

(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2016-124835

(P2016-124835A)

(43) 公開日 平成28年7月11日(2016.7.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/435 (2006.01)	C07K 14/435	4B065
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4H045
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 102	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 G	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2015-670 (P2015-670)
 (22) 出願日 平成27年1月6日 (2015.1.6)

(71) 出願人 314012076
 パナソニックIPマネジメント株式会社
 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
 (74) 代理人 100101683
 弁理士 奥田 誠司
 (74) 代理人 100155000
 弁理士 喜多 修市
 (74) 代理人 100180529
 弁理士 梶谷 美道
 (74) 代理人 100125922
 弁理士 三宅 章子
 (74) 代理人 100135703
 弁理士 岡部 英隆
 (74) 代理人 100188813
 弁理士 川喜田 徹

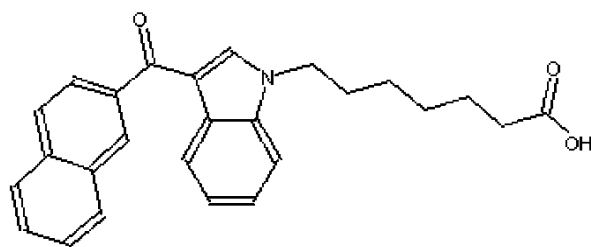
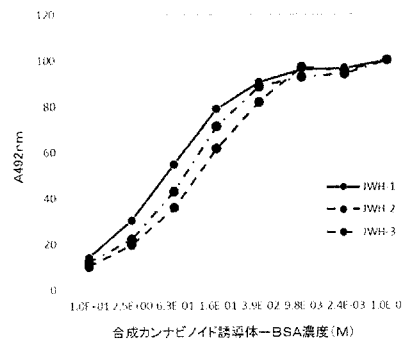
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫原、それを用いた抗体の製造方法、及び、そのモノクローナル抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 合成カンナビノイドを検出するために必要なモノクローナル抗体、及びその作製方法の提供。

【解決手段】 合成カンナビノイドに対して特異的な抗体の製造するために有用なハプテンが下記式とキャリアタンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニンが結合した免疫原を準備。免疫原を動物(マウス、ウサギなど)に免疫し、特異的な抗体を作製する。



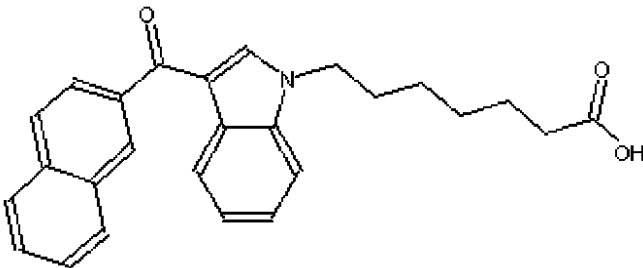
【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の構造式（化 1）の化合物とキャリアタンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニンが結合した免疫原。

【化 1】



10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の免疫原を接種する段階を有することを特徴とするモノクローナル抗体産生細胞ライン作製方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のモノクローナル抗体産生細胞ライン作製方法により作製され、前記化合物に結合能を有するモノクローナル抗体を産生する細胞ラインである、下記のうちのいずれかのモノクローナル抗体産生細胞ライン、

20

寄託番号 N I T E B P - 0 1 9 5 5 として寄託された細胞ライン、
寄託番号 N I T E B P - 0 1 9 5 6 として寄託された細胞ライン、
寄託番号 N I T E B P - 0 1 9 5 7 として寄託された細胞ライン。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の細胞ラインにより産生されるモノクローナル抗体であって、前記化合物と反応することを特徴とするモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、法的管理および健康管理などの産業分野において、合成カンナビノイドの検出するために必要な抗体、その作製方法、及び免疫原に関する。

30

【背景技術】

【0002】

合成カンナビノイドを検出するためには、通常迅速にかつ正確に検出作業を行うことが要請される。また上記合成カンナビノイドの検出においては、微量成分の分析を行うことも要請される。

【0003】

従来、合成カンナビノイドを検出する方法として、ガスクロマトグラフ質量分析（GC - MS）や液体クロマトグラフ質量分析（LC - MS）あるいは、特許文献 1 に開示されているイオナイザ/コレクタ装置による測定方法があった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特表 2 0 0 7 - 5 1 5 6 1 9 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従来法である GC - MS や LC - MS の感度は約 ppm オーダーであり、さらには不純物が存在した場合には、著しく感度低下を引き起こす課題があった。

【0006】

50

そのため、前処理としてある程度の不純物を除去する必要がある、結果として測定時間も長時間（30分以上）かかるという問題があった。

【課題を解決するための手段】

【0007】

前記従来課題を解決するために、本発明の免疫原（合成カンナビノイド免疫原）は、構造式（化1）の構造を有した化合物をキャリアタンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニンと結合したものである。

