

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4493882号  
(P4493882)

(45) 発行日 平成22年6月30日(2010.6.30)

(24) 登録日 平成22年4月16日(2010.4.16)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>C O 7 K</b> 16/28 (2006.01)	C O 7 K	16/28	
<b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2
<b>C 1 2 P</b> 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
<b>G O 1 N</b> 33/563 (2006.01)	G O 1 N	33/563	
<b>G O 1 N</b> 33/566 (2006.01)	G O 1 N	33/566	

請求項の数 10 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-184432 (P2001-184432)  
 (22) 出願日 平成13年6月19日(2001.6.19)  
 (65) 公開番号 特開2002-371099 (P2002-371099A)  
 (43) 公開日 平成14年12月26日(2002.12.26)  
 審査請求日 平成20年2月22日(2008.2.22)

微生物の受託番号 FERM P-17789

(73) 特許権者 000000941  
 株式会社カネカ  
 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
 (72) 発明者 大原 高秋  
 兵庫県長田区大谷町3-1-41-606  
 (72) 発明者 山下 憲司  
 香川県高松市神在川窪町332-3  
 (72) 発明者 角谷 徹  
 兵庫県加古川市別府町新野辺90-43  
 (72) 発明者 京泉 誠之  
 広島県安芸郡府中町瀬戸ハイム3-24-5

審査官 佐々木 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原およびこの抗原を識別するモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

未熟なヒト造血幹細胞を認識し、CD34<sup>+</sup>Jurkat細胞を認識しないことを特徴とする、受託番号がFERM P-17789であるハイブリドームによって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項2】

マウスモノクローナル抗体である請求項1記載の抗体。

【請求項3】

蛍光標識、放射性同位元素標識又は酵素標識されている請求項1又は2記載の抗体。

【請求項4】

請求項1、2又は3記載の抗体が結合してなることを特徴とする固体支持体。

【請求項5】

請求項1又は2記載の抗体の免疫反応性フラグメント。

【請求項6】

蛍光標識、放射性同位元素標識又は酵素標識されている請求項5記載の免疫反応性フラグメント。

【請求項7】

請求項5又は6記載の免疫反応性フラグメントが結合してなることを特徴とする固体支持体。

【請求項8】

10

20

未熟なヒト造血幹細胞を認識し、 $CD34^+$ Jurkat細胞を認識しないモノクローナル抗体を産生することを特徴とする、受託番号がFERM P - 17789であるハイブリドーム。

【請求項9】

急性骨髄性白血病患者由来ヒト骨髄芽球様細胞であるKG-1細胞で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させて得られることを特徴とする請求項8記載のハイブリドーム。

【請求項10】

請求項1若しくは2記載の抗体又は請求項5記載の免疫反応性フラグメントを用いることを特徴とする、ヒト骨髄細胞、臍帯血及び顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)処理でヒト造血幹細胞を大量に動員させた血液中から未熟な造血幹細胞を分離精製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 $CD34$ 陽性( $CD34^+$ ;以下CD抗原の陽性の記載は同様にして表記する)造血幹細胞に存在し、分子量が約 $110 \times 10^3$ のタンパク質である新規なHSCA-3抗原、並びに、この抗原を識別するモノクローナル抗体HSCA-3(以下、HSCA-3抗体と称する)に関する。本発明のHSCA-3抗体は、1)抗体の標識によりイムノアッセイ、フローサイトメトリーへの利用、2)ヒト骨髄細胞、臍帯血およびG-CSF処理でヒト造血幹細胞を大量に動員させた血液中からの未熟な造血幹細胞の分離精製に活用できる。

【0002】

【従来の技術】

ヒト造血幹細胞及び造血前駆細胞の表面抗原マーカーとして、 $CD34$ 分子が知られている(アメリカ特許第4714680号)。 $CD34$ 分子はヒト骨髄の未分化細胞に発現している細胞表面抗原であり、純化した $CD34^+$ 細胞の移植によって、すべての系統の血液系細胞の速やかな再構築が得られること、 $CD34^+$ 細胞比率と造血幹細胞の同定に最もよく用いられているコロニーアッセイ法(奈良信雄、血液病学第2版、文光堂(1995)pp.1558)の成績とがよく相関することから、 $CD34^+$ 細胞分画に造血幹細胞が存在すると考えられている。 $CD34$ 分子は造血前駆細胞において、最も早期のマーカータンパク質である。 $CD34$ 分子はI型細胞膜貫通型細胞表面糖タンパク質で、分子量 $105 \times 10^3 \sim 120 \times 10^3$ である。 $CD34$ 分子と同様なヒト造血幹細胞の表面抗原マーカーとして、 $AC133$ 分子も知られている(アメリカ特許第5843633号)。 $AC133$ 分子に対する抗体は、 $CD34^+$ 細胞の20~60%に反応し、未分化な $CD34^+$ 細胞のすべてに反応するとされている。これは、5回細胞膜貫通型細胞表面糖タンパク質で、分子量 $117 \times 10^3$ である。また、 $CD90$ 分子もヒト造血幹細胞の表面抗原マーカーとして知られている(アメリカ特許第5061620号)。ヒト造血幹細胞の表面抗原マーカーとして知られているタンパク質は以上のものが主なもので、知られているものは数少ない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、未熟な造血幹細胞に存在する新規なHSCA-3抗原、並びに、この抗原を識別するモノクローナル抗体を、1)抗体の標識によりイムノアッセイ、フローサイトメトリーへの利用、2)ヒト骨髄細胞、臍帯血およびG-CSF処理でヒト造血幹細胞を大量に動員させた血液中からの未熟な造血幹細胞の分離精製に活用することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、KG-1細胞をBALB/cマウスに免疫することにより調製したモノクローナル抗体が、新規なHSCA-3抗原を識別することを見出し、上記目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、本抗体が、上記目的を満たし得るものであることを確認し、

10

20

30

40

50

本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、未熟なヒト造血幹細胞を認識し、 $CD34^+Jurkat$ 細胞を認識しないモノクローナル抗体又は免疫反応性フラグメントである。また、これらモノクローナル抗体又は免疫反応性フラグメントが結合してなる固体支持体でもある。

【0006】

また、本発明は、未熟なヒト造血幹細胞を認識し、 $CD34^+Jurkat$ 細胞を認識しないモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ、又は、急性骨髄性白血病患者由来ヒト骨髄芽球様細胞である $KG-1$ 細胞で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させて得られることを特徴とするハイブリドーマでもある。

10

【0007】

さらに、本発明は、分子量が約 $110 \times 10^3$ のタンパク質であり、 $CD34^+$ 造血幹細胞に存在する $HSCA-3$ 抗原でもある。

さらにまた、本発明は、蛍光標識、放射性同位元素標識又は酵素標識によるイムノアッセイ又はフローサイトメトリーにおいて、上記抗体又は上記免疫反応性フラグメントを用いて、上記抗原を測定する方法でもある。

