

(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 - 265500

(P2002 - 265500A)

(43)公開日 平成14年9月18日 (2002.9.18)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 16/16		C 0 7 K 16/16	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/02		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
15/09		G 0 1 N 33/53	G 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		33/543	501 A 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 3書面 (全 4 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 113279(P2001 - 113279)

(22)出願日 平成13年3月6日 (2001.3.6)

(71)出願人 598118503

正山 征洋

福岡県春日市上白水1217 - 1

(71)出願人 393031450

アルプス薬品工業株式会社

岐阜県吉城郡古川町向町2丁目10番50号

(72)発明者 正山 征洋

福岡県春日市上白水1217 - 1

(72)発明者 田中 宏幸

福岡県福岡市東区箱崎2 - 16 - 47安武荘202

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗アコニチンモノクローナル抗体

(57)【要約】

【目的】アコニチンをカルボジイミド法により、キャリアー蛋白として牛血清アルブミンを添加抱合させる。このものを抗原としてマウスに免疫する。免疫後脾臓細胞を単離し、ポリエチレングリコールを用いてミエローマ細胞と融合する。H A T培地で融合細胞 (ハイブリドーマ)のみを選抜する。ハイブリドーマを限界希釈法でクローニングする。これらの中から、アコニチン - 卵白アルブミン (E A)複合体を用いて選抜し、抗アコニチンモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを単離する。

【効果】本抗体は極めて特異性が高いので通常の E L I S A に用いることにより、再現性が高く、高感度、かつ前処理が不要な定量が可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】アコニチンに対する抗体

【請求項2】アコニチンをタンパク質と共有結合させたものを抗原として抗体を作成する抗体の製造方法。

【請求項3】タンパク質と共有結合したアコニチンを吸着させたウェルにアコニチン溶液を添加し、さらに請求項1に記載の抗体を加えてインキュベートした後にウェルを洗浄し、標識化免疫定量法を用いてアコニチン溶液中のアコニチン含有量を定量する抗体を用いた抗原の定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】「発明に属する技術分野」本発明はアコニチンに対する抗アコニチンモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマに関する。

【従来の技術】

【0002】細胞融合技術は、ケーラーとミルスタインの報告(Nature, 495-497頁, 1975年)以来急速に発展した。哺乳動物のひ細胞と癌細胞であるミエローマ細胞を融合させた雑種細胞をハイブリドーマと称する。ハイブリドーマは用いたひ細胞が産生する抗体産生能を有することから、多くの蛋白質やペプチドの様な高分子化合物に対する抗体の生産に用いられてきた。

【0003】一方、本出願人は通常は抗原とは成りえないアコニチンに対する抗アコニチンモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製する。

【発明が解決しようとする課題】

【0004】アコニチンの植物中の含有量は少なく、その検出は容易ではない。このため前処理を必要とせず、再現性があり、かつ高感度なアッセイ系が要求される。これに対応出来るのは抗アコニチンモノクローナル抗体以外にない。

【課題を解決するための手段】

【0005】本発明者等は、上述の問題点を解決すべく研究を重ねた結果、細胞融合によりアコニチンに対する抗アコニチンモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを得、本ハイブリドーマを培養することによって抗アコニチン抗体を大量に生産することに成功した。本抗体を用いることによって高感度、再現性良好な、かつ前処理を必要としないアッセイ系を完結した。

【発明の実施の形態】

【0006】抗アコニチン抗アコニチンモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは以下の様に作成する。すなわち、(1)抗原としてアコニチン-B S A複合体を免疫した動物の抗体産生ひ臓細胞を作成する。(2)ミエローマ細胞を培養増殖し、調整する。(3)上記2種の細胞をポリエチレングリコールを媒体として融合する。(4)得られたハイブリドーマをH A T培地にて選抜する。(5)抗アコニチン-抗アコニチンモノクローナル抗体生産ハイブリドーマを選抜する。(6)選抜ハ

イブリドーマをクローニングする。これらの行程について詳細に説明する。

【0007】(1)抗体産生細胞の調整

アコニチン-B S A複合体を動物に免疫する。免疫法としてはフロイントのコンプリートアジュバンドを併用する手法がとられる。動物としてはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジなどが例示される。抗体産生細胞としてはひ臓、リンパ節、抹消血液等から分離した細胞が使用される。

10 【0008】(2)骨髄腫細胞の調整

細胞融合に使用する骨髄腫細胞は特に限定されず、各種の哺乳動物の細胞株が利用可能であるが、抗体産生細胞の調整に用いた動物と同種の細胞株を使用するのが好ましい。用いる細胞株は細胞融合の後に、未融合の骨髄腫細胞が選択培地で生存できず、ハイブリドーマのみが増殖可能なようにすることによって、未融合細胞と融合細胞を選別することを考慮して、特定の薬剤抵抗性をゆうするものが好ましい。例えば8-アザグアニン抵抗性の細胞は、H A T培地中で生育できない性質を有するため好んで用いられる。具体的には、マウス骨髄腫細胞株、P A I, P 3 - X 6 3 - A g 8, P 3 - X 6 3 - A g 8 - U I, P 3 - N S I / 1 - A g 4 - 1, X 6 3 - A g 8 - 6 . 5 . 3 ., S P 2 / 0 - A g 1 4, F O, S 1 9 4 / 5 X X O, B U . 1, M P C 1 1 - 4 5 . 6 ., T G . 1 . 7 等が用いられる。