【0008】

さらに、前記免疫原を動物（マウス、ウサギなど）に免疫し、特異的な抗体を作製することができるモノクローナル抗体産生細胞ライン作製方法を提供することができる。

10

【0009】

また、前記モノクローナル抗体産生細胞ライン作製方法により、前記化合物に結合能を有するモノクローナル抗体を産生する細胞ラインである、下記のうちのいずれかのモノクローナル抗体産生細胞ラインを提供することができる。寄託番号NITE BP-01955として寄託された細胞ライン、寄託番号NITE BP-01956として寄託された細胞ライン、寄託番号NITE BP-01957として寄託された細胞ライン。

【0010】

さらに、前記記載の細胞ラインにより産生される前記化合物と反応するモノクローナル抗体。

【発明の効果】

20

【0011】

本発明の合成カンナビノイド誘導体および抗体作製法より高性能な抗体を作製することが可能となる。また、上記抗体を用いることにより合成カンナビノイドを迅速にかつ正確に分析できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】3種類のモノクローナル抗体のELISAによる結合能評価図

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下本発明の実施の形態について、図面を参照しながら説明する。

30

【0014】

以下実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。

【0015】

以下、カルボキシル基を所有した合成カンナビノイド誘導体の作製方法及びこの抗体を用いた合成カンナビノイドの検出方法について説明する。

【0016】

（1）合成カンナビノイド誘導体の合成

2.5Mエチルマグネシウムプロミド（1.65mmol）を1.1mlエーテル溶媒中に添加し、しばらく0で撹拌した。この溶液に、あらかじめ1.1mlエーテル溶媒で溶解したインドール（1.3mmol）を徐々に添加し、添加終了後30分間、室温で撹拌した。

40

【0017】

撹拌しながら、予め1mlエーテル溶媒で溶解した1-ナフトイルクロライド（1.46mmol）を徐々に添加した。その反応液は1.5時間、室温で撹拌しながら放置した。その後、飽和塩化アンモニウム水溶液を反応液と同体積添加することにより反応を停止させると共に、微粉末状になるまで撹拌を続けた。この粉末をろ過し、適量の水で洗浄した後に適量のエーテルで洗浄した。粉末を1mlメタノールで溶解した後に、1ml水酸化ナトリウム水溶液（0.4g/ml）を添加し、室温で18時間撹拌した。沈殿物をろ過後に適量のメタノール、水、エーテルで洗浄した。その後、100真空下で乾燥させ、0.25gの3-（1-ナフトイル）インドール混合物を得た。この混合物を精

50

製することなく次の合成ステップに利用した。

【0018】

0.2 g 3-(1-ナフトイル)インドール混合物を1.5 ml ジメチルスルフォキシド(DMSO)で溶解した後に、0.6 g 水酸化カリウムを添加した。この反応液に1-プロモヘプタン酸(5.5 mmol)を徐々に添加し、85℃で18時間撹拌した。反応液を適量の水で希釈した後に、適量の酢酸エチルで3度抽出した。抽出物を濃縮後、クロマトグラフィー(シリカ担体、溶出液:石油エーテル/ = 7/1)により精製し、0.1 g 1-ヘプタン酸-3-(1-ナフトイル)インドール(収率:41%)を得ることができた。

【0019】

得られた反応生成物の構造は、赤外線スペクトル及びNMRデータにより上記式(化1)であることを同定した。

【0020】

(2) 免疫原の合成

10 mg 合成カンナビノイド誘導体を1 ml のDMSOに溶解後、5 mg エチル(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を添加し、1時間、室温で撹拌した。その溶液を、予め100 mgのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を5 mlの生理食塩水を含むリン酸緩衝液[pH 7.4]PBSバッファに溶解した溶液に、撹拌しながら徐々に添加した。その後、更に8時間、室温で撹拌した。

【0021】

この溶液を予め、0.25 µmフィルターで沈殿物を除去した後に、セファデックスG-25カラム(溶出液:PBSバッファ)により未反応物の合成カンナビノイド誘導体を除去することにより、免疫原である合成カンナビノイド誘導体-KLH(濃度:1 mg/ml)を得た。

【0022】

(3) 免疫

上記で作製した1 mg/ml免疫原に同体積のアジュバント(ヒト結核死菌含有完全フロイントアジュバント、和光純薬製、H37Rv)を添加し、よくホモジナイザ(1000 rpm)で乳化した。生後約8週のマウスに、免疫原を含むアジュバントエマルジョンを100 µlずつ10箇所注射した。