さらにまた、本発明は、上記抗体又は上記免疫反応性フラグメントを用いて、ヒト骨髄細胞、臍帯血および $G-CSF$ 処理でヒト造血幹細胞を大量に動員させた血液中からの未熟な造血幹細胞を分離精製する方法でもある。

【0008】

20

【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳述する。

【0009】

本発明においては、特に記載のない限り、当該分野で公知であるモノクローナル抗体の作製及び分析方法が採用される。

【0010】

以下に、本発明を説明する上で用いられる用語を説明する。

「 $HSCA-3$ 抗原」とは、ヒト造血幹細胞に存在し、分子量が約 $110 \times 10^3$ のタンパク質である新規な抗原である。

【0011】

30

また、「 $HSCA-3$ 抗体」とは、上記 $HSCA-3$ 抗原を識別するモノクローナル抗体である。 $HSCA-3$ 抗体は、急性骨髄性白血病患者由来ヒト骨髄芽球様細胞である $KG-1$ 細胞で免疫された哺乳動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とを融合して得られるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である。

【0012】

「造血幹細胞」とは、赤血球、白血球、巨核球などの細胞のみならず、T細胞、B細胞などのリンパ系を含めた全ての血液系細胞への分化能を有する多能性の細胞であって、かつ、自己増殖可能な細胞をいう。造血幹細胞は、 $CD34$ 抗原が陽性でかつ $CD38$ 抗原が陰性である( $CD34^+CD38^-$ ; 以下CD抗原の陽性、陰性の記載は同様にして表記する)ことにより特徴付けられる。

40

【0013】

以下、さらに本発明の詳細について説明する。

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、 $KG-1$ 細胞を感作抗原として使用して、基本的には、これを通常の免疫法を応用して免疫し、通常の細胞融合法を応用して細胞融合させ、通常のクローン化法を応用して、クローン化することによって作製することができる。

【0014】

より具体的には、 $KG-1$ 細胞を感作抗原として使用して、被免疫哺乳動物として、ヒト以外のマウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどの腹腔内、皮下、フットパッドなどに投与する。細胞融合相手となるミエローマ細胞が、通常はマウス

50

由来のものであるため、特にマウスを免疫することが好ましい。免疫は、一般的な方法により、例えば、前記KG-1細胞をPBS(-) (phosphate-buffered saline、pH7.2)や生理食塩水などで適量に希釈、懸濁したものを、動物に毎週、1~3ヶ月投与することが好ましい。

#### 【0015】

被免疫動物から、脾臓細胞、リンパ球、末梢血などの抗体産生細胞を採取し、これらと腫瘍細胞株であるミエローマ細胞とを細胞融合させてハイブリドーマを作製する。抗体産生細胞としては、上記KG-1細胞を最終投与後に摘出した脾臓細胞を使用するのが好ましい。ミエローマ細胞としては、公知の細胞株、例えば、P3-NS1/1-Ag4-1細胞(略称NS-1細胞)(ケーラーら、Eur. J. Immunol.、6:511(1976))、SP2/0-Ag14細胞(略称SP2細胞)(シュルマンら、Nature、276:269(1978))、FO細胞(デサントグロスら、J. Immunol. Meth.、35:1(1980))などがよく用いられる。ハイブリドーマの培養上清から目的の抗体の取得を容易にするために、ミエローマ細胞としての固有の免疫グロブリンを分泌しない株を使用することが望ましい。この点で、NS-1細胞が望ましい。

10

#### 【0016】

抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には、通常の方法、例えば世界で最初に実施したケーラーとミルシュタインの方法(ケーラーら、Nature、256:495(1975))に準じて行うことができる。

#### 【0017】

より具体的には、細胞融合促進剤の存在下に、通常の栄養培地中で実施される。細胞融合促進剤としては、ポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルスなどが用いられる。細胞融合は、抗体産生細胞とミエローマ細胞との所定量を、例えばミエローマ細胞に対して抗体産生細胞を約1~10倍程度用いて行われる。細胞融合時の培地としては、ミエローマ細胞の増殖に適した培地、例えばRPMI 1640培地、が例示できる。このような培地中で両細胞を混合し、37℃に保ったポリエチレングリコール(例えば、平均分子量1,000~6,000のもの)溶液を培地に30~60%(W/V)の濃度で添加し、混合することで細胞融合を開始する。さらに、適当な培地を添加し、遠心分離による上清の除去を繰り返すことにより、目的とするハイブリドーマが得られる。

20

#### 【0018】

このハイブリドーマは、通常の選択培地、例えば、ヒポキサンチン(H)、アミノプテリン(A)及びチミジン(T)を含有するHAT培地で培養することにより選択される。HAT培地では、目的のハイブリドーマ以外の細胞が死滅するまで数日間~数週間培養する。ハイブリドーマのコロニーが確認できるようになったら、その培養上清中の抗体をスクリーニングする。培養上清中の抗体のスクリーニングは、例えば、固定した細胞を抗原とするエライザ(ELISA)法により培養上清中の抗体活性を測定することにより実施できる(安東民衛ら、単クローン抗体実験操作入門、講談社サイエンティフィック(1993)pp.126)。これによりスクリーニングした目的の抗体を産生するハイブリドーマは、常法により限界希釈法を繰り返すことにより、最終的に単一のハイブリドーマクローンからなるコロニーとして得ることができる。

30

40

#### 【0019】

こうして得られる本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常ハイブリドーマと同様に、公知の培地、例えば、RPMI 1640や、ダルベッコ改変培地で、培養、継代できる。また、液体窒素中で長期間保存することもできる。

#### 【0020】

本発明のハイブリドーマを大量に15%牛胎児血清(FCS)-RPMI 1640培地で培養することにより、本発明のモノクローナル抗体を培養上清から調製することもできる。また、マウスの腹腔にハイブリドーマを注射して生じた腹水から、本発明のモノクローナル抗体を調製することもできる。

#### 【0021】

50

こうして調製したモノクローナル抗体は、通常の抗体の精製方法によって精製してもよい。抗体の精製方法としては、硫酸アンモニウムなどによる塩析、ジエチルアミノエステル（DEAE）誘導体及びカルボキシメチル（CM）誘導体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、プロテインA又はプロテインGを用いたアフィニティークロマトグラフィーなどの方法があり、これらの方法を組み合わせて精製することができる。

#### 【0022】

上記のようにして得られる本発明のモノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスは、特に限定されるものではないが、免疫グロブリン（以下Igと表記する）G1、カップ鎖が例示される。

