

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 209579

(P2002 - 209579A)

(43)公開日 平成14年7月30日(2002.7.30)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-ト* (参考) |
|--------------------------|------|----------------|-------------|
| C 1 2 N 15/02 | | C 0 7 K 16/18 | 4 B 0 2 4 |
| C 0 7 K 16/18 | | C 1 2 P 21/08 | 4 B 0 6 4 |
| C 1 2 N 5/10 | | G 0 1 N 33/53 | K 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 P 21/08 | | 33/577 | B 4 H 0 4 5 |
| G 0 1 N 33/53 | | C 1 2 R 1:91) | |

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 8329(P2001 - 8329)

(22)出願日 平成13年1月16日(2001.1.16)

(71)出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 中山 浩

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器

産業株式会社内

(72)発明者 重藤 修行

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器

産業株式会社内

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体、およびそれを産生する細胞株またはそれを含むヒトヘモグロビン検出用キット

(57)【要約】

【課題】 H B の定量を正確かつ簡便に行う手段を提供する。

【解決手段】 H B に特異的なモノクローナル抗体を産生する細胞株であって、H B で免疫した哺乳動物の脾臓細胞と、哺乳動物の骨髓腫由来の細胞とを細胞融合して、融合細胞を得る工程；および、H B に対して特異的なモノクローナル抗体を産生する細胞株を該融合細胞の中からクローニングする工程であって、該融合細胞から産生される抗体を、H B に対する結合能について免疫測定法により検定する工程を包含する方法により得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトヘモグロビン（HB）に特異的なモノクローナル抗体を産生する細胞株であって、

HBで免疫した哺乳動物の脾臓細胞と、哺乳動物の骨髄腫由来の細胞とを細胞融合して、融合細胞を得る工程；および、

HBに対して特異的なモノクローナル抗体を産生する細胞株を該融合細胞の中からクローニングする工程であって、該融合細胞から産生される抗体を、HBに対する結合能について免疫測定法により検定する工程を包含する方法により得られる、細胞株。

【請求項2】 工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号FERM BP-7288号、またはFERM BP-7289号である、請求項1に記載のモノクローナル抗体産生細胞株。

【請求項3】 前記哺乳動物の骨髄腫由来の細胞が、マウス骨髄腫由来P3X63-Ag8.653株の細胞である、請求項1に記載の細胞株。

【請求項4】 前記免疫測定法が、酵素免疫測定法（ELISA法）である、請求項1に記載の細胞株。

【請求項5】 前記免疫した哺乳動物が、マウスまたはラットである、請求項1に記載の細胞株。

【請求項6】 前記免疫した哺乳動物が、BALB/C系統マウスである、請求項1に記載の細胞株。

【請求項7】 請求項1に記載の細胞株により産生される抗HBモノクローナル抗体であって、HBに高い結合能を有する、モノクローナル抗体。

【請求項8】 HBを検出するためのキットであって、固相に結合された第1の抗体、および第2の抗体を含み、該第1の抗体が請求項7に記載のモノクローナル抗体であり、そして該第2の抗体がHBに特異的に結合する標識抗体である、キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト由来のヘモグロビンに特異的なモノクローナル抗体、およびこのモノクローナル抗体を産生する細胞株、およびこのモノクローナル抗体を含むキットに関する。

【0002】

【従来の技術】結腸と直腸の癌は、肺を除けば他のどの解剖学的位置よりも多くの新しい症例を毎年数えているといわれ、米国では、1989年には、約75,000人の人々がこれらの癌で死亡している。

【0003】ヘモグロビン（HB）は、赤血球中に存在するタンパク質である。ヒトヘモグロビンの種類は、2個の鎖と2個の非鎖（ $\alpha_2\beta_2$ 、 $\alpha_2\delta_2$ ）からなるテトラマーで、 $\alpha_2\beta_2$ （Hb A）、 $\alpha_2\delta_2$ （Hb F）および $\alpha_2\beta_2$ （Hb A₂）で構成される。便中のHBについての検査は、結腸や直腸などの癌の存在を検出するために非常に有用である。HBに対する抗体を用いて、

HB量の定量による病態スクリーニング、治療効果の確認、予後の判定等を行なうことができる。

【0004】従来、HBを免疫学的手法により特異的に検出するために、ポリクローナル抗体である抗ヒトHB血清が用いられてきた。従来の検査法のほとんどは、抗血清とHBとの凝集反応による沈降線の有無または濁度の増加によってHBを検査する。しかし、未精製の抗血清は、血清中の種々の抗原に対する種々の抗体を含むことが多いため、HB以外の抗原を検出する可能性がある。そこで、検査においてHB以外の抗原を誤って検出することを防ぐために、アフィニティークロマトグラフィーなどの手法を用いて抗血清中からヒト標準血清中のタンパク質に結合する抗体を取り除くことによって、ヒト標準血清においてHB以外の抗原に由来する反応が起こらないようにすることが普通である。

【0005】しかし、抗ヒトHB血清は、作製される血清毎に得られる抗ヒトHB抗体群が異なり、HBとの反応性が変動するという問題がある。さらに、抗ヒトHB血清を用いたヒトHBの検出は、操作が煩雑であり、またHBの定量も容易ではない。そのため、HBの定量をより正確かつ簡便に行うための方法が望まれてきた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、HBの定量を正確かつ簡便に行う手段を提供することを目的とする。本発明は、HBに特異的なモノクローナル抗体を提供し、これを用いたサンドイッチ方式の免疫クロマトグラフィーによる簡便なHBの定量法を提供する。