【0009】(3)融合細胞

細胞融合は通常M E M培地、R P M I 1 6 4 0培地、I M D M培地等のe - R D F培地中で、骨髄腫細胞と抗体産生細胞を混合(混合比は通常1 : 4 - 1 : 1 0)することにより行われる。融合促進剤としては平均分子量1 0 0 0 - 6 0 0 0のポリエチレングリコール(P E G)が使用できる。P E Gの使用濃度は通常3 0 - 5 0 %である。

【0010】(4)ハイブリドーマの選択的増殖

融合を終えた細胞は、1 0 % F C S含有e - R D F培地などで適当に希釈し、遠心分離する。沈査を選択培地(例えばH A T培地)で浮遊し、9 6穴ウエルマイクロプレートに接種した後に、5 %炭酸ガス培養装置で培養する。選択培地で生育してくる細胞はハイブリドーマである。

【0011】(5)抗体産生ハイブリドーマの検索

抗体産生ハイブリドーマの検索は常法に従えばよく、特に限定されない。例えばハイブリドーマの増殖した培養液を採取し、アコニチン-卵白アルブミンと反応させ、酵素、蛍光物質、発光物質などでラベルした2次抗体との反応により検索できる。

【0012】(6)クローニング抗体産生ハイブリド

ーマを含むことを確認した培養ウエル中の細胞を限界希釈法などによりクローニングを行い、抗アコニチンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得る。以上の操作

により抗アコニチンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ1B3を得た。このハイブリドーマはアコニチンに対する抗アコニチンモノクローナル抗体を産生する新規な細胞である。

【0013】抗アコニチンモノクローナル抗体の調整
上記で得られたハイブリドーマを適切な培地中で培養することにより、その培養上清から本発明抗アコニチンモノクローナル抗体が得られる。大量に生産する方法としては骨髓腫細胞由来動物と同種の動物にプリスタン等の鉱物油を腹腔内投与後、ハイブリドーマを接種する。接種後、腹水を採取し、通常の抗体分離操作により抗アコニチンモノクローナル抗体を得る。また、無血清培地で培養し、通常的手法で抗アコニチンモノクローナル抗体を得る。

【0014】抗アコニチンモノクローナル抗体のキャラクタリゼーション精製した抗アコニチンモノクローナル抗体のサブクラス、軽鎖等を通常の方法で決定した。また、分子量をシナピン酸をマトリックスとする方法によりマルデイトフマスにて測定し、148、500と決定した。

【発明の効果】

【0015】本抗体は極めて特異性が高いので通常のELISAに用いることにより、再現性が高く、高感度、かつ前処理が不要な定量が可能である。

【実施例】実施例1

【0016】抗アコニチンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの製造

(1) 抗原の調整：アコニチン5mgを無水ピリジン1.2mlに溶かした溶液を、5mgの牛血清アルブミン(BSA)を20mMリン酸緩衝液(pH5.5)に溶かした溶液に攪拌しながら添加する。反応溶液にEDC15mgを加え、15時間攪拌反応する。反応後透析して4.8mgのアコニチン-BSA抱合体を得た。

(2) 抗原中のハプテン数の検討：得られたアコニチン-BSA抱合体の微量をとり、過剰のシナピン酸を添加して混合する。混合物の少量をカセットのウエルに入れ、マルデイトフマスにて測定する。

(3) 免疫細胞の調整：アコニチン-BSA抱合体50μgをフロイントコンプリート-アジュバントに乳濁化させ、BALB/C系マウスの腹腔内に投与した。以後、2週間の間隔で50μgのアコニチン-BSA抱合体アジュバント溶液を2回同様に投与し、最後にアコニチン-BSA抱合体のみを100μg投与し免疫を完了した。3日後にマウスを麻酔下屠殺し、ひ臓を摘出した。ひ臓を細断した後、100メッシュのナイロン網でろ過し、ひ臓の単離細胞を得た。

(4) ハイブリドーマの調整：単離した免疫細胞に低張液(155mM塩化アンモニウム)を加えて赤血球を溶血した後、e-RDF培地で細胞を3回洗う。マウス骨髓腫細胞もe-RDF培地で3回洗った。両細胞

胞数を計測し細胞と骨髓腫細胞を10:1の割合として遠心をする。上清を捨て、沈殿した細胞を充分解きほぐし、PEG4,000を培地で希釈した50%液を1.0ml滴下して融合を行った。37、30秒間静置した後、e-RDF培地5mlを5分間かけて添加した。1,000rpmで10分間遠心した。沈殿を10%FCS添加IMDMにより洗い、遠心して上清を捨てた。ヒポキサンチン10⁻²M、アミノプテリン4×10⁻⁷Mおよびチミジン1.5×10⁻⁵Mを加えた(HAT)10%FCS添加e-RDF培地を用いて沈殿を再び浮遊させ、96ウエルマイクロプレートに100μlずつ分注した。3日毎に同一培地を50μl追加し、細胞の増殖を確認した。