10

#### 【0023】

また、本発明のモノクローナル抗体を、抗原結合部位（Fab）を分解しないタンパク質分解酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで消化し、さらに、タンパク質の単離精製を常法により行い得られた、Fab、F(ab)<sub>2</sub>などの、抗体の免疫反応性フラグメントであっても、本発明のモノクローナル抗体と同様の性質を保持する限り、本発明のモノクローナル抗体と同様に使用することができる。

#### 【0024】

本発明のモノクローナル抗体を抗原と反応させた後、さらに2次抗体として、フルオレッセインイソチオシアネート（FITC）などの蛍光標識物質、<sup>125</sup>Iなどの放射性同位元素、又は、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素によって標識した免疫グロブリンを反応させることにより、抗原を検出することができる。また、本発明のモノクローナル抗体そのものを、FITCなどの蛍光標識物質、<sup>125</sup>Iなどの放射性同位元素、又は、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素によって標識することにより、抗原を検出することもできる。

20

#### 【0025】

また、本発明のモノクローナル抗体を固体支持体（例えば、プロテインA若しくはプロテインGを固定化したセファロースやアガロースなどの樹脂、又は、臭化シアン活性化セファロースやアガロースなどの樹脂）に固定化することにより、細胞分離用カラムを作製することができる。このカラムへ、ヒト骨髓細胞、臍帯血およびG-CSF処理でヒト造血幹細胞を大量に動員させた血液を流してやると、未熟な造血幹細胞はカラムに吸着したままになるので、他の細胞と分離することができる。

30

#### 【0026】

##### 【実施例】

以下、本発明におけるHSCA-3抗原及びこの抗原を識別するモノクローナル抗体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。

（実施例1：HSCA-3抗体産生ハイブリドーマの調製、及び、HSCA-3抗体の産生）

##### （a）感作抗原

感作抗原として、急性骨髓性白血病患者由来ヒト骨髓芽球様細胞であるKG-1細胞（JCRB細胞バンク）を用いた。KG-1細胞を、 $1.0 \times 10^5 / \text{ml}$ の濃度になるように、15%牛胎児血清（FCS）-RPMI 1640培地（株式会社日研生物医学研究所製）15mlに懸濁し、カルチャーディッシュ（グライナー社製）（直径10cm）に入れ、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで、37℃で培養を行った。培養4～5日目に、細胞を4℃、240Gで10分間遠心分離して回収し、PBS（-）（phosphate-buffered saline, pH7.2；株式会社日研生物医学研究所製）で2回洗浄後、 $1.0 \times 10^7$ 個の細胞を200µlのPBS（-）に懸濁し、これを感作抗原として用いた。

40

#### 【0027】

##### （b）免疫

免疫するマウスは、BALB/cのメス（8週齢）を用いた。上述のKG-1細胞を感作

50

抗原とし、マウスに皮下注射した。以後、同様の細胞 ( $1.0 \times 10^7$ 個) を7日目、14日目、21日目、29日目、54日目、61日目、68日目、74日目、85日目、そして92日目に皮下注射し、最終免疫として、96日目に同様の細胞 ( $1.0 \times 10^7$ 個) を腹腔内に注射した。

#### 【0028】

##### (c) ハイブリドーマの調製

最終免疫から4日後すなわち最初の免疫から100日目に、マウスから脾臓を摘出し、PBS(-)を入れたディッシュに入れ、スライドグラス2枚のすりガラス部分を用いて、脾臓をつぶし、脾臓細胞を回収した。細胞をチューブに入れ、4、240Gで10分間遠心分離し、上清を捨てた。

#### 【0029】

これに対し、融合相手のX63細胞由来の骨髄腫細胞であるNS-1細胞を、以下のように調製した。NS-1細胞を、 $1.0 \times 10^5$ /mlの濃度になるようにし、15%牛胎児血清(FCS)-RPMI 1640培地15mlに懸濁し、カルチャーディッシュ(直径10cm)に入れ、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で培養を行った。培養4~5日目に細胞を、4、240Gで10分間遠心分離して回収した。次に、脾臓細胞およびNS-1細胞を、それぞれRPMI 1640培地30mlで3回洗浄した後、脾臓細胞(合計 $2.89 \times 10^8$ 個)およびNS-1細胞(合計 $8.07 \times 10^7$ 個)を混合した。RPMI 1640培地を加え、10mlにし、ガラスチューブに入れ、4、300Gで10分間遠心分離し、上清を除去した。PEG溶液[ポリエチレングリコール4,000をPBS(-)に溶解して50%にしたもの(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)1ml+ジメチルスルフォキシド0.1ml+RPMI 1640培地0.1ml]1mlをガラスチューブに1分間かけて加え、1分間攪拌し、次にRPMI 1640培地1mlを1分間の間に加え、さらに、RPMI 1640培地1mlを1分間かけて加え、最後に、RPMI 1640培地7mlを3分間かけて加え、150G、10分間室温で遠心分離し、上清を完全に除去した。

#### 【0030】

こうして得られたペレットをほぐして、15%FCS-RPMI 1640培地を適量入れて、細胞濃度を $1 \times 10^7$ 個/mlにした。この細胞を96ウェル平底プレート(コーニング社製)に、100μl/ウェルまいた。その翌日に、50倍濃縮ヒポキサンチン+アミノプテリン+チミジン(HAT)溶液(大日本製薬社製)を15%FCS-RPMI 1640培地で希釈して2%にしたもの(HAT2%溶液)を、100μl/ウェル加え、さらにその翌日、そのうち100μlを上記のHAT2%溶液100μlに交換した。同様にして、細胞融合の日から、3、5、8、11、14日目にウェル中の100μlを上記のHAT2%溶液100μlに交換した。次に、下記のエライザ(ELISA)法により培養上清中の抗体活性を測定した。

#### 【0031】

##### (d) エライザ法を用いた抗体アッセイ

以下に示すポリ-L-リジン処理エライザ用96ウェルプレートを準備した。エライザ用96ウェルプレートとしてEIA/RIA高結合型平底プレート(コースター社製)を用い、ポリ-L-リジン溶液(50μg/ml)50μlを、プレートの各ウェルに入れた。プレートミキサーで攪拌後、室温で5~30分間放置し、ポリ-L-リジン溶液を吸引除去した。さらに、洗浄のために、滅菌超純水100μlをプレートの各ウェルに入れ、吸引除去した。この洗浄操作はさらに2回繰り返し、クリーンベンチ内にプレートを放置して乾燥させた。こうしてポリ-L-リジン処理エライザ用96ウェルプレートを準備した。次に、免疫原に用いたKG-1細胞( $4.8 \times 10^6$ 個/96ウェルプレート)を、アールの緩衝塩類溶液(EBSS)(株式会社日研生物医学研究所製)で、3回洗浄し、PBS(-)で、 $1 \times 10^6$ 個/mlの細胞濃度として、上記のプレートの各ウェルに、50μlずつ分注した。室温で15分間放置して、細胞が底面に接着するのを待ち、90Gで遠心分離した。上清を吸引除去後、0.05%のグルタルアルデヒド-PBS(-)