【0007】HBは、2個の鎖と2個の非鎖（ α 、 β 、 δ ）からなるヘテロテトラマーであり、HBを介してサンドイッチ状に結合できる抗体のペアを得ることは比較的容易である。しかし、モノクローナル抗体を用いる場合、抗体が均一であるため、抗体の交叉反応性は、ポリクローナル抗体のみを用いる場合と比較して非常に大きな問題となる。HBに対するモノクローナル抗体の中には、HBだけでなく、その他の成分に対しても高い結合能を有する抗体が存在し得る。このような抗体をサンドイッチ法に用いると、HBの正確な定量に支障をきたす恐れがある。従って、その他の成分に対する交叉反応性が低い抗HB抗体を用いる必要がある。

【0008】本発明は、上記問題点の解決を意図するものであり、HBに対して高い結合能を有するが、他成分に対する交叉反応性が低い抗体、およびこれを産生する細胞株、ならびにこの抗体を含むHB検出用キットを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、ヒトヘモグロビン（HB）に特異的なモノクローナル抗体を産生する細胞株に関し、この細胞株は、HBで免疫した哺乳動物の脾臓細胞と、哺乳動物の骨髄腫由来の細胞とを細胞融合して、融合細胞を得る工程；およびHBに対して特異

的なモノクローナル抗体を産生する細胞株を該融合細胞の中からクローニングする工程であって、該融合細胞から産生される抗体を、HBに対する結合能について免疫測定法により検定する工程を包含する方法により得られる。

【0010】好ましくは、上記モノクローナル抗体産生細胞株は、工業技術院生命工学工業技術研究所受託番号FERM BP-7288号、またはFERM BP-7289号である。

【0011】好ましくは、上記哺乳動物の骨髄腫由来の細胞は、マウス骨髄腫由来P3X63-Ag8.653株の細胞である。

【0012】好ましくは、上記免疫測定法は、酵素免疫測定法(ELISA法)である。

【0013】好ましくは、上記免疫した哺乳動物は、マウスまたはラットである。

【0014】好ましくは、上記免疫した哺乳動物は、BALB/C系統マウスである。

【0015】本発明は、1つの局面で、上記の細胞株により産生される抗HBモノクローナル抗体であって、HBに高い結合能を有する、モノクローナル抗体に関する。

【0016】本発明は、1つの局面で、HBを検出するためのキットに関し、このキットは、固相に結合された第1の抗体、および第2の抗体を含み、この第1の抗体は、上記のモノクローナル抗体であり、そして上記第2の抗体はHBに特異的に結合する標識抗体である。

【0017】

【発明の実施の形態】以下、本発明について、より具体的に説明する。

【0018】本発明においては、特に指示のない限り、当該分野で公知である、タンパク質の分離および分析法、ならびに免疫学的手法が採用され得る。これらの手法は、市販の酵素、キット、抗体、標識物質などを使用して行い得る。

【0019】本発明の抗HBモノクローナル抗体産生細胞株の作製を、以下に作製手順に沿って説明する。

【0020】(免疫)まず、哺乳動物をHBで免疫することによって、動物体内で抗体産生細胞を調製する。

【0021】「哺乳動物」の例として、マウス、ラット、ウシ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモットが挙げられる。哺乳動物は、好ましくはマウスおよびラットであり、より好ましくはマウスである。マウスの例として、A/J系統、BALB/C系統、DBA/2系統、C57BL/6系統、C3H/He系統、SJL系統、NZB系統、CBA/JNCrj系統のマウスが挙げられる。BALB/C系統のマウスは、免疫後に血清中に高い抗体力価を示すので、HBとの親和性が極めて高いモノクローナル抗体を得ることが可能である。血中抗体力価が、特異的なハイブリドーマの出来易さと関係してい

ることは公知である。また、細胞株の確立後の腹水による抗体大量作製においては、BALB/C系統マウスが一般によく使用される。以上により、BALB/C系統のマウスは、HBの免疫に好ましい例である。実験動物の齢は、特に限定されないが、代表的には約4週齢~約12週齢であり、好ましくは約6~約10週齢、より好ましくは約7週齢のマウスまたはラットである。

【0022】免疫に用いられるHBは、人工のヒトHB、天然のヒトHB、それらのモノマーサブユニットまたはそれらのフラグメントであり得る。好ましくは、天然のヒトHBが用いられる。HBは、ヒトの血清から精製してもよいし、市販のものを用いてもよい。HBは、通常、約80%以上の純度、好ましくは約90%以上の純度、さらに好ましくは約95%以上の純度、そして最も好ましくは約98%以上の純度で用いられる。

【0023】免疫の前に、HBは、免疫応答を増強させるためにアジュバントと混合され得る。アジュバントの例としては、油中水型乳剤(例えば、不完全フロイントアジュバント)、水中油中水型乳剤、水中油型乳剤、リポソーム、水酸化アルミニウムゲル、シリカアジュバント、粉末ベントナイト、およびタピオカアジュバントの他に、BCG、Propionibacterium acnesなどの菌体、細胞壁およびトレハロースダイコレート(TDM)などの菌体成分；グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖体(LPS)およびリピドA画分；-グルカン(多糖体)；ムラミルジペプチド(MDP)；ベスタチン；レバミゾールなどの合成化合物；胸腺ホルモン、胸腺ホルモン液性因子およびタフトシンなどの生体成分由来のタンパク質またはペプチド性物質；ならびにそれらの混合物(例えば、完全フロイントアジュバント)などが挙げられる。

