(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3821830号
(P3821830)
(45)発行日　平成18年9月13日(2006.9.13)　(24)登録日　平成18年6月30日(2006.6.30)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24	
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	
G01N 33/577	(2006.01)	G01N	33/577	B

請求項の数 4　(全 15 頁)

(21)出願番号　特願2005-154801 (P2005-154801)
(22)出願日　平成17年5月27日 (2005.5.27)
(62)分割の表示　特願平6-311763の分割
原出願日　平成6年12月15日 (1994.12.15)
(65)公開番号　特開2005-308757 (P2005-308757A)
(43)公開日　平成17年11月4日 (2005.11.4)
審査請求日　平成17年5月27日 (2005.5.27)

(73)特許権者　000001029
協和醗酵工業株式会社
東京都千代田区大手町１丁目６番１号
(72)発明者　花井　陳雄
神奈川県相模原市大野台７－９－１５
(72)発明者　古谷　安希子
東京都町田市木曽町１４６４－４９
(72)発明者　山▲崎▼　基生
東京都町田市中町３－９－１３
(72)発明者　小林　智
静岡県駿東郡長泉町上土狩６１４－１１
(72)発明者　▲桑▼原　隆
静岡県駿東郡長泉町下土狩１０６４－８－２０１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子の定量法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒト顆粒球コロニー刺激因子、その誘導体ＮＤ２８またはＮＤ２８の部分ペプチドで非ヒト動物を免疫して得られるヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８およびＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８に反応するポリクローナル抗体と、ヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８に特異的に反応し、ＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８に反応しないモノクローナル抗体とを用いた免疫学的測定法によるＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８の定量法。

【請求項２】

以下の工程からなる免疫学的測定法によるＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８の定量法。

［１］ヒト顆粒球コロニー刺激因子、その誘導体ＮＤ２８またはＮＤ２８の部分ペプチドで非ヒト動物を免疫して得られるヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８およびＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８に反応するポリクローナル抗体を用いて、試料中のヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８およびＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８を定量する工程、

［２］ヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８に反応し、ＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８に反応しないモノクローナル抗体を

用いて、［１］の試料中のヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８を定量する工程、
［３］［１］の工程で求められる値から、［２］の工程で求められる値を差し引くことにより、試料中に含有されるＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８を定量する工程。
【請求項３】
免疫学的測定法が固相サンドイッチ法による酵素免疫測定法である請求項１または２記載の定量法。
【請求項４】
定量するＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子またはその誘導体ＮＤ２８が血中のものである請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明はポリエチレングリコール化したヒト顆粒球コロニー刺激因子（以下、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦと略記する）またはその誘導体の定量法ならびにそれに用いるモノクローナル抗体に関する。
【背景技術】
【０００２】
ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体ＮＤ２８（特許文献１、２および３；以下、ＰＥＧ化したＮＤ２８と略記する）は、ヒト顆粒球コロニー刺激因子（特許文献４；以下、Ｇ－ＣＳＦと略記する）またはヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体ＮＤ２８（特許文献５；以下、ＮＤ２８と略記する）に較べて血中半減期が長いなどの利点があり、治療効果が高いことが期待されている。ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８の臨床応用の際には、その血中での動態を知るためなどに抗体を利用した特異的な定量系が必要である。しかしながら、ＰＥＧ化された分子は宿主の免疫機構に認識されにくく、抗体を作製することが困難である（非特許文献１）。Ｇ－ＣＳＦおよびＮＤ２８の場合もこれらに対するモノクローナル抗体は得られている（抗Ｇ－ＣＳＦモノクローナル抗体；特許文献６、非特許文献２および非特許文献３、抗ＮＤ２８モノクローナル抗体；特許文献７および非特許文献４）が、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化したＮＤ２８に反応する抗体は得られていない。
【０００３】
【特許文献１】特開平１－３１６４００号公報
【特許文献２】国際公開第９０／０６９５２号パンフレット
【特許文献３】特開平５－３２５５９号公報
【特許文献４】米国特許第４８８３１２７号明細書
【特許文献５】特開昭６３－２６７２９２号公報
【特許文献６】特開昭６３－１８０８６０号公報
【特許文献７】特開平１－２２５４９５号公報
【非特許文献１】「リンフォカイン・アンド・サイトカイン・リサーチ（Lymphokine and Cytokine Research）」，（米国），１９９１年，第１０巻，第６号，ｐ．４７５－４８０
【非特許文献２】「ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ（Journal of Immunological Methods），（オランダ），１９９０年，第１２８巻，第２号，ｐ．２１１－２１７
【非特許文献３】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（The Journal of Biological Chemistry），（米国），１９９１年，第２６６巻，第３５号，ｐ．２３８１５－２３８２３
【非特許文献４】「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー（Agricultural and Biological Chemistry），１９８９年，第５３巻，ｐ．１０９５－１１０

1

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

本発明の目的は、Ｇ－ＣＳＦまたはその誘導体およびＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に反応するモノクローナル抗体を作製し、それを用いてＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体を定量する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

本発明は、Ｇ－ＣＳＦまたはその誘導体およびＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に反応する抗体とＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に特異的に反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に反応しないモノクローナル抗体とを用いた免疫学的測定法によるＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体の定量法に関する。

本発明に用いられるＧ－ＣＳＦの誘導体としては、例えば、特開昭63-267292 に記載のＧ－ＣＳＦ誘導体があげられる。その一例として記載されているＮＤ２８は、Ｇ－ＣＳＦのアミノ酸配列のうち、第１番目、第３番目、第４番目、第５番目、第１７番目のアミノ酸残基がそれぞれアラニン(Ala) 、スレオニン(Thr) 、チロシン(Tyr) 、アルギニン(Arg) 、セリン(Ser) に置換されたポリペプチドである。

【０００６】

本発明に用いられるＰＥＧの分子量はとくに限定されないが、通常３００～３００００であり、とくに１０００～２００００が好ましい。ＰＥＧ化の方法は、公知の方法〔特開平１－３１６４０、Biotech. Lett., 14, 559-564 (1992)、Bio/technology, 8, 343-346 (1990) 等〕が用いられる。