【0023】

2週間後、1 mg/ml免疫原に同体積の不完全フロイントアジュバントをホモジナイザで乳化し、このエマルジョンをマウスに100 µlずつ10箇所注射したその後、4、6、8週間後に再度免疫原を含む不完全フロイントアジュバントエマルジョンを同様に注射した。注射後、1週間目に採血し、以下に示す抗体産生を確認した。

【0024】

(4) 血清評価

採取した血清を、酵素免疫測定法(ELISA)により抗体産生の確認をした。固相として0.1 mg/ml・BSA-PBS-Az(0.04重量%ナトリウムアジドPBS溶液にウシ血清アルブミン(以下BSAという)を0.1 mg/mlの濃度で溶解したもので調製した2.5 µg/ml合成カンナビノイド誘導体-BSAを100 µl/ウェルずつ使用した。第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体またはペルオキシダーゼ標識抗マウスIgM抗体を使用した。その結果、合成カンナビノイド誘導体抗体の産生が認められるとともに、IgG/IgM比が100以上ありクラススイッチが起こっていることを確認した。

【0025】

(5) 細胞融合

免疫したマウスの中で特に力価の高かった2匹の脾臓を肥大させるために、ブースト(弱い免疫原の注射)をした。免疫原は、1 mg/ml合成カンナビノイド誘導体-KLH溶液をアジュバントを、加えずにそのまま用いた。ブースト後3日を経過したマウスの脾臓

10

20

30

40

50

細胞を摘出し、平均分子量 1,500 のポリエチレングリコールを用いた常法により、マウス骨髄腫由来細胞ライン (P3X63-Ag8.653) と融合した。フィーダー (成長因子を供給する細胞) として同じマウスの脾臓細胞を用い、96 ウェルプレート 2 枚の上で 15 重量% のウシ胎児血清 (以下、FCS) を含むイシコフ培地で 1 日間培養した後 (100 μ l / ウェル)、2 倍濃度のヒポキサンチン / アミノプテリン / チミジン (HAT) 培地を 100 μ l / ウェル添加して CO₂ インキュベータ (CO₂ 濃度: 5 体積%、温度: 37、湿度: 95%) 内で 1 週間培養した。その後、培養上清を除いた後、15 重量% の FCS を含むヒポキサンチン / チミジン (HT) 培地 (250 μ l / ウェル) と交換した。

【0026】

(6) 細胞選別

HT 培地と交換 1 週間後、培養上清を 200 μ l / ウェルずつ取り出した。15 重量% の FCS を含む HT 培地 (200 μ l / ウェル) を添加し、3 日間培養し後培養上清を 200 μ l / ウェルずつ取り出した。合計で培養上清を 400 μ l / ウェルを得ることができた。この培養上清を用いて以下に示す ELISA 法により合成カンナビノイド誘導体 - BSA に対する結合能を測定した。固相として 0.1 mg / mL BSA · PBS · Az で調整した 2.5 μ g / mL 合成カンナビノイド誘導体 - BSA 溶液を 100 μ l / ウェルずつ使用した。抗体液として細胞培養上清を使用した。この結果、合成カンナビノイド誘導体 - BSA に対して結合能を示したものは 3 ウェルあった。

【0027】

(7) クローニング

上記 3 ウェルの細胞についてウェルあたり 1 ケの細胞が含まれる濃度に希釈 (限界希釈) し、96 ウェルのマイクロプレート 3 枚に分注した。フィーダーとして生後 5 週のマウス (Balb/c) の胸線細胞を用いて初期増殖を促した。プレートのサイズを上げながら培養を進め、適時上清について ELISA 法によるスクリーニングを繰り返し、合成カンナビノイド誘導体 - BSA に対して高い力価を示し、かつ良好な増殖を示している細胞ラインを最終的に選別し、200 mL 中で 5×10^5 細胞 / mL の濃度に至るまで培養を進めた。最終的に、合成カンナビノイド誘導体 - BSA に対して結合能を示した 3 株を選定した。

【0028】

これらの細胞ラインは、寄託番号 NITE BP - 01955、寄託番号 NITE BP - 01956、寄託番号 NITE BP - 01957 として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託された。受託日 (原寄託日) は、2014 年 10 月 27 日である。

【0029】

(8) 細胞の保存

最終的に選別された細胞ラインは、上清を遠心分離し、 5×10^6 細胞 / mL の濃度で FCS : ジメチルスルフォキシド = 9 : 1 (体積比) の溶液 1 mL に浮遊させ、-80 で凍結した後、-135 に移して長期保存状態にした。