【0024】これらのアジュバントは、投与経路、投与量、投与時期などに依存して免疫応答の増強または抑制に効果を示す。さらにアジュバントの種類によって、抗原に対する血中抗体産生、細胞性免疫の誘導、免疫グロブリンのクラスなどに差が認められる。それゆえ、目的とする免疫応答に応じて、アジュバントを適切に選択することが好ましい。選択されたアジュバントの取扱い、例えばHBとの混合方法などは当該分野で公知である。

【0025】哺乳動物の免疫は、当該分野で公知の方法に従って行われる。例えば、抗原であるHBは、哺乳動物の皮下、皮内、静脈、または腹腔内に注射され得る。免疫応答は、免疫される哺乳動物の種類および系統によって異なるので、免疫スケジュールは、使用される動物に合わせて適切に変更され得る。抗原投与は、最初の免疫の後に、何回か繰り返される。追加免疫は、例えば、最初の免疫から4週間後、6週間後、および半年後に行われ得る。

【0026】(抗体産生の確認)免疫後、哺乳動物から採血し、得られた血液をHB結合活性の存在についてア

ッセイすることにより、哺乳動物の体内でHBに対する抗体が産生されていること、および免疫末期にはIgMからIgGへのクラススイッチが起こっていることを確認する(例えば、HarlowおよびLane、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、COLD SPRING HARBOR LABORATORY、New York(1988)を参照のこと)。適切なアッセイ方法の例として、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射免疫アッセイ法(RIA)、蛍光抗体法が挙げられる。本発明では、HBに対して高親和性を有する抗HBモノクローナル抗体を得ることが望ましい。高親和性のモノクローナル抗体産生細胞を得るためには、抗血清の時点で高い抗体価を示している必要がある。

【0027】(ブースト)HB結合性抗体の産生を確認した後、脾臓を肥大させるために、ブースト(免疫原の追加注射)を行い得る。ブーストで投与されるHBの量は、最初に免疫されるHBの量の約4~5倍の量が望ましいがこれに限定されない。

【0028】ブーストは、代表的には、HBと不完全フロイントアジュバントとのエマルジョンを用いて行われる。ただし、最終免疫(細胞融合数日前の免疫原の追加注射)で投与されるHBとしては、アジュバントを加えず純粋品を用いることが好ましい。投与経路は、皮下、皮内、静脈、または腹腔内それぞれの投与によって、HBの異なった部位を認識する抗体が得られる可能性があることを考慮して、適宜決定される。

【0029】(細胞融合)最終免疫後、免疫した哺乳動物から脾臓細胞を摘出し、骨髄腫由来の細胞株の細胞と細胞融合する。

【0030】融合細胞の増殖能力は、細胞融合時に用いられる骨髄腫由来の細胞株の種類に依存するので、細胞融合には、増殖能力の優れた細胞株を用いることが好ましい。また、骨髄腫由来の細胞株は、融合する脾臓細胞の由来する哺乳動物と適合性があることが好ましい。骨髄腫由来の細胞株は、新たに調製してもよいし、市販のものを使用してもよい。マウスの骨髄腫由来の細胞株としては、P3X63-Ag8.653、Sp2/O-Ag14、FO.1、S194/5.XX0 B.U.I、P3/NS1/1-Ag4-1などが挙げられる。抗体の断片を産生せず、かつ融合細胞の増殖能力が優れたものとなるため、P3X63-Ag8.653の使用が好ましい。ラット骨髄腫由来の細胞株としては、210、RCY3.Ag.1.2.3、YB2/0などが挙げられる。

【0031】細胞融合は、当該分野で公知の方法に従って行われる(KoehlerおよびMilstein、Nature 256:495[1975]、Kosborら、1983、Immunol. Today 4:72、Coteら、1983、Proc. Nat

l. Acad. Sci. USA、80:2026、Coleら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R Liss Inc.、New York、NY、77-96頁[1985]などを参照のこと)。細胞融合法の例として、例えば、ポリエチレングリコール法、センダイウイルスを用いた方法、電流を利用する方法などが挙げられる。細胞毒性も比較的少なく、融合操作も容易で再現性が高いため、ポリエチレングリコール法が好ましい。

【0032】得られた融合細胞は、当該分野で公知の条件に従って増殖させ得る。産生される抗体の結合能に基づいて、所望の融合細胞を選択し得る。

【0033】(細胞選別およびクローニング)融合細胞から産生される抗体の結合能は、当該分野で公知の方法に基づいてアッセイされ得る。本発明においては、HBに高い結合能を有し、その他の成分に対して結合能を有さないか、もしくは低い結合能を有する抗体を産生する融合細胞を得るために、HBに対する結合能に基づく選別を利用して、目的の細胞株をクローニングする。従って、本明細書中で用語「HBに対して特異的なモノクローナル抗体」とは、HBに高い結合能を有し、その他の成分に対して結合能を有さないか、もしくは低い結合能を有する抗体を意味する。HBに高い結合能を有し、その他の成分に対して「結合能を有さない」抗体は、交叉反応性がない。

