

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**WO2009/072660**

発行日 平成23年4月28日 (2011. 4. 28)

(43) 国際公開日 **平成21年6月11日 (2009. 6. 11)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 21/08 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 39/395 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 39/395 B	4 C O 8 5
<b>G O 1 N 33/531 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 39/395 J	4 H O 4 5
<b>C O 7 K 16/18 (2006. 01)</b>	G O 1 N 33/531 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2009-544772 (P2009-544772)	(71) 出願人 000126757 株式会社アドバンス 東京都中央区日本橋小舟町5番7号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2008/072361	
(22) 国際出願日 平成20年12月3日 (2008. 12. 3)	
(31) 優先権主張番号 特願2007-312931 (P2007-312931)	(72) 発明者 稲垣 貴之 東京都中央区日本橋小舟町5番7号 株式会社アドバンス内
(32) 優先日 平成19年12月3日 (2007. 12. 3)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-222215 (P2008-222215)	(72) 発明者 吉見 達成 東京都中央区日本橋小舟町5番7号 株式会社アドバンス内
(32) 優先日 平成20年8月29日 (2008. 8. 29)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	
	F ターム (参考) 4B024 AA01 BA53 BA56 BA58 CA02 DA06 EA04 GA03 4B064 AG26 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 4C085 AA13 AA14 AA19 DD62 DD88

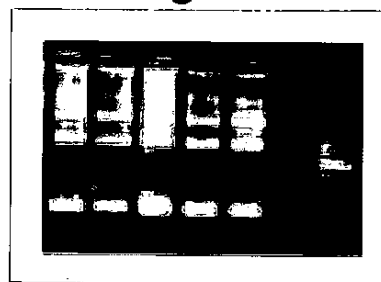
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体作製方法

(57) 【要約】

体外で免疫用細胞を含む組織を抗原と刺激物質を含む培養液中で免疫する工程と、前記免疫された細胞を選別する工程と、前記選別された免疫細胞から抗体を得る工程とを含む抗体作製方法。この抗体作製方法によると、抗体を短時間で大量に作製することができ、よって免疫学的検査の普及に寄与することができる。

**Fig.1A**



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

体外で免疫用細胞を含む組織を抗原と刺激物質を含む培養液中で免疫する工程と、  
前記免疫された細胞を選別する工程と、  
前記選別された免疫細胞から抗体を得る工程とを含む抗体作製方法。

## 【請求項 2】

前記免疫細胞から、PCR増幅手法により増幅抗体遺伝子を取得した後、宿主細胞により抗体又は抗体に類する蛋白質の発現調製をするステップをさらに含む請求項 1 に記載の抗体作製方法。

## 【請求項 3】

前記組織が免疫用動物である請求項 1 に記載の抗体作製方法。

10

## 【請求項 4】

前記選別された細胞が、クラススイッチ若しくはアフィニティマチュレーションの発生した細胞である請求項 1 に記載の抗体作製方法。

## 【請求項 5】

前記免疫された細胞の選別が、フローサイトメトリー又は染色による請求項 1 に記載の抗体作製方法。

## 【請求項 6】

前記刺激物質が、免疫担当細胞上に発現しているサイトカイン受容体、表面抗原又はシグナル伝達に関与する受容体を刺激する物質である請求項 1 に記載の抗体作製方法。

20

## 【請求項 7】

前記抗原がペプチドである請求項 1 に記載の抗体作製方法。

## 【請求項 8】

前記抗原が S100 family に属するタンパク質であり、一本鎖抗体 scFv (single chain variable fragment) 若しくは抗体 IgG1 (Immunoglobulin G1) を取得する請求項 1 に記載の抗体作製方法。

## 【請求項 9】

前記抗原が S100A10 タンパク質であり、一本鎖抗体 scFv (single chain variable fragment) 若しくは抗体 IgG1 (Immunoglobulin G1) を取得する請求項 1 に記載の抗体作製方法。

30

## 【請求項 10】

前記刺激物質が、サイトカイン受容体に対する刺激物質としての、IL-4 又は IL-5、表面抗原に対する刺激物質としての、anti-CD38 抗体又は anti-CD40 抗体、及びシグナル伝達に関与する受容体に対する刺激物質としての LPS (Lipopolysaccharide) の少なくとも 1 つである請求項 6 に記載の抗体作製方法。

## 【請求項 11】

体外で免疫用細胞を含む組織と、IL-4、IL-5、anti-CD38 抗体、anti-CD40 抗体及び LPS からなる群から選ばれた 1 以上の刺激物質を含む培養液中で免疫して抗体を作製する請求項 1 に記載の抗体作製方法。

## 【請求項 12】

選別された前記抗体遺伝子アミノ酸配列を決定する工程と、  
このアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーと比較し、ホモロジー (相同性) の高い配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーから選択し又は改変調整してヒト化抗体遺伝子を形成する工程とをさらに含む請求項 1 に記載の抗体作製方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は抗体作製方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

50

周知の通り、生体防御機能のなかでもその中心的な存在である免疫機能の解明は、疾病の診断、治療において、重要な課題となりつつある。例えば、癌、糖尿病等の生活習慣病の他各種疾病の診断に用いられる手法の中で、疾病に深く関わりのあるマーカー物質の濃度、量を目視可能に検出するイムノクロマト法のように、より簡易的診断が可能なものまでも提案されており、研究用試薬、診断用試薬、各種物質モニター用試薬、免疫学的診断、治療の分野はより拡大していくものであるが、当該方法における抗体の安定した確保は、今後より重要になってくることが明らかである。また、ファージディスプレイ系を用いた抗体ライブラリー作製技術が開発され、ヒト抗体単離も可能となっている。

ところで、免疫学的測定に必要なモノクローナル抗体の作製は、まずマウスに抗原を注射（免疫）する工程で約3ヶ月を要する。その後抗体を産生しているB細胞群を取り出し、ミエローマ細胞と細胞融合する。この工程によって、無限に増殖することが可能な抗体産生細胞（ハイブリドーマ）群を構築する。最後にこのハイブリドーマ群の中から、目的にあった抗体を産生している細胞を選別（クローニング）し、この細胞を用いて抗体の大量調製を実施する。このクローニング工程では、ハイブリドーマ群を希釈し、1ウェルに1細胞しかいないという状態にして、1細胞から培養を行う。これを抗体の性質が検討できる細胞濃度まで増殖させ、得られるモノクローナル抗体の性質を検査する。この検査で陽性となったウェルを再度希釈し、上記と同様に検査を実施する。この操作を複数回実施し、使用に耐えうるハイブリドーマを分離取得する。この工程1サイクルに約2週間を要し、全体で約3ヶ月以上を要する場合もある。このようにモノクローナル抗体の作製には手間と時間のかかる作業が必要であり、また、これを専門の業者に依頼すると、抗体の作製費用が高額となる。