(5) 抗体産生ハイブリドーマの検索：ハイブリドーマが増殖したウエルの液を採取し、アコニチン-EA抱合体を結合させた別のウエルに添加し、直接ELISAによりアコニチンに対する抗アコニチンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを検索した。即ち、96ウエルマイクロプレートにアコニチン-EA抱合体5μg/100μl/ウエルを分注し、37で1時間インキュベートしてウエルに吸着させた。このウエルに培養上清を100μlずつ分注し抗原抗体反応を行った。0.05%Tween20含有リン酸緩衝食塩水(T-PBS)で3回洗浄した。パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体1000倍希釈液をウエルあたり100μl添加し、1時間後にTPBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS0.3mg/ml含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。20分後プレートリーダーを用いて405nmの波長で吸光度を測定した。発色したウエルの細胞を採取した。

(6) 抗アコニチンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのクローニング：抗体産生ハイブリドーマを限界希釈してウエルに分注した。抗体産生能を持ち、かつ増殖したハイブリドーマを同様に3回クローニングしてクローンを得た。

(7) 抗アコニチンモノクローナル抗体の調整：上記の抗体産生ハイブリドーマを無血清培地(10μg/mlインスリン、35μg/mlトランスフェリン、20μMエタノールアミン、25nMセレニウム添加e-RDF培地)で37、炭酸ガス培養器で培養した。上清をプロテインGFFカラムを用いて精製した。即ち、上清をトリス緩衝液でpH7に調整し、カラムに付す。カラムを10mMリン酸緩衝液で洗浄後、吸着している抗体を100mMクエン酸緩衝液で溶出する。得られた抗体溶液はPBSに対して3回透析し、最後に凍結乾燥して精製抗体をえた。

(8) 精製した抗アコニチンモノクローナル抗体を微量とり、シナピン酸を添加し混合する。この混合物をマルデイトフマスにて測定し、純度を確認した。

(9) 競合的ELISAによる定量：アコニチン-EA

抱合体溶液 (5 µg/ml) を 100 µl ずつウエルに添加し 1 時間反応し吸着させる。非特異的結合を除去するためにスキนมilk添加PBS溶液 300 µl を加え 1 時間反応してブロッキングする。50 µl の各種濃度のアコニチン 10% エタノール溶液を加え、さらに抗アコニチンモノクローナル抗体溶液 (5 µg/ml) 50 µl を添加して 1 時間インキュベートした。TPBS で 3 回洗浄し、1000 倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス抗体 100 µl を加え 1 時間反応した。1 時間*

*後にTPBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS 0.3 mg/ml 含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。20分後に発色を405 nmで測定。各濃度のアコニチンの吸光度から検量線を作成した。

(10) 交差反応性の調査: アコニチンおよび各種関連化合物を測定した。その結果, アコニチンと構造の類似したアコニチン系アルカロイドには反応性を示したが, その他のアルカロイドについては殆ど反応性を示さなかった。

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 33/543	5 0 1	C 1 2 R 1:91)	
33/577		(C 1 2 P 21/08	
// C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
(C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 R 1:91)			A
(C 1 2 P 21/08		5/00	B
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	

F タ-ム(参考) 4B024 AA11 BA41 DA02 GA03 HA01
 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
 4B065 AA92X AB05 AC16 BA08
 CA25
 4H045 AA11 CA30 DA75 DA76 EA50
 FA74

专利名称(译)	抗乌头碱单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2002265500A	公开(公告)日	2002-09-18
申请号	JP2001113279	申请日	2001-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	正山 征洋		
申请(专利权)人(译)	正山 征洋 阿尔卑斯山制药工业.有限公司		
[标]发明人	正山征洋 田中宏幸		
发明人	正山 征洋 田中 宏幸		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/16 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/543 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/16 C12P21/08 G01N33/53.G G01N33/543.501.A G01N33/577.B C12R1/91 C12N15/00.C C12N15/00.A C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC16 4B065/BA08 4B065/CA25 4H045/AA11 4H045/CA30 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[目的]以碳二亚胺法和牛血清白蛋白为载体蛋白偶联乌头碱。用其免疫小鼠作为抗原。免疫后，分离脾细胞并使用聚乙二醇与骨髓瘤细胞融合。仅用HAT培养基选择融合细胞（杂交瘤）。通过有限稀释法克隆杂交瘤。其中，通过使用乌头碱 - 卵白蛋白（EA）复合物进行筛选来分离产生抗乌头碱单克隆抗体的杂交瘤。【效果】由于该抗体具有极高的特异性，因此可以通过将其用于普通ELISA进行定量测定，重复性高，灵敏度高，无需预处理。