【0034】用語「高い結合能を有する」とは、下記の実施例に記載されたインヒビションELISA法と実質的に同一の条件での測定においてインヒビションがかかり、インヒビションの半値が約 10^{-6} M以下であることをいう。用語「低い結合能を有する」とは、同じ測定においてインヒビションがかかるが、インヒビションの半値が約 10^{-5} M以上(例えば、 10^{-4} M、 10^{-3} Mなど)であることをいう。用語「結合能を有さない」とは、同じ測定においてインヒビションがかからないことをいう。用語「インヒビションがかかる」とは、固相に固定されたHBに結合する抗体の量が、競合物質(インヒビター)の存在下で、インヒビターの不存在下と比較して減少することをいう。用語「インヒビションがかからない」とは、固相に固定されたHBに結合する抗体の量が、インヒビターの存在下および不存在下で実質的に同等であることをいう。「インヒビションの半値」とは、インヒビターの不存在下での吸光度(抗体結合量を反映する)の半分の吸光度が測定されるインヒビターの濃度をいう。

【0035】抗体の結合能は、抗体産生の確認に関して上述したのと同様に、ELISA法、RIA法、蛍光抗体法などの方法を用いてアッセイされる。簡便に感度よく抗体を検出し得ることから、ELISA法が好ましい。

【0036】融合細胞のクローニングには、当該分野で公知の方法が用いられ得る。クローニングの方法の例としては、限界希釈法、軟寒天法などが挙げられる。操作も容易で数多くの実績があり、再現性が高いため、限界希釈法が好ましい。

【0037】細胞融合により得られた多くの融合細胞の中から、効率よく有用な細胞を選択するために、細胞選別は、クローニングの初期の段階から行うことが好ましい。

【0038】このようにして、望ましい結合能を有する抗体を産生する融合細胞株が最終的に選別される。選別された細胞株は、液体窒素中で半永久的に保存され得る。

【0039】(抗体の精製)上記のようにして選別されたモノクローナル抗体産生細胞株を大量培養することにより、HBに対して特異的なモノクローナル抗体を大量に産生し得る。モノクローナル抗体産生細胞株の大量培養方法として、インビボおよびインビトロでの培養が挙げられる。インビボでの大量培養の例としては、哺乳動物の腹腔内に融合細胞を注射して増殖させ、腹水中に抗体を産生させる方法が挙げられる。インビトロでの培養では、融合細胞が培地中で培養され、抗体が培地中に産生される。

【0040】大量培養により得られた腹水または培養上清から、当該分野で公知の方法を用いて、本発明のモノクローナル抗体を精製し得る。精製のためには、例えば、DEAE陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法などが適宜組み合わせられて用いられる。本発明の抗体は、通常、約90%の純度、好ましくは約95%の純度、より好ましくは約98%の純度となるように精製される。

【0041】(抗体の評価)精製されたモノクローナル抗体の結合能を評価することにより、得られたいくつかの抗体の中から、HB上の異なるエピトープを認識する抗体の組合せを選択し得る。異なるエピトープを認識する、任意の2種の抗体の組合せは、サンドイッチ法のために有用である。

【0042】本発明においては、HBを検出するためのキットが提供される。本発明のキットは、例えば、抗原抗体結合反応に基づいて水性試料中の抗原を検出する免疫クロマトグラフィーを実施するために提供され得る。本発明のキットは、固相に結合された第1の抗体および移動相に含められて用いられる第2の抗体を含む。

【0043】固相に結合される第1の抗体としては、受託番号FERM BP-7288号または受託番号FERM BP-7289号の細胞株により産生されるモノクローナル抗体が使用され得る。好適には、受託番号FERM BP-7288号の細胞株により産生されるモノクローナル抗体が第1の抗体として使用され得る。

【0044】第2の抗体としては、HBに高い結合能を有する限り任意の抗体を使用し得、これは、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。好ましくはモノクローナル抗体が用いられる。第2の抗体として受託番号FERM BP-7288号または受託番号FERM BP-7289号の細胞株により産生されるモノクローナル抗体が好適に用いられる。この場合、受託番号FERM BP-7288号および受託番号FERM BP-7289号の細胞株により産生されるモノクローナル抗体を第1の抗体および第2の抗体の一组のペアとして用い、それによってサンドイッチアッセイを実施し得る。

【0045】第2の抗体として、その他の抗体を用いる場合、上記受託番号FERM BP-7288号またはFERM BP-7289号の細胞株により産生されるモノクローナル抗体が結合するエピトープに結合能を有さない抗体であることが好ましい。

【0046】第2の抗体は、当該分野で公知の方法により任意の標識により標識され得る。標識の例としては、酵素標識、色素標識、磁性標識、放射性標識、色の付いた粒子(金コロイド、ラテックスなど)による標識などが挙げられる。

【0047】本発明のキットは、当該分野で公知の方法により適切に作製され得る。本発明のキットは、1つまたはそれ以上の容器中に上記第1の抗体および上記第2の抗体を含み得る。キットはまた、HBのサンドイッチアッセイにおける、抗体の使用を教示する説明教材を含み得る。キットは、標識の検出のため、または陽性コントロールおよび陰性コントロールを検出するための適切な試薬、洗浄溶液、希釈緩衝液などを含み得る。