ここで、公知文献を挙げて抗体作製方法を具体的に説明すると、特開平10-282097号公報には、アジュバンド物質、サイトカインの組合せを特徴とする抗原に対する特異的な免疫法が記載されている。特開2004-121237号公報には、抗体産生応答の誘導方法により、抗原特異的抗体の産生応答が誘導された抹消血リンパ球細胞を、エプスタインバールウィルスにより不死化し、抗原特異的B細胞を単離して抗原特異的抗体産生B細胞を調製し、さらにこのB細胞を培養することを特徴とする抗原特異的抗体の製造方法が記載されている。特開2006-180708号公報には、標識化抗原をターゲット細胞に結合させる工程と、標識化ターゲット細胞を分離する工程と、抗体遺伝子を調製する工程と、抗体遺伝子を発現ベクターを用いて発現させる工程とを含む抗体作製方法が記載されている。また、特表2006-516408号公報には、一連の工程を経て、目的の抗体からヒト化高親和性抗体を作製する方法が記載されている。

#### 【発明の開示】

#### 【0003】

本発明の目的は、したがって、手間と時間が係る作業が必要な抗体作製をより短時間で、しかも容易に抗体が作製できるような新規な抗体作製方法を提供することにある。

また、本発明は、これらの新規な抗体作製手法に基づき、腎臓癌マーカーとして今般注目されているS100A10タンパク質の免疫学的測定、治療に有効な抗体作製方法を実現することを目的としている。S100A10タンパク質は、高山達也他、腎細胞癌におけるS100A10蛋白の特異的発現、腎癌研究会会報、28:9-10, 2005等で示されるように、腎臓癌マーカーとしても有用であり、当該マーカーは、尿成分からも得られることから、腎臓癌の簡易的な診断においてその価値が高いからである。

これらの目的を達成するため、本発明は、体外で免疫用細胞を含む組織を抗原と刺激物質を含む培養液中で免疫する工程と、その免疫された細胞を選別する工程と、その選別された免疫細胞から抗体を得る工程とを含む抗体作製方法を提供する。

すなわち、本発明は、いわゆる体外免疫法において、特定の刺激物質を添加した培養液中で、抗原による感作免疫細胞を得ることで、通常必要としていた時間の数十分の一の時間で抗体を作製することを実現したものである。

より詳細には、まず、異物（抗原）が体内に入ると、マクロファージや樹状細胞がこれを細胞内に取り込む。異物は、細胞内で分解し、分解産物を細胞膜表面上に提示する。次

いで、分解産物にナイーブT細胞が近づき、ナイーブT細胞表面のT細胞レセプター（TCR）を介して抗原を認識する。この過程を経てT細胞が活性化され、ヘルパーT細胞（Th2）となる。

一方B細胞も体内に侵入した異物（抗原）を細胞表面上のB細胞レセプター（BCR）で認識して細胞内に取り込む。取り込んだ抗原をやはり分解し、分解産物をMHC Class II分子上に提示する。この際に細胞膜表面にCD40という分子も同時に発現する。

このようにしてできたTh2と抗原提示B細胞が近づき、互いに認識することでB細胞の活性化と抗体のクラススイッチが入る。この際に、同じ抗原で活性化した分子同士でなければかかる現象は発現しない。

10

なお、上記の場合には免疫反応を生体内で実施しているけれども、この免疫反応を生体外で発生させる方法が、いわゆる体外免疫法である。

本発明は、生体外において、所望の抗体産生細胞を得るために、刺激物質を添加してB細胞を抗体産生細胞（プラズマ細胞）又はメモリーB細胞へと分化誘導するものである。ここで、刺激物質とは、例えばB細胞、樹状細胞、T細胞などのような免疫担当細胞の膜表面に発現しているレセプター分子と相互作用可能である限り、特に制限はない。本発明の実施には、特にサイトカインレセプターに対する刺激物質として、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-21、表面抗原に対する刺激物質としてTGF- $\beta$ （Transforming Growth Factor-beta）、BAFF（B cell Activating Factor）、APRIL（A Proliferation-Inducing Ligand）、CD40 ligand、CD38 ligand、BCDF（B Cell Differentiation Factor）、BCAF（B Cell Activation Factor）、シグナル伝達に参与する受容体に対する刺激物質としてLPS（Lipopolysaccharide）等が例示される。刺激物質の使用濃度は、免疫する細胞濃度に依存して変化するけれども、LPSは10ng/mL~500 $\mu$ g/mLの濃度が良く、特に20~80 $\mu$ g/mLの濃度が推奨される。また、LPS以外の物質では、一般に1ng/mL~50 $\mu$ g/mLの濃度が良く、特に10ng/mL~40ng/mLの濃度が推奨される。また、これら物質の機能を代替するアゴニスト抗体であっても問題はない。その分化誘導の過程において、特にIL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体刺激により、抗体の親和性成熟及びクラススイッチを誘導し、より親和性の高い抗体となすことができる。

20

30

さらに、FACSscanのようなフローサイトメトリー等に基づく細胞分離装置を用いて、目的とした細胞を染色して選別する手法を利用した感作免疫細胞の検出及び分離を行う。

本発明における免疫細胞の選別及び検出の際に用いられる染色剤としては、特に限定されるものではない。例えば、染色剤としてTrypan Blueを用いて増殖・生存しているB細胞を検出しているが、その他、フローサイトメトリーの際に用いられるFITCやPEなどの蛍光物質を標識した抗原や抗体、さらに細胞内のカルシウム濃度を検出するFura-2のような蛍光プローブや細胞内のDNAを染色するエチジウムブロマイドに代表されるDNA染色剤等、目的とする免疫細胞を染色できるものであれば、適宜使用することができる。

40

また、クラススイッチやアフィニティマチュレーションの発生した細胞を選別する際も、上記したものと同様の染色剤を適宜使用することができる。

染色された細胞を検出・選別する手法は、例えばフローサイトメトリー等の細胞分離装置の他、例えばヘモサイトメーター等の血球計算盤や、電気泳動デバイス、遠心分離デバイス、磁気ビーズデバイス、マイクロ流路デバイスなどを好適に利用することができる。