ＰＥＧ分子は、Ｇ－ＣＳＦまたはＧ－ＣＳＦ誘導体分子のアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基またはグアニジノ基と結合する。ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦ誘導体は、通常ＰＥＧが１分子～５分子結合している。本発明に用いられるＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦ誘導体は、結合しているＰＥＧの結合数が同一のものを分離して用いるか、または、ＰＥＧの結合数が異なるものの混合物をそのまま用いる。

【０００７】

本発明に用いられるＧ－ＣＳＦまたはその誘導体およびＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に反応する抗体（以下、抗体Ａと記す）は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。抗体Ａの具体例としては、後記のごとくして製造されるウサギ抗ＮＤ２８抗体およびハイブリドーマ細胞株ＫＭ５０９が産生するモノクローナル抗体ＫＭ５０９をあげることができる。ハイブリドーマ細胞株ＫＭ５０９は平成６年８月９日付でブダペスト条約に基づき工業技術院生命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　ＢＰ－４７７４として寄託されている。

【０００８】

本発明に用いるＧ－ＣＳＦの誘導体に特異的に反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に反応しないモノクローナル抗体（以下、抗体Ｃと記す）としては、例えば、ＮＤ２８に特異的に反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはＮＤ２８に反応しないモノクローナル抗体であるハイブリドーマ細胞株ＫＭ５１１が生産するモノクローナル抗体ＫＭ５１１があげられる。また、Ｇ－ＣＳＦに特異的に反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に反応しないモノクローナル抗体（以下、抗体Ｂと記す）としては、Ｇ－ＣＳＦと特異的に反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはＮＤ２８に反応しないモノクローナル抗体であるハイブリドーマ細胞株ＫＭ３４３が生産するモノクローナル抗体ＫＭ３４３があげられる。ハイブリドーマ細胞株ＫＭ５１１、ＫＭ３４３は平成６年１１月１０日付でブダペスト条約に基づき工業技術院生命工学工業技術研究所にそれぞれＦＥＲＭ　ＢＰ－４８８０、ＦＥＲＭ　ＢＰ－４８７９として寄託されている。

【０００９】

本発明の免疫学的測定法としては、固相サンドイッチ法などを用いたラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法（ELISA)などがあげられる。

【発明の効果】

【００１０】

本発明の定量法により、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体のみを高感度に定量することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１１】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明のＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体の定量法は、Ｇ－ＣＳＦまたはその誘導体およびＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に反応する抗体（抗体Ａ）を用いた免疫学的測定法によるＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体の定量系（定量系１）、Ｇ－ＣＳＦと特異的に反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体およびＧ－ＣＳＦ誘導体に反応しない抗体（抗体Ｂ）を用いたＧ－ＣＳＦに特異的な定量系（定量系２）およびＧ－ＣＳＦ誘導体に特異的に反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体に反応しない抗体（抗体Ｃ）を用いたＧ－ＣＳＦ誘導体に特異的な定量系（定量系３）を確立し、定量系１によって求められる値から、定量系２によって求められる値または定量系３によって求められる値を差し引くことにより、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはその誘導体のみの量を求めることができる。以下にＧ－ＣＳＦ誘導体としてＮＤ２８を用いた場合の各々の定量系の確立方法について説明する。

【００１２】

１．各定量系の確立

（１）抗体Ａを用いたＧ－ＣＳＦまたはＮＤ２８およびＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはＰＥＧ化ＮＤ２８の定量系の確立

第一抗体として抗体Ａを１～５０μｇ／ｍｌで１０～１００μｌ／穴ずつ９６穴プレートに分注し、４℃で一晩放置してプレートにコートする。ＢＳＡ溶液〔１％のウシ胎児血清（ＢＳＡ）を含むＰＢＳ溶液（リン酸二ナトリウム１．８３ｇ、リン酸一カリウム０．２１ｇ、食塩７．６５ｇ、蒸留水１リットル、ｐＨ７．２）〕などでブロッキングした後、段階希釈したＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはＰＥＧ化したＮＤ２８を５０～１００μｌ／穴ずつ分注し、室温で２時間または４℃で一晩反応させる。ＰＢＳまたはＰＢＳに０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を加えた溶液（ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ）で洗浄した後、第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物等で標識した抗体Ａ１～５０μｇ／ｍｌを５０～１００μｌ／穴ずつ分注し、室温で１～２時間反応させる。よく洗浄した後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行なう。このようにしてＧ－ＣＳＦまたはＮＤ２８およびＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８の定量系を確立する。

【００１３】

（２）抗体Ｃを用いたＮＤ２８の定量系の確立

第一抗体として抗体Ｃを用い、（１）で得られる抗体Ａを第二抗体に用いる以外は（１）と同様にしてサンドイッチELISA 法によるＮＤ２８の定量系を確立する。

（３）抗体Ｂを用いたＧ－ＣＳＦの定量系の確立

第一抗体として抗体Ｂを用い、（１）で得られる抗体Ａを第二抗体に用いる以外は（１）と同様にしてサンドイッチELISA 法によるＧ－ＣＳＦの定量系を確立する。

次に本発明の方法に用いる抗体Ａ、ＢおよびＣの製造法をＧ－ＣＳＦ誘導体としてＮＤ２８を用いた場合を例にして示す。

【００１４】

２．抗体Ａ、ＢおよびＣの製造

（１）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

３～２０週令のマウスまたはラットに組換えＤＮＡ技術により大腸菌で生産させたＧ－ＣＳＦ、大腸菌で生産させたＮＤ２８またはＮＤ２８の部分ペプチド、例えば、ＮＤ２８の第１６８～１７４番目のアミノ酸配列を有し、Ｎ末にシステイン（Ｃｙｓ）を付加した

ペプチド（ＰＥＧ－５）、ＮＤ２８の第５９～７０番目のアミノ酸配列を有するが、第６４番目のＣｙｓがセリン（Ｓｅｒ）に置換され、Ｎ末にＣｙｓを付加したペプチド（ＰＥＧ－９）、ＮＤ２８の第９２～９９番目のアミノ酸配列を有し、Ｎ末にＣｙｓを付加したペプチド（ＰＥＧ－１０）等を免疫する。ＮＤ２８の部分ペプチドは免疫原性を高める目的で、キーホールリンペットヘモシアニン（以下ＫＬＨと略記する）や牛血清アルブミン（ＢＳＡ）とコンジュゲートし、免疫に用いる。免疫の方法は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に適当なアジュバント〔例えば、フロインドの完全アジュバント（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ Ａｄｊｕｖａｎｔ）または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど〕とともに投与する。免疫原の投与は、１回目の投与の後１～２週間おきに５～１０回行う。各投与後３～７日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が免疫原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）：医学書院刊　１９７６年〕などで調べる。

