培地、I M D M 培地等のe - R D F 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 : 1 0)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1 0 0 0 - 6 0 0 0 のポリエチレングリコール(P E G)が使用できる。P E G の使用濃度は通常3 0 - 5 0 % 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、1 0 % F C S 含有e - R D F 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H A T 培地)で浮遊し、9 6 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、P F - H S A 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、M A b 産生ハイブリドーマを得る。以上の操作により抗P F M A b 産生ハイブリドーマC 3 1 B 9 を得た。このハイブリドーマはP F に対する特異的なM A b を産生する新規な細胞である。

【0013】

(抗P F M A b 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M A b 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P F M A b を得る。また、無血清培地で培養し、通常の手法で抗P F M A b を得る。

40

【0014】

(抗P F M A b のキャラクタリゼーション)

精製した抗P F - M A b のサブクラス、軽鎖等を通常の方法で決定した。

【0015】

50

(発明の効果)

本抗体は極めて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。以下の実施例で示すように各種の芍薬のPF含有量を簡便に定量出来る。

【0016】

【実施例】

(抗PE MAb産生ハイブリドーマの製造)

(抗原の調整)

PF 5 mgをメタノール 4 mlに溶かした液を、5 mgの過ウ素酸ナトリウムを水 0.6 mlに溶かした液に滴下し室温で1時間反応した。BSA添加炭酸バッファー (50 mM, pH 9.6, 1 ml)を上記の反応液に加えて反応した。反応後水に対して4で透析を行い、凍結乾燥後PF-BSA (4.8 mg)を得た。なおELISAで使用するPE-HSAについても同様な方法で作製した。

【0017】

(抗原中のハプテン数の検討)

得られたPF-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1)。

【0018】

(免疫脾細胞の調整)

PF-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週間の間隔で50 µgのPF-BSA抱合体アジュバント溶液を2回同様に投与し、最後にPE-BSA抱合体のみを100 µg投与し免疫を完了した。3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、脾臓の単離細胞を得た。

【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 x 10⁻⁷ Mおよびチミジン 1.5 x 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。

【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、PF-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PFに対するMAb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PF-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IgG抗体 1000倍希釈液をウエルあたり100 µl添加し、1時間後にTPBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS 0.3 mg/ml含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。20分後プレートリーダーを用いて405 nm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。

【0021】

(抗PF MA 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。

【0022】

(抗PE MA b の調整)

上記の抗体産生ハイブリドーマを無血清培地(10 µg/ml インスリン、35 µg/ml トランスフェリン、20 µM エタノールアミン、25 nM セレニウム添加 eRDF 培地)で37℃、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pH 7に調整し、カラムに付す。カラムを10 mM リン酸緩衝液で洗浄後、吸着している抗体を100 mM 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えた。

10

【0023】

(競合的ELISAによる定量)

PF-HSA 抱合体溶液(1 µg/ml)を50 µl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PBS 溶液300 µlを加え1時間反応してブロッキングする。50 µlの各種濃度の試料溶液を加え、さらに抗PE MA b 溶液(1 µg/ml) 50 µlを添加して1時間インキュベートした。TPBS で3回洗浄し、1000倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス抗体100 µlを加え1時間反応した。1時間後にTPBS で洗浄した。0.003% 過酸化水素、ABTS 0.3 mg/ml 含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。15分後に発色を405 nm で測定。各濃度のPEの吸光度から検量線を作成した(図2)。

20

【0024】

(交差反応性の調査)

PFおよびモノテルペン配糖体の芍薬固有の配糖体類、およびその他のテルペン類を測定した。表1に見られる通り、芍薬の薬理活性を代表している主活性成分であるPFとアルピフロリン(AL)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。また、ベンジルペオニフロリンに約30%の交差反応性が認められたが、その他の成分には殆ど交差反応性を示さなかった(図3の構造式参照)。

表1 抗体C31B9のペオニフロリン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 (%)
ペオニフロリン	100.0
アルピフロリン	143.7
オキシペオニフロイン	5.2
ベンジルペオニフロリン	29.4
(1R) —エンドー (+) —	
フェンコール	<0.008
(±) カンフェン	<0.008
D—カンファー	<0.008
(—) — α —ピネン	<0.008
DL—ボルネオール	<0.008
コージ酸	<0.008
チモール	<0.008
L—メントール	<0.008
パクリタクセル	<0.008
安息香酸	<0.008

10

20

【0025】

(各種芍薬のPFおよびアルピフロリン(AL)含有量)