また、この分離された細胞と、ミエローマ細胞を融合させて、ハイブリドーマを得ても良いが、ハイブリドーマを得る必要は必ずしもない。

さらに、本発明は、抗体遺伝子を得るための細胞を、組織上から選別すべく、体外免疫

50

工程により、免疫細胞を選別し、その免疫細胞から、抗体遺伝子をPCR手法を用いて形成し、これを宿主細胞に導入して培養発現し、抗体の大量生産をする構成を取り得るものであり、当該手法によれば、組織片から免疫後の細胞を得るため、作業効率の向上が図れる。

当該細胞から得られる抗体遺伝子をPCR (polymerase chain reaction) 法により増幅し、更に大腸菌等の宿主細胞により、好ましくはコロニー化させて抗体を得る工程を組み合わせることで、大量の抗体を短時間で作製することが可能となる。宿主細胞としては、大腸菌の他、ストレプトマイセス、枯草菌、酵母、CHO細胞、COS細胞、HEK293細胞、等が例示される。

また、発現ベクターとしては、宿主細胞で発現されるものであれば、特に限定されるものではない。発現ベクターとして、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、染色体、エピソーム、ウイルス由来、レトロウイルス由来のベクターなどを例示することができる。

上記したような課題に加えて、本発明者らは、体外で免疫細胞を選別し得たとしても、スクリーニングまでの準備としてのハイブリドーマ形成工程を要することなく抗体遺伝子の分離ができないかという課題にも取り組んだ。

本発明者らは、体外免疫手法を採るに際し、メモリーB細胞又はプラズマ細胞へ分化誘導及び、その過程で発生すると考えられる抗体の親和性成熟・クラススイッチを所定の刺激物質の添加により実現できるという知見を得、本発明を完成した。

従来、高親和性抗体の作製は、生体内においては、繰り返し抗原を免疫することにより、メモリーB細胞又はプラズマ細胞への分化誘導を行い、その過程で発生すると考えられる抗体の親和性成熟・クラススイッチを利用している。分化誘導した免疫細胞からハイブリドーマを形成し、スクリーニングを行うことで高親和性抗体を得ている。一方、生体外の場合は、ハイブリドーマや市販のライブラリーなどから得た抗体遺伝子にPCRを用いたランダム変異導入法等により様々な変異を導入したライブラリーを構築し、ファージミドベクターへの組み込みを経て、パニング法によって、強い抗体をスクリーニングする方法が主であった。

しかしながら、本発明者らは、生体外で特定の刺激物質を、所定の環境下で、供給することでもメモリーB細胞又はプラズマ細胞への分化誘導及び、その過程で発生すると考えられる抗体の親和性成熟・クラススイッチが可能であることを知見したのである。また、刺激物質の導入は、B細胞をメモリーB細胞、プラズマ細胞へ分化誘導することを可能としていることから、体外免疫における当該手法は、従来の脾臓細胞そのものもしくは、B細胞とT細胞の共培養状態でしか免疫ができなかったものを、B細胞のみであっても免疫可能にし、抗原も従来の体外免疫法同様、生体内での免疫に比べて1/1000~1/10000程度の少量で可能となった。

さらに、本発明において使用する刺激物質は、親和性成熟や抗体のクラススイッチに関係している蛋白質の発現を誘導し、その結果、抗体のIgMからIgGへのクラススイッチを迅速にかつ確実にに行わせることも実現した。

要するに、本発明は、いわゆる体外免疫法において、組織片をすり潰す等して得られる細胞に特定の刺激物質を添加した培養液で、抗原による感作を行い免疫細胞を得ることで、通常免疫動物を免疫した場合に必要としていた時間の数十分の一の時間で実現できるようにしたものである。

上記のような本発明による抗体作製方法の実施において、生体内及び生体外において免疫反応を発生させる方法は、すでに説明したような手法によって有利に実施することができる。

本発明における体外免疫手法において、各種の刺激物質と各種の分化、誘導等との関係について以下に説明する。

本発明で示す抗原は、免疫用組織片調製直後の1回で充分であるが、2~3日の間隔を置いて、複数回行っても制限はない。またその際の抗原濃度は1pmol~1mmolが好ましく、例えば1nmolを例示することができる。

抗原刺激を補助する目的でLPSに代表されるTLR (Toll Like Receptor) を刺激する物質を添加しても良い。この刺激物質の添加は、抗原刺激の度に行うことが好ましく、添加量は10 ng/mL~500 µg/mLの濃度が良く、特に20~80 µg/mLの濃度が良い。

また、本発明で示す、メモリーB細胞又はプラズマ細胞へ分化誘導及び、その過程で発生すると考えられる抗体の親和性成熟・クラススイッチの誘導用刺激物質としては、前述の刺激物質であれば特に制限はないが、特にIL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体が好ましい。添加濃度は、IL-4、IL-5は1 ng/mL~50 µg/mLの濃度が良く、特に10 ng/mL~40 ng/mLが好ましく、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体は1 ng/mL~50 µg/mLの濃度が良く、特に100 ng/mL~10 µg/mLが好ましい。また、この刺激物質の添加は、抗原刺激の度に行うことが好ましい。

10

本発明における体外で行う免疫用の組織片を構成する細胞としては、例えば、上述したものの他、例えばマウス、ラット、モルモット、ラビットなどのような免疫動物由来の臓器・組織から得た細胞、iPS細胞・ES細胞を分化させて調整した免疫担当細胞、培養細胞株を分化させて調整した免疫担当細胞などを例示することができる。

本発明で用いられる抗原には、例えば、h (ヒト) S100A10、he (鶏) EL、h (ヒト) Ras、h (ヒト) rap74、h (ヒト) TPO2B、b (ウシ) SA、b (ウシ) Casein等のマウス由来以外の蛋白質、マウス由来のm (マウス) S100A10、mSA、mMapk1等の蛋白質、ペプチド (4種類: 7mer、10mer、16mer、20mer)などを例示することができる。さらに、本発明の実施では、従来抗体を得るために用いることができない、低分子化合物 (ローダミン等の蛍光物質、FITC) も利用可能となる。

20

本発明は、体外での目的に応じた刺激物質の導入により、T細胞を必要とせず、B細胞を抗体産生細胞に分化誘導する工程により、低分子抗原の利用が可能になるほか、クラススイッチによる好ましい抗体、親和性成熟による抗体が得られる免疫細胞を得ることができる。