10

20

30

40

50

50  $\mu$ l ずつ静かに各ウェルに入れ、室温で3分間放置した後、PBS (-) 100  $\mu$ l を各ウェルに入れ、吸引除去した。さらに、PBS (-) で3回洗浄後、ブロッキング溶液 (0.2%ゼラチン、0.1%BSA、100mMグリシン、0.1%アジ化ナトリウム添加PBS (-)) 100  $\mu$ l を各ウェルに入れ、吸引除去した。もう一度、ブロッキング溶液 100  $\mu$ l を各ウェルに入れ、室温で1時間静置した後、吸引除去し、ハイブリドーマの培養上清 100  $\mu$ l を各ウェルに入れ、室温で2時間以上反応させた。ウェルを 0.1%ゼラチン添加PBS (-) - 0.05%Tween 20 溶液 150  $\mu$ l で、3回洗浄した。

#### 【0032】

次に、1,500倍希釈したヤギIgG抗体 (マウスIgG、IgA、IgMに対する抗体;カッセル社製) 100  $\mu$ l を各ウェルに入れ、室温で1時間以上反応させた。ここでウェルを 0.1%ゼラチン添加PBS - 0.05%Tween 20 溶液 150  $\mu$ l で、3回洗浄した。オルトフェニレンジアミン(OPD) - 過酸化水素溶液 (0.3%OPD、0.02%過酸化水素を 0.05Mクエン酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解したもの) 100  $\mu$ l を各ウェルに入れ、室温で10分間放置し、発色を確認後、1N硫酸 - 2mMアジ化ナトリウム溶液 100  $\mu$ l をさらにウェルに加え、攪拌した。最後に、492nmの波長の吸光度(OD492)をプレートリーダー (大日本製薬社製) で読み、発色色素量を測定し、抗体の活性を判定した。本実験の陽性対照として、KG-1細胞を免疫したマウスの脾臓細胞採取前の血清をPBS (-) で500倍希釈した溶液を用い、陰性対照として、通常のマウスの血清をPBS (-) で500倍希釈した溶液を用いた。HSCA-3 10  
20  
抗体の培養上清のOD492は、0.195、陰性対照のOD492は0.019、陽性対照のOD492は0.453であった。

#### 【0033】

##### (e) シングルセルクローニング

上記実施例1(d)で得られたKG-1細胞結合活性を有するモノクローナル抗体HSCA-3を、限界希釈法によりシングルセルクローニングした。すなわち、ハイブリドーマが、1個/ウェルとなるように、クローニング培地 [15%FCS-RPMI 1640培地に5%(w/w)の濃度になるようにブライクローン (大日本製薬社製) を添加したもの] に懸濁し、その懸濁液を100  $\mu$ l ずつ、胸腺細胞をフィーダー細胞としてまいた96ウェル平底プレート (コーニング社製) に分注して、37、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。フィーダー細胞の調製の仕方は、以下のようにした。BALB/cマウスから、胸腺を摘出し、ピペティングで細胞をばらばらにして、ヒポキサンチン/チミジン(HT)を含む、15%FCS-RPMI 1640培地に懸濁した。その細胞濃度を5 $\times$ 10<sup>6</sup>個/mlに合わせ、100  $\mu$ l ずつ各ウェルに分注した。約2週間後に、ウェル当たり、1個のハイブリドーマが生育している培養上清を100  $\mu$ l 回収して、抗体活性の有無を上記(d)エリザ法を用いた抗体アッセイにて調べた。こうして陽性クローンに対して、上記と同様のシングルセルクローニングを合計5回行い、抗体産生が安定でかつ完全にHSCA-3抗体を産生しているハイブリドーマクローンを得た。このHSCA-3抗体産生ハイブリドーマは、Mouse-Mouse hybridoma HSCA-3 30  
40  
として、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託した。受託番号は、FERMP-17789である。

##### (f) HSCA-3抗体の大量調製と精製

HSCA-3抗体を大量調製するために、ハイブリドーマをマウス腹腔に注射して、HSCA-3抗体を大量に含む腹水を調製した。すなわち、BALB/cマウスに1 $\times$ 10<sup>7</sup>個/PBS (-) 1mlのHSCA-3ハイブリドーマを腹腔内に注射し、1~2週間でマウスの腹部が肥大し、腹水が最大に達した頃に、腹水10.0mlを採取した。これに等量のPBS (-) 10.0mlを加えた後、さらに等量のSAS溶液 (75gの硫酸アンモニウムを100mlの純水に50に温めて溶かし、4に1晩放置して、過剰の硫酸アンモニウムを沈殿除去して、上清を使用した) 20.0mlを添加、水中30~60分放置した。8,000G、10分間、4で遠心分離後、沈殿にPBS (-) 4.0m 50

1を加え懸濁し、SAS溶液1mlも加え、氷中30～60分放置した。8、000G、10分間、4で遠心分離した後、上清にSAS溶液2.55ml加え(33%飽和)、氷中30～60分放置した。8、000G、10分間、4で遠心分離した後、沈殿を回収し、PBS(-)4.0mlに溶解した。さらに、4にて、3LのPBS(-)に対して透析した。この硫酸分画法で精製した46.6mg(溶液で4ml)の中、約10mgを使用して、プロテインGセファロース(アマシャムファルマシアバイオテク社製)2mlで、さらに精製した。プロテインGセファロースカラムをバインディングバッファー(MAPSI Iキット;日本バイオラッドラボラトリーズ社製)10mlで平衡化した後、抗体サンプルをカラムにアプライし、30mlバインディングバッファーで洗浄した。カラムからの溶出は、0.2Mグリシン/HCl(pH2.2)10mlで行った。クー  
マシーブリリアントブルー法のキット(日本バイオラッドラボラトリーズ社製)で回収した抗体溶液のタンパク質濃度を測定すると、0.35mg/mlで、合計2.8mgであった。

10

## 【0034】

(実施例2:抗体のサブクラスの決定)

