

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2004/078964

発行日 平成18年6月8日 (2006.6.8)

(43) 国際公開日 **平成16年9月16日(2004.9.16)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B064
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	4B065
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 S	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

出願番号	特願2005-503156 (P2005-503156)	(71) 出願人	802000042 株式会社三重ティーエルオー
(21) 国際出願番号	PCT/JP2004/002926		三重県津市栗真町屋町1577
(22) 国際出願日	平成16年3月5日 (2004.3.5)	(71) 出願人	503140056
(31) 優先権主張番号	特願2003-59667 (P2003-59667)		日本エンバイロケミカルズ株式会社
(32) 優先日	平成15年3月6日 (2003.3.6)		大阪府大阪市中央区道修町二丁目3番8号
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
		(72) 発明者	富田 昌弘 三重県津市栗真町屋町1577 三重大学 工学部内
		(72) 発明者	藤本 茂 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番 85号 日本エンバイロケミカルズ株式会 社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリドーマの製造方法およびその利用

(57) 【要約】

本発明は、生体外でB細胞を免疫した免疫化細胞をミエローマ細胞と細胞融合して抗体産生ハイブリドーマを製造する従来よりも効率的かつ実用的な方法であって、詳細には、生体外でサイトカインおよび糖脂質を共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合して抗体産生ハイブリドーマを製造する方法、ならびにその利用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I g Gタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカイン、および糖脂質を生体外で共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合して抗体産生ハイブリドーマを製造する方法。

【請求項 2】

サイトカインの濃度が1 ng/ml～100 ng/mlの範囲である、請求の範囲 1 に記載の方法。

【請求項 3】

サイトカインの濃度が5 ng/ml～30 ng/mlの範囲である、請求の範囲 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

アメリカヤマゴボウレクチンおよび/またはプロテインA被覆黄色ブドウ球菌死菌の非存在下で細胞を免疫する請求の範囲 1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

サイトカインがインターロイキン-4であり、かつ糖脂質がリポ多糖である請求の範囲 1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

抗原物質が内分泌攪乱物質またはペプチドを含むタンパク質である請求の範囲 1～5のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 7】

電気パルス法によって細胞融合させることを特徴とする請求の範囲 1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

以下の (a) および (b) を用いて細胞融合させることを特徴とする請求の範囲 6 に記載の方法：

(a) 免疫に使用した抗原と特異的結合対の一方とを含む複合体に連結した免疫化細胞、および

(b) 当該特異的結合対の他方と連結したミエローマ細胞。

【請求項 9】 30

請求の範囲 1～8のいずれかに記載の方法で製造されたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体。

【請求項 10】

I g Gタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカインと、糖脂質とを少なくとも含有する細胞融合用試薬。

【請求項 11】

サイトカインがインターロイキン-4であり、かつ糖脂質がリポ多糖である請求の範囲 10 に記載の細胞融合用試薬。

【請求項 12】

I g Gタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカイン、および糖脂質を生体外で共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合して得られた抗体産生ハイブリドーマを用いる工程を含むことを特徴とする、モノクローナル抗体の製造方法。 40

【請求項 13】

抗原物質が内分泌攪乱物質またはペプチドを含むタンパク質である請求の範囲 12 に記載の製造方法。

【請求項 14】

I g Gタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカイン、および糖脂質を生体外で共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合して得られた抗体産生ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体を用いる工程を含むことを特 50

徴とする、抗原物質のスクリーニング方法。

【請求項 15】

抗原物質が内分泌攪乱物質またはペプチドを含むタンパク質である請求の範囲 14 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 16】

以下の (a) および (b) を電気パルス法で細胞融合させることを特徴とするハイブリドーマの製造方法：

(a) 免疫に使用した抗原と特異的結合対の一方とを含む複合体に連結した免疫化細胞、および

(b) 当該特異的結合対の他方と連結したミエローマ細胞。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、抗体産生ハイブリドーマを製造する方法、およびその利用に関する。

【背景技術】

近年、内分泌攪乱物質（「環境ホルモン」とも称される）による環境汚染が問題とされてきており、環境中の内分泌攪乱物質やその分解物を測定・分析して、その結果を環境保全に早急に役立てる必要性がある。内分泌攪乱物質を測定・分析する方法としては、従来から種々の方法が知られており、現在では、ガスクロマトグラフィー質量分析装置（GC-MS）を用いた方法が主流となっている。しかしこの方法では、極微量しか存在しない内分泌攪乱物質を定量するには必要な感度が得られないこと、また定量するためには溶媒による抽出などによる高倍率の濃縮が必要であること、さらに非常に高価な機器であり操作に習熟を要すること、1検体あたりの濃縮、抽出、検出に時間を要する（ダイオキシンなど物質によっては数週間）ことなどの問題がある。

20

これらの問題を解決し得る、従来とは全く異なる視点からの内分泌攪乱物質に対する迅速かつ高感度検出法として、モノクローナル抗体を利用する方法が考えられている。モノクローナル抗体は、抗原物質内に存在する幾つかのエピトープ（抗原決定基）の中で特定の1つのエピトープのみを特異的に認識する抗体であり、その非常に高い特異性により、構造の類似した物質の認識や微量成分の検出、あるいは目的抗原物質のワンステップ精製など多方面において幅広く利用されている。

モノクローナル抗体を作製する方法としては、目的とする抗原物質で予め免疫した脾細胞やリンパ節細胞などのB細胞（以下、免疫したB細胞を「免疫化細胞」ということがある。）と、不死であるB細胞由来の骨髄腫細胞（ミエローマ細胞）とを細胞融合して抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を作製する方法が、現在広く利用されている。この方法によれば、特定のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを半永久的に増殖させて、半永久的にモノクローナル抗体を製造することが可能となる。

30

上記免疫化細胞の作製のための免疫は、従来より、生体内免疫法によって行われていることが多い。しかし内分泌攪乱物質のように生体に毒性を有する物質を抗原物質とする場合には、生体外で免疫（たとえば、Bossら、Methods Enzymol. 121, 27-33 (1986)を参照。）を行うことが望ましい。また生体外で免疫を行うと、抗原量が微量で済む（ $1\mu\text{g}\sim 10\mu\text{g}$ の少量の抗原量で免疫化が可能）、免疫時間が短くて済む（3日間～5日間と非常に短い期間で免疫化が完了）などの利点もあり、より効率的で実用的なモノクローナル抗体の製造方法を確立する観点からは、生体外で免疫した免疫化細胞を細胞融合して、所望の抗体産生ハイブリドーマを作製することが望まれる。

40

【発明の開示】

しかし生体外で免疫したB細胞を細胞融合して得られたハイブリドーマの出現率は、10%～30%程度と従来の生体内免疫で免疫した場合と比較して低く（生体内免疫によった場合のハイブリドーマ出現率：40%～50%程度）、より効率的なハイブリドーマの製造方法の開発が求められている。また、上記生体外で免疫したB細胞を細胞融合して得られたハイブリドーマは、産生するモノクローナル抗体の多くが5量体で構造上不安定な

50

I g Mタイプであり、実用性に乏しいという問題もある。

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであって、その目的とするところは、生体外で免疫したB細胞を免疫抗原で選択後、ミエローマ細胞と細胞融合して抗体産生ハイブリドーマを製造する方法であって、従来よりも効率的かつ実用的な方法を提供することである。

本発明者らは、上記課題を解決するために、生体外で脾細胞を免疫する際に、抗体のI g MタイプからI g Gタイプへのクラススイッチを目的としてインターロイキン-4とリポ多糖を共存させることを試みた。その際、抗原物質としてはフタル酸-ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) の誘導体 (ハプテン) を用いた。DEHPは、可塑剤として広く汎用されているが、欧州委員会 (EU) が2000年6月、内分泌攪乱物質プライオリティ
10 リストに関する報告書 (案) をまとめたとき、生物に対して少なくとも1つの内分泌攪乱作用の証拠が挙げられている物質の中でも優先してリスク評価に取り組む8物質に含まれており、その早急な対応が特に求められている内分泌攪乱物質である。

本発明者らは、上記の試みによって得られた免疫化細胞を電気パルス (PEF) 法によってミエローマ細胞と細胞融合させて作製したハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を調べたところ、I g Gタイプへのクラススイッチを確認することができたが、それとは別に、かかる手法によって得られたハイブリドーマの出現率がほぼ50%に上昇するという、全く予想だにしていなかった事実を見出し、かかる知見に基づいて本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) I g Gタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカイン、および糖脂質を生体外で共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合して抗体産生ハイブリドーマを製造する方法。
20

(2) サイトカインの濃度が1 ng/ml ~ 100 ng/mlの範囲である、上記(1)に記載の方法。

(3) サイトカインの濃度が5 ng/ml ~ 30 ng/mlの範囲である、上記(1)に記載の方法。

(4) アメリカヤマゴボウレクチンおよび/またはプロテインA被覆黄色ブドウ球菌死菌の非存在下で細胞を免疫する上記(1) ~ (3)のいずれかに記載の方法。

(5) サイトカインがインターロイキン-4であり、かつ糖脂質がリポ多糖である上記(1) ~ (4)のいずれかに記載の方法。
30

(6) 抗原物質が内分泌攪乱物質またはペプチドを含むタンパク質である上記(1) ~ (5)のいずれかに記載の方法。

(7) 電気パルス法によって細胞融合させることを特徴とする上記(1) ~ (6)のいずれかに記載の方法。

(8) 以下の(a)および(b)を用いて細胞融合させることを特徴とする上記(6)に記載の方法：

(a) 免疫に使用した抗原と特異的結合対の一方とを含む複合体に連結した免疫化細胞、および

(b) 当該特異的結合対の他方と連結したミエローマ細胞。

(9) 上記(1) ~ (8)のいずれかに記載の方法で製造されたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体。
40