さらに、上記したように、FACSscanのようなフローサイトメトリー等に基づく細胞分離装置を用いて、目的とした細胞を染色して選別する手法を利用した感作免疫細胞の検出及び分離を行う。

30

その他、得られる免疫細胞の大きさは、他の細胞に比べ大きいこと、更に親和度を成熟させた場合、細胞の大きさがより大きくなることもあるため、細胞の大きさによって、選別することも可能である。また、当該細胞の大きさにより、選別する手法としては、例えば特開2007-175684号公報等に記載された手法を好適に使用することができる。

本発明における免疫細胞の選別、検出の際に用いられる染色剤は、すでに説明した通りである。また、クラススイッチやアフィニティマチュレーションの発生した細胞を選別する際も、上記したように、同様の染色剤を適宜使用することができる。

さらに、本発明は、上記したように、抗体遺伝子を得るための細胞を、組織上から、体外免疫工程により、免疫細胞を選別し、その免疫細胞から、抗体遺伝子をPCR法を用いて形成し、これを宿主細胞に導入して培養発現し、抗体の大量生産をする構成を取り得るものであり、当該手法によれば、組織片から免疫後の細胞を得るため、作業効率の向上を図ることができる。ここで、免疫細胞を選別しないで、組織片の細胞の遺伝子を分離したとしても、PCRに使用するプライマーが抗体遺伝子特異的なものであるため、目的の遺伝子のみを取得することが可能であり、免疫細胞を選別した場合と同様に、抗体遺伝子を抽出する手法を採用することも可能である。

40

上記したように、当該細胞から得られる抗体遺伝子をPCR法により増幅し、さらに大腸菌等の宿主細胞により、好ましくはコロニー化させて抗体を得る工程を組み合わせることで、大量の抗体を短時間で作製可能となすことができる。使用しうる宿主細胞及び発現ベクターは、前記した通りである。

50

本発明における抗体の選別方法としては、例えば、ファージや大腸菌、酵母、動物細胞等の表面に抗体を表示させる方法、酵母、大腸菌等を用いる2-ハイブリッド法、IVV法、リボソームディスプレイ法のようなDNAやmRNAに提示させる方法、表面プラズモン共鳴を利用したBIACORE法、ELISA法、ウェスタンブロット法、磁気ビーズに抗体もしくは高原を固定化し、磁力を用いた選別(MACS)方法等を例示することができる。この選別方法は、タンパク質間相互作用を調べ得る手法であれば、特に限定されるものではない。

本発明によれば、以下の詳細な説明から理解されるように、短時間で、目的とする免疫細胞を分離及び取得することができ、さらには、遺伝子工学的な手法による抗体の作製によって、迅速な抗体の生産及び取得を可能とすることができる。この免疫細胞は、とりわけスクリーニング等に好適である。 10

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1Aは、調製したTotal RNAの電気泳動を示す写真、図1Bはその説明図であり、

図2Aは、調製したcDNAの電気泳動を示す写真、図2Bはその説明図であり、

図3Aは、調製したscFv PCR産物の電気泳動を示す写真、図3Bはその説明図であり、

図4Aは、調製した大腸菌クロンの電気泳動を示す写真、図4Bはその説明図であり、

図5Aは、精製したMBP-scFv蛋白質のSDS-PAGE法による解析図、図5Bはその説明図であり、

図6は、抗原とIgG1陽性率の関係をプロットしたグラフであり、

図7は、マーカー遺伝子とmRNA発現量の関係をプロットしたグラフであり、

図8は、サイトカインの細胞毒性試験の結果を刺激物質と比増殖率の関係としてプロットしたグラフであり、

図9A及び図9Bは、それぞれ、刺激物質と比増殖率の関係をプロットしたグラフであり、

図10A、図10B、図10C及び図10Dは、それぞれ、単独刺激時のBlimp-1発現量、Xbp-1発現量、Bcl-6発現量及びAID発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、 30

図11A及び図11Bは、それぞれ、複合刺激、プラズマ細胞分化時のBlimp-1発現量及びXbp-1発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図12A及び図12Bは、それぞれ、複合刺激、体細胞変異時のBcl-6発現量及びAID発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図13は、複合刺激、プラズマ細胞分化時のBlimp-1発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図14は、複合刺激、プラズマ細胞分化時のXbp-1発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図15は、複合刺激、体細胞変異時のBcl-6発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、 40

図16は、複合刺激、体細胞変異時のAID発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図17A及び図17Bは、それぞれ、サイトカイン濃度の上限と下限のマーカー発現量を、抗原1nmolを免疫した場合と抗原0.1nmolを免疫した場合についてプロットしたグラフであり、

図18A及び図18Bは、それぞれ、B細胞の分化の検討の結果を、脾臓細胞中のB細胞の割合と脾臓細胞中のプラズマ細胞の割合とについてプロットしたグラフであり、

図19A、図19B、図19C及び図19Dは、それぞれ、B細胞の分化の検討の結果を、B細胞中のT1-B細胞の割合、B細胞中のT2-B細胞の割合、B細胞中のB2細胞 50

胞の割合及びB細胞中のA c t i v a t e d - B細胞の割合についてプロットしたグラフであり、

図20A, 図20B, 図20C及び図20Dは、それぞれ、B細胞分化の検討時のB l i m p - 1発現量、X b p - 1発現量、B c l - 6発現量及びA I D発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図21は、S p l e n o c y t eに対して免疫操作を行い取得したa n t i - H e n E g g L y s o z y m e / M B P - s c F vのE L I S A結果を示したものであり、抗原特異性をみるために、 $\beta$ -カゼイン, S 1 0 0 A 2, S 1 0 0 A 1 4, H e n E g g L y s o z y m eをそれぞれコートしたE L I S Aプレートを用いて比較したグラフであり、

10

図22は、B細胞に対して免疫操作を行い取得したa n t i - H e n E g g L y s o z y m e / M B P - s c F vのE L I S A結果を示したものであり、抗原特異性をみるために、 $\beta$ -カゼイン, S 1 0 0 A 2, S 1 0 0 A 1 4, H e n E g g L y s o z y m eをそれぞれコートしたE L I S Aプレートを用いて比較したグラフであり、