エライザ法により、HSCA-3抗体の免疫グロブリンクラス及びサブクラスを決定した。そのために、マウスハイブリドーマサブタイピングキット(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いた。抗マウス免疫グロブリン(ヒツジ由来)をコーティング緩衝液(50mM炭酸ナトリウム緩衝液/0.01%アジ化ナトリウム(pH9.4-9.7))で500倍に希釈し、96平底プレートウェル当たり、50μlを入れ、37で、30  
分間放置し、洗浄溶液(0.9%塩化ナトリウム/0.1%ツイーン20)200μl/ウェルで、2回洗浄した。後コーティング緩衝液(ゼラチンの分解により得られたペプチドをトリス塩酸緩衝液と塩化ナトリウムで溶解したもの)200μl/ウェルで、37  
で、15分間放置後、洗浄溶液200μl/ウェルで、2回洗浄した。次に、HSCA-3抗体の培養上清を50μl/ウェルアプライし、37で30分間放置後、洗浄溶液200μl/ウェルで2回洗浄した。さらに、サブクラス特異的抗マウス免疫グロブリン-ペルオキシダーゼ(POD)コンジュゲート(抗マウスIgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、ラムダ鎖及びカッパ鎖)を10倍希釈して、50μl/ウェルアプライし、37で、30分間放置した後、洗浄溶液200μl/ウェルで、2回洗浄した。基質溶液[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)(ABTS)タブレット1個を5mlの基質緩衝液(過ほう酸塩をクエン酸/リン酸ナトリウム緩衝液に溶解)に溶解した]100μl/ウェルアプライし、室  
温で、30分以内反応させた。陽性対照サンプル(抗マウスIgG1)が濃い緑色を呈したら、4mMアジ化ナトリウム溶液100μl/ウェル加えて、反応を停止させた。プレート各ウェルの405nmの吸光度を分光光度計(U2000;日立製作所製)で測定した。

20

30

## 【0035】

結果は、陽性対照サンプル(IgG1、カッパ鎖)の抗マウスIgGでの405nmの吸光度は1.422、抗マウスIgG1では2.525、抗マウスIgG2aでは0.087、抗マウスIgG2bでは0.049、抗マウスIgG3では0.063、抗マウスIg  
Mでは0.064、抗マウスIgAでは0.057、ラムダ鎖では0.077、カッパ鎖では0.572であった。それに対して、陰性対照サンプルの抗マウスIgGでの405nmの吸光度は0.109、抗マウスIgG1では0.126、抗マウスIgG2aでは0.093、抗マウスIgG2bでは0.052、抗マウスIgG3では0.060、抗マウスIgMでは0.079、抗マウスIgAでは0.061、ラムダ鎖では0.058、カッパ鎖では0.122であった。HSCA-3抗体の抗マウスIgGでの405nmの吸光度は1.737、抗マウスIgG1では2.550、抗マウスIgG2aでは0.086、抗マウスIgG2bでは0.047、抗マウスIgG3では0.056、抗マウスIgMでは0.065、抗マウスIgAでは0.057、ラムダ鎖では0.059、カッパ鎖では0.325であった。すなわち、HSCA-3抗体の免疫グロブリンクラス

40

50

及びサブクラスは、I g G 1であり、軽鎖（L鎖）のタイプは、カッパ鎖であった。

【0036】

（実施例3：HSCA-3抗体反応抗原の免疫沈降による解析）

15% FCS-RPMI 1640培地で培養した、対数増殖期にあるKG-1細胞を $5.0 \times 10^7$ 個集めて、PBS(-)で3回洗浄した。15mlポリプロピレン製チューブ（ファルコン社製）に細胞のペレットを集め、そこに150 $\mu$ l PBS(-)を入れ、懸濁し、氷上に放置した。これは使用前に30分のインキュベーターで、30 $^{\circ}$ Cにした。これに、ラクトペルオキシダーゼ（シグマ社製；PBS(-)に溶解して、2mg/mlにした）50 $\mu$ lと、0.5Mリン酸緩衝液（0.5Mリン酸二水素ナトリウム溶液1.95mlに対して、0.5Mリン酸水素二ナトリウム約3~4mlを加え、pH7.0にした）10 $\mu$ lを入れ、さらに、ヨウ化ナトリウム-125（NEN社製；低pH、全2mCi）約1mCi分を入れ、速やかに、過酸化水素水（30%過酸化水素水をPBS(-)で1,000倍希釈した）20 $\mu$ lを加え、混合し、30 $^{\circ}$ Cで、4分間インキュベーションした。そこに再度、過酸化水素水（30%過酸化水素水をPBS(-)で1,000倍希釈した）20 $\mu$ lを加え、混合し、室温で、10分間放置した。次に、4 $^{\circ}$ Cに冷やした洗浄緩衝液（0.02%アジ化ナトリウム/2mMヨウ化カリウム/PBS(-)）5mlを加え、300Gで、7分間、室温で遠心分離した。この洗浄操作を3回繰り返した。遠心分離用のチューブに、牛胎児血清2mlを入れて、その上に、洗浄緩衝液1mlに懸濁した細胞懸濁液を静かに上層し、300Gで10分間遠心分離した。これを洗浄緩衝液で2回洗浄した。このヨウ化ナトリウム-125ラベルした細胞の遠心分離ペレットに、0.5mlノニドットP（NP）-40緩衝液（NP-40 1g、トリス塩酸0.12g、食塩0.87g、アジ化ナトリウム0.02gに蒸留水80mlを入れて、塩酸でpHを7.2に調製し、100mlに合わせた）を入れて、ポルテックスミキサーで混合した（氷上で15分間放置）。10,000Gで20分間遠心分離し、上清を回収した。このヨウ化ナトリウム-125ラベルしたKG-1細胞の抽出液を80 $\mu$ l（/全量500 $\mu$ l）取り、HSCA-3抗体を1.5 $\mu$ g、対照のI g G 1抗体（イムノテック社製）も1.5 $\mu$ g用い、上記抽出液に加え、氷上で30分間放置した。一方、プロテインG-セファロースをNP-40緩衝液で3回洗浄した後、プロテインG-セファロース10mlに対して、NP-40緩衝液10mlを加え、このうち20 $\mu$ lを、上記抗体を添加したKG-1細胞の抽出液に添加して、氷上で1時間インキュベーションした。NP-40緩衝液1mlを加えて、8,000Gで3分間遠心分離して、上清を除去し、さらにこれを4回繰り返し洗浄した。これにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動サンプル溶解緩衝液（150mMトリス-塩酸（pH6.8）、4%SDS、14%グリセロール）30 $\mu$ lを加え、このうち15 $\mu$ lをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。SDS-ポリアクリルアミドゲル（10%ポリアクリルアミドゲル）を作製し、上述のサンプル15 $\mu$ lをアプライした。レーン1には、対照のCD34（クラスIIII）抗体（イムノテック社製）をアプライし、レーン2には、HSCA-3抗体をアプライした。レーン3には、ベンチマークプレステインドプロテインラダー（ギブコビーアルエル社製）を5 $\mu$ lアプライした。100ボルト一定電圧下、1時間電気泳動後、ゲルを50%トリクロロ酢酸で、30分間固定後、蒸留水で30分間ずつ、合計3回洗浄した。スタンダードタンパク質の電気泳動位置を確認し、ゲルをゲル乾燥機で乾燥し、オートラジオグラフィに供した。結果は、図1に示した。