【0048】上記のように、第1の抗体は、通常、固相に固定化されており、そして第2の抗体は標識されている。HBの測定にあたっては、まず、第2の抗体を液相でHBと反応させ、標識-抗体-HB複合体を形成させる。そして、この複合体を含む反応液を移動相として固体化された第1の抗体と反応させる。その結果、第1の抗体および第2の抗体は、HBを介してサンドイッチ状に結合する。従って、HBが存在する場合にのみ、HBを介して固相上に標識が固定化される。

【0049】受託番号FERM BP-7288号の細胞株により産生される抗HBモノクローナル抗体は、HBに高い結合能を有し、他の成分には結合能を有しない。受託番号FERM BP-7289号の細胞株により産生される抗HB抗体も同様に、HBに高い結合能を有し、他の成分には結合能を有しない。

【0050】本発明による「抗HBモノクローナル抗体」には、その結合特性を保持した機能性の断片もまた含まれる。これらの断片は、それらが由来するインタクトな抗体とHBへの特異的結合について競合し得、少なくとも 10^7 、 10^8 、 $10^9 M^{-1}$ 、または $10^{10} M^{-1}$ の

親和性で結合し得る。抗体の断片は、免疫グロブリンの重鎖、軽鎖、Fab、Fab'、(ab')₂、Fab cおよびFvを含み得る。抗体の断片は、インタクトな免疫グロブリンの酵素的または化学的分離によって生じ得る。例えば、F(ab')₂断片は、HarlowおよびLane、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、COLD SPRING HARBOR LABORATORY、New York (1988)に記載されたような標準的な方法を用い、pH3.0~3.5においてペプシンでタンパク質消化することによってIgG分子から得ることができる。Fab断片は、限定的還元によってF(ab')₂断片から、あるいは還元剤の存在下パペイン消化によって全抗体から得ることができる(Paul, W. 編、FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY第2版 Ravan Press、N.Y.、1989、第7章を参照のこと)。

【0051】

【実施例】以下、本発明のモノクローナル抗体産生細胞株の作製についてさらに具体的に説明する。本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

【0052】<酵素免疫測定法(ELISA法)>以下の実施例においては、得られた抗血清、培養上清およびモノクローナル抗体の評価は、ELISA法により行なった。その操作法を以下に記載する。

【0053】(A) 抗原(HB)のコーティング
HBを、0.1mg/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0.1mg/mLの濃度で溶解したものを)を用いて2μg/mLの濃度に調製した。マイクロプレート(ポリスチレン製高結合型平底#2580、コスター社製)に抗原溶液を100μl/ウェル注入し、室温で飽和水蒸気中に一晩保存した。実験直前に、アスピレータで抗原溶液を除去した。

【0054】(B) ブロッキング

1重量%BSA-PBS-Az(Az:アザイドナトリウム塩)を200μl/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1重量%BSA-PBS-Azを除去した。以降の実験を即日に行わないときは、この状態で、飽和水蒸気中に4℃で保存した。

【0055】(C) 抗体の反応

1重量%BSA-PBS-Azで種々の濃度に希釈した抗体溶液(抗血清、培養上清、精製抗体等)を50μl/ウェル、および1重量%BSA-PBS-Azを50μl/ウェルで注入した。相対的な親和性を測定する目的でインヒビション(阻害)実験を行うときは、インヒビター溶液(HBを含む溶液)を50μl/ウェル注入した後、抗体溶液50μl/ウェルをさらに加え、振盪した。常温で1時間半放置した後、PBSで3回洗浄し、アスピレータで残存するPBSを除去した。

【0056】(D) 第2抗体の反応

0.2μg/mLのペルオキシダーゼ標識したヤギ由来の抗マウスIgG抗体(KPL社製)を1重量%BSAのPBS溶液に溶解したもの、または0.2μg/mLのペルオキシダーゼ標識したヤギ由来の抗マウスIgM抗体(KPL社製)を1重量%BSAのPBS溶液に溶解したものを50μl/ウェル注入し、常温で30分放置した。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。

【0057】(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-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4μlを加えた溶液(基質溶液)を100μl/ウェル注入し、室温放置した。約3分後、4N硫酸を25μl/ウェル注入して反応を停止した。

【0058】(F) 測定

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

【0059】なお、本実施例では免疫測定法として酵素免疫測定法を用いたが、他にRIA法、蛍光抗体法等を用いてもよい。

【0060】<実施例>本実施例においては、本発明者の研究所で実績があること、およびモノクローナル抗体産生細胞株確立後の腹水による抗体大量培養においてはBALB/C系統マウスが最もよく使用されることを考慮に入れ、BALB/C系統マウスを免疫に使用した。

【0061】(免疫)免疫原であるヘモグロビン(HB)(Sigma INC.製)を、生理食塩濃度リン酸緩衝液(PBS)を用いて2mg/mLに調製した。このHBのPBS溶液に、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、ホモジナイザで回転数1000rpmで十分に乳化することにより、免疫原を含むアジュバントエマルジョンを得た。

【0062】生後約7週間の雌のマウス(BALB/C)15匹に、免疫原を含むアジュバントエマルジョンを100μlずつ腹腔内、あるいは皮下に注射した。2週間後、PBSを用いて2mg/mLに調製したHB溶液およびこれと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BALB/Cマウスに前回と同じ部位に100μlずつ注射した。