図23は、a n t i - H e n E g g L y s o z y m e / M B P - s c F v / E G F PのE L I S A結果を示したものであり、E G F Pは、G 1 - L i n k e r及びG 5 - L i n k e rを介してs c F vに融合されており、また、抗原特異性をみるために、 $\beta$ -カゼイン, S 1 0 0 A 2, S 1 0 0 A 1 4, H e n E g g L y s o z y m eをそれぞれコートしたE L I S Aプレートを用いて比較したグラフであり、

図24は、a n t i -  $\beta$ -C a s o m o r p h i n 7 / M B P - s c F v, a n t i - A n g i o t e n s i n I / M B P - s c F v, a n t i - P T H / M B P - s c F vのE L I S A結果を示したものであり、抗原特異性をみるために、 $\beta$ -C a s 7  $\beta$ -C a s o m o r p h i n 7 ( b - C a s 7 ), A n g i o t e n s i n I ( A n g I ), P T HをそれぞれコートしたE L I S Aプレートを用いて比較したグラフであり、

20

図25は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を吸光度 ( m A l b u m i n E L I S A ) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、

図26は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を陽性クローン出現率 ( m A l b u m i n 陽性率 ) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、

図27は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を吸光度 ( m S 1 0 0 A 1 0 E L I S A 1 n m o l の抗原 ) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、

30

図28は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を吸光度 ( m S 1 0 0 A 1 0 E L I S A 1 n m o l の抗原 ) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、

図29は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を陽性クローン出現率 ( m S 1 0 0 A 1 0 陽性率 ) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、そして

図30は、抗低分子化合物抗体の取得を示す電気泳動の写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

引き続き、本発明の好ましい実施の形態を説明する。なお、本発明は、以下に記載する特定の実施の形態によって限定されるものではないことを理解されたい。

本発明は、マウス、ラット等の免疫用動物から臓器を摘出し、当該臓器から免疫細胞を含む細胞群を分離して、これを刺激物質を含む培養液中で抗原による感作を行うことで、免疫細胞を得るものである。

40

この免疫細胞を、F A C S c a n等の細胞分離装置、又はその他の細胞染色による選別手法を用いて、リンパ球中、例えば目的の抗体を産生するB細胞を選別する。選別したB細胞をミエローマ細胞との融合により不死化させ、ハイブリドーマを形成させ、クローニング後に抗体や抗体遺伝子を取得することも可能であるが、必ずしもハイブリドーマ形成の工程は必要とはしない。

この選別した細胞若しくはハイブリドーマから、遺伝子を抽出し、P C R法によりH鎖、L鎖の遺伝子を取得、大腸菌で発現できるように一本鎖抗体s c F vに改変してプラスミド化した後、大腸菌内で発現させて抗体を得るものであれば、抗原については、特定し

50

ないが、この中で例えば、S100A10タンパク質が尿を検体として用いることができる腎臓癌マーカーとして使用できることから、本発明は、腎臓癌の免疫学的診断のための抗体の作製方法として、好適である。

〔マウス由来のヒト抗体の作製について〕

本発明では、マウス由来のヒト抗体の作製工程を更に組み合わせても良い。以下にヒト抗体を取得する工程例を示す。

#### 1. 免疫ヒト化マウス由来の脾臓細胞を用いる方法

マウスの脾臓細胞内の抗体遺伝子をすべてヒト由来の遺伝子に置き換えた免疫ヒト化マウスが報告されている。これは、抗体遺伝子以外はマウス由来の細胞なので、今回の体外免疫法を直接そのまま使用しての免疫が可能である。この方法で取れてきた抗体はすべてヒト抗体となる。

#### 2. 抗体のヒト化を行う方法

取得した遺伝子から、抗体のアミノ酸配列を決定する。このアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーと比較する。超可変領域 (Complementarity determining region) 以外の抗体のフレーム部分を特に比較し、ホモロジー (相同性) の高い配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーから選択する。選択したフレーム配列に、取得した抗体遺伝子の超可変領域を組み込み、ヒト化する。この段階では抗体はヒト化マウス抗体である。

完全長ヒト抗体は、取得した遺伝子から、抗体のアミノ酸配列を決定する。このアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーと比較する。超可変領域を含む抗体の全長を比較し、ホモロジーの高い配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーから選択する。選択した配列を細胞で発現させれば、完全長ヒト抗体となる。選択した配列の超可変領域を遺伝子工学的手法で改変して元の配列とそっくり同じにしても完全長ヒト抗体とすることもできる。

ここで、本発明を要約して示すと、下記の各項に記載される通りである。

(1) 体外で免疫用細胞を含む組織を抗原と刺激物質を含む培養液中で免疫する工程と

、前記免疫された細胞を選別する工程と、

前記選別された免疫細胞から抗体を得る工程とを含む抗体作製方法。

(2) 前記免疫細胞から、PCR増幅手法により増幅抗体遺伝子を取得した後、宿主細胞により抗体又は抗体に類する蛋白質の発現調製をするステップをさらに含む上記第1項に記載の抗体作製方法。

(3) 前記組織が免疫用動物である上記第1項に記載の抗体作製方法。

(4) 前記選別された細胞が、クラススイッチ若しくはアフィニティマチュレーションの発生した細胞である上記第1項に記載の抗体作製方法。

(5) 前記免疫された細胞の選別が、フローサイトメトリー又は染色による上記第1項に記載の抗体作製方法。

(6) 前記刺激物質が、免疫担当細胞上に発現しているサイトカイン受容体、表面抗原又はシグナル伝達に関与する受容体を刺激する物質である上記第1項に記載の抗体作製方法。

(7) 前記抗原がペプチドである上記第1項に記載の抗体作製方法。

(8) 前記抗原がS100 familyに属するタンパク質であり、一本鎖抗体scFv (single chain variable fragment) 若しくは抗体IgG1 (Immunoglobulin G1) を取得する上記第1項に記載の抗体作製方法。

(9) 前記抗原がS100A10タンパク質であり、一本鎖抗体scFv (single chain variable fragment) 若しくは抗体IgG1 (Immunoglobulin G1) を取得する上記第1項に記載の抗体作製方法。

(10) 前記刺激物質が、サイトカイン受容体に対する刺激物質としての、IL-4又はIL-5、表面抗原に対する刺激物質としての、anti-CD38抗体又はanti-

—CD40抗体、及びシグナル伝達に関与する受容体に対する刺激物質としてのLPS (Lipopolysaccharide)の少なくとも1つである上記第6項に記載の抗体作製方法。

(11) 体外で免疫用細胞を含む組織と、IL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体及びLPSからなる群から選ばれた1以上の刺激物質を含む培養液中で免疫して抗体を作製する上記第1項に記載の抗体作製方法。