【0037】

CD34（クラスIIII）抗体は広範なバンドを示しており、分子量105~120 $\times 10^3$ のタンパク質と反応していた。それに対してHSCA-3抗体は、分子量約110 $\times 10^3$ のタンパク質と反応していた。

【0038】

（実施例4：KG-1細胞におけるHSCA-3抗原の発現）

KG-1細胞 $1 \times 10^5$ 個を3本のチューブに入れ、それぞれPBS(-)（FCS 1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む）で2回洗浄した後、第1のチューブ（A）にI

10

20

30

40

50

g G 1 - F I T C 抗体 [ F I T C 標識された I g G 1 抗体 ( イムノテック社製 ) ] 及び I g G 1 - P E 抗体 [ フィコエリスリン ( P E ) 標識された I g G 1 抗体 ( イムノテック社製 ) ]、第 2 のチューブ ( B ) に C D 3 4 ( クラス I I I ) - F I T C 抗体 ( イムノテック社製 ) 及び C D 3 8 - P E 抗体 ( イムノテック社製 ) をそれぞれ 0 . 5  $\mu$  g 加えて攪拌した後、氷上で 3 0 分間放置した。P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 2 回洗浄した後、ヨウ化プロピジウム ( シグマアルドリッチジャパン社製 ) を最終濃度 1 0  $\mu$  g / m l になるように加えて細胞を染色した。第 3 のチューブ ( C ) には H S C A - 3 抗体を 0 . 5  $\mu$  g 加えて氷上で 3 0 分間放置した。P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 2 回洗浄した後、P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 2 , 5 0 0 倍希釈した F I T C 標識抗マウス I g 抗体 ( ノルディック社製 ) を 5 0  $\mu$  l 加えて、氷上で 3 0 分間放置した後、P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 1 回洗浄した。さらに P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 5 0 倍希釈した正常マウス血清 ( ロックランド社製 ) を 5 0  $\mu$  l 加えて、氷上で 1 5 分間放置した。次に C D 3 8 - P E 抗体を 0 . 5  $\mu$  g 加えて氷上で 3 0 分間放置し、P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 2 回洗浄した後、ヨウ化プロピジウムを最終濃度 1 0  $\mu$  g / m l になるように加えて細胞を染色した。

#### 【 0 0 3 9 】

染色された細胞をフローサイトメーター F A C S c a n ( ベクトンディッキンソン社製 ) で励起波長 4 8 8 n m、最大蛍光波長 5 3 0 n m で測定した。その結果を図 2 に示す。図の ( A ) ( B ) ( C ) は、それぞれ、上記チューブ ( A ) ( B ) ( C ) に対応する結果である。

#### 【 0 0 4 0 】

図 2 の ( A ) において、横軸はマウス I g G 1 - F I T C 抗体の蛍光強度、そして縦軸はマウス I g G 1 - P E 抗体の蛍光強度を示した。十字の線は、マウス I g G 1 - F I T C 抗体およびマウス I g G 1 - P E 抗体で処理して得られたフローサイトメトリー図に引いた縦軸と横軸の、それぞれの陽性陰性を区分する線を示した。ドットは細胞を示している。また、同様に、図 2 の ( B ) では、右下の象限は C D 3 4 ( クラス I I I ) + C D 3 8 - を示し、右上の象限は C D 3 4 ( クラス I I I ) + C D 3 8 + を示し、左上の象限は C D 3 4 ( クラス I I I ) - C D 3 8 + を示し、そして左下の象限は C D 3 4 ( クラス I I I ) - C D 3 8 - を示した。この結果から、K G - 1 細胞は C D 3 4 ( クラス I I I ) + であることがわかる。。同様に、図 2 の ( C ) の結果から、K G - 1 細胞が H S C A - 3 + であることがわかった。C D 3 4 ( クラス I I I ) - F I T C 抗体を他の C D 3 4 分子のクラスを認識する C D 3 4 - F I T C 抗体にして、すなわち C D 3 4 ( クラス I ) - F I T C 抗体及び C D 3 4 ( クラス I I ) - F I T C 抗体を用いて同様に実施した結果、C D 3 4 ( クラス I I I ) - F I T C 抗体の場合と同様に K G - 1 細胞を認識できた。

( 実施例 5 : C D 3 4 + J u r k a t 細胞における H S C A - 3 抗体の発現 )

C D 3 4 + J u r k a t 細胞  $1 \times 10^5$  個を 3 本のチューブに入れ、それぞれ P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 2 回洗浄した後、第 1 のチューブ ( A ) に I g G 1 - F I T C 抗体及び I g G 1 - P E 抗体、第 2 のチューブ ( B ) に C D 3 4 ( クラス I I I ) - F I T C 抗体及び C D 3 8 - P E 抗体をそれぞれ 0 . 5  $\mu$  g 加えて攪拌した後、氷上で 3 0 分間放置した。P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 2 回洗浄した後、ヨウ化プロピジウム ( シグマアルドリッチジャパン社製 ) を最終濃度 1 0  $\mu$  g / m l になるように加えて細胞を染色した。第 3 のチューブ ( C ) には H S C A - 3 抗体を 0 . 5  $\mu$  g 加えて氷上で 3 0 分間放置した。P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 2 回洗浄した後、P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 2 , 5 0 0 倍希釈した F I T C 標識抗マウス I g 抗体を 5 0  $\mu$  l 加えて、氷上で 3 0 分間放置した後、P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 1 回洗浄した。さらに P B S ( - ) ( F C S 1 %、アジ化ナトリウム 0 . 0 1 % を含む ) で 5 0 倍希釈した正常マウス血清を 5 0

10

20

30

40

50

μl 加えて、氷上で15分間放置した。次にCD38-PE抗体を0.5 μg 加えて氷上で30分間放置し、PBS(-) (FCS 1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で2回洗浄した後、ヨウ化プロピジウムを最終濃度10 μg/mlになるように加えて細胞を染色した。染色された細胞をフローサイトメーターFACSscanで測定した。その結果を図3に示す。図の(A)(B)(C)は、それぞれ、上記チューブ(A)(B)(C)に対応する結果である。

【0041】

図3の(A)において、横軸はマウスIgG1-FITC抗体の蛍光強度、そして縦軸はマウスIgG1-PE抗体の蛍光強度を示しているこれを参考にしてフローサイトメトリ図に縦軸と横軸の、それぞれの陽性陰性を区分する線を引いた。図3の(B)の結果から、CD34<sup>+</sup>Jurkat細胞は、CD34(クラスIII)<sup>+</sup>であることがわかった。図3の(C)からは、CD34<sup>+</sup>Jurkat細胞がHSCA-3<sup>-</sup>であることがわかった。CD34(クラスIII)-FITC抗体を他のCD34分子のクラスを認識するCD34-FITC抗体にして、すなわちCD34(クラスI)-FITC抗体及びCD34(クラスII)-FITC抗体を用いて同様に実施したが、結果は、CD34(クラスIII)-FITC抗体の場合と同様でCD34<sup>+</sup>Jurkat細胞を認識できた。