(10) I g Gタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカインと、糖脂質とを少なくとも含有する細胞融合用試薬。

(11) サイトカインがインターロイキン-4であり、かつ糖脂質がリポ多糖である上記(10)に記載の細胞融合用試薬。

(12) I g Gタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカイン、および糖脂質を生体外で共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合して得られた抗体産生ハイブリドーマを用いる工程を含むことを特徴とする、モノクローナル抗体の製造方法。

(13) 抗原物質が内分泌攪乱物質またはペプチドを含むタンパク質である上記(12)
50

に記載の製造方法。

(14) IgGタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカイン、および糖脂質を生体外で共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合して得られた抗体産生ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体を用いる工程を含むことを特徴とする、抗原物質のスクリーニング方法。

(15) 抗原物質が内分泌攪乱物質またはペプチドを含むタンパク質である上記(14)に記載のスクリーニング方法。

(16) 以下の(a)および(b)を電気パルス法で細胞融合させることを特徴とするハイブリドーマの製造方法：

(a) 免疫に使用した抗原と特異的結合対の一方とを含む複合体に連結した免疫化細胞、
および

(b) 当該特異的結合対の他方と連結したミエローマ細胞。

【図面の簡単な説明】

図1は、生体外免疫後、細胞融合前の実施例1の免疫化細胞の特異的蛍光標識を用いた可視化解析の結果を示す顕微鏡写真である。

図2は、生体外免疫後、細胞融合前の比較例1の免疫化細胞の特異的蛍光標識を用いた可視化解析の結果を示す顕微鏡写真である。

発明の詳細な説明

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の抗体産生ハイブリドーマの製造方法は、〔1〕サイトカインおよび糖脂質を共存させた状態で、生体外でB細胞を抗原物質で免疫する工程と、〔2〕上記免疫したB細胞(免疫化細胞)を免疫抗原で選択後、ミエローマ細胞と細胞融合させて、ハイブリドーマを作製する工程との、大きく分けて二つの工程を含有することを特徴とするものである。

なお本明細書において「B細胞を抗原物質で免疫する際にサイトカインおよび糖脂質を共存させる」とは、サイトカインおよび糖脂質がB細胞およびその他の免疫応答細胞に十分に会合し得るように免疫を行うことを指し、このように免疫が行われるならば、これらB細胞、抗原物質、サイトカイン、糖脂質を混合する順序や量は、特に制限されるものではない。

本発明の上記〔1〕の工程においては、抗原物質にて免疫する際に、B細胞をサイトカインと糖脂質の両方を共存させることが必要であり、いずれか一方のみ共存させただけでは後述する本発明の効果を奏することはできない。すなわち、生体外のB細胞の免疫の際にサイトカインのみを共存させた場合であると、B細胞の活性化が充分に行われないう不具合があるためであり、また糖脂質のみを共存させた場合であると、IgMからIgGへのクラススイッチが起こらないという不具合があるためである。また、抗原物質を免疫する際以外の時点でB細胞にサイトカインおよび糖脂質を共存させたとしても、これをミエローマ細胞と細胞融合しても、抗体産生ハイブリドーマの高出現率を達成できない。

本発明に用いられるサイトカインは、免疫系における情報伝達物質であるサイトカインとして公知のものであれば、特に制限なく使用することができ、たとえば、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-4(IL-4)、インターロイキン-5(IL-5)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-7(IL-7)、インターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-9(IL-9)、インターロイキン-10(IL-10)、インターロイキン-11(IL-11)、インターロイキン-12(IL-12)、インターロイキン-13(IL-13)、インターロイキン-14(IL-14)、インターロイキン-15(IL-15)、インターロイキン-16(IL-16)、インターロイキン-17(IL-17)、インターロイキン-18(IL-18)などだけでなく、インターフェロン(IFN)、腫瘍壊死因子(TNF)、コロニー刺激因子(CSF)、エリスロポエチン(EPO)なども包含する。中でも、IgMからIgGへのクラススイッチを惹起し得ることから、IL-4を用いるのが好ましい。上記インターロ

イキンは、マウス、ヒト、ラットのいずれの由来のものを用いてもよいが、マウスが免疫対象動物として好適であるため、マウス由来のものを使用するのが好ましい。かかるサイトカインは、市販のものを好適に用いることができる。

免疫の際に共存させるサイトカインの量に特に制限はないが、例えば、IL-4を用いる場合、細胞培養における最適濃度の観点から、最終濃度が0.1 ng/ml~100 ng/mlとなるように添加するのが好ましく、最終濃度が5 ng/ml~30 ng/mlとなるように添加するのがより好ましい。

別の局面では、免疫の際に共存させるサイトカインの量は、最終濃度が1 ng/mlを超え、かつIgGタイプの抗体を産生するB細胞をより選択的に取得することを可能とする濃度となるように添加する場合、細胞培養における最適濃度の観点から最終濃度が1 ng/ml~100 ng/mlとなるように添加するのがより好ましく、最終濃度が5 ng/ml~30 ng/mlとなるように添加するのがさらに好ましい。

本発明においては、上記例示したサイトカインを2種以上用いた場合であっても、後述する本発明の効果を奏することができる。この場合、用いる2種以上のサイトカインの総量が、上述した範囲内となるように用いるのが好ましい。

本発明に用いられる糖脂質は、分子内に糖と脂質の両者（水溶性糖鎖と脂溶性基の両者）を含む物質群であれば、特に制限はなく使用することができる。たとえば、リポ多糖（大腸菌、腸炎菌、ネズミチフス菌、霊菌等由来）（例：シグマ総合カタログ2000-2001 日本語版、LIPOLY SACCCHARIDESに記載の種々の抽出法で得られた種々の形態のリポ多糖や人工的に作製されたりポ多糖）が挙げられる。かかる糖脂質は、市販のものを特に制限なく使用することができる。

免疫の際に共存させる糖脂質の濃度に特に制限はないが、例えば、リポ多糖を用いる場合、最終濃度が5 μg/ml~50 μg/mlとなるように添加するのが好ましく、最終濃度が10 μg/ml~20 μg/mlとなるように添加するのがより好ましい。

本発明においては、上記例示した糖脂質を2種以上用いた場合であっても、後述する本発明の効果を奏することができる。この場合、用いる2種以上の糖脂質の総量が、上述した範囲内となるように用いるのが好ましい。

本発明において生体外での免疫に用いるB細胞は、たとえば、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ラット、モルモット、ニワトリなどの従来より生体内免疫に通常用いられているような動物から、常法に従って脾臓またはリンパ節を無菌的に摘出し、これを洗浄後、破碎し、脾細胞またはリンパ節細胞として得ることができる。B細胞およびその他の免疫応答細胞を多く含むことから、脾細胞をB細胞として使用するのが好ましい。B細胞は、抗生物質入りの適宜の懸濁用液（たとえば、脾細胞を用いる場合には、カナマイシン入りRPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) (日水製薬社製) など) に懸濁して生体外での免疫に供し得るように調製される。

また本発明で用いるミエローマ細胞（骨髄腫細胞）に特に制限はなく、たとえば、従来公知のNS-1、P3U1、Sp2/O、PAIなどが挙げられ、中でも融合効率が高いことから、PAIが好ましい。ミエローマ細胞は、当分野において通常行われている方法にしたがって予め継代培養されたものを用いればよい。

本発明の〔1〕の工程において、B細胞、抗原物質、サイトカインおよび糖脂質を混合させる順序は、特に制限はないが、目的の抗原物質に対するB細胞の感作をより効率的に行うためには、▲1▼B細胞、▲2▼抗原物質、▲3▼サイトカイン、▲4▼糖脂質の順に混合させるのが好ましい。

上記〔1〕の工程での生体外でのB細胞の免疫は、従来公知であるBossの方法 (Boss: Methods Enzymol. 121, 27-33 (1986)) に基づいて好適に行うことができる。たとえば、脾細胞を用いる場合、具体的には、以下の(1)~(3)の手順にて行う。

(1) 上記のように調製した脾細胞入り懸濁液に、後述するようにして予め調製した抗原溶液を適量ずつ添加して放置する。

10

20

30

40

50

(2) 放置後、40% FCS (fetal calf serum) を含む完全培地 (60% RPMI 1640 + 100 μ g/ml 硫酸カナマイシン + 2 mM L-グルタミン + 50 μ M β -メルカプトエタノール + 40% FCS) を添加する。本発明の特徴の一つであるサイトカインおよび糖脂質の添加は、たとえば、この40% FCSを含む完全培地の添加の後に行う。その後、5%炭酸ガスインキュベータ内で3日間~5日間程度培養を行う。

(3) 培養後、培養液を遠心分離して得た沈殿を抗生物質入りRPMI 1640で懸濁、さらに遠心分離して洗浄後、沈殿を抗生物質入りRPMI 1640に懸濁して、生体外で免疫化された免疫化細胞の懸濁液を得る。

なお上述の(1)の手順において、免疫の効率を向上し得る観点からは、アジュバントをさらに添加するのが好ましい。アジュバントとしては、従来公知のものを適宜選択して用いればよく、特に制限はない。アジュバントは、市販のものを用いればよく、たとえば、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (SIGMA社製)、フロインド完全アジュバント (ディフコ社製)、フロインド不完全アジュバント (ディフコ社製)、リビアジュバント (コリクサ社製) などが挙げられ、中でもN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミンが生体外で効率的に免疫化を行うために好ましい。アジュバントの添加量は、特に制限はないが、免疫の効率向上の観点からは、抗原物質に対し5 μ g/ml ~ 50 μ g/mlの量を添加するのが好ましく、20 μ g/ml ~ 40 μ g/ml 添加するのがより好ましい。