(12) 選別された前記抗体遺伝子アミノ酸配列を決定する工程と、

このアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーと比較し、ホモロジー(同源性)の高い配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーから選択し又は改変調整してヒト抗体遺伝子を形成する工程とをさらに含む上記第1項に記載の抗体作製方法。

10

#### 【実施例】

#### 【0006】

引き続き、本発明を下記の実施例によりさらに具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

#### 実施例1

本例では、S100A10タンパク質を抗原例として用い、抗体IgG1の作製方法について説明する。

#### 脾臓細胞(Splenocyte)抽出

マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、洗浄した。2匹分の脾臓をメッシュ上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした後、遠心分離(1300rpm x 3min, 4℃)し、細胞を回収した。次いで、ACK lysing Buffer 3mLに細胞を懸濁した後、10mL PBS(-)を加えた。遠心分離(1300rpm x 3min, 4℃)して細胞を回収し、RPMI1640(-) 6mLに懸濁した。セルスクレイナーを通して、不溶性の脂肪等を除去した。

20

#### 体外免疫

S100A10タンパク質抗原をアッセイキット(Dc Protein Assay kit, BioRad社製)で濃度を測定した。この際のスタンダードとして、BSA(Sigma社製)を用いた。濃度既知のS100A10タンパク質抗原を所定の量(5μg若しくは20μg)分注し、これにアジュバントN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン1mg/mLを100μL(マウス1匹当50μL)で添加し室温で15分間静置した。脾臓細胞に、調製した抗原溶液を添加し、室温で15分間静置した。RPMI1640(40%FBS)を6mLずつ添加した。刺激物質(IL-4(終濃度10ng/mL)、IL-5(終濃度10ng/mL)、anti-CD38抗体(終濃度1μg/mL)、anti-CD40抗体(終濃度1μg/mL)、LPS(終濃度40μg/mL))を添加した。10cmデッシュに全量を播いた。37℃ CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養(4日間)した。培養終了後、細胞を遠心分離(2000rpm、5分、4℃)で回収し、Trypan Blue Stain 0.4%(GIBCO社製)で細胞を染色し血球計算版(アズワン社製)にて免疫後の脾臓細胞数をカウントした。細胞数は5μgのS100A10抗原を免疫した場合、 $1.33 \times 10^7$  cells、20μgのS100A10抗原を免疫した場合、 $0.71 \times 10^7$  cellsであった。この細胞をMedium B(Clona Cell HYキット、Stem Cell Technology社製)を用いてウオッシュ洗浄(10mL x 3times)し、 $1.00 \times 10^8$  cells/mLに調製した。

30

40

#### メラノーマ細胞の調製

PAI細胞(マウス由来ミエローマ細胞)をMedium A(Clona Cell HYキット、Stem Cell Technology社製)を用いて、継代培養しておいた。Medium Bを用いて細胞をウオッシュ洗浄(10mL x 3times)し、上記と同じ装置を用いてカウントした。当該細胞数は、細胞融合時に $5 \times 10^7$  cellsが好ましい。

#### 細胞融合

50

脾臓細胞 Splenocyte : メラノーマ細胞 Myeloma = 2 : 1 にて細胞を混合し、遠心して回収した。タッピングした後、PEG (ポリエチレングリコール) 溶液を、 $5 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $66.5 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $35.5 \mu\text{L}$  (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して  $500 \mu\text{L}$ )、で混合した。

遠心分離して回収した後、Medium B を、 $5 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $665 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $355 \mu\text{L}$  (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して  $5\text{mL}$ )、で一滴ずつ添加した。

これに Medium C (Clona Cell HY キット、StemCell Technology 社製) を、 $5 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $665 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $355 \mu\text{L}$  (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して  $5\text{mL}$ )、で一滴ずつ添加した。この溶液を、 $5 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $5.32\text{mL}$ 、 $20 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $2.84\text{mL}$  (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して  $40\text{mL}$ )、で Medium C に静かに添加し、 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  インキュベーターにて培養 (1 日間) ( $15\text{mL}$  遠沈管にて) した。

細胞融合したその日に  $4^\circ\text{C}$  のインキュベーターに Medium D (Clona Cell HY キット、StemCell Technology 社製) を移し、溶解しておいた。溶解確認後、よく混合した後、室温に戻した。

#### クローニング

細胞を遠心して回収し、 $5 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $1.33\text{mL}$ 、 $20 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $0.71\text{mL}$  (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して  $10\text{mL}$ ) の Medium C に懸濁し、これを、 $5 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $11.97\text{mL}$ 、 $20 \mu\text{g}$  の S100A10 抗原を免疫した場合  $6.39\text{mL}$  (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して  $90\text{mL}$ ) の Medium D に懸濁した。 $37^\circ\text{C}$  で 15 分 インキュベートした後、 $10\text{cm}$  デッシュに撒いた。更に、 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  インキュベーターにて培養 (10~14 日間) した。

#### ハーベスト

細胞コロニーを目視下でカウントし、その全てを 96 well plate (ウェルプレート) に移し、 $200 \mu\text{L}$  の Medium E (Clona Cell HY キット、StemCell Technology 社製) を加えた。次いで、 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  インキュベーターにて培養 (4 日間) した。上清を  $150 \mu\text{L}$  回収し、S100A10 ELISA による確認を行った。

#### S100A10 ELISA Plate の調製

S100A10 抗原を PBS (-) にて  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し、 $100 \mu\text{L}$  ずつ 96 well plate (Nunc-Immuno module F8 maxisoap, Nunc 社製) に添加した。これを  $4^\circ\text{C}$  で 1 日間静置した後、上清を捨て、 $0.1\%$  BSA/PBS (-) を  $200 \mu\text{L}$  ずつ添加した。室温で 1 時間静置した後、PBS (-) で 3 回洗浄し、S100A10 ELISA Plate を調製した。

#### S100A10 ELISA

S100A10 ELISA Plate に上記ハーベストの項で取得した  $150 \mu\text{L}$  の培養上清を加え、 $37^\circ\text{C}$  インキュベーターにて 1 時間静置した。上清を捨て、PBS (-) で 3 回洗浄し、PBS (-) で 5000 倍に希釈した二次抗体 (anti-Mouse IgG1-HRP、フナコシ社製) を  $50 \mu\text{L}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$  インキュベーターにて 1 時間静置した。上清を捨て、PBS (-) で 3 回洗浄し、 $100 \mu\text{L}$  の TMB 溶液を添加し、 $37^\circ\text{C}$  インキュベーターにて 10 分間静置した。その後直ちに  $1\text{N}$  HCl (和光純薬社製) を  $100 \mu\text{L}$  添加し、反応を停止させた。その後、各ウェルの  $450\text{nm}$  の吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 550, BioRad 社製) にて測定した。得られた結果を下記の第 1 表に示す。