【0063】その後、免疫開始より4週間後、6週間後、および半年後に、2週間後の免疫と同じ組成、濃度のHBを含む不完全フロイントアジュバントエマルジョンを、マウスに100μlずつ前回と同じ部位に注射した。2回目の注射の1週間後と4回目の注射の1週間後にそれぞれ採血し、以下に示す抗体産生を確認した。

【0064】(抗体産生の確認)採取した血液から血清を分離し、得られた血清を用いて、酵素免疫測定法(ELISA法)により抗体産生の確認をした。固相として0.1mg/mL・BSA-PBS-Azで調製した2μg/mL・HBを、100μL/ウェルずつ分注し、室温で一晩コートしたマイクロプレートを使用した。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。ウェル中での発色により、抗体サンプル中にHBに結合する抗体が存在することが確認される。

【0065】その結果、15匹すべてのマウスにおいて抗HB抗体の産生が認められた。さらに、いずれのマウスにおいても、2回目の注射後に抗体産生がIgGからIgMへシフトしていることが確認され、4回目の注射後にはIgG/IgM比が100以上でありクラススイッチが充分起こっていることを確認した。

【0066】(細胞融合)免疫したマウスの中で特に力価の高かった3匹の脾臓を肥大させるために、最終免疫を行なった。免疫開始から6ヶ月後、免疫原のHBを、PBSを用いて5mg/mLの濃度に調製し、アジュバントを加えずにマウスに100μLずつ注射した。

【0067】最終免疫後3日を経過したマウスのうち1匹の脾臓細胞を摘出した。平均分子量1,500のポリエチレングリコールを用いて、常法により、脾臓細胞とマウス骨髓腫由来細胞株(P3X63-Ag8.653)とを融合させ、融合細胞を得た。

【0068】融合細胞を、15重量%のウシ胎児血清(以下、FCS)を含むシコフ培地で調製したヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン(HAT)培地に浮遊させた後、96ウェルプレート1枚にまいた(200μL/ウェル)。この際、フィーダー細胞(培養開始時に成長因子を供給する細胞)は同じマウス個体の脾臓細胞を用いた。CO₂インキュベータ(CO₂濃度:5体積%、温度:37℃、湿度:95%)内で培養を開始した。以下の培養では、他に示さない限り、これと同じ条件で培養を行なった。

【0069】(細胞選別およびクローニング)1週間後、融合細胞の培養上清を100μL採取した後、融合細胞を含む残りの培養液を4枚の24ウェルプレートに継代し、各ウェルに1mLの15重量%のFCSを含むヒポキサンチン/チミジン(HT)培地を加えた。融合細胞を24ウェルプレートに継代した4日後、細胞培養上清を150μL/ウェルずつ採取した。この培養上清と、培養開始後1週間目に採取した培養上清を用いて以下に示すELISA法により、HBに対する結合能を測定した。

【0070】固相として0.1mg/mL・BSA-PBS-Azで2μg/mLの濃度に調製したHBを、100μL/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。第二抗体としてペルオキシダーゼ標

識抗マウスIgG抗体を使用した。

【0071】2回採取した培養上清のELISA法結果を合わせて、HBに対して高い結合能を有する、増殖状態の良い10ウェルを確認した。第1段階の選択として、これらのウェルの細胞を、すべて2枚の6ウェルプレートに継代し、各ウェルに4mLの15重量%のFCSを含むHT培地を加えた。

【0072】第1段階の細胞選別の2日後、培養上清を採取し、以下に示すELISA法(インヒビションELISA法)によりHBに対する結合能を測定した。

【0073】固相として0.1mg/mL・BSA-PBS-Azで2μg/mLの濃度に調製したHBを、100μL/ウェルずつ使用し、インヒビターとしてHBを使用した。抗体液として細胞培養上清を使用した。第二抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を使用した。細胞培養上清中に、HBに結合する抗体が存在すると、インヒビターとして添加された可溶性HBと結合してインヒビションがかかる(固相HBへの結合が阻害される)ので、ウェル中の発色は確認されない。

【0074】この結果、第2段階の選択として、HBに対して高い結合能を有し、インヒビションELISA法においてインヒビションがかかったウェルを、5ウェル選別した。これらのウェルの細胞を、それぞれ、中フラスコ(容量50mL)に継代した。培地は15重量%のFCSを含むHT培地を45mLずつ加えた。

【0075】第2段階の選択を受けた細胞の継代3日後、培養上清を採取し、以下に示すELISA法によりHBに対する結合能を測定した。

【0076】固相として、0.1mg/mL・BSA-PBS-Azで2μg/mLの濃度に調製したHBを、100μL/ウェルずつ使用し、インヒビターとしてHBを使用した。抗体液として細胞培養上清を使用した。第二抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を使用した。細胞培養上清中に、インヒビターに結合する抗体が存在するとインヒビションがかかるので、ウェル上の発色は確認されない。HBでのみインヒビションがかかった2ウェル選別した。

【0077】上記2ウェルの細胞について、15重量%のFCSを含むHT培地を用いて、1ウェルあたり2ヶ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各2枚に分注した。フィーダーとして生後4週の雌のマウス(BALB/C)の胸腺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、適時細胞培養上清について上記のELISA法によるスクリーニングを繰り返した。HB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株を最終的に選別し、200mLの培地中で5×10⁵細胞/mLの濃度に至るまで培養を進めた。最終的に、HBに対して高い結合能を有した株を1株選定した。