本発明の〔2〕の工程で用いる細胞融合法としては、従来公知のセンダイウイルスを使用する方法、ポリエチレングリコール (PEG) を融合促進剤として使用する方法、電気パルス (PEF: pulsed electric field) 法、レーザー放射法 (laser radiation) などを特に制限なく用いることができる。これらの中でPEGを使用する細胞融合法は、比較的簡単であるため一般に広く利用されている方法であるが、PEGが酸化して生成されるアルデヒド物質が強い細胞毒性を有し、ハイブリドーマの育成に悪影響を及ぼすことが判っている。またかかる融合法では、細胞融合を行う際に、免疫化細胞とミエローマ細胞間だけでなく、免疫化細胞同士および/またはミエローマ細胞同士の間でも非特異的な細胞融合が起こってしまい、目的のモノクローナル抗体を得るまでに多くの労力と時間を要するという欠点がある。したがって本発明では、上記細胞融合法の中でも、細胞毒性を有する物質を用いることなく、免疫化細胞とミエローマ細胞とを選択的に細胞融合させることができ、上記PEGを用いた細胞融合法と比較して10倍~20倍高い効率にて目的とする抗原特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製できる、PEF法にて細胞融合を行うことが好ましい。

PEF法は、免疫化細胞に抗原物質を介してアビジンを結合させた第一の複合体と、ミエローマ細胞にビオチンを結合させた第二の複合体とで、ビオチンとアビジンとの間の強い親和力を利用し、ビオチン/アビジン架橋を用いて免疫化細胞-抗原物質-アビジン-ビオチン-ミエローマ細胞の複合体を作製し、これに高電圧矩形波パルスを負荷することで細胞融合させる方法である。このPEF法の最大の特徴は、免疫化細胞をその細胞上の抗原レセプターを介して予め抗原にて選択できるため、アビジンを結合した抗原物質を用いることで、免疫化細胞のみを選択的に第一の複合体の形成に供することができる点にある (Lo, M. M. Sら: Nature 310, 792-794 (1984)、富田昌弘ら: Biochem. Biophys. Acta. 1055, 199-206 (1990)、富田昌弘ら: J. Immunol. Methods. 251, 31-43 (2001)、Tsong, T. Yら: Methods Enzymol. 220, 238-246 (1993)、富田昌弘ら: タンパク質 核酸 酵素 45, 600-606 (2000))。

具体的には、従来公知の手順に従って、以下のように行えばよい。以下、後述するフタル酸-ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) の誘導體 (ハプテン) を抗原物質として用い、脾細胞をB細胞として用いる場合について、例示する。他の抗原物質の場合は、以下の方法と同様の方法で行うことができる。

(1) 適宜の溶媒 (DMSOなど) 中で、予め調製したカルボキシル基を含有するDEHPの誘導体 (ハプテン) に、N-ヒドロキシサクシイミドおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドヒドロクロライドを添加して、エステル化する。これにアビジンを添加して、該誘導体 (ハプテン) とアビジンとを結合したコンジュゲートを作製する。

(2) 上記コンジュゲートを免疫化細胞の懸濁液に混合し、攪拌後、遠心分離して得られた沈殿を適宜の抗生物質入りの懸濁液 (たとえば、上記のカナマイシン入りRPMI 1640) で洗浄した後、上記懸濁液に懸濁する。このようにして免疫化細胞に抗原物質を介してアビジンを結合させた第一の複合体が形成される。

(3) 常法によって予め継代培養していたミエローマ細胞を洗浄し、適宜の懸濁液 (たとえば、PBS) に懸濁してミエローマ細胞入りの懸濁液を調製し、一方でNHS-ビオチン (N-ヒドロキシスクシイミド-ビオチン) を適宜の溶媒 (たとえば、DMF) に懸濁してビオチン入りの懸濁液を調製する。これらを混合し、37℃、5%炭酸ガスインキュベータ内でローテーション後、遠心分離して得られた沈殿を上記懸濁液 (カナマイシン入りRPMI 1640) で洗浄後、該懸濁液に懸濁する。このようにしてミエローマ細胞にビオチンを結合させた第二の複合体が形成される。

(4) 上記(2)で調製した第一の複合体入りの懸濁液と、上記(3)で調製した第二の複合体入りの懸濁液とを混合する。混合の割合は、免疫化細胞を含む脾細胞懸濁液とミエローマ細胞とが10:1~1:2となる比率で行うのが好ましく、1:1となるように行うのがより好ましい。混合して得た液を遠心分離し、得られた沈殿を上記懸濁液に懸濁する。さらに遠心分離し、適宜の時間放置した後、ローテーションする。ローテーション後、遠心分離して得られた沈殿を等張ショ糖バッファ (0.25M ショ糖+2mM リン酸二水素ナトリウム/リン酸水素二ナトリウム (pH7.2)+0.1mM 塩化マグネシウム+0.1mM 塩化カルシウム) に懸濁する。このようにして、ビオチンとアビジンとの強い親和力を利用した免疫化細胞-DEHP誘導体 (ハプテン) -アビジン-ビオチン-ミエローマ細胞の複合体が形成される。

(5) 上記(4)で得られた免疫化細胞-DEHP誘導体 (ハプテン) -アビジン-ビオチン-ミエローマ細胞の複合体入りの懸濁液を、プラチナ製プレパレート型プレート上に1mlずつ加え、これに電気パルスを負荷する。該電気パルスの負荷は、たとえば、市販の細胞融合装置であるelectro square porator T820 (BTX社製)、ECM830 (BTX社製)、ECM2001 (BTX社製) などを用いて、直流高電圧の矩形波パルスを負荷する。負荷の条件は、通常、2kV/cm (10μsec×4回) または3kV/cm (10μsec×4回) であり、細胞損傷を抑えることから、2kV/cm (10μsec×4回) が好ましい。これにより、架橋形成した免疫化細胞とミエローマ細胞が選択的に細胞融合されて、ハイブリドーマが作製される。

本発明の方法にて作製されたハイブリドーマは、スクリーニングに供すべく常法にしたがって培養される。

上記ハイブリドーマにたとえばRPMI完全培地 (90% RPMI 1640+10% FCS+100μg/ml 硫酸カナマイシン+2mM L-グルタミン+50μM β-メルカプトエタノール) を添加した後、培養する。培養は、通常、96ウェルマイクロプレートや48ウェルマイクロプレート上で行い、たとえば、従来公知のように、上清をHAT含有RPMI完全培地 (100μM ヒポキサンチン+0.4μM アミノプテリン+16μM チミジン含有) で1.5週間~2週間培地交換 (たとえば0.1ml/wellずつ) した後、上清をHT含有RPMI完全培地 (100μM ヒポキサンチン+16μM チミジン含有) で1.5週間~2週間培地交換 (たとえば0.1ml/wellずつ交換) し、その後はRPMI 1640完全培地で培地交換することによって行えばよい。

所望のハイブリドーマのスクリーニングには、種々の方法が使用できるが、たとえばELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法によって行うことができる。上記ELISA法によって抗体活性が陽性であったハイブリ

10

20

30

40

50

ドーマは、当分野で通常行われている手法、たとえば限界希釈法によって、クローニングを行えばよい。クローン化されたハイブリドーマ上清の抗体価を上記の方法で測定し、安定的に力価の高い抗体を産生するハイブリドーマを選択し、目的とするモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得することができる。

ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の産生（製造）、精製は、自体公知の方法で行うことができる。抗体の産生、精製方法の具体例としては、たとえば、「エンザイムイムノアッセイ」第46～71頁、第85頁～110頁に記載され、塩析（ Na_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）、イオン交換体（DEAE、QAE、CM/cellulose、Sephadex、Sepharose、Servacelなど）、疎水クロマトグラフィー（L-フェニルアラニル-Sepharoseなど）、ゲル濾過（Sephadex G-200、Bio-Gel p-300など）、電気泳動（アガロースゲルによるゾーン電気泳動、等電点電気泳動、等速電気泳動など）、超遠心（シヨ糖密度勾配遠心法）、アフィニティークロマトグラフィー（固定化プロテインA（Protein-A Sepharose、Protein-A superoseなど））などの方法が挙げられる。

さらに、〔2〕の工程は、以下の（a）および（b）を電気パルス法により細胞融合させることを含む：（a）免疫に使用した抗原と特異的結合対の一方とを含む複合体に連結した免疫化細胞、および（b）当該特異的結合対の他方と連結したミエローマ細胞。「特異的結合対」とは、互いに特異的親和性を有する2つの化合物の特定の組合せをいい、例えば、アビジン-ビオチン、ストレプトアビジン-ビオチン、抗原（免疫に用いられたものとは異なるもの）-抗体、受容体-ホルモン、受容体-リガンド、受容体-アゴニスト、受容体-アンタゴニスト、酵素-基質、レクチン-炭水化物、核酸（RNAまたはDNA）ハイブリダイズ配列、Fc受容体またはマウスIgG-プロテインA、マウスIgG-プロテインGなどが挙げられる。特異的結合対は、直接あるいはリンカー等を介して間接的に、免疫化細胞およびミエローマ細胞に連結することができる。この工程によって、さらに効率的にハイブリドーマの出現率を上げることが可能となる。

本発明は、上述してきた〔1〕、〔2〕の工程を経て、ハイブリドーマを製造する方法である。

本発明の製造方法によれば、免疫に際し、B細胞にサイトカインおよび糖脂質を共存させることで、該サイトカインおよび糖脂質を共存させない以外は本発明と同様に行った場合（後述する比較例1、2）とは異なり、作製されたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体は、単量体であり構造的に安定なIgGタイプの抗体がIgMタイプの抗体よりも格段に多い割合で産生される。

このように本発明者らは、生体外でB細胞を免疫し、さらにこの免疫されたB細胞を用いて細胞融合を行った場合であっても、IgGタイプのモノクローナル抗体を効率的に製造することができることを見出した。なお、上記モノクローナル抗体のクラスは、公知の方法であるサンドイッチELISA法（Tandem法）によって決定することができる。