免疫原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットから脾臓を摘出して脾細胞を調製し、抗体産生細胞の供給源として供する。

【００１５】

（２）骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を使用する。たとえば、８－アザグアニン耐性マウス（ＢＡＬＢ／ｃ由来）骨髄腫細胞株Ｐ３－Ｘ６３Ａｇ８－Ｕ１（Ｐ３－Ｕ１）〔カレント・トピックス・イン・ミクロバイオロジィ・アンド・イムノロジィ（Current Topics in Microbiology and Immunology ）81, 1-7 (1978)〕、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジィ（European J. Immunology ）6, 511-519 (1976) 〕、ＳＰ２／Ｏ－Ａｇ１４（ＳＰ－２）〔ネイチャー (Nature) 276, 269-270 (1978)〕、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８６５３（６５３）〔ジャーナル・オブ・イムノロジィ(J. Immunology) 123, 1548-1550 (1979)〕、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）〔ネイチャー (Nature) 256, ,495-497 (1975)〕などが用いられる。これらの細胞株は、８－アザグアニン培地〔ＲＰＭＩ－１６４０培地にグルタミン（１．５ｍＭ）、２－メルカプトエタノール（５×１０$^{-5}$Ｍ）、ジェンタマイシン（１０μｇ／ｍｌ）および牛胎児血清（ＦＣＳ）（ＣＳＬ社製、１０％）を加えた培地（以下、正常培地という。）に、さらに８－アザグアニン（１５μｇ／ｍｌ）を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の３～４日前に正常培地に継代し、融合当日２×１０^{7} 個以上の細胞数を確保する。

【００１６】

（３）細胞融合

（１）で免疫した抗体産生細胞と（２）で得られた骨髄腫細胞をＭＥＭ培地（日水製薬社製）またはＰＢＳ（リン酸二ナトリウム１．８３ｇ、リン酸一カリウム０．２１ｇ、食塩７．６５ｇ、蒸留水１リットル、ｐＨ７．２）でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髄腫細胞＝５～１０：１になるよう混合し、遠心分離（１，２００ｒｐｍ、５分間）した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら３７℃でポリエチレングリコール－１，０００（ＰＥＧ－１，０００）２ｇ、ＭＥＭ２ｍｌおよびジメチルスルホキシド０．７ｍｌの混液０．２～１ｍｌ／１０^{8} 抗体産生細胞を加え、１～２分間毎にＭＥＭ培地１～２ｍｌを数回加えた後、ＭＥＭ培地を加えて全量が５０ｍｌになるようにする。遠心分離（９００ｒｐｍ、５分間）後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに細胞をＨＡＴ培地〔正常培地にヒポキサンチン（１０$^{-4}$Ｍ）、チミジン（１．５×１０$^{-5}$Ｍ）およびアミノプテリン（４×１０$^{-7}$Ｍ ）を加えた培地〕１００ｍｌ中に懸濁する。

【００１７】

この懸濁液を９６穴培養用プレートに２００μｌ／穴ずつ分注し、５％CO_2 インキュベーター中、３７℃で７～１４日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとり以下の（４）に記載の酵素免疫測定法などにより、免疫原に対し特異的に反応する穴を選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを２回繰り返し〔１回目は、ＨＴ培地（ＨＡＴ培地からアミノプテリンを除いた培地）、２回目

は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【００１８】

（４）モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示す酵素免疫測定法によるバインディングアッセイにより行う。

Ｇ－ＣＳＦ、ＮＤ２８またはＮＤ２８の部分ペプチドをキャリア蛋白質と結合させたもの１～５０μｇ／ｍｌを１０～１００μｌ／穴ずつ９６穴プレートに分注し、４℃で一晩放置してプレートにコートする。コントロールとして大腸菌夾雑蛋白質ＮＹ４９を同様にプレートにコートする。ＢＳＡ溶液などでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清もしくは後記（５）で得られる精製抗体を第一抗体として５０～１００μｌ／穴ずつ分注し、室温で２時間または４℃で一晩反応させる。ＰＢＳまたはＰＢＳに０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を加えた溶液（ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ）で洗浄した後、第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物等で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体１～５０μｇ／ｍｌを５０～１００μｌ／穴ずつ分注し、室温で１～２時間反応させる。よく洗浄した後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行ない、免疫原に対し特異的に反応する穴を選択する。

【００１９】

（５）モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（Ｐｒｉｓｔａｎｅ）０．５ｍｌを腹腔内投与し、２週間飼育する〕した８～１０週令のヌードマウスに（３）で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞2×10^{7}～5×10^{6}細胞／匹を腹腔内注射する。１０～２１日間でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離（３，０００ｒｐｍ、５分間）して固形分を除去後、４０～５０％飽和硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法により精製モノクローナル抗体とするか、ＤＥＡＥ－セファロースカラム、プロテインＡ－カラムあるいはゲル濾過カラムに通塔し、ＩｇＧあるいはＩｇＭ画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法および２８０ｎｍでの吸光度より算出する。