【0078】HBに対して高い結合能を示した株を細胞株名：Hb1と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成12年8月31日に国内寄託した（受託番号FERM BP-7288号）。

【0079】同様に、HBに対して高い結合能を有したもう一つの株を細胞株名：Hb2と命名し、生命研に平成12年8月31日に国内寄託した（受託番号FERM BP-7289号）。

【0080】HB1株およびHB2株の産生する抗体を、それぞれ、HB1抗体およびHB2抗体と称する。

【0081】（細胞の保存）最終的に選別された細胞株は、遠心分離して上清を取り除き、 1×10^7 細胞/mLの濃度でFC S：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°C で予備凍結した後、液体窒素中に移して長期保存状態にした。

【0082】（抗体の精製）選択した2株を、それぞれ、15重量%FC Sを含むイシコフ培地で大量培養し、その上清を遠心分離した。また、選択した2株を、それぞれ、雌のBALB/Cマウスの腹腔内に注射して増殖させ、腹水を蓄積させた。蓄積した腹水を採取し、各株の培養上清あるいは腹水を、プロテインA結合ゲル（プロテインAセファロース4FF、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かけ、以下の条件で各モノクローナル抗体（HB1抗体およびHB2抗体）を精製した。

【0083】プロテインA結合ゲルを充填したカラムを、結合緩衝液（ 1.5M グリシン・ 3M NaCl、 $\text{pH}8.9$ ）で平衡化した。培養上清あるいは腹水を、結合緩衝液で約3倍に希釈した後、平衡化したカラムにアプライした。カラムからの溶出液を 280nm でモニターしながら、不純物の溶出が終了するまで、カラムを結合緩衝液で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液（ 100mM クエン酸、 $\text{pH}4$ ）をカラムにアプライ（線流速：約 $20\text{cm}/\text{時間}$ ）し、IgG含有溶出液を回収した。回収したIgG含有溶出液について、吸光度計で 280nm の吸光度を測定し、測定された吸光度を吸光係数で換算することにより、抗体の濃度を決定した。

【0084】SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による標準タンパク質との比較から、これらのモノクローナル抗体（HB1およびHB2）の精製分画は、いずれも分子量約 $50,000$ 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。なお、電気泳動上で、不純物の混入は検出限界以下であった。

【0085】（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2種類のモノクローナル抗体について、HBの希釈系列を用いて、上記第2段階の選択におけるインヒビションELISA法と同一条件で抗体評価を行った。

【0086】図1は、HB1抗体について、図2は、同様にHB2抗体について、それぞれHBに対する結合能

を測定した結果を示すグラフである。図1、2において、縦軸は吸光度を、横軸は各抗原の濃度（ mole/L 、以下M、又は mg/ml ）の対数値を示す。

【0087】図1に示すように、HB1抗体では、インヒビションの半値が約 $2 \times 10^{-7}\text{M}$ であり、約 10^{-8}M のHBを検出し得る可能性が示された。

【0088】図2に示すように、HB2抗体では、インヒビションの半値が約 10^{-7}M であり、 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 以上のHBの検出感度を持つ可能性が示された。

【0089】（サンドイッチ反応）ELISA法においてHB1抗体をプレートにコートし、HBを結合させ、酵素ラベルしたHB2抗体を反応させた後に余分な抗体を除去し、発色基質を添加してインキュベートしたところ、充分な発色が得られた。つまり、HB1抗体と、HB2抗体またはポリクローナル抗体との組合せは、免疫クロマトグラフィーなどのサンドイッチ反応を利用した検査方法に有用であることが確認できた。

【0090】（免疫クロマトグラフィーにおける検出感度）常法に従ってHB1抗体を濾紙上に固定化し、金コロイド標識したHB2抗体を移動相に置いて、免疫クロマトグラフィー装置を作製した。種々の濃度でHBを含むサンプルをアプライしたところ、この免疫クロマトグラフィー装置の最高検出感度は、約 $7 \times 10^{-8}\text{M}$ であった。

【0091】一般に、健常人の血中HBレベルは、約 10^{-4}M であることが知られている。従って、本発明の抗体を用いて作製された免疫クロマトグラフィー装置は、血中HBを検出するために十分な感度を有する。

【0092】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体産生細胞株の作製方法によれば、細胞株のクローニングにおいて、融合細胞から産生される抗体のHBに対する結合能を決定し、目的の細胞を選別する。そのため、細胞融合の後、初期に存在する多くの細胞から、効率よく有用な細胞を選択し得る。そして、HBに対する高い親和性を達成しながら、特異性の高い抗体を産生する細胞株を作製し得る。

【0093】免疫測定法が酵素免疫測定法（ELISA法）である場合、抗体の結合能を簡便に感度よく検定し得る。

【0094】哺乳動物の骨髓腫由来の細胞株が、マウス骨髓腫由来P3X63-Ag8.653である場合、抗体の断片を産生せず、さらに得られる融合細胞の増殖能力が特に優れているため、短時間に多くの細胞を検定し得る。

【0095】免疫する哺乳動物がマウスまたはラットである場合、動物の取り扱い、免疫感作の点で都合がよい。免疫する哺乳動物がBALB/C系統マウスである場合、HBとの親和性が極めて高いモノクローナル抗体を得ることが可能となる。