さらに本発明の方法では、免疫の際にサイトカインおよび糖脂質を共存させることで、該サイトカインおよび糖脂質を共存させない以外は同様に本発明を行った場合（後述する比較例1、2）と比較して、細胞融合後、格段に高い割合（ハイブリドーマ陽性率）でハイブリドーマを出現させることができる。さらに、PEF法にて細胞融合を行うことで、40%～85%のハイブリドーマ陽性率を得ることができる（かかるハイブリドーマ陽性率は、上記サイトカインおよび糖脂質を共存させない以外は同様に本発明を行った場合の2倍～40倍である。）。

このような本発明は、従来よりも格段に効率的かつ実用的なハイブリドーマの製造方法を実現することができる。

本発明の方法において用いる抗原物質としては、従来公知の適宜の物質、あるいは今後新規に得られる物質を、特に制限なく使用することができる。中でも、近年その早急な対応が叫ばれている内分泌攪乱物質（環境ホルモン）を抗原物質として用いることで、該内

分泌攪乱物質に対し特異的に吸着し得るモノクローナル抗体を従来よりも効率的かつ実用的に産生し得るハイブリドーマを製造することができる。ここで、「内分泌攪乱物質」とは、生体の恒常性、生殖、発生あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合、そしてそのホルモン作用そのもの、あるいはそのクリアランス等の諸過程を阻害する性質をもつ外来性の物質をいい、本明細書中においては、一般に内分泌攪乱物質として認識されている全ての物質を包含するものとする。かかる内分泌攪乱物質としては、たとえば、女性ホルモン類、男性ホルモン類、甲状腺ホルモン類、アルキルフェノールエトキシレート類、アルキルフェノール類、樹脂成分類、樹脂可塑剤類、クロロフェノール類、その他の物質が挙げられる。

上記女性ホルモン類としては、たとえば、エストロゲン、エストラジオール (E2)、エストロン (E1)、エストリオール (E3) などが挙げられる。男性ホルモン類としては、たとえば、アンドロゲン、テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオンなどが挙げられる。該甲状腺ホルモン類としては、たとえば、チロキシン (T3)、トリヨードチロニン (T4) などがそれぞれ挙げられ、また、これらの生体内代謝物である抱合体 (たとえば、グルクロニド、硫酸抱合体など) もこれらに包含される。

上記アルキルフェノールエトキシレート類 (APE) としては、たとえば、NPE (ノニルフェノールエトキシレート、たとえば、NP2EO (平均酸化エチレン鎖数: 2)、NP5EO (平均酸化エチレン鎖数: 5)、NP10EO (平均酸化エチレン鎖数: 10)、NP10EC (平均酸化エチレン鎖数: 10、末端OH→カルボン酸)、OPE (オクチルフェノールエトキシレート) などが挙げられる。

上記アルキルフェノール類 (AP) としては、たとえば、DP (4-ドデシルフェノール)、EP (4-エチルフェノール)、HP (ヘプチルフェノール)、IPP (4-イソペンチルフェノール)、2-OP (2-オクチルフェノール)、4-NP (4-ノニルフェノール)、4-OP (4-オクチルフェノール)、4-sBP (4-s e c-ブチルフェノール)、4-tBP (4-t-ブチルフェノール)、4-tPP (4-t-ペンチルフェノール)、4-tOP (4-t-オクチルフェノール) などが挙げられる。

上記樹脂成分類 (PRC) としては、たとえば、BPA (ビスフェノールA)、4,4'-EBP (4,4'-エチリデンビスフェノール)、BHPP (ビス(p-ヒドロキシフェニル)メタン)、2,2'-BHPP (2,2'-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-1-プロパノール)、2,2'-BMHPP (2,2'-ビス(m-メチル-p-ヒドロキシフェニル)プロパン)、4,4'-BHPP (4,4'-ビス(p-ヒドロキシフェニル)ペンタン酸)、4,4'-DDE (4,4'-ジヒドロキシジフェニルエーテル)、4,4'-DOHDS (4,4'-ジヒドロキシジフェニルスルホン)、4,4'-DCIDS (4,4'-ジクロロジフェニルスルホン)、BHEDBrPS (ビス[4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3,5-ジブromoフェニル]スルホン)、BHEPS (ビス[4-(2-ヒドロキシエトキシ)フェニル]スルホン)、4,4'-DDE (4,4'-ジヒドロキシデフェニルエーテル)、p,p'-DBP (p,p'-ジヒドロキシベンゾフェノン)、HBP (4-ヒドロキシビフェノールなど) が挙げられる。

上記樹脂可塑剤類 (PP) としては、BBP (フタル酸ブチルベンジル)、DBP (フタル酸ジブチル)、DCHP (フタル酸ジシクロヘキシル)、DEP (フタル酸ジエチル)、DEHP (フタル酸ジ-2-エチルヘキシル)、DEHA (アジピン酸ジエチルヘキシル)、DHP (フタル酸ジヘキシル)、DPP (フタル酸ジ-n-ペンチル)、DPrP (フタル酸ジプロピル) などが挙げられる。

上記クロロフェノール類 (CP) としては、2-CP (2-クロロフェノール)、3-CP (3-クロロフェノール)、4-CP (4-クロロフェノール)、2,3-CP (2,3-ジクロロフェノール)、2,4-CP (2,4-ジクロロフェノール)、2,5-CP (2,5-ジクロロフェノール)、2,6-CP (2,6-ジクロロフェノール)、2,3,4-CP (2,3,4-トリクロロフェノール)、2,4,5-CP (2,4,5-トリクロロフェノール)、2,4,6-CP (2,4,6-トリクロロフェノール) などが挙げられる。

、2, 3, 4, 5-CP (2, 3, 4, 5-テトラクロロフェノール)、2, 3, 4, 6-CP (2, 3, 4, 6-テトラクロロフェノール)、PCP (ペンタクロロフェノール) などが挙げられる。

その他の内分泌攪乱物質としては、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン (TCDD) を代表とするポリクロロジベンゾ-p-ジオキシン (PCDD)、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン (TCDF) を代表とするポリクロロジベンゾフラン (PCDF)、ポリクロロビフェニル (PCB)、ベンゾフェノン、ベンゾピラン、クロロベンゼン、ブromonaftール、ニトロトルエン、トリブチル錫、各種農薬、重金属 (例えば、Cd、Hg、Pbなど)、合成エストロゲン (セントクロマン、エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、ヘキセストール、2-ヒドロキシエストラジオール、タモキシフェン、ラロキシフェンなど)、食品、食品添加物 (たとえば、BHA (ブチルヒドロキシアニソール)、エコール、エンテルラクトン、フィトエストロゲン、クメストール、ホルモノネチン、ダイゼイン、ビオチニンA、ゲニステインなど) が挙げられる。

また、本発明の方法においては、タンパク質を抗原物質として用いても好適に実現することができる。上記タンパク質は、たとえばヒトインスリンなどのペプチドも包含するものとする。

なお本発明の製造方法において、たとえばDEHPなどの低分子量化合物で抗原性が比較的低い物質を抗原物質として用いる場合には、その抗原性を高める目的で、当該抗原物質とキャリアータンパク質とを結合させた複合体を用いるとよい。複合体は、たとえば、
下記式

A-R

(式中、RはCOOH、NH₂またはSHを、AはR基の離脱により抗原物質 (好ましくは上記内分泌攪乱物質またはペプチドを含むタンパク質) となる基を示す。) で表される物質を、自体公知の方法によりキャリアータンパク質に結合させることにより行うことができる。上記式で表される化合物も、自体公知の方法で、適宜の原料に、カルボキシル基、アミノ基、スルフヒドリル基を形成または導入することにより、化学的に合成できる。

たとえば、RがCOOHで、Aがポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる上記式で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルと無水コハク酸を脱水縮合 (ハーフエステル) することにより製造できる (キャンサー・バイオケミストリー・バイオフィジックス (Cancer Biochem. Biophys), 7, 175 (1984))。RがNH₂で、Aがポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる上記式で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルの水酸基を塩化チオニルにより塩素化した後 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 60, 2540 (1938))、アンモニアで処理することにより製造できる (オーガニック・ファンクショナル・グループ・プレパレーションズ (Organic Functional Group Preparations)、第1巻、382頁)。RがSHで、Aがポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる上記式で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルの水酸基を塩化チオニルにより塩素化した後 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 60, 2540 (1938))、水酸化ナトリウムと反応させることにより製造できる (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 72, 1843 (1950))。

上記キャリアータンパク質としては、当分野において従来より広く用いられている種々のキャリアータンパク質、たとえばKLH (keyhole limpet hemocyanin)、BSA (Bovine serum albumin)、OVA (ovalbumin) などが挙げられる。

本発明は、上述してきた抗体産生ハイブリドーマが製造するモノクローナル抗体、ならびに上記ハイブリドーマを用いる工程を含むモノクローナル抗体の製造方法も、提供する。本発明のモノクローナル抗体は、目的とする抗原物質 (以下、目的物質ともいう) を定

10

20

30

40

50

量的に測定する際の試薬として使用したり、種々の担体に固定化することにより上記目的とする抗原物質を濃縮するためのアフィニティークラムの製造などに利用することができる。