【表 1】

第 1 表

抗原	免疫量 ( $\mu\text{g}$ )	免疫後の Splenoocyte数 ( $\times 10^7$ cells)	ハイブリドーマ数			クローニン グ後の増殖		IgG1 発現株数
			大コロニー	小コロニー	総計	++	+	
S100A10	5	1.33	27	32	59	15	14	4
	20	0.71	108	35	143	51	40	20

10

次いで、ハイブリドーマをコロニー化し、そのコロニーの大小を肉眼で確認した。それらのコロニーを上記手法によりクローニングし、その後の増殖を確認した。増殖したクローンの培養上清をS100A10 ELISAによって、抗S100A10 IgG1抗体を産生しているクローン数を確認した。上記第1表に記載の通り、体外免疫法によって、IgG1が作製できることを確認した。免疫工程で要した日数は、約5日と、通常(2~3ヶ月)に比べ非常に早い時間でS100A10タンパク質に対するIgG1が作製できた。

20

#### 実施例 2

本例では、抗S100A10抗体遺伝子の抽出及び大腸菌による抗体の発現工程について説明する。

#### DNA抽出、一本鎖抗体scFvプラスミドの作製

免疫後のB細胞やハイブリドーマ $1.5 \times 10^6$  cells (セル)より、Iso gen (ニッポンジーン社製)を用いてTotal RNAを取得した。なお、前記実施例1で説明した体外免疫工程で得られる免疫細胞を当該工程で用いても良い。

次いで、1.2% Agarose Gel (アガロースゲル)電気泳動により、取得確認を実施した。得られた結果を図1A及び図1Bに示す。

取得したTotal RNAをテンプレートとして、マウス(mouse) VH遺伝子特異的プライマー若しくはmouse VL遺伝子特異的プライマーとし、ReverTra Ace (TOYOB0社製)試薬を用いて一本鎖cDNAを合成した。調製したcDNAをテンプレートとしてプライマーVH forward primer mix/VH reverse primer mix若しくはVL forward primer mix/VL reverse primer mixを用いて、PrimeSTAR HS Polymerase (TaKaRa社製)により、1st PCRを実施した。使用したプライマー配列は、Antibody Engineering a practical approach (pp. 210-211)に紹介されているものを利用した。

30

その後、2% Agarose Gel電気泳動により、取得確認を実施した。得られた結果を図2A及び図2Bに示す。

40

電気泳動後のアガロースゲルから目的のバンドを切り取り、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN社製)を用いてVH遺伝子及びVL遺伝子を抽出し、精製した。次いで、そのVH遺伝子及びVL遺伝子の各10ngを用いて、PrimeSTAR HS Polymerase (TaKaRa社製)により、プライマーを添加せず、Link PCRを実施した。その後、Link PCRのサンプルにプライマー2nd PCR Primer Premixを加えてそのままPCR増幅を実施した。その後、2% Agarose Gel電気泳動により、取得確認を実施した。得られた結果を図3A及び図3Bに示す。これらの結果から、目的のscFv PCR産物が得られたことが確認できた。

50

次いで、s c F v PCR産物を、制限酵素E c o R I及びH i n d I I Iと37℃で1時間反応させて分解し、電気泳動後のアガロースゲルから目的のバンドを切り取り、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n k i t (Q I A G E N社製)を用いてs c F v遺伝子を抽出し、精製した。同様に、プラスミドベクターpM A L - p 2 Xを制限酵素E c o R I及びH i n d I I Iと37℃で1時間反応させて分解し、電気泳動後のアガロースゲルから目的のバンドを切り取り、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n k i t (Q I A G E N社製)を用いてプラスミドベクター遺伝子を抽出し、精製した。これらの精製物をプラスミドベクター遺伝子1molに対しs c F v遺伝子6molの割合で混合し、DNA L i g a t i o n k i t <M i g h t y M i x> (T a K a R a社製)を用いてライゲーションした。ライゲーション溶液20μLを大腸菌J M 1 0 9株のコンピテントセルと混合し、大腸菌J M 1 0 9株を形質転換した。この形質転換体を50μg/mLのアンピシリンを含むL B寒天培地に塗布し、37℃で18時間培養した。

s c F v遺伝子の連結したプラスミドを持つ大腸菌クローンをセレクションするため、上記の工程で形成したコロニーをコロニーPCR法に供し、さらに2% A g a r o s e G e l電気泳動により、取得確認を実施した。得られた結果を図4A及び図4Bに示す。

上記のようにして得たクローンを50μg/mLのアンピシリンを含むL B液体培地により37℃で18時間培養し、Q I A p r e p M i n i p r e p k i t (Q I A G E N社製)を用いて、プラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドのDNA配列をD N A シークエンサーM e g a B A S E 1 0 0 0 (G Eヘルスケア社製)を用いて確認した。この抗体遺伝子の取得工程には、3日を要した。

#### 大腸菌による一本鎖抗体s c F vの発現

シークエンスを確認したプラスミドを用いて、大腸菌B L 2 1 (D E 3)株を形質転換した。この形質転換体を50μg/mLのアンピシリンを含むL B寒天培地に塗布し、37℃で18時間培養した。

次いで、上記のようにして形成したコロニーを、5mLの50μg/mLのアンピシリンを含むL B G液体培地により30℃で18時間培養した。この培養液1mLを100mLの50μg/mLのアンピシリンを含むL B G液体培地により30℃で培養した。培養1時間ごとに660nmの吸光度を分光光度計U V - 1 2 0 0 (島津製作所社製)にて測定した。吸光度が0.5に達した時点で、I P T Gを終濃度0.5mMになるように添加し、23℃で20時間培養した。培養終了後、遠心分離(6000rpm, 20min, 4℃)により大腸菌菌体を回収した。これをS o l . A 5mL (20% S u c r o s e, 1mM E D T A, 30mM T r i s - H C l p H 8. 0, 0.5mM A P M S F)に溶解し、室温で10分間静置した。遠心分離(6000rpm, 20min, 4℃)により大腸菌菌体を回収し、氷冷したS o l . B 5mL (5mM M g S O<sub>4</sub>)に溶解し氷上に10分間静置した。その後遠心分離(6000rpm, 20min, 4℃)により、上清を回収した。