【0096】本発明のモノクローナル抗体産生細胞株によれば、それを培養することによりHBに対する高い親和性を有し特異性の高い抗HBモノクローナル抗体を半永久的に提供し得る。

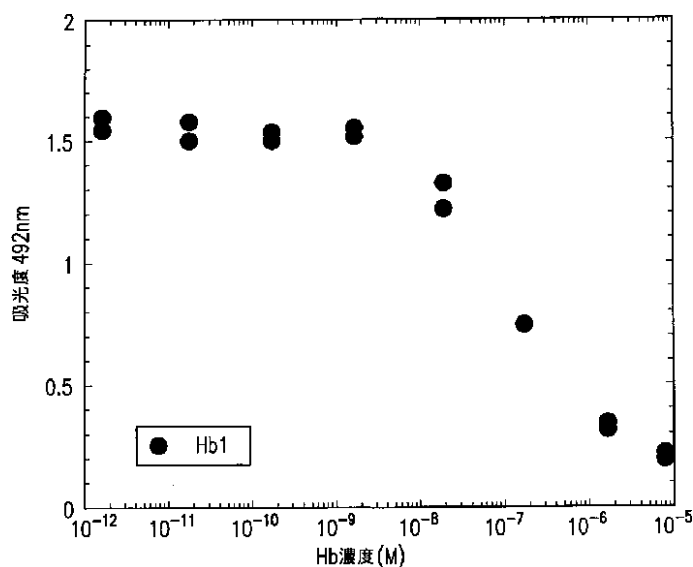
【0097】本発明のモノクローナル抗体である、HB1抗体とHB2抗体とを組み合わせ、あるいは、本発明のモノクローナル抗体と、抗HBポリクローナル抗体とを組み合わせサンドイッチ法に使用すれば、高感度かつ高特異的なHB検出キットを提供し得る。

*【図面の簡単な説明】

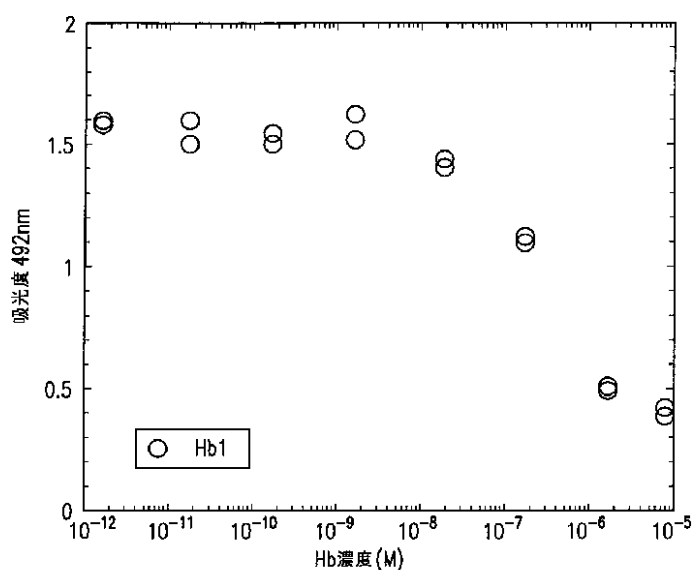
【図1】HB1抗体を用いた、インヒビションELISA法の結果を示すグラフである。グラフのデータは、本発明の抗HBモノクローナル抗体(HB1抗体)のHBに対する結合能を示す。

【図2】HB2抗体を用いた、インヒビションELISA法の結果を示すグラフである。グラフのデータは、本発明の抗HBモノクローナル抗体(HB1抗体)のHBに対する結合能を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード(参考) |
|--------------------------|------|---------------|------------|
| G 0 1 N 33/577 | | C 1 2 N 15/00 | C |
| // (C 1 2 N 5/10 | | 5/00 | B |
| C 1 2 R 1:91) | | C 1 2 R 1:91) | |

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 GA03 GA09
 GA18 GA27 HA03
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24
 CD30 CE12 DA01 DA13
 4B065 AA91X AC14 AC15 BA08
 BA24 BB01 BC01 BD14 CA25
 CA44 CA46
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76
 EA20 EA50 FA72 GA26 HA03

| | | | |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗人血红蛋白单克隆抗体，产生它的细胞系，或用于检测含有其的人血红蛋白的试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | JP2002209579A | 公开(公告)日 | 2002-07-30 |
| 申请号 | JP2001008329 | 申请日 | 2001-01-16 |
| 申请(专利权)人(译) | 松下电器产业有限公司 | | |
| [标]发明人 | 中山浩 重藤修行 | | |
| 发明人 | 中山 浩 重藤 修行 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577 | | |
| FI分类号 | C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.K G01N33/577.B C12R1/91 C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/10 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/GA09 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CD30 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/BB01 4B065/BC01 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26 4H045/HA03 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种准确，简单地量化HB的方法。产生对HB具有特异性的单克隆抗体的细胞系，其中将用HB免疫的哺乳动物的脾细胞和来源于哺乳动物的骨髓瘤的细胞进行细胞融合以获得融合细胞。以及从融合细胞克隆产生对HB特异的单克隆抗体的细胞系的步骤，其中，从融合细胞产生的抗体结合HB的能力被免疫测定。它是通过包括分析步骤的方法获得的。

【图1】

