

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-23015

(P2005-23015A)

(43) 公開日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/44	CO7K 16/44	4B064
C12P 21/08	C12P 21/08	4H045
GO1N 33/53	GO1N 33/53	S
// GO1N 33/00	GO1N 33/00	D

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2003-189538 (P2003-189538)	(71) 出願人	598118503 正山 征洋 福岡県春日市上白水1217-1
(22) 出願日	平成15年7月1日(2003.7.1)	(72) 発明者	田中宏幸 福岡県福岡市東区箱崎2-16-47-2 02
		(72) 発明者	正山征洋 福岡県春日市上白水1217-1
		(72) 発明者	三浦則雄 福岡県福岡市中央区平尾1-11-18- 1402
		Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 DA16 4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50 FA72

(54) 【発明の名称】 抗2, 4-ジクロロフェノールモノクローナル抗体の製造方法並びに抗体を用いた抗原の定量方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 環境モニタリングの為に2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸及びその関連化合物に対する抗体を提供する。

【解決手段】 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)は長年月除草剤として大量に散布され、土壌へ多量に蓄積している。2, 4-Dは徐々に2, 4-ジクロロフェノール(2, 4-DP)へと代謝され蓄積される。2, 4-DPIは2, 4-Dによる土壌や水の汚染の歴史的な背景を知るための重要なマーカー化合物であるが、本化合物に対する高感度分析法の開発は未だなされていない。本発明は抗2, 4-DPモノクローナル抗体を作製し、競合的ELISAを確立し、数ng/ml濃度の2, 4-DPおよび2, 4-Dを簡便かつ再現性よく分析する手法を開発した。

【選択図】 図1

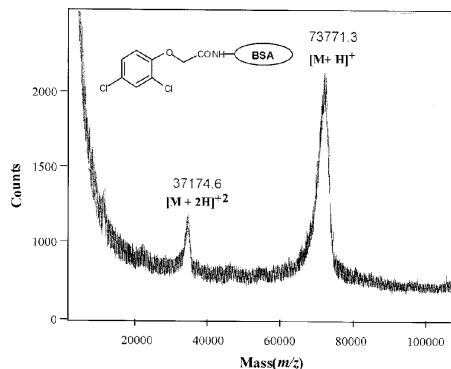


図1 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸-BSA コンジュゲートの MALDI-ToF マスによるヘブタン数の分析

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2, 4-ジクロロフェノール(2, 4-DPと省略)及び関連化合物に対する抗体。

【請求項 2】

前記2, 4-DP及び関連化合物は2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-Dと省略)である請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

2, 4-DをイソブチルクロロフォルメートとN-トリエチルアミンで処理し、本反応物とタンパク質を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 4】

タンパク質と結合した2, 4-DP関連化合物を吸着させたウエルに2, 4-DP関連化合物溶液を添加し、更に請求項1に記載の抗体を加えてインキュベートした後にウエルを洗浄し、標識化免疫定量法を用いて2, 4-DP関連化合物溶液中の2, 4-DP関連化合物を定量する抗体を用いた抗原の定量方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明に属する技術分野】

本発明は水質や土壌汚染のマーカーである2, 4-DP及び2, 4-Dに対するモノクローナル抗体(MAb)を生産するハイブリドーマに関する。

【0002】

【従来技術】

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。哺乳動物の脾細胞と癌細胞であるミエロ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脾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。

20

【0003】

一方、本出願人は通常は抗原とは成りえない2, 4-DPに対するMAbを生産するハイブリドーマを作製する。2, 4-Dは除草剤として大量に散布されてきたため、土壌に蓄積し2, 4-DPへと代謝される。このため土壌汚染や水質汚染のマーカーとして2, 4-DPおよび2, 4-Dの測定は不可欠となった。

30

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

土壌や水中の2, 4-DPや2, 4-Dの含有量は極めて低く、その検出は容易ではない。従って含有量を精査するためには前処理等に多大な労力を要する。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MAb以外にない。

【0005】

【課題を解決するための手段】

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2, 4-DPに対する、MAb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2, 4-DP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。

40

【0006】

【発明実施の形態】抗2, 4-DP MAb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2, 4-D-BSA複合体を免疫した動物の抗体産生脾臓細胞を作成する。(2)ミエロ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HAT培地にて選抜する。(5)抗2, 4-DP MAb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

50

。

【0007】

(抗体産生細胞の調整)

2, 4-D-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脾臓、リンパ節、抹消血液等から分離した細胞が使用される。

【0008】

(骨髓腫細胞の調整)

細胞融合に使用する骨髓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、未融合の骨髓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有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、マウス骨髓腫細胞株、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 1 0 - A g 1 4 . F O , S 1 9 4 / 5 X X 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。

10

【0009】

(融合細胞)

細胞融合は通常MEM培地、R M I 1 6 4 0 培地、I M D M 培地等のe-R D F 培地中で、骨髓腫細胞と抗体産生細胞を混合(混合比は通常1:4-1:10)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1000-6000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30-50%である。

20

【0010】

(ハイブリドーマの選択的増殖)

融合を終えた細胞は、10% 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、96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。

30

【0011】

(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、2, 4-D-H S A 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】

(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、M A b 産生ハイブリドーマを得る。以上の操作により抗2, 4-D P M A b 産生ハイブリドーマ2 C 4 を得た。このハイブリドーマは2, 4-D P に対する特異的なM A b を産生する新規な細胞である。

40

【0013】

(抗2, 4-D P M A b 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M A b 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2, 4-D P M A b を得る。また、無血清培地で培養し、通常的手法で抗2, 4-D P M A b を得る。

【0014】

50

(抗2, 4-DP MA bのDPMA bのキャラクタリゼーション)

精製した抗2, 4-DP MA bのサブクラスはI G g 1、軽鎖は であることを、通常の方法で決定した。

【0015】

(発明の効果)

抗原の2, 4-Dのカルボキシル基に直接キャリアタンパクを結合して免疫したため、2, 4-Dの認識は低いと考えられるが、実際には本抗体は2, 4-DPはもとより、感度は低いものの抗原とした2, 4-Dをも認識しているので、通常のELISAに用いることにより、両者の分析を再現性高く、高感度、かつ前処理が不要な方法で実施可能である。

10

【0016】

【実施例】

(抗2, 4-DP MA b産生ハイブリドーマの製造)

(抗原の調整)

2, 4-D 5 mgをジオキササン1 mlに溶かした液へ、イソブチルクロロフォルメート10 μ lとN-トリエチルアミン10 μ lを加えて攪拌しながら2時間室温で反応。この反応液へBSA 5 mgを水2 mlに溶かした溶液を添加し、室温下攪拌しながら16時間反応する。反応後、4°Cにおいて水に対して透析を5回繰り返し、最後に凍結乾燥し2, 4-D-BSA 5.2 mgを得た。なおELISAで使用する2, 4-D-HSAについても同様な方法で作製した。

20

【0017】

(抗原中のハプテン数の検討