【００２０】

（６）抗体Ａの選択

（１）で得られる抗血清または（５）で得られるモノクローナル抗体のＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に対する反応性を酵素免疫測定法により調べる。ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８はELISA プレートに吸着されないため、インヒビションアッセイにより調べる。Ｇ－ＣＳＦ、ＮＤ２８またはＮＤ２８の部分ペプチドをキャリア蛋白質と結合させたもの１～５０μｇ／ｍｌを１０～１００μｌ／穴ずつ９６穴プレートに分注し、４℃で一晩放置してプレートにコートする。ＢＳＡ溶液などでブロッキングした後、段階希釈したＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはＰＥＧ化したＮＤ２８を５０～１００μｌ／穴ずつ分注し、さらに（１）で得られる抗血清または（５）で得られる精製抗体を５０～１００μｌ／穴ずつ分注して混合し、室温で２時間または４℃で一晩反応させる。ＰＢＳまたはＰＢＳに０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を加えた溶液（ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ）で洗浄した後、第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物等で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体もしくは抗ラットイムノグロブリン抗体１～５０μｇ／ｍｌを５０～１００μｌ／穴ずつ分注し、室温で１～２時間反応させる。よく洗浄した後、第二抗体の標識物質に応じた反応を行なう。ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８によって結合活性が阻害された抗血清あるいはモノクローナル抗体を抗体Ａとして選択する。

【００２１】

（７）抗体Ｂの選択

（５）で得られたモノクローナル抗体のＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に対する反応性を酵素免疫測定法により調べる。ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に対する反応性は（６）と同様にして行う。Ｇ－ＣＳＦのみに反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に反応しないモノクローナル抗体を抗体Ｂとして選択する。

【００２２】

（８）抗体Ｃの選択

（７）と同様にしてＮＤ２８にのみ反応し、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に反応しないモノクローナル抗体を抗体Ｃとして選択する。

（９）ウサギ抗ＮＤ２８抗体の製造

３～３０週令のウサギに１～１０００μｇ／匹のＮＤ２８またはキャリア蛋白質と結合させたＮＤ２８の部分ペプチドを適当なアジュバンドとともに免疫し、血中抗体価の上昇を確認した後、抗血清を採取する。４０～５０％飽和硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法により精製し、ウサギ抗ＮＤ２８抗体とするか、ＤＥＡＥ－セファロースカラムあるいはプロテインＡ－カラムに通塔しＩｇＧ画分を集め、ウサギ抗ＮＤ２８抗体とする。

【実施例１】

【００２３】

（１）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

８週令のBalb/c雌マウスに組換えＤＮＡ技術により大腸菌で生産させたＧ－ＣＳＦ、大腸菌で生産させたＮＤ２８またはＮＤ２８の部分ペプチドを免疫した。ＮＤ２８の部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で、m-マレイミド- ベンゾイル-n- ハイドロキシサクチル（ＭＢＳ、ナカライテスク社製）を架橋剤としてＫＬＨ（CALBIOCHEM社）とコンジュゲートし、免疫原とした。ＭＢＳとの反応のため、ペプチドにはＮ末にCys を加えて合成した。以下に、免疫原の作製方法を示した。

【００２４】

ＫＬＨをＰＢＳに溶解して10mg/ml に調整し、1/10容量の25mg/ml ＭＢＳを滴下して室温で攪拌して30分間反応させた。あらかじめＰＢＳで平衡化したセファデックスG-25カラムで遊離しているＭＢＳを除き、得られたＫＬＨ－ＭＢＳ2.5mg を0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（PH7.0 ）に溶解したペプチド1mg と混合し、室温で３時間攪拌して反応させた。反応後、塩化ナトリウム0.5Mを加えたＰＢＳで透析したものを免疫原とした。

【００２５】

免疫原100 μg/匹を初回のみアルミニウムゲル２ｍｇおよび百日咳ワクチン（千葉県血清研究所製）1×10^{9} 細胞とともに投与し、２週間後より100 μg/匹の免疫原を１週間に１回、計４回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べた。

免疫原に対し十分な抗体価の上昇を示したマウスから、最終免疫３日後に脾臓を摘出した。脾臓をＭＥＭ培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（１２００ｒｐｍ、５分間）した後、上清を捨て、トリス－塩化アンモニウム緩衝液（ｐＨ７．６５）で１～２分間処理し赤血球を除去し、ＭＥＭ培地で３回洗浄し、細胞融合に用いた。

酵素免疫測定法（バインディングアッセイ）

96穴のEIA 用プレート（グライナー社製）に、Ｇ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＮＤ２８の部分ペプチド－サイログロブリン（ＴＨＹ）コンジュゲート、ネガティブ抗原として大腸菌夾雑蛋白質ＮＹ４９または免疫原とは異なるペプチド－ＴＨＹコンジュゲート10μg/mlを50μl/穴分注し、４℃で一晩放置して吸着させた。ＮＤ２８の部分ペプチド－ＴＨＹコンジュゲートはグルタールアルデヒド法を用いて作製した。すなわち、ペプチド1mg を0.1M酢酸アンモニウム緩衝液（PH7.0 ）に溶解し、同じ緩衝液に溶解したＴＨＹ5mg を加えて全量を1ml にした。攪拌下、0.02M グルタールアルデヒド540 μl を滴下し、室温で５時間攪拌して反応させた。反応後、ＰＢＳで一晩透析したものをＮＤ２８の部分ペプチド－Ｔ

ＹＨコンジュゲートとした。

【００２６】

プレートを洗浄後、１％ＢＳＡを含むＰＢＳ溶液（ＢＳＡ－ＰＢＳ）を１００μｌ／穴分注し、室温で１時間または４℃で１晩放置して、プレート上に残った蛋白質との結合残基をブロック（ブロッキング）した。その後、ＢＳＡ－ＰＢＳを捨て、ＰＢＳでよく洗浄した後、第一抗体として、ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈した試料（マウス血清、ハイブリドーマ培養上清、精製モノクローナル抗体）を50μｌ／穴分注し、室温で２時間または４℃で一晩放置した。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎでよく洗浄した後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体〔ダコ（ＤＡＫＯ）社製〕を５０μｌ／穴分注し、室温で１時間放置した。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎでよく洗浄した後、ＡＢＴＳ基質液〔２，２’－アジノビス（３－エチルベンゾチアゾリン－６－スルホン酸）二アンモニウム５５０ｍｇを０．１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ４．２）１リットルに溶かした溶液に、使用直前に過酸化水素１μｌ／ｍｌを加えた溶液〕を用いて発色させ、$ＯＤ_{415nm}$ の吸光度を測定した。

【００２７】

（２）マウス骨髄腫細胞の調製

８－アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株Ｐ３－Ｕ１を正常培地で培養し、細胞融合時に$２×１０^{7}$ 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