【0030】

(9) 抗体の精製

採取した培養液を遠心分離より単離した後に、その上清についてプロテイン A 結合ゲル (プロテイン A セファロース CL - 4 B、ファルマシア製) を用いたアフィニティークロマトグラフィにより、細胞培養上清からモノクローナル抗体を精製した。このモノクローナル抗体は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、標準蛋白との比較から、精製抗体は分子量約 50,000 の H 鎖と約 25,000 の L 鎖からなる IgG であることを確認した。

【0031】

(10) 抗体の評価

上記のアフィニティークロマトグラフィにより精製したモノクローナル抗体について以下

10

20

30

40

50

に示す酵素免疫測定法（E L I S A法）で抗体評価を行った。

【0032】

E L I S A法

（A）抗原のコーティング

予め合成カンナビノイド誘導体と牛血清アルブミン（B S A）とを結合させた2.5 μ g / mL合成カンナビノイド誘導体 B S Aをマイクロプレート（塩化ビニル製96ウェルプレート コスター社製）に抗原溶液を100 μ l / ウェル注入し、20度で一晩保存した。実験直前に、アスピレータで抗原溶液を除去した。

【0033】

（B）ブロッキング

B S A - P B S - A zを200 μ l / ウェル注入し、30分間室温で放置した。その後、アスピレータでB S A - P B S - A zを除去した。即日に以降の実験を行わないときは、この状態で、水で湿したろ紙と共に4度で保存した。

10

【0034】

（C）抗体の反応

1重量% B S A - P B S - A zで希釈した抗体溶液（希釈倍率：100 ~ 100000倍）を100 μ l / ウェル振とうしながら加えた。常温で3時間保存した後、アスピレータで抗体溶液を除去し、P B Sで3回洗浄し、アスピレータで残存するP B Sを除去した。

【0035】

（D）第2抗体の反応

0.2 μ g / mLのペルオキシダーゼ標識抗マウスI g G抗体ヤギ由来（K P L社製）を1重量% B S AのP B S溶液に溶解したもの、または0.2 μ g / mLのペルオキシダーゼ標識抗マウスI g M抗体ヤギ由来（K P L社製）を1重量% B S AのP B S溶液に溶解したものを50 μ l / ウェル注入し、常温で30分放置した。アスピレータで除去し、P B Sで3回洗浄し、さらにアスピレータで残存するP B Sを除去した。

20

【0036】

（E）基質の反応と停止

O - フェニレンジアミン（生化学用）40mgを10mLのクエン酸ーリン酸バッファー（pH5）に溶解し、使用直前に30重量%過酸化水素水4 μ Lを加えた溶液（基質溶液）を100 μ l / ウェル注入し、室温放置した。5分後、4N硫酸を25 μ l / ウェル注入して反応を停止した。

30

【0037】

（F）測定

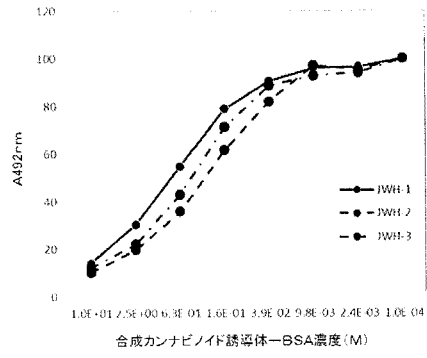
東洋ソーダマイクロプレートリーダを用いて492nmの吸光度を測定した。

【産業上の利用可能性】

【0038】

本発明は、法的管理および健康管理などの産業分野において、利用されうる。

【 図 1 】



フロントページの続き

(74)代理人 100184985

弁理士 田中 悠

(72)発明者 中山 浩

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 パナソニック株式会社内

Fターム(参考) 4B065 AA91X AB01 BA01 CA25

4H045 AA11 AA20 BA51 CA50 DA76 EA50 GA26

专利名称(译)	免疫原，使用其制备抗体的方法及其单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2016124835A	公开(公告)日	2016-07-11
申请号	JP2015000670	申请日	2015-01-06
申请(专利权)人(译)	松下IP管理有限公司		
[标]发明人	中山浩		
发明人	中山 浩		
IPC分类号	C07K14/435 C07K16/00 C12N5/10 G01N33/53		
FI分类号	C07K14/435 C07K16/00 C12N5/00.102 G01N33/53.G C07K16/44 C12N5/10 C12N5/18 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA25 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA51 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/GA26		
代理人(译)	奥田诚治 Kajiya Bido 三宅明子 田中 悠		
其他公开文献	JP6493786B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供检测合成大麻素所必需的单克隆抗体及其生产方法。
 解决方案：制备了一种免疫原，其中制备了可用于生产对合成大麻素特异的抗体的半抗原和作为载体蛋白的匙孔血蓝蛋白。用免疫原免疫动物（小鼠，兔子等）以产生特异性抗体。[选型图]图1