本発明のモノクローナル抗体の固相化用担体としては、たとえば、マイクロプレート（例、96ウェルマイクロプレート、24ウェルマイクロプレート、192ウェルマイクロプレート、384ウェルマイクロプレートなど）、試験管（例、ガラス試験管、プラスチック試験管）、ガラス粒子、ポリスチレン粒子、修飾ポリスチレン粒子、ポリビニル粒子、ラテックス（例、ポリスチレン・ラテックス）、ニトロセルロース膜、臭化シアン活性化濾紙、DBM活性化濾紙、粒状固相（例、セファロース、セファデックス、アガロース、セルロース、セファクリルなど）、鉄含有ポリカーボネート膜、マグネット含有ビーズなどが挙げられる。本発明で得られたモノクローナル抗体を担体に担持させるには、自体公知の方法である、「エンザイムイムノアッセイ」第268～296頁、「アフィニティークロマトグラフィ－ハンドブック」（アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社（1998年12月20日発行））に記載の方法によって担持できる。

本発明はさらに、抗原物質をスクリーニングする方法も提供する。本発明のスクリーニング方法は、生体外でサイトカインおよび糖脂質を共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合して得られた抗体産生ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体を用いる工程を含むことを特徴とする。また目的物質としては、従来公知の適宜の物質、あるいは今後新規に得られる物質を特に制限なく用いることができるが、上述した内分泌攪乱物質またはペプチドを含むタンパク質が好適である。

本発明のスクリーニング方法は、具体的には、上記工程（本発明のハイブリドーマの製造方法）にて製造されるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を利用して、抗原物質（目的物質）をスクリーニングする。上記目的物質の測定法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（Engvall, E., Methods in Enzymol., 70, 419-439 (1980)）、蛍光抗体法、ブランク法、スポット法、凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）等の一般に抗原物質の検出に使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁～第53頁、昭和57年3月5日）が挙げられる。感度、簡便性等の観点からは、ELISA法が汎用される。

また、本発明のモノクローナル抗体は、免疫学的濃縮方法にも利用できる。具体的には、大量の検体を、免疫吸着体カラムを通過させたり、免疫吸着体粒子と混合したりすることにより、抗原抗体反応を利用して、上記目的物質を、免疫吸着体に捕捉させ、ついで、pHの変更（pH2.5～3に下げる、pH11.5に上げるなど）、イオン強度の変更（1M NaClなど）、極性の変更（10%ジオキサン、50%エチレングリコール、3Mカオトロピック塩（SCN⁻、CCl₃、COO⁻、I⁻）など）、タンパク変性剤（8M尿素、6M塩酸グアニジンなど）の添加や、電気泳動による解離など公知の方法で溶出させることにより、免疫学的に夾雑物の少ない目的物質を、数千倍から数万倍もの高倍率に濃縮できる。これにより、上記目的物質が内分泌攪乱物質である場合にあっては、環境中に極く微量しか存在しない該内分泌攪乱物質、その分解物またはそれらの混合物を、溶媒抽出法や固層抽出法などの従来の濃縮方法と比較して、はるかに高倍率に濃縮することができ、しかも定量を妨害する夾雑物等の含量の少ない濃縮液を得ることができる。

また本発明は、サイトカインと、糖脂質とを少なくとも含有する試薬を提供する。サイトカイン、糖脂質の好適なものとしては、上述した通りであり、特に、サイトカインがインターロイキン-4であり、かつ糖脂質がリポ多糖であるのが好ましい。かかる試薬は、細胞融合用、特に生体外で免疫したB細胞とミエローマ細胞との細胞融合用として有用であり、適宜のB細胞、ミエローマ細胞と組み合わせて、本発明の抗体産生ハイブリドーマの製造方法、モノクローナル抗体の製造方法を好適に行うことができる。

【実施例】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

10

20

30

40

50

【実施例 1】

〔1〕ミエローマ細胞の培養

(1) ミエローマ細胞の解凍

ミエローマ細胞は、BALB/cマウス由来のPAI (Stocker et al., 1982) を使用した。液体窒素中に保存してあるPAIを37℃ですばやく解凍させ、クリーンベンチ内に移し、次の無菌操作を行った。

まず、予め用意しておいたRPMI 1640完全培地 (90% RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) (日本製薬社製) + 10% FCS (fetal calf serum) (大日本製薬社製) + 100 μ g/ml 硫酸カナマイシン (明治製菓社製) + 2mM L-グルタミン (日本製薬社製) + 50 μ M β -メルカプトエタノール) を10ml入れた遠心チューブに移し穏やかに混合した。

10

次に、室温、800rpm (130 \times g) で5分間遠心分離した後、上清を除去し、細胞沈殿をRPMI 1640完全培地2.5mlで懸濁した。最後に、T-25培養フラスコに移し、37℃、5%炭酸ガスインキュベータ (三洋電機社製) 内で培養した。翌日、さらに2.5mlのRPMI 1640完全培地をフラスコに加えて2日~3日ごとに継代を行った。

(2) ミエローマ細胞の継代

通常の継代は、T-25培養フラスコの底にはりついたミエローマ細胞を3回~4回軽くたたいて剥がし、RPMI 1640完全培地で5倍~10倍に希釈して行った。細胞融合には大最のミエローマ細胞を必要とするため、細胞融合の1週間前からスケールアップを行った。

20

まず、ミエローマ細胞をセルカウントし、 1×10^5 cells/mlの濃度でT-75培養フラスコを用いて培養した。融合2日前には、 1×10^5 cells/mlの濃度に希釈したミエローマ細胞をT-150培養フラスコ3個にスケールアップして培養した。

〔2〕抗原物質の調製

フタル酸-ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) は、低分子量化合物の抗原物質であるため抗原性が低い。そこで、以下の方法でDEHP誘導体を作成した。

DEHP誘導体 (ハプテン) の作成:

30

8-ブromoオクタン酸10gをテトラヒドロフラン (THF) 300mlに溶解後、ジフェニルアミノメタン20mlを添加し、室温で一晩反応させた。翌日、さらにジフェニルアミノメタン20mlを添加し、さらに室温で一晩反応させた。減圧濃縮後、反応物をヘキサン-酢酸エチル (9:1) に溶解し、シリカゲルカラムで粗精製した。

この粗精製物20gと、フタル酸2.42g、1,8-ジアザビシクロウンデンセン (DBU) 2.22gとをベンゼン60ml中で一晩中加熱還流した。翌日、DBU 2.22gを添加後、さらに6時間加熱還流し、室温に冷却後、水、クロロホルムを加え、水洗した。クロロホルム層を脱水、濃縮後、ヘキサン-酢酸エチル (9:1) に溶解し、シリカゲルカラムにて粗精製した。

この粗精製物4.1gをTHF 100mlに溶解し、10% Pd/C (50% 含水品) 0.4gを添加した。H₂ 吹き込み (0.3ml/分、5時間) 後、10% Pd/C 1.2gを追加した。さらにH₂ 吹き込み (0.5ml/分、2時間) 後、触媒を除去し、減圧濃縮した。75%メタノールに溶解後、ODSカラムにて精製し、目的物質 (DEHP誘導体) 1.9gを得た。

40

抗原性を高める目的で、KLH (keyhole limpet hemocyanin) をキャリアタンパク質として用い、予めこれらを結合させたDEHP誘導体-キャリアタンパク質複合体であるDEHP誘導体-KLHを、抗原物質として用いた。

〔3〕マウス脾細胞の調製

(1) 抗体価測定のための血清の取得

4週齢~10週齢のBALB/cマウス (SPF仕様、メス) を使用した。マウスの腹

50

腔内に0.1 g/ml 抱水クロラールを50 μ l 注射し、しばらくして動きが鈍くなった後、さらに50 μ l 注射した。マウスが完全に麻酔にかかったことを確認した後、注射針で解剖台に固定した。マウスの腹部を70%アルコールで消毒した後、解剖用ハサミで切り込みを入れ、切り目を心臓近くまで広げた。次に心臓近くの内皮をピンセットでつまみ、心臓がみえるまで解胸し、すばやく心臓から採血した。得られた採血液は、血餅化後、4℃、6700×gで5分間遠心分離し、血清を得た。得られた血清の抗体価を、後述するELISA法にて測定した。

(2) 脾細胞の調製

心臓採血後のマウスを、70%エタノールが入った300 mlのビーカー内に浸して無菌化した後、クリーンベンチ内に入れて脾細胞を摘出するべく解剖した。

まず、ピンセットで上記マウスの外皮を摘み上げ、左わき腹に解剖用ハサミで切れ目を入れ、脾臓が露出するように内皮を切った。次にピンセットを用いて脾臓を体外に引き出し、ハサミで脾臓の周りの脂肪を切り取ってマウスより摘出した。摘出した脾臓は、10 mlの抗生物質(100 μ g/ml カナマイシン)入りRPMI 1640を入れたシャーレで数回洗浄し、周りの脂肪をハサミで取り除いた。別のシャーレには、ステンレスメッシュを浸しておき、そこに脾臓を置いてラバーポリスマンで穏やかに砕いた。

次に、脾臓懸濁液を50 ml 遠心チューブに移した。さらに、ステンレスメッシュを10 mlの抗生物質入りRPMI 1640で洗浄し、懸濁液を50 ml チューブに加えた。この操作を液量が40 mlになるまで繰り返した。その後、懸濁液を2000 rpm (800×g)で5分間遠心分離することにより脾細胞を調製した。

[4] マウス脾細胞の生体外での免疫

上記[3](2)で得られた脾細胞の沈殿を5 mlの抗生物質入りRPMI 1640で懸濁し、T-25培養フラスコに2.5 mlずつ分注した。そこに、1 mg/mlのアジュバントペプチド(N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン)(SIGMA社製)を100 μ lずつ添加し、軽くフラスコを揺らして混ぜた。さらに、抗原溶液DEHP誘導体-KLH(1 mg/ml)を20 μ lと5 μ lずつ添加し、15分間放置した。最後に、予め調製しておいた40% FCSを含む完全培地(60% RPMI 1640+100 μ g/ml 硫酸カナマイシン+2 mM L-グルタミン+50 μ M β -メルカプトエタノール+40% FCS)をそれぞれのフラスコに2.5 mlずつ添加した。さらに、5 μ g/ml インターロイキン-4(I1020、SIGMA社製)を20 μ l(最終濃度:10 ng/ml)、1 mg/ml リポ多糖(L4391、SIGMA社製)を200 μ l(最終濃度:20 μ g/ml)添加し、軽く混和後、5%炭酸ガスインキュベータ内で4日間培養した。

