

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6493786号
(P6493786)

(45) 発行日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日(2019.3.15)

(51) Int.Cl.		F 1	
C 0 7 K 14/435 (2006.01)		C O 7 K	14/435
C 0 7 K 16/44 (2006.01)		C O 7 K	16/44
C 1 2 N 5/18 (2006.01)		C 1 2 N	5/18
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N	33/53
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P	21/08
			G

請求項の数 4 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2015-670 (P2015-670)	(73) 特許権者	314012076
(22) 出願日	平成27年1月6日(2015.1.6)		パナソニックIPマネジメント株式会社
(65) 公開番号	特開2016-124835 (P2016-124835A)		大阪府大阪市中央区域見2丁目1番61号
(43) 公開日	平成28年7月11日(2016.7.11)	(74) 代理人	100101683
審査請求日	平成29年12月1日(2017.12.1)		弁理士 奥田 誠司
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-01955	(74) 代理人	100155000
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-01956		弁理士 喜多 修市
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-01957	(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

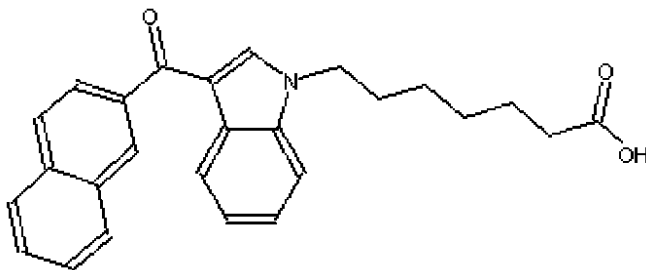
(54) 【発明の名称】 免疫原、それを用いた抗体の製造方法、及び、そのモノクローナル抗体

(57) 【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】



【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、

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。 10

【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。 20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特表2007-515619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】

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が、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。 30

【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。 40

【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。

【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】

【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。

10

【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

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

20

【0017】

攪拌しながら、予め 1 ml エーテル溶媒で溶解した 2 - ナフトイルクロライド (1.46 mmol) を徐々に添加した。その反応液は 1.5 時間、室温で攪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攪拌を続けた。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 1 ml メタノールで溶解した後に、1 ml 水酸化ナトリウム水溶液 (0.4 g/ml) を添加し、室温で 18 時間攪拌した。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、0.25 g の 3 - (2 - ナフトイル) インドール混合物を得た。この混合物を精製することなく次の合成ステップに利用した。

30

【0018】

0.2 g 3 - (2 - 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 時間攪拌した。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 - (2 - 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。

40

【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、室温で攪拌した。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、攪拌しながら徐々に添加した。その後、更に 8 時間、室温で攪拌した。

【0021】

50

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。

10

【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）により抗体産生を確認をした。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きていることを確認した。

20

【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 µl/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 µl/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 µl/ウェル）と交換した。

30

【0026】

(6) 細胞選別

HT培地と交換1週間後、培養上清を200 µl/ウェルずつ取り出した。15重量%のFCSを含むHT培地（200 µl/ウェル）を添加し、3日間培養し後培養上清を200 µl/ウェルずつ取り出した。合計で培養上清を400 µl/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/mlBSA・PBS・Azで調整した2.5 µg/ml合成カンナビノイド誘導体-BSA溶液を100 µl/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。

40

【0027】

50

(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、200ml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1ml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-4B、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に示す酵素免疫測定法(ELISA法)で抗体評価を行った。

【0032】

ELISA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(BSA)とを結合させた $2.5 \mu\text{g/ml}$ 合成カンナビノイド誘導体 BSA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 $100 \mu\text{l}$ /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

BSA-PBS-Azを $200 \mu\text{l}$ /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BSA-PBS-Azを除去した。即日以後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。

【0034】

(C) 抗体の反応

1重量%BSA-PBS-Azで希釈した抗体溶液(希釈倍率:100~100000倍)を $100 \mu\text{l}$ /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、PBSで3回洗浄し、アスピレータで残存するPBSを除去した。

【0035】

10

20

30

40

50

(D) 第2抗体の反応

0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig G 抗体ヤギ由来 (KPL社製) を 1 重量% BSA の PBS 溶液に溶解したもの、または 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig M 抗体ヤギ由来 (KPL社製) を 1 重量% BSA の PBS 溶液に溶解したものを 50 μl / 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、PBS で 3 回洗浄し、さらにアスピレータで残存する PBS を除去した。

【0036】

(E) 基質の反応と停止

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

【0037】

(F) 測定

東洋ソーダマイクロプレートリーダーを用いて 492 nm の吸光度を測定した。

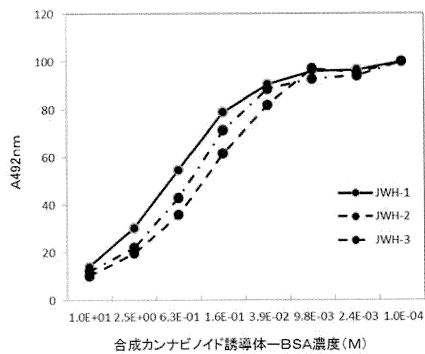
【産業上の利用可能性】

【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。

10

【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1006番地 パナソニック株式会社内

審査官 星 功介

(56)参考文献 欧州特許出願公開第2487155(E P, A1)

米国特許出願公開第2013/0066053(U S, A1)

国際公開第2014/015298(W O, A1)

特開昭61-47463(J P, A)

Journal of Analytical Toxicology, 2012年, 36, pp.293-302

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 1/00 - 19/00

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)

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	JP6493786B2	公开(公告)日	2019-04-03
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		
当前申请(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 C07K16/44 C12N5/18 G01N33/53 C12P21/08		
FI分类号	C07K14/435 C07K16/44 C12N5/18 G01N33/53.G C12P21/08 C07K16/00 C12N5/00.102 C12N5/10		
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	JP2016124835A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供检测合成大麻素所必需的单克隆抗体及其制备方法。 解决方案：用于产生对合成大麻素特异的抗体的半抗原制备免疫原，其中结合了下式的匙孔血蓝蛋白和载体蛋白。免疫原用于免疫动物（小鼠，兔等）以产生特异性抗体。 [选图]图1

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6493786号 (P6493786)
(45) 発行日 平成31年4月3日(2019.4.3)	(24) 登録日 平成31年3月15日(2019.3.15)	
(51) Int. Cl. F 1		
C 0 7 K 14/435 (2006.01)	C 0 7 K 14/435	
C 0 7 K 16/44 (2006.01)	C 0 7 K 16/44	
C 1 2 N 5/18 (2006.01)	C 1 2 N 5/18	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	G
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
請求項の数 4 (全 7 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-670 (P2015-670)	(73) 特許権者 314012076	
(22) 出願日 平成27年1月6日(2015.1.6)	パナソニックIPマネジメント株式会社	
(65) 公開番号 特開2016-124835 (P2016-124835A)	大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号	
(43) 公開日 平成28年7月11日(2016.7.11)	(74) 代理人 100101683	
審査請求日 平成29年12月1日(2017.12.1)	弁理士 奥田 誠司	
微生物の受託番号 NPM D NITE BP-01955	(74) 代理人 100155000	
微生物の受託番号 NPM D NITE BP-01956	弁理士 喜多 修市	
微生物の受託番号 NPM D NITE BP-01957	(74) 代理人 100180529	
	弁理士 梶谷 美蓮	
	(74) 代理人 100125922	
	弁理士 三宅 隼子	
	(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		