【0042】

(実施例6：各種株化細胞によるHSCA-3抗原の発現)

KG-1細胞及びCD34<sup>+</sup>Jurkat細胞以外の株化細胞、(1)KU812、(2)KU812(CD34<sup>+</sup>)、(3)HEL、(4)Jurkat(CD2<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>)、(5)MOLT14、(6)MOLT4、(7)RAJI、(8)NALM6、(9)DAUDI、(10)K562、(11)THP-1、(12)HL60、(13)U937、(14)NS-1を用いて、HSCA-3抗体による染色を行った。上記の株化細胞1×10<sup>5</sup>個に、HSCA-3抗体を0.5 μg 加えて氷上で30分間放置した。PBS(-) (FCS 1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で2回洗浄した後、PBS(-) (FCS 1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で2,500倍希釈したFITC標識抗マウスIg抗体を50 μl 加えて、氷上で30分間放置した後、PBS(-) (FCS 1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で1回洗浄した。さらにPBS(-) (FCS 1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で50倍希釈した正常マウス血清を50 μl 加えて、氷上で15分間放置した。PBS(-) (FCS 1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で2回洗浄した後、ヨウ化プロピジウムを最終濃度10 μg/mlになるように加えて細胞を染色した。染色された細胞をフローサイトメーターFACSscanで測定した。

【0043】

測定結果は、

- (1) KU812 = +  
 (2) KU812(CD34<sup>+</sup>) = ++  
 (3) HEL = +  
 (4) Jurkat(CD2<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>) = -  
 (5) MOLT14 = -  
 (6) MOLT4 = -  
 (7) RAJI = -  
 (8) NALM6 = -  
 (9) DAUDI = -  
 (10) K562 = -  
 (11) THP-1 = -  
 (12) HL60 = -  
 (13) U937 = -  
 (14) NS-1 = -

であった。ここで、++は強陽性、+は弱陽性、-は陰性を示す。

10

20

30

40

50

## 【0044】

CD34抗体で陽性の細胞は、HSCA-3抗体においても陽性であった。実施例5の結果と合わせて考えると、CD34抗体とHSCA-3抗体との違いは、CD34抗体ではCD34<sup>+</sup>Jurkatを認識できるのに対して、HSCA-3抗体では認識しない点にあることがわかった。

## 【0045】

(実施例7：HSCA-3抗体のビオチン-ヒドラジドによる標識)

HSCA-3抗体2.27mgを0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)に一晩透析した後、20mM過ヨウ素酸ナトリウムを加えて最終10mMにし、氷上で20分間攪拌した。トータル反応液1ml当たり11 $\mu$ lの10%グリセロール溶液を加えて、5分間攪拌し、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)に室温で一晩透析した。ビオチン-ヒドラジド粉末を最終10mMになるように加え、室温で2時間攪拌を続け、1,200Gで10分間遠心分離して沈殿を除去した。PBS(-)(アジ化ナトリウム0.01%を含む)に1日透析して標識抗体を作製した。

10

## 【0046】

(実施例8：臍帯血単核球細胞におけるHSCA-3抗原及びCD34抗原の発現)

臍帯血単核球細胞を以下のように調製した。すなわち、15mlポリプロピレン製チューブ(コーニング社製)にヘパリンナトリウム注射液(10,000U/ml)0.05mlを入れ、産婦人科からインフォームドコンセントにて供与された、ヒト臍帯血4mlを加え、さらにPBS(-)/H(PBS(-)に1%ヘパリンナトリウム注射液(1,000U/ml)を加えた)を5ml加え、よく混ぜた。そこに、リンフォサイトセレーションメディウム(オルガノンテクニカ社製)3.5mlをチューブ底に入れて、400Gで30分間、遠心分離した。ここで、単核球細胞層を集め、PBS(-)/HF(PBS(-)に1%ヘパリンナトリウム注射液(1,000U/ml)および2.5%FCSを加えた)を15mlポリプロピレン製チューブに加えて15mlにして、510Gで10分間、遠心分離した。沈殿にPBS(-)/HF15mlを加えて、懸濁し、240Gで10分間、遠心分離した。今度は沈殿に10%FCS/RPMI 1640 0.5mlに懸濁し、細胞数を約 $1 \times 10^7$ 個/mlにした。これに凍結保存用培地(20%ジメチルスルホキシド(DMSO)/10%FCS-RPMI 1640)0.5mlを加え、懸濁し、液体窒素中に凍結保存した。これを、使用開始時に凍結融解後、15%FCS-RPMI 1640にて洗浄して使用した。

20

30

## 【0047】

臍帯血単核球細胞 $1 \times 10^6$ 個を3本のチューブに入れ、第1のチューブ(A)にIgG1-FITC抗体及びIgG2-PE抗体(イムノテック社製)、第2のチューブ(B)にCD34(クラスII)-FITC抗体(イムノテック社製)及びCD34(クラスIII)-PE抗体(イムノテック社製)をそれぞれ0.5 $\mu$ g加えて攪拌した後、氷上で30分間放置した。PBS(-)(FCS1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で2回洗浄した後、ヨウ化プロピジウムを最終濃度10 $\mu$ g/mlになるように加えて細胞を染色した。第3のチューブにはビオチン-ヒドラジドによって標識したHSCA-3抗体を5 $\mu$ g加えて氷上で30分間放置した。PBS(-)(FCS1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で2回洗浄した後、FITC標識アビジン(ベクトンディッキンソン社製)1 $\mu$ gを加えて氷上で30分間放置した。PBS(-)(FCS1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で2回洗浄した後、CD34(クラスIII)-PE抗体をそれぞれ0.5 $\mu$ g加えて攪拌した後、氷上で30分間放置した。PBS(-)(FCS1%、アジ化ナトリウム0.01%を含む)で2回洗浄した後、ヨウ化プロピジウムを最終濃度10 $\mu$ g/mlになるように加えて細胞を染色した。染色された細胞をフローサイトメーターFACSscanで測定した。結果を図4に示す。図の(A)(B)(C)は、それぞれ、上記チューブ(A)(B)(C)に対応する結果である。