（３）ハイブリドーマの作製

（１）で得られたマウス脾細胞と（２）で得られた骨髄腫細胞とを１０：１になるよう混合し、遠心分離（１，２００ｒｐｍ、５分間）した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、３７℃でポリエチレングリコール－１，０００（ＰＥＧ－１，０００）２ｇ、ＭＥＭ培地２ｍｌおよびジメチルスルホキシド０．７ｍｌの混液０．２～１ｍｌ／１０^{8} をマウス脾細胞に加え、１～２分間毎にＭＥＭ培地１～２ｍｌを数回加えた後、ＭＥＭ培地を加えて全量が５０ｍｌになるようにした。遠心分離（９００ｒｐｍ、５分間）後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞をＨＡＴ培地100 ｍｌ中に懸濁した。

【００２８】

この懸濁液を９６穴培養用プレートに200 μｌ／穴ずつ分注し、５％$ＣＯ_{2}$ インキュベーター中、３７℃で１０～１４日間$ＣＯ_{2}$ ５％下で培養した。この培養上清を（１）に記載した酵素免疫測定法で調べ、免疫原に特異的に反応する穴を選び、さらにＨＴ培地と正常培地に換え、２回クローニングを繰り返して、ハイブリドーマ株を得た。

【００２９】

図１に示したようにＧ－ＣＳＦおよびＮＤ２８と反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとしてハイブリドーマＫＭ３４１、ＫＭ３４２、ＫＭ５０９及びＫＭ５１０が、Ｇ－ＣＳＦと反応し、ＮＤ２８と反応しないモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとしてＫＭ３４３が、ＮＤ２８と反応し、Ｇ－ＣＳＦと反応しないモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとしてＫＭ４９８およびＫＭ５１１がそれぞれ選択された。

【００３０】

（４）モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した８週令ヌード雌マウス（Balb/c）に（３）で得られたハイブリドーマ株を５～２０×１０^{6} 細胞／匹それぞれ腹腔内注射した。１０～２１日後に、ハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取（１～８ｍｌ／匹）し、遠心分離（３，０００ｒｐｍ、５分間）して固形分を除去した。モノクローナル抗体がＩｇＭのときは、５０％硫酸アンモニウムを用いて塩析し、塩化ナトリウム０．５Ｍを添加したＰＢＳで透析後、セルロファインＧＳＬ２０００（生化学工業社製）（ベットボリューム７５０ｍｌ）のカラムに流速１５ｍｌ／時で通塔しＩｇＭ画分を集め、精製モノクローナル抗体とした。モノクローナル抗体がＩｇＧのときは、カプリル酸沈殿法(Antibodies-A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,1988) により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

【００３１】
抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により決定した。（３）で得られたハイブリドーマのサブクラスを第１表に示す。
【００３２】
【表１】

モノクローナル抗体	サブクラス
KM341	G1
KM342	G1
KM343	G1
KM498	G1
KM509	G2a
KM510	G1
KM511	G1

【００３３】
（５）ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に対する反応性の検討
（４）で得られたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体のＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に対する反応性を酵素免疫測定法を用いたインヒビションアッセイにより以下のようにして調べた。なお、以下の実験に用いるＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に結合しているＰＥＧの分子量は約１００００であり、Ｇ－ＣＳＦまたはＮＤ２８の１分子に対して３分子結合している。
【００３４】
それぞれの免疫原を１０μｇ／ｍｌで５０μｌ／穴ずつ９６穴プレートに分注し、４℃で一晩放置してプレートにコートし、BSA-PBS でブロッキングした。100 μg/mlから0.1 μg/mlまで段階希釈したＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦまたはＰＥＧ化したＮＤ２８を５０μｌ／穴ずつ分注し、さらに（４）で得られた精製抗体を５０μｌ／穴ずつ分注して混合し、室温で２時間反応させた。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎでよく洗浄した後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体〔ダコ（ＤＡＫＯ）社製〕を５０μｌ／穴分注し、室温で１時間放置した。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎでよく洗浄した後、（１）と同様にして発色させ、OD_{415nm} の吸光度を測定した。図２に示したように、（３）で選択されたハイブリドーマのうち、ハイブリドーマＫＭ３４１、ＫＭ５０９およびＫＭ５１０がそれぞれ生産するモノクローナル抗体ＫＭ３４１、ＫＭ５０９およびＫＭ５１０はＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８によって濃度依存的に結合活性が阻害され、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に対して反応することが示された。
【００３５】
（６）ウサギ抗ＮＤ２８抗体の作製
組換えＤＮＡ技術により大腸菌で生産させたＮＤ２８の１００μｇ／匹を20週令のウサギにフロインドの完全アジュバント(Complete Freund Adjuband;ナカライテスク社）とともに１週間間隔で４回皮下投与し、その後１０００μg/匹のＮＤ２８をフロインドの不完全アジュバント(Incomplete Freund Adjuband;ナカライテスク社）とともに２週間間隔で６回投与した。酵素免疫測定法により血中抗体価の上昇を確認後抗血清を採取した。カプリル酸沈殿法および５０％飽和硫酸アンモニウムによる塩析によりＩｇＧ画分を集め、ウサギ抗ＮＤ２８抗体とした。図３にウサギ抗ＮＤ２８抗体のＮＤ２８、Ｇ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に対する反応性を示す。
【００３６】
（７）ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に反応するモノクローナル抗体を用いたＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２