5%炭酸ガスインキュベータ内で4日間静置後、免疫化されたマウスの脾細胞は、800×gで5分間遠心分離後、10 mlの抗生物質入りRPMI 1640で懸濁し、再び800×gで5分間遠心分離して洗浄した。遠心分離後、沈殿を2.5 mlの抗生物質入りRPMI 1640に懸濁し、生体外で免疫された脾細胞を含む懸濁液を調製した。

[5] PEF(Pulsed Electric Field)法による細胞融合と可視化解析

(1) 免疫化細胞-抗原物質(DEHP誘導体)-アビジン複合体の作製

20 μ l(1 mg/ml)のDEHP誘導体-Av(抗原物質-アビジンコンジュゲート)を2.5 mlのカナマイシン入りRPMI 1640に加え、そこに上述の方法にて生体外で免疫された脾細胞の懸濁液2.5 mlを混合した。4℃で2時間ローテーション後、800×gで5分間遠心分離し、得られた沈殿を10 mlのカナマイシン入りRPMI 1640で洗浄した。最終的に5 mlのカナマイシン入りRPMI 1640で懸濁した。

(2) ビオチン-ミエロマ細胞複合体の作製

スケールアップ培養したミエロマ細胞を回収し、130×gで5分間遠心分離し、沈殿を40 mlのPBS(phosphate-buffered saline)で懸濁した。これを再び130×g、5分間遠心分離した後、沈殿を5 mlのPBSで懸濁した。一方、30 μ lのN-ヒドロキシサクシイミド-ビオチン(NHS-ビオチン)(1 m

10

20

30

40

50

g/30 μ l in DMF) を5mlのPBSに加えておき、両者を素早く混合し、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベータ内で30分間ゆっくりとローテーションした。その後、130 \times gで5分間遠心分離し、細胞沈殿を50mlのカナマイシン入りRPMI1640で洗浄した。ビオチン化されたミエローマ細胞を5mlの抗生物質入りRPMI1640で懸濁した。

(3) 免疫化細胞-抗原物質 (DEHP誘導体) -アビジン-ビオチン-ミエローマ細胞複合体の作製と電気融合

上記〔5〕(1)、(2)で作製した各懸濁液を、脾細胞-抗原物質-アビジン複合体とミエローマ細胞-ビオチン複合体とが1:1の割合となるように混合した。これを1000rpm(200 \times g)で10分間遠心分離し、沈殿を1mlのカナマイシン入りRPMI1640で懸濁した。さらに、500rpm(50 \times g)で1分間~2分間の遠心分離後、クリーンベンチ内で30分間放置した。その後、さらに30分間、5%炭酸ガスインキュベータ内でゆっくりとローテーションした。ローテーション後200 \times gにて10分間遠心分離し、2mlの等張シヨ糖バッファ(0.25Mシヨ糖+2mMリン酸二水素ナトリウム/リン酸水素二ナトリウム(pH7.2)+0.1mM塩化マグネシウム+0.1mM塩化カルシウム)に懸濁した。これをプラチナ製プレパレート型プレート上に0.5ml~1.0mlずつ加え、細胞融合装置(electro square porator T820、BTX社製)により、2kV/cm(10 μ sec \times 4回)と3kV/cm(10 μ sec \times 4回)の条件で電気融合を行った。

電気融合後、予め用意しておいた20mlのRPMI1640完全培地に融合細胞懸濁液を静かに加え、30分間静置し、96穴プレートに0.2ml/wellになるように分注した。その後、速やかに37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベータ内で培養した。次の日に、プレートの培養上清を0.1ml/wellずつ除去し、RPMI1640完全培地で50倍に希釈したHAT(100 μ Mヒポキサンチン+0.4 μ Mアミノプテリン+16 μ Mチミジン)(SIGMA社製)を0.1ml/wellずつ加えた。

(4) 免疫化細胞の可視化解析(免疫化細胞-抗原物質-アビジン-ビオチン-フィコエリトリン複合体の作製)

PEF法において、最も重要なステップである免疫化細胞の選択について、特異的蛍光標識を用いて、次のような手順にて可視化解析を行った。

生体外にて免疫された脾細胞を2.5mlのRPMI1640に懸濁し、20 μ lのDEHP誘導体-アビジンコンジュゲートを含む2.5mlのRPMI1640と混合した後、4 $^{\circ}$ C、2時間ローテーションした。その後、800 \times gで5分間遠心分離し、10mlのハンクス平衡塩で懸濁して再び800 \times gで5分間遠心分離して洗浄した。沈殿を0.5mlのハンクス平衡塩で懸濁し、20 μ lのビオチン-フィコエリトリン(ビオチン-PE)(バイオメダ社製)を加えた後、遮光条件にて1時間室温でローテーションした。ローテーション終了後、800 \times gで5分間遠心分離し、沈殿をハンクス平衡塩で10mlに懸濁して再び800 \times gで5分間遠心分離することにより洗浄した。最終的に0.5mlのハンクス平衡塩に懸濁して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

結果、特異的に蛍光を呈するいくつかの細胞を確認することができた。このことから、目的の免疫化細胞がDEHP誘導体により特異的に認識され、免疫化細胞-抗原物質-アビジン複合体を形成していると考えられた。すなわち、生体外免疫法が低分子機能性抗原物質である内分泌攪乱物質に対しても有効であることが実証された。

なお、抗原物質によって感作されていない脾細胞懸濁液を用いた場合、DEHP誘導体-アビジン、ビオチン-PEを加えても特異的に蛍光標識される細胞は全く認めることができなかった。

〔6〕モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングとクローン化

(1) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法

倒立位相差顕微鏡で各wellを検鏡し、ハイブリドーマのコロニー形成の有無について調べた。コロニーが形成されているwellについては培養上清を取り、以下の手順に

10

20

30

40

50

てELISA法を行い、目的の抗体産生ハイブリドーマの有無を調べた。

DEHP誘導体-OVA (DEHP誘導体-オボアルブミン) を抗原物質とし、これをPBS (pH7.2) で $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、96穴プレートに $50\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ蒔き、 4°C で一昼夜静置することにより、抗原物質をプレートに吸着させた。次に、プレートをPBSで2回洗浄後、PBSで希釈した3%ゼラチンを $350\mu\text{l}/\text{well}$ 加えて 4°C で一昼夜静置し、ブロッキングを行った。さらに 37°C で1時間静置させた後、PBST (phosphate-buffered saline in 0.05% Triton X-100) で3回洗浄し、培養上清である一次抗体を $50\mu\text{l}/\text{well}$ 加えて 37°C 、1時間インキュベートした。続いてPBSTで3回洗浄後、PBSTで10000倍に希釈した二次抗体 (goat anti-mouse IgG (H+L) conjugated with HRP (horseradish peroxidase) (バイオソース社製)) を $50\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、 37°C 、1時間インキュベートした。最後に、PBSTで5回洗浄後、発色剤 (0.1M sodium citrate buffer (pH5.2) + o-phenylene diamine (1mg/ml) + 0.02% H_2O_2) を $100\mu\text{l}/\text{well}$ 加えて 37°C 、15分間インキュベートして発色させ、1M 硫酸を $50\mu\text{l}/\text{well}$ 加えて反応を止めた。これをマイクロプレートリーダー (バイオラド社製) を用い $\text{OD}_{490\text{nm}}$ にて測定を行った。

10

(2) HAT選択およびHT選択

2週間、2~3日毎に96穴プレートの培養上清をHAT含有RPMI完全培地 ($100\mu\text{M}$ ヒポキサンチン+ $0.4\mu\text{M}$ アミノプテリン+ $16\mu\text{M}$ チミジン) (SIGMA社製) で $0.1\text{ml}/\text{well}$ ずつ交換した。2週間経過した後、HAT含有RPMI培地をHT含有RPMI完全培地 ($100\mu\text{M}$ ヒポキサンチン+ $16\mu\text{M}$ チミジン) (SIGMA社製) に替えて、同様に培地交換の作業を2週間行い、それ以後はRPMI1640完全培地により培地交換を行った。

20

(3) 限界希釈法 (Limiting dilution)

上記〔6〕(1)のELISA法にて陽性であった目的の抗体産生ハイブリドーマ (ELISA陽性ウェル) を、パスツールピペットを用いて注意深くウェルから剥がし、細胞数のカウントを行った。次に、 $9\text{cells}/\text{well}$ 、 $3\text{cells}/\text{well}$ 、 $1\text{cell}/\text{well}$ 、 $0.5\text{cells}/\text{well}$ にRPMI1640完全培地で希釈し、96穴プレートにそれぞれ $0.2\text{ml}/\text{well}$ になるように各々12wellずつに分注した。その後、 37°C 、5%炭酸ガスインキュベータ内で培養した。2週間継代を行い、培地交換する前に各wellを位相差顕微鏡で観察しハイブリドーマの形成を調べた。ハイブリドーマがwell中30%~40%形成されている場合は培養上清をとり、ELISA法で抗体価を測定して目的の抗体産生ハイブリドーマの有無を決定した。

30

〔7〕モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの大量培養と保存

(1) ハイブリドーマの大量培養

限界希釈法を1回~2回繰り返した後、ELISA法による抗体価が高い ($\Delta\text{OD}>0.5$) ハイブリドーマを24穴プレートにスケールアップした。続いてT-25培養フラスコ、T-75培養フラスコの順にスケールアップした。その各々の段階において、培養上清をとり、 $800\times\text{g}$ で5分間遠心分離した上清についてELISA法を行い、抗体価を調べた。