40

## 【0048】

図4の(A)において、横軸はマウスIgG1-FITC抗体の蛍光強度、そして縦軸は

50

マウス IgG2 - PE 抗体の蛍光強度を示している。これを参考にしてフローサイトメトリー図に縦軸と横軸の、それぞれの陽性陰性を区分する線を引いた。図4の(B)では、縦軸はCD34 (クラスIII) - PE 抗体の蛍光強度、そして横軸はCD34 (クラスIII) - FITC 抗体の蛍光強度を示した。その結果、臍帯血単核球細胞に、CD34 (クラスIII)<sup>+</sup>CD34 (クラスIII)<sup>-</sup>画分及びCD34 (クラスIII)<sup>+</sup>CD34 (クラスIII)<sup>-</sup>画分は存在しなかった。図4の(C)では、縦軸はCD34 (クラスIII) - PE 抗体の蛍光強度、そして横軸はHSCA-3 抗体 (FITCアビジン結合) の蛍光強度を示した。その結果、臍帯血単核球細胞に、HSCA-3<sup>+</sup>CD34 (クラスIII)<sup>-</sup>画分が存在していた。従って、HSCA-3 抗体は、CD34 (クラスIII) 抗体とは異なる抗原を認識していると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 HSCA-3 抗体反応抗原の免疫沈降による解析を示したオートラジオグラフィー図

【図2】 KG-1 細胞におけるHSCA-3 抗原の発現を示したフローサイトメトリー図

【図3】 CD34<sup>+</sup>Jurkat 細胞におけるHSCA-3 抗原の発現を示したフローサイトメトリー図

【図4】 臍帯血単核球細胞におけるHSCA-3 抗原及びCD34 抗原の発現を示したフローサイトメトリー図

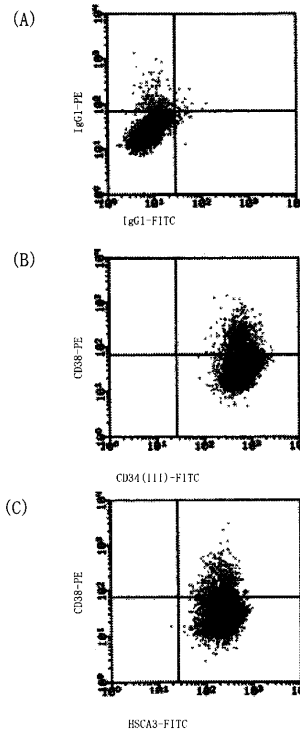
【図1】



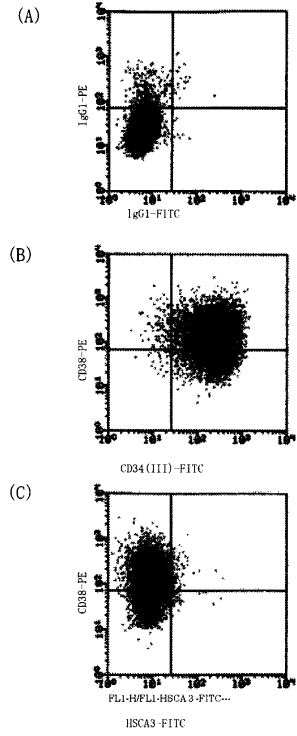
- 1. CD34 (クラスIII) 抗体
- 2. HSCA-3抗体

1 2

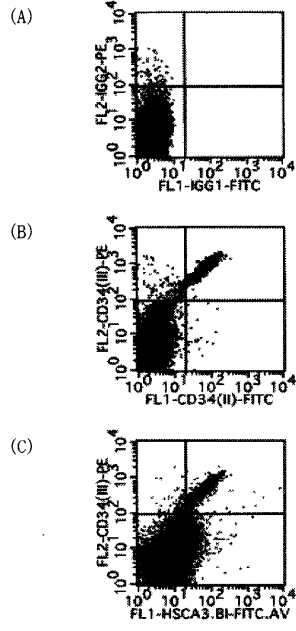
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
<b>G 0 1 N 33/577</b>	<b>(2006.01)</b>		G 0 1 N 33/577		B
C 1 2 N 15/02	(2006.01)		C 1 2 N 15/00		C
C 1 2 R 1/91	(2006.01)		C 1 2 P 21/08		
			C 1 2 R 1:91		

- (56) 参考文献 Tissue Antigens, 1999, Vol.54, pp.1-15  
 Blood, 1999, Vol.93, pp.3723-3735  
 J. Immunology, 1994, Vol.153, pp.4978-4987  
 第30回日本免疫学会総会講演要旨集, 2000.09.26, p.188  
 Annual Review 免疫, 1999, Vol.1999, pp.166-175  
 Cellular Immunology, 1986, Vol.99, pp.345-353  
 Yokohama Med. Bull., 1990, Vol.41, No.1-2, pp.7-17

## (58) 調査した分野(Int.Cl., D B 名)

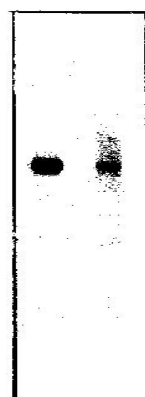
C12N 15/00-15/90  
 C07K 1/00-19/00  
 C12N 1/00- 7/08  
 C12P 21/08  
 G01N 33/48-33/98  
 PubMed  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 MEDLINE/CAPus/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	抗原和单克隆抗体，区分这种抗原		
公开(公告)号	<a href="#">JP4493882B2</a>	公开(公告)日	2010-06-30
申请号	JP2001184432	申请日	2001-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	钟渊化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	钟渊化学工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	Kaneka公司		
[标]发明人	大原高秋 山下憲司 角谷徹 京泉誠之		
发明人	大原 高秋 山下 憲司 角谷 徹 京泉 誠之		
IPC分类号	C07K16/28 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/563 G01N33/566 G01N33/577 C12N15/02 C12R1/91 G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/06 C12N5/08 C12N5/20 G01N33/532 G01N33/569		
CPC分类号	C07K16/28 C07K14/47 G01N33/56966		
FI分类号	C07K16/28 C12N5/00.102 C12P21/08 G01N33/563 G01N33/566 G01N33/577.B C12N15/00.C C12R1 /91 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/00.B C12N5/00.E C12N5/00.202.Q C12N5/0789 C12N5/20 G01N33 /53.D G01N33/532.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064 /CC24 4B064/CE04 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA24 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
审查员(译)	佐佐木大辅		
其他公开文献	JP2002371099A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：获得能够区分造血干细胞抗原3 (HSCA-3) 的新抗原的单克隆抗体，该抗原存在于未成熟的造血干细胞中并且能够用于 (1) 免疫测定和流式细胞术通过标记抗体和 (2) 通过处理人骨髓细胞，细胞血液和粒细胞集落刺激因子 (G) 大量动员未成熟造血干细胞的血液中未成熟造血干细胞的分离和纯化-CSF)。解决方案：该单克隆抗体区分存在于未成熟造血干细胞中的HSCA-3的新抗原。从抗体中获得免疫反应性片段。

【 図 1 】



1. CD34 (クラスIII) 抗体  
2. HSCA-3抗体

1 2