その後、上記のようにして回収した上清をアミロースレジンカラム(10mL、φ2.5cm x 3.3cm)に供した。上清が全てカラムを通過した後、ウオッシュ緩衝液(200mM N a C l, 20mM T r i s - H C l p H 8. 0)40mLでカラムを洗浄した。この洗浄を2回実施した後、E l u t e緩衝液(5mM M a l t o s e, 200mM N a C l, 20mM T r i s - H C l p H 8. 0)40mLでカラムに吸着したM B P (M a l t o s e b i n d i n g p r o t e i n) - s c F v蛋白質を溶出し、精製した。精製したM B P - s c F v蛋白質をS D S - P A G E法により解析した。得られた結果を図5A及び図5Bに示す。

また、精製したM B P - s c F v蛋白質の濃度を、アッセイキット(D c P r o t e i n A s s a y k i t, B i o R a d社製)で測定した。その結果、50mLの培養液から0.345mgのM B P - s c F v蛋白質が得られたことがわかった。

ところで、上記の精製工程には3日を要した。本方法は、抗体遺伝子の取得工程から数

えれば、6日で終了し、通常の方法（2～3ヶ月を要する）に比べ非常に早い時間でS100A10タンパク質に対するs c F vを作製できたことがわかる。

なお、本発明は、実施例として抗S100A10抗体を大量に生産することを可能とすることを示したが、抗体は抗S100A10抗体に限られるものではなく、その他のさまざまな抗体にも有利に適用可能であることを理解されたい。

### 実施例3

前記実施例1に記載の手法を反復した。但し、本例の場合、S100A1タンパク質及びS100A10タンパク質を抗原として使用し、前記実施例1と同様の手法で体外免疫法を実施し、IgG1陽性率を計算した。図6は、このようにして得られた結果をプロットしたものである。抗原によってバラつきができるものの、どちらも60%以上という高い確率でIgG1へのクラススイッチが発生していることを図6から確認することができる。

10

本発明では、体外（in vitro）での免疫において、LPS（40  $\mu$ g/mL）、IL-4、IL-5（10 ng/mL）、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体（1  $\mu$ g/mL）等の刺激物質を抗原免疫後に1回添加し、4日間刺激物質存在下で培養することで有効なクラススイッチが実現可能であることが明らかになった。

### 実施例4

前記実施例1に記載の手法を反復した。但し、本例の場合、S100A10蛋白質を抗原として前記実施例1と同様の手法で体外免疫法を実施し、培養を行った4日目と7日目に全細胞を回収し、そこからTotal-RNAを取得した。

20

Total-RNA 600 ngをテンプレートとして、ReverTra Ace（TOYOBO社）を用いて逆転写反応を実施した。反応組成は、メーカープロトコールに従い20  $\mu$ Lの容量で、プライマーとして、Oligo（dT）20（TOYOBO社）を用いた。反応条件は、42℃20分、99℃5分、4℃5分で実施した。この産物1  $\mu$ Lをテンプレートとして、PowerSYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems社）を用いてReal-time PCRを実施した。反応条件は、95℃10分→（95℃ 15秒、60℃1分）を40サイクルで行った。

また、本例で使用した機材は、7500 Fast（Applied Biosystems社）である。得られた結果を内部標準である $\beta$ アクチンで標準化し、グラフ化した。得られた結果を図7に示す。図7から、すべてのマーカー遺伝子（Bcl6、AID、Xbp1、Blimp1）で発現量の上昇が確認され、抗体の親和性、抗体産生細胞の分化、誘導がより高まることが確認された。ここで、Bcl6やAIDは、主に抗体の親和性成熟やクラススイッチに関与する遺伝子であり、Xbp1は、多機能転写因子であって、抗体産生細胞への分化にもかかわっているとされ、Blimp1もXbp1と同様に、B細胞が抗体産生細胞（プラズマ細胞）へ分化する際に働く因子である。

30

### 実施例5

本例では、サイトカインの細胞毒性試験の実験方法について説明する。

BALB/cマウス（4週齢、♀、SPF/VAF）を頸椎脱臼にて殺し、マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、70%エタノールで洗浄した。さらに、PBSで洗浄した後、2匹分の脾臓をセルストレイナー上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした。セルストレイナーを4 mLのPBS（-）で3回洗浄することで脾臓細胞をセルストレイナーから溶出させた。これを遠心分離（1300 rpm x 3 min, 4℃）し、細胞を回収した。

40

ACK lysing Buffer 3 mLに細胞を懸濁した後、10 mL PBS（-）を加えることで赤血球を除去し、遠心分離（1300 rpm x 3 min, 4℃）して脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞はRPMI 1640培地10 mLに懸濁し、セルストレイナーを通すことにより、不溶性の脂肪等を除去した。細胞数を血球計算版を用いて計測し、 $1 \times 10^7$  cells/mLになるように濃縮した。

刺激物質（IL-4（標準の終濃度10 ng/mL）、IL-5（標準の終濃度10 n

50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2009072660A5</a>	公开(公告)日	2011-06-16
申请号	JP2009544772	申请日	2008-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	联合胶体有限公司		
申请(专利权)人(译)	提前有限公司		
[标]发明人	稻垣貴之 吉見達成		
发明人	稻垣 貴之 吉見 達成		
IPC分类号	C12P21/08 C12N15/09 A61K39/395 G01N33/531 C07K16/18		
CPC分类号	C07K16/00 C07K16/18 C07K16/3038 C07K2317/622 C07K2317/92		
FI分类号	C12P21/08 C12N15/00.A A61K39/395.B A61K39/395.J G01N33/531.A C07K16/18		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA53 4B024/BA56 4B024/BA58 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/DD62 4C085/DD88 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA34 4H045/FA74		
优先权	2007312931 2007-12-03 JP 2008222215 2008-08-29 JP		
其他公开文献	JP5414535B2 JPWO2009072660A1		

#### 摘要(译)

该方法包括以下步骤：用含有抗原和刺激剂的培养液免疫含有体外免疫细胞的组织，选择免疫细胞，并从所选择的免疫细胞中获得抗体制作方法。根据该抗体制备方法，可以在短时间内制备大量抗体，从而有助于免疫学试验的传播。