８の定量系（定量系１）の確立

（５）で選択されたＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に反応するモノクローナル抗体と（６）で作製したウサギ抗ＮＤ２８抗体を用い、サンドイッチELISA法によるＰＥＧ化したＮＤ２８定量系を検討した。第一抗体としてＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に反応するモノクローナル抗体またはウサギ抗ＮＤ２８抗体１０μｇ／ｍｌを５０μｌ／穴ずつ９６穴プレートに分注し、４℃で一晩放置してプレートにコートした。ＢＳＡ溶液でブロッキングした後、160ng/mlから２倍希釈で0.15625ng/mlまで段階希釈したＰＥＧ化ＮＤ２８を５０μｌ／穴ずつ分注し、４℃で一晩反応させた。洗浄後、第二抗体としてビオチンで標識したＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８に反応するモノクローナル抗体またはウサギ抗ＮＤ２８抗体１０μｇ／ｍｌを５０μｌ／穴ずつ分注し、室温で１～２時間反応させた。よく洗浄した後、アビジン－ペルオキシダーゼ（VECTOR社）を５０μｌ／穴ずつ分注し、室温で１～２時間反応させた。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎでよく洗浄した後、（１）と同様にして発色し、OD_{415nm} の吸光度を測定した。１６通りの第一抗体と第二抗体の組み合わせのうち、ＰＥＧ化したＮＤ２８を最も高感度に検出しうる組合せとして第一抗体がＫＭ５０９、第二抗体がウサギ抗ＮＤ２８抗体の組合せを選択した。この組合せを用いた系によるＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化ＮＤ２８およびインターフェロンγの定量曲線を図４に示した。図４に示したようにこの系はＮＤ２８、Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化ＮＤ２８をいずれも等しい感度で検出することができた。

【００３７】

（８）抗ＮＤ２８モノクローナル抗体を用いたＮＤ２８定量系の確立

（３）で得られたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体のうち、ＮＤ２８に反応し、Ｇ－ＣＳＦに反応せず、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８には反応しないモノクローナル抗体であるＫＭ４９８またはＫＭ５１１を第一抗体に用い、（６）で作製したウサギ抗ＮＤ２８抗体を第二抗体に用いてサンドイッチELISA 法によるＮＤ２８に特異的な定量系を検討した。その結果、第一抗体としてＫＭ５１１、第二抗体としてウサギ抗ＮＤ２８抗体の組合せを選択した。この組合せを用いた定量系によるＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化ＮＤ２８およびインターフェロンγの定量曲線を図５に示した。図５に示したようにこの定量系は、ＮＤ２８を特異的に定量することができた。

【００３８】

（９）抗Ｇ－ＣＳＦモノクローナル抗体を用いたＧ－ＣＳＦ定量系の確立

（３）で得られたハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体のうち、Ｇ－ＣＳＦに反応し、ＮＤ２８に反応せず、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８には反応しないモノクローナル抗体であるモノクローナル抗体ＫＭ３４３をを第一抗体に用い、（６）で作製したウサギ抗ＮＤ２８抗体を第二抗体に用いてサンドイッチELISA 法によるＧ－ＣＳＦに特異的な定量系を確立した。この定量系によるＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＰＥＧ化Ｇ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化ＮＤ２８およびインターフェロンγの定量曲線を図６に示した。図６に示したようにこの定量系は、Ｇ－ＣＳＦを特異的に定量することができた。

【００３９】

（10）ＰＥＧ化したＮＤ２８の定量

（７）で確立した定量系１によって求められる値より（８）で確立したＮＤ２８に特異的な定量系（定量系３）によって求められる値と（９）で確立したＧ－ＣＳＦに特異的な定量系（定量系２）によって求められる値とを差し引くことにより、ＰＥＧ化したＮＤ２８を高感度に定量することができた。

【実施例２】

【００４０】

（１）抗ＮＤ２８抗体を用いたＰＥＧ化したＮＤ２８およびＮＤ２８の定量系（定量系１）の確立

実施例１の（６）で得られた抗ＮＤ２８抗体よりヒンジ法（酵素免疫測定法、第３版、

医学書院刊）を用いてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ＮＤ２８抗体Ｆａｂ’を作製した。

【００４１】

第一抗体としてウサギ抗ＮＤ２８抗体を用い、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ＮＤ２８抗体Ｆａｂ’を用いてサンドイッチELISA 法によるＰＥＧ化したＮＤ２８およびＮＤ２８の定量系を確立した。この定量系によるＰＥＧ化ＮＤ２８およびＮＤ２８の定量曲線を図７に示した。図７に示したようにこの定量系は、ＮＤ２８およびＰＥＧ化したＮＤ２８を定量することができた。

【００４２】

（２）ＮＤ２８の定量系の確立

第一抗体として、ＮＤ２８に反応し、Ｇ－ＣＳＦに反応せず、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦおよびＰＥＧ化したＮＤ２８には反応しないモノクローナル抗体であるＫＭ５１１を用い、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ＮＤ２８を用いたサンドイッチELISA 法によるＮＤ２８の定量系を確立した。この定量系によるＰＥＧ化ＮＤ２８およびＮＤ２８の定量曲線を図８に示した。図８に示したようにこの定量系は、ＮＤ２８を定量することができた。

【００４３】

（３）ＰＥＧ化したＮＤ２８の定量系の確立

実施例１と同様にして、（１）で確立したＮＤ２８およびＰＥＧ化したＮＤ２８の定量系によって求められる値より（２）で確立したＮＤ２８に特異的な定量系によって求められる値を差し引くことにより、ＰＥＧ化したＮＤ２８を高感度に定量することができた。

【実施例３】

【００４４】

ＰＥＧ化したＮＤ２８を投与したラットの血中ＰＥＧ化ＮＤ２８量の測定

実施例２の（３）で確立した定量系を用いて、ＰＥＧ化したＮＤ２８を投与したラットの血中のＰＥＧ化したＮＤ２８量の測定を行った。また、実施例２の（２）で確立した定量系を用いて、ＮＤ２８を投与したラットの血中のＮＤ２８の量を測定した。ＰＥＧ化したＮＤ２８またはＮＤ２８は、５０μｇ／ｋｇでラットの静脈内に投与し、投与後、経時的に血清を採取して、血清中のＰＥＧ化したＮＤ２８またはＮＤ２８量を測定した。その結果を図９に示した。図９に示したように、ＰＥＧ化ＮＤ２８は、ＮＤ２８と比較して血中クリアランスが著しく低下した。

【図面の簡単な説明】

【００４５】

【図１】モノクローナル抗体ＫＭ３４１、ＫＭ３４２、ＫＭ３４３、ＫＭ４９８、ＫＭ５０９、ＫＭ５１０およびＫＭ５１１のバインディングアッセイによるＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８および大腸菌夾雑蛋白質ＮＹ４９との反応性を示す。