40

(2) ハイブリドーマの保存

上記〔7〕(1)でスケールアップしたハイブリドーマは、 $130\times\text{g}$ 、5分間遠心分離し 1.5ml の100% FCSに懸濁した。次にfreezing buffer (80% RPMI1640 (日水製薬株式会社製) + 20% DMSO (SIGMA社製) + 4mM L-グルタミン (日水製薬株式会社製)) をFCS懸濁ハイブリドーマに等量 (1.5ml) 加え、混合した。これを -80°C のフリーザーで1週間~2週間保存した。その後、ドライアイス中にて液体窒素保存容器内に移動した。

また、ハイブリドーマ培養上清は0.05% NaN_3 存在下、 4°C にて保存した。

〔8〕マウス腹水中でのモノクローナル抗体産生

50

上記〔7〕(1)で得られたハイブリドーマを130×g、5分間遠心分離し、沈殿を0.5mlのPBSに懸濁した。細胞数をカウントし、 1×10^8 cells/ml以上の細胞濃度とした。そのハイブリドーマを予め3日～7日前に0.5mlのプリスタン(2,6,10,14-tetramethylpentadecane)を腹腔内に注射したマウス一匹に注射した。約2週間後、マウスの下腹部が膨らみ歩行困難になったとき、マウスの頸椎を脱臼して死亡させ、腹腔内にたまった腹水を回収した。さらに、PBSで腹腔内を洗浄し、洗液を回収した。得られた腹水は800×gで5分間遠心分離し、同じ遠心操作を2回繰り返した後、上清を0.05% NaN₃存在下4℃にて保存した。

〔9〕モノクローナル抗体の精製

上述の〔8〕で得られたマウス腹水からモノクローナル抗体をプロテインGカラムにより精製を行った。カラムの前処理として、5mlの超純水を1drop/secとなるようにカラム内にシリンジで注入し、保存用エタノールを洗い流した。次に、結合バッファーでカラム内を平衡化し、マウス腹水を等量の結合バッファーと混合した後、カラムにかけた。結合バッファーでカラム内を洗浄してカラム溶出液のOD_{280nm}がほぼ0になった後、溶出バッファーでモノクローナル抗体を分取した。各フラクションのOD_{280nm}を測定し、ELISA法で抗体価を測定した後、目的のモノクローナル抗体を含むフラクションを0.05% NaN₃存在下4℃で保存した。

【実施例2】

抗原物質としてヒトインスリン(I0259、SIGMA社製：全量25μg)を用い、B細胞選択コンジュゲートとしてビオチン-B-1-II(全量20μg：通常のペプチド合成機で合成)またはビオチン-B-3-II(全量20μg：通常のペプチド合成機で合成)を用い、かつストレプトアビジンを介してビオチン-ミエローマ細胞コンジュゲートとの複合体を細胞融合させた以外は、実施例1と同様にしてハイブリドーマを作製し、目的のモノクローナル抗体を得た。

なお、B細胞選択コンジュゲートに用いたB-1-IIおよびB-3-IIは、ヒトインスリンのB鎖のアミノ酸配列の一部に対応するものであって、具体的には、以下のアミノ酸配列のものである。

B-1-II : Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly (配列表配列番号1)

B-3-II : Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (配列表配列番号2)

比較例1

生体外での脾細胞の免疫に際し、インターロイキン-4およびリポ多糖を共存させなかった以外は、実施例1と同様にしてハイブリドーマを作製し、目的のモノクローナル抗体を得た。

比較例2

生体外での脾細胞の免疫に際し、インターロイキン-4およびリポ多糖を共存させなかった以外は、実施例2と同様にしてハイブリドーマを作製し、目的のモノクローナル抗体を得た。

評価結果1

：ハイブリドーマ陽性率およびELISA陽性率

PEF法後、倒立位相差顕微鏡を用いて観察したハイブリドーマのコロニー形成の有無の結果より、ハイブリドーマの陽性率(=(ハイブリドーマ陽性ウェル数/全ウェル数)×100(%))を算出した。

また、陽性であったハイブリドーマのELISA(実施例1の〔6〕(1)の際のELISA)の陽性率(=(ELISA陽性ウェル数/ハイブリドーマ陽性ウェル数)×100(%))を算出した。

実施例1の結果を表1に、比較例1の結果を表2に、実施例2の結果を表3に、比較例2の結果を表4にそれぞれ示す。

表1：

10

20

30

40

サンプルNo	1	2	3	4
PEF法での印加電圧(kV/cm)	2.0	3.0	2.0	3.0
全ウェル数	96	96	96	96
ハイブリドーマ陽性ウェル数	51	41	55	43
ELISA陽性ウェル数	9	22	15	12
ハイブリドーマ陽性率(%)	53.1	42.7	57.3	44.8
ELISA陽性率(%)	17.6	53.7	27.3	27.9

表 2 :

サンプルNo	1	2	3
PEF法での印加電圧(kV/cm)	2.0	3.0	3.0
全ウェル数	96	96	96
ハイブリドーマ陽性ウェル数	12	5	19
ELISA陽性ウェル数	4	1	5
ハイブリドーマ陽性率(%)	12.5	5.2	19.8
ELISA陽性率(%)	33.3	20.0	26.3

10

表 3 :

サンプルNo	1	2	3	4
選択抗原	B-1-II	B-1-II	B-3-II	B-3-II
PEF法での印加電圧(kV/cm)	2.0	3.0	2.0	3.0
全ウェル数	48	48	48	48
ハイブリドーマ陽性ウェル数	38	41	24	40
ELISA陽性ウェル数	3	6	1	6
ハイブリドーマ陽性率(%)	79.2	85.4	50.0	83.3
ELISA陽性率(%)	7.9	14.6	4.2	15.0

20

表 4 :

サンプルNo	1	2	3	4
選択抗原	B-1-II	B-1-II	B-3-II	B-3-II
PEF法での印加電圧(kV/cm)	2.0	3.0	2.0	3.0
全ウェル数	48	48	48	48
ハイブリドーマ陽性ウェル数	2	1	1	1
ELISA陽性ウェル数	0	0	0	0
ハイブリドーマ陽性率(%)	4.2	2.1	2.1	2.1
ELISA陽性率(%)	0	0	0	0

30

上記結果より、生体外でB細胞の免疫を行う際にインターロイキン-4およびリポ多糖を共存させる工程を経た後にPEF法によって細胞融合された実施例1、2のハイブリドーマは、かかる工程を経ずに得られた比較例1、2のハイブリドーマと比較して、格段に高い割合にて出現することが判る。

40

評価結果2

：抗体クラスの比率

実施例1、2および比較例1、2においてそれぞれ作製され、クローン化されたハイブリドーマの各サンプル（ここで、ELISA法にて測定値が0.5以上であったウェルが1つのサンプルであるものとする）について、産生されるモノクローナル抗体のクラスをサンドイッチELISA法（Tandem法）によって決定した。サンドイッチELISA法は、以下の手順で行った。

抗マウスIgM抗体、抗マウスIgG₁抗体、抗マウスIgG_{2a}抗体、抗マウスIgG_{2b}抗体、抗マウスIgG₃抗体（いずれもコスモ・バイオ株式会社製）を0.1M NaHCO₃（pH9.8）で希釈し、10μg/mlとして、96穴プレートに50μ

50

1/wellずつ分注し、4℃で一昼夜静置することにより、抗原物質（抗マウス抗体）をプレートに吸着させた。次に、プレートをPBSで3回洗浄後、1%ゼラチンを350 μ l/well加えて37℃で1時間～2時間インキュベートしてブロッキングを行った。PBSTで3回洗浄後、細胞培養上清を25 μ l/wellずつ加えて37℃、1時間インキュベートした。PBSTで3回洗浄後、PBSTで5000倍に希釈した二次抗体を50 μ l/wellずつ加えて37℃、1時間インキュベートした。最後に、PBSTで5回洗浄後、発色剤（上記〔6〕（1）と同じ）を50 μ l/wellずつ加えて37℃、15分間インキュベートして発色させ、1M H₂SO₄を50 μ l/well加えて反応を止めた。これを、マイクロプレートリーダーを用いOD_{490nm}にて測定を行い、モノクローナル抗体のタイプを決定した。

10

実施例1および比較例1の結果を、表5に示す。

表5：

	サンプルNo	IgMタイプ	IgGタイプ
実施例1	1	0.34±0.08	0.70±0.16
	2	0.37±0.19	0.56±0.18
	3	0.22±0.08	0.53±0.16
	4	0.22±0.08	0.58±0.16
比較例1	1	0.55±0.44	0.12±0.02
	2	0.57±0.02	0.14±0.01
	3	0.58±0.04	0.37±0.04
	4	0.40±0.24	0.08±0.04
	5	0.55±0.25	0.21±0.05

20

上記結果より、生体外でB細胞の免疫を行う際にインターロイキン-4およびリポ多糖を共存させる工程を経て得られた実施例1、2のモノクローナル抗体は、かかる工程を経ずに得られた比較例1、2のモノクローナル抗体と比較して、格段に高い割合にてIgGタイプのモノクローナル抗体が製造されることが判る。

評価結果3

：生体外免疫への影響

実施例1の〔5〕（4）での特異的蛍光標識を用いた脾細胞の可視化解析において、目的の免疫化細胞がDEHP誘導体-アビジンコンジュゲートにより特異的に認識された結果が得られたことは上述した。

30

図1は実施例1の可視化解析結果を示す顕微鏡写真であり、図2は比較例1の可視化解析結果を示す顕微鏡写真である（共に、共焦点レーザー顕微鏡により撮影（300倍拡大））。上記可視化解析においてはさらに、上記生体外での免疫の際にインターロイキン-4およびリポ多糖を共存させることで、インターロイキン-4およびリポ多糖を共存させない場合と比較して特異的に認識される脾細胞の数が顕著に増加することが判明した。