各種芍薬の乾燥粉末5mgをメタノール0.5mlで5回抽出する。抽出液を合わせて遠心にかける。上清を10%メタノール溶液で適切な濃度に希釈して実施例に準じて定量する。結果を表2に示す。PFおよびAL含有量を通常の方法によりHPLCで分析した。それらの分析値と抗体を用いて分析した結果(ELISA)と比較したところ両者は非常に良好な一致をみた。このことから今回開発した芍薬の活性本体であるPFおよびAL含有量の分析法は信頼性が高く、また、高感度かつ再現性が良好なことが明らかとなった。

30

表2 各種芍薬中のペオニフロリン (PF) 及びアルピフロリン(AL)の含量

生産地	PF含量 (%)		AL含量 (%)	
	HPLC	HPLC	HPLC	ELISA
奈良	3.69	0.57	4.26	4.31
北海道	2.99	0.57	3.56	3.51
新潟	2.62	0.36	2.89	3.06
中国—1	2.81	2.34	5.16	5.03
中国—2	1.73	2.00	3.73	3.69
中国—3	2.14	0.36	3.01	2.95
中国—4	4.02	0.11	4.13	4.08
中国—5	0.35	0.18	0.53	0.53

10

【図面の簡単な説明】

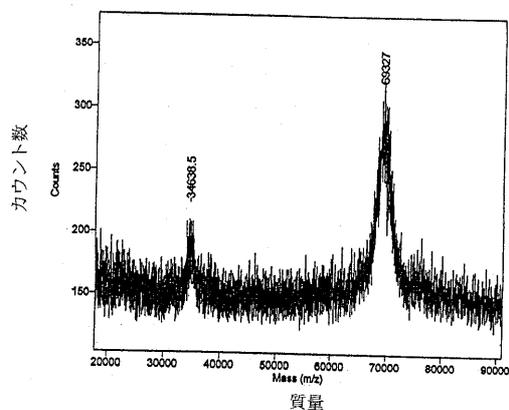
【図1】実施例の抗原のハプテン数を調査したマルジマススペクトログラフ。

20

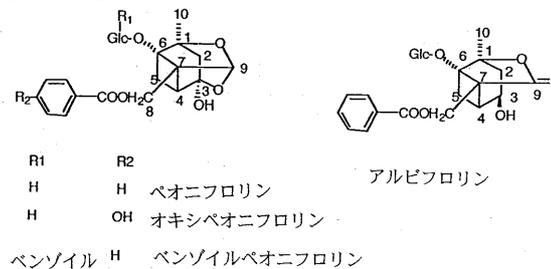
【図2】実施例の抗体C31B9の検量線を示す片対数グラフ。

【図3】ペオニフロリンと関連化合物の構造式。

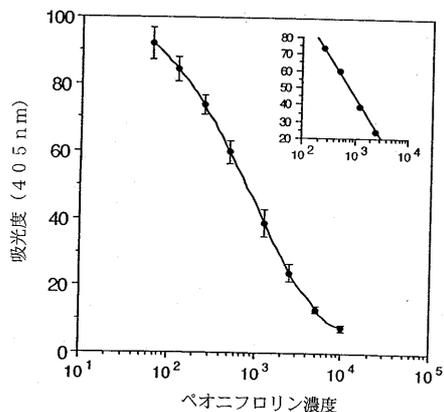
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

【要約の続き】

【選択図】 図1

专利名称(译)	抗体，其制备方法和使用抗体定量抗原的方法		
公开(公告)号	JP2004091454A	公开(公告)日	2004-03-25
申请号	JP2002291667	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		
FI分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA21		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种简单且高度灵敏的方法，用于定量测定抗原，通过形成不具有任何抗原性的芍药苷 (PF) 及其相关化合物的抗体，具有高重复性。ŽSOLUTION：抗PF及其相关化合物的抗体是通过切割PF的一部分糖部分，通过使用EDC的碳二亚胺法将PF中的羧基与牛血清白蛋白 (BSA) 等蛋白质的赖氨酸残基结合而得到的。赋予抗原性，用所得物质免疫动物，免疫后分离脾脏，用聚乙二醇与骨髓瘤细胞融合，用HAT培养基仅选择融合细胞 (杂交瘤)，用有限稀释法克隆杂交瘤分离通过使用PF-人血清白蛋白 (HSA) 复合物选择并产生抗PF单克隆抗体 (MAb) 的杂交瘤。通过将PF，其相关化合物和抗体加入到与蛋白质共价键合的抗原吸附的孔中，孵育，洗涤孔然后使用标记的免疫定量测定方法来进行定量分析方法。Ž