【図２】モノクローナル抗体ＫＭ３４１、ＫＭ３４２、ＫＭ３４３、ＫＭ４９８、ＫＭ５０９、ＫＭ５１０およびＫＭ５１１のインヒビションアッセイによるＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦとの反応性（Ａ）およびＰＥＧ化したＮＤ２８との反応性（Ｂ）を示す。

【図３】ウサギ抗ＮＤ２８抗体のバインディングアッセイによるＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８および大腸菌夾雑蛋白質ＮＹ４９との反応性（Ａ）およびインヒビションアッセイによるＰＥＧ化したＮＤ２８との反応性（Ｂ）を示す。

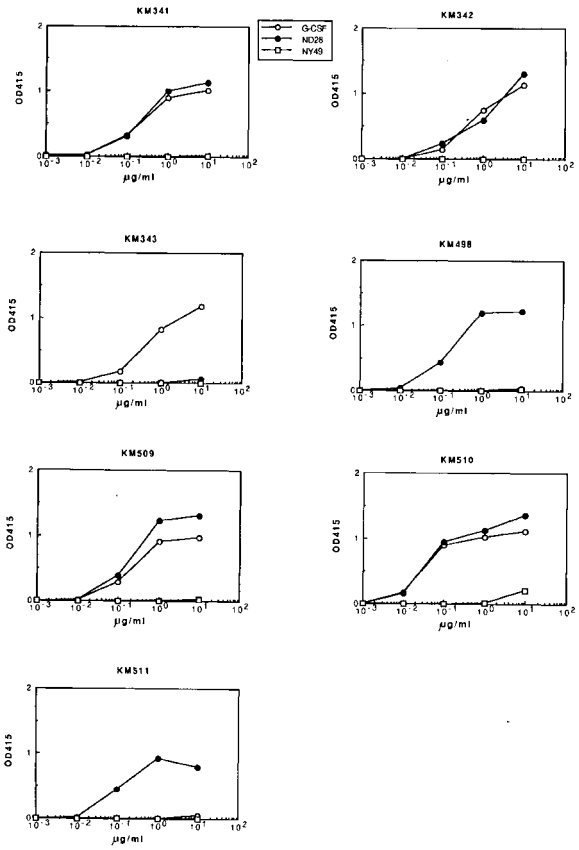
【図４】第一抗体にＫＭ５０９、第二抗体にビオチン化ウサギ抗ＮＤ２８を用いたサンドイッチELISA 系によるＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化したＮＤ２８およびインターフェロンγの定量曲線を示す。

【図５】第一抗体にＫＭ５１１、第二抗体にビオチン化ウサギ抗ＮＤ２８を用いたサンドイッチELISA 系によるＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化したＮＤ２８およびインターフェロンγの定量曲線を示す。

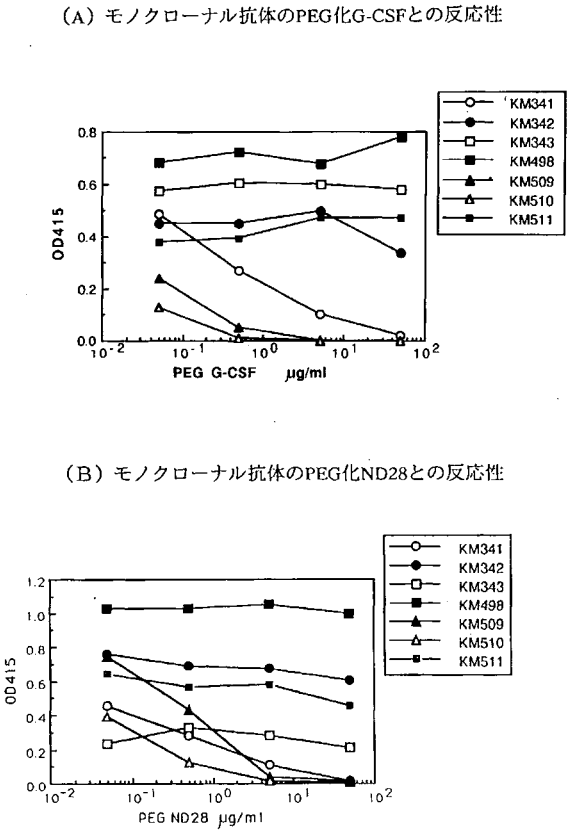
【図６】第一抗体にＫＭ３４３、第二抗体にビオチン化ウサギ抗ＮＤ２８を用いたサンドイッチELISA 系によるＧ－ＣＳＦ、ＮＤ２８、ＰＥＧ化したＧ－ＣＳＦ、ＰＥＧ化したＮＤ２８およびインターフェロンγの定量曲線を示す。

【図７】第一抗体にウサギ抗ＮＤ２８抗体、第二抗体にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ＮＤ２８Ｆａｂ’を用いたサンドイッチELISA 系によるＮＤ２８およびＰＥＧ化したＮＤ２８の定量曲線を示す。
【図８】第一抗体にＫＭ５１１、第二抗体にペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ＮＤ２８を用いたサンドイッチELISA 系によるＮＤ２８、ＰＥＧ化したＮＤ２８の定量曲線を示す。
【図９】ＰＥＧ化したＮＤ２８およびＮＤ２８を投与したラットを経時的に採血し、血中のＰＥＧ化したＮＤ２８およびＮＤ２８の量を測定した結果を示す。○はＰＥＧ化したＮＤ２８を投与したラットの血中のＰＥＧ化したＮＤ２８およびＮＤ２８の量を、△はＰＥＧ化したＮＤ２８を投与したラットの血中のＮＤ２８の量を、●はＮＤ２８を投与したラットの血中のＮＤ２８の量を示す。