また上記可視化解析の際、共焦点レーザー顕微鏡での観察の前に、血球計数盤を用いて細胞数を調べたところ、4日間の生体外免疫の間に、脾細胞全体としてほぼ10倍（実施例1：4.7×10⁷ cells～5.4×10⁷ cells、比較例1：0.58×10⁷ cells）の細胞数の増加も認められ、生体外免疫の際にインターロイキン-4およびリポ多糖を共存させることで、細胞が増殖することを示唆する結果も得られた。

40



【産業上の利用可能性】

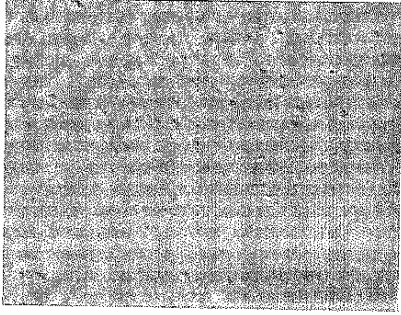
以上の説明で明らかなように、本発明の製造方法で得られたハイブリドーマは、従来と比較して格段に高い割合（ハイブリドーマ陽性率）で出現する。さらに、本発明の製造方法で得られたハイブリドーマは、5量体であり構造的に不安定なIgMタイプよりも、単量体であり構造的に安定なIgGタイプのモノクローナル抗体を格段に多い割合で産生できる。このようなハイブリドーマの製造方法を利用することで、従来と比較して格段に有用な、モノクローナル抗体の製造方法、細胞融合用試薬、抗原物質のスクリーニング方法等を提供することができる。



【配列表フリーテキスト】

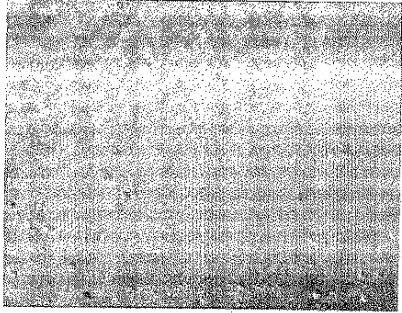
配列番号1：B-1-I I

50

【 1】
 1



【 2】
 2



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2004/002926
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/00, C07K16/00, C12N5/00, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/00, C07K16/00, C12N5/00, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Masahiro TOMITA et al., Kogen ni yoru B Saibo Sentaku o Mochiita Kokoritsu Monoclonal Kotai Sakuseiho, Biophysics (1994), Vol.34, No.2, pages 40 to 43	16/1-15
X/A	TOMITA, M. et al., Targeting antigen-specific receptors on B lymphocytes to generate high yields of specific monoclonal antibodies directed against biologically active lower antigenic peptides within presenilin 1., J.Immunol.Methods.(2001), Vol.251, Nos.1 to 2, pages 31 to 43	16/1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 April, 2004 (09.04.04)		Date of mailing of the international search report 27 April, 2004 (27.04.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002926

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Mitsumi SUGO et al., "Kankyo Hormon ni Taisuru Shinki Monoclonal Kotai Sakuseiho no Kaihatsu", Seikagaku (2001), Vol.73, No.12, page 1469	16/1-15
X/Y	Masahiro TOMITA et al., "Kogen no B Saibo Ninshiki ni Motozuku Koritsuteki Shinki Monoclonal Kotai Sakuseiho no Kaihatsu", CSJ: The Chemical Society of Japan, Biotechnology Bukai Symposium Koen Yoshishu (2001), Vol.5, page 63	16/1-15
Y	SNAPPER, CM. et al., Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4., J.Exp.Med.(1988), Vol.167, No.1, pages 183 to 196	1-15
Y	BERGSTEDT-LINDQVIST, S. et al., Interleukin 4 instructs uncommitted B lymphocytes to switch to IgG1 and IgE., Eur.J.Immunol.(1988), Vol.18, No.7, pages 1073 to 1077	1-15
Y	KNODEL, M. et al., Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching., Eur.J.Immunol.(2001), Vol.31, No.7, pages 1972 to 1980	1-15
Y	GOODMAN, DJ. et al., The IL-4 induced increase in the frequency of resting murinesplenic B cells expressing germline Ig heavy chain gamma 1 transcripts correlates with subsequent switching to IgG1., Int.Immunol.(1993), Vol.5, No.2, pages 199 to 208	1-15
Y	BURGER, C. et al., The response of B cells in spleen, Peyer's patches, and lymph nodes to LPS and IL-4., Cell Immunol.(1991), Vol.138, No.1, pages 35 to 43	1-15
P,X	TOMITA, M. et al., Production of monoclonal antibodies with sensitivity for endocrine disruptors by a pulsed electric field method., Seikagaku, 25 August, 2003 (25.08.03), Vol.75, No.8, page 876, 2P-601	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002926

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- in written format
- in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in computer readable form
- furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002926

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 15 relate to a method of producing a hybridoma by fusing a B cell, which has been immunized with an antigenic substance in the coexistence of a cytokine at a sufficient concentration for selectively producing an IgG type antibody and a glycolipid *in vitro*, with a myeloma cell and the thus obtained hybridoma. In contrast, the invention according to claim 16 has no description concerning the method of producing a hybridoma and the hybridoma *per se*. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between the inventions according to claims 1 to 15 and the invention according to claim 16 involving one or more of the same or corresponding special technical features.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/002926
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl' C12N 15/00, C07K 16/00, C12N 5/00, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577</p>		
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl' C12N 15/00, C07K 16/00, C12N 5/00, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577</p>		
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>		
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STM), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST7ライク (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	富田昌弘他「抗原によるB細胞選択を用いた高効率モノクローナル抗体作製法」生物物理 (1994) 第34巻第2号第40-43頁	16/1-15
X/A	TOMITA, M. et al., Targeting antigen-specific receptors on B lymphocytes to generate high yields of specific monoclonal antibodies directed against biologically active lower antigenic peptides within presenilin 1. J Immunol Methods. (2001) Vol. 251, No. 1-2, p. 31-43	16/1-15
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日	09.04.2004	国際調査報告の発送日
		27.4.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 左海 匡子	4N 3038
	電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/002926
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	菅生みつ美他「環境ホルモンに対する新規モノクローナル抗体作製法の開発」、生化学(2001)第73巻第12号第1469頁	16/1-15
X/Y	富田昌弘他「抗原のB細胞認識に基づく効率的新規モノクローナル抗体作製法の開発」、日本化学会バイオテクノロジー部会シンポジウム講演要旨集(2001)第5巻第63頁	16/1-15
Y	SNAPPER, CM. et al., Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. J Exp Med. (1988)Vol.167, No.1, p.183-196	1-15
Y	BERGSTEDT-LINDQVIST, S. et al., Interleukin 4 instructs uncommitted B lymphocytes to switch to IgG1 and IgE. Eur J Immunol. (1988)Vol.18, No.7, p.1073-1077	1-15
Y	KNODEL, M. et al., Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. Eur J Immunol. (2001)Vol.31, No.7, p.1972-1980	1-15
Y	GOODMAN, DJ. et al., The IL-4 induced increase in the frequency of resting murinesplenic B cells expressing germline Ig heavy chain gamma 1 transcripts correlates with subsequent switching to IgG1. Int Immunol. (1993)Vol.5, No.2, p.199-208	1-15
Y	BURGER, C. et al., The response of B cells in spleen, Peyer's patches, and lymph nodes to LPS and IL-4. Cell Immunol. (1991)Vol.138, No.1, p.35-43	1-15
P, X	TOMITA, M. et al., Production of monoclonal antibodies with sensitivity for endocrine disruptors by a pulsed electric field method. 生化学(2003.08.25)第75巻第8号第876頁 2P-601	1-16

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/002926

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
- a. タイプ 配列表
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット 書面
 コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された
2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/002926

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
- 2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
- 3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-15に係る発明は、IgGタイプの抗体を選択的に産生するのに十分な濃度のサイトカイン及び糖脂質を生体外で共存させて抗原物質で免疫したB細胞と、ミエローマ細胞を細胞融合して抗体産生ハイブリドーマを製造する方法及びそうして得たハイブリドーマに係る発明であるのに対し、請求の範囲16に係る発明は、そのようなハイブリドーマの製造法及びハイブリドーマについての記載がないものであるから、請求の範囲1-15に係る発明と請求の範囲16に係る発明の間に、一以上の同一または対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるとは認められない。

- 1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- 2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
- 4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CD21 CD30 DA01 DA13
4B065 AA90X AB04 AC14 BA08 BD50 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	产生杂交瘤的方法及其用途		
公开(公告)号	JPWO2004078964A1	公开(公告)日	2006-06-08
申请号	JP2005503156	申请日	2004-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	三重TLO		
申请(专利权)人(译)	有限公司三联TLO 日本ENVIRO化工有限公司		
[标]发明人	富田昌弘 藤本茂		
发明人	富田 昌弘 藤本 茂		
IPC分类号	C12N5/10 C07K16/24 C12P21/08 G01N33/53 C07K16/00 C12N5/16		
CPC分类号	C07K16/00 C07K2317/10 C12N5/163		
FI分类号	C12N5/00.B C07K16/24 C12P21/08 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CD21 4B064/CD30 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BD50 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	高岛肇		
优先权	2003059667 2003-03-06 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是一种更有效和实用的方法，通过融合离体免疫B细胞的免疫细胞与骨髓瘤细胞产生抗体产生杂交瘤，并详细地说，体外本发明提供了通过细胞因子和糖脂共存下用抗原物质免疫的B细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合产生抗体产生杂交瘤的方法，及其用途。