【図１】

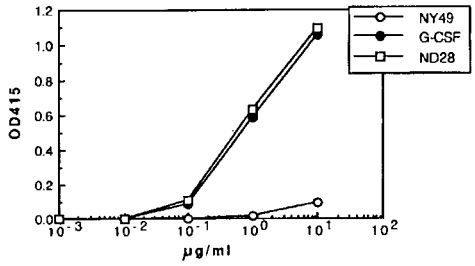


【図２】

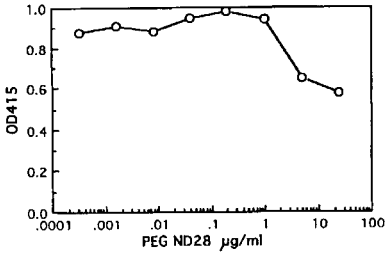


【図３】

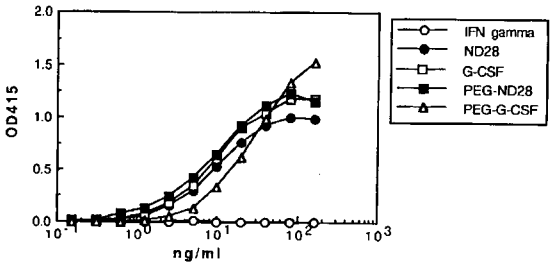
（A）ウサギ抗ND28抗血清の反応特異性



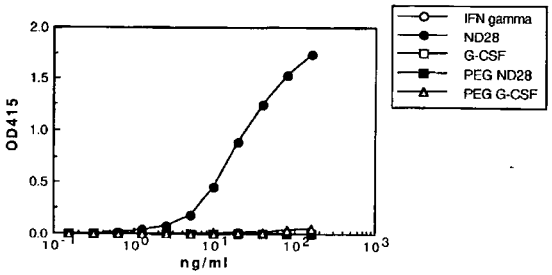
（B） ウサギ抗ND28抗血清のPEG化ND28との反応性



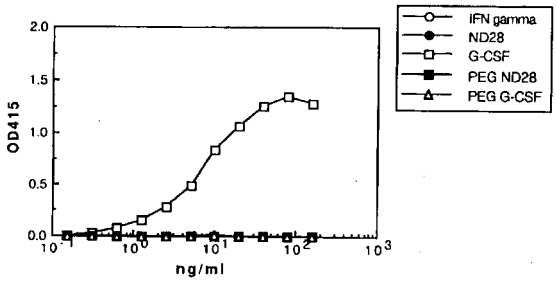
【図４】



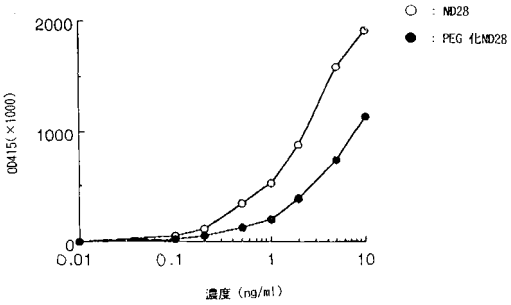
【図５】



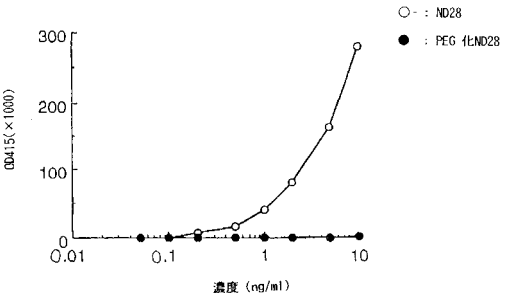
【図６】



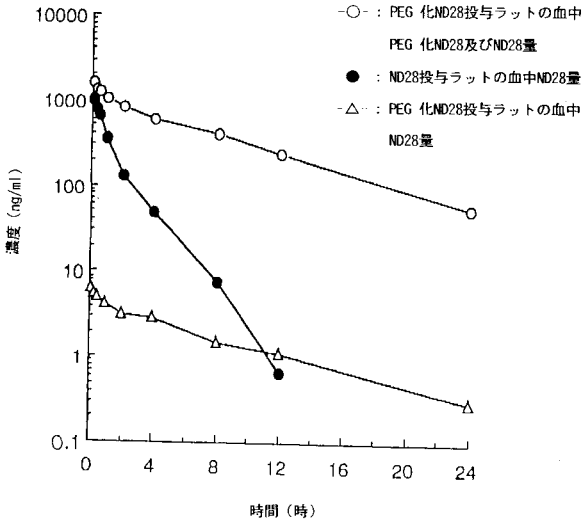
【図７】



【図８】



【図９】


-○- : PEG 化ND28投与ラットの血中
PEG 化ND28及びND28量
● : ND28投与ラットの血中ND28量
-△- : PEG 化ND28投与ラットの血中
ND28量
10000
1000
100
10
1
0.1
濃度（ng/ml）
0
4
8
12
16
20
24
時間（時）

フロントページの続き

審査官　白形　由美子

(56)参考文献 Abuchowski, A et al., Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovin, J.Biol.Chem., １９７７年, Vol.252, No.11, p.3582-3586
Yoshida, H. & Shitara, S., Generation and characterization of monoclonal antibodies to recombinant human granulocyte-colony sti, Agric.Biol.Chem., １９８９年, Vol.53(4), 1059-1101
Richter, A.W. & Akerblom, E., Antibodies against polyethylene glycol produced in animals by immunization with monomethoxy polyethy, Int.Archs allergy appl.Immun., １９８３年, Vol.70, 124-131

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／５３
ＰｕｂＭｅｄ

专利名称(译)	聚乙二醇化人粒细胞集落刺激因子的测定		
公开(公告)号	JP3821830B2	公开(公告)日	2006-09-13
申请号	JP2005154801	申请日	2005-05-27
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	花井陳雄 古谷安希子 山崎基生 小林智 桑原隆		
发明人	花井 陳雄 古谷 安希子 山▲崎▼ 基生 小林 智 ▲桑▼原 隆		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/24 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/24 C12N15/00.C C12P21/08 G01N33/577.B G01N33/543.545.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE07 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA57 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22		
审查员(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2005308757A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：高度敏感地确定PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物。ŽSOLUTION：使用PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物，与PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物和单克隆抗体反应的免疫测定方法测定PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物的特异性反应人粒细胞集落刺激因子或其衍生物，不与PEG人粒细胞集落刺激因子或其衍生物反应。Ž

モノクローナル抗体	サブクラス
KM341	G1
KM342	G1
KM343	G1
KM498	G1
KM509	G2a
KM510	G1
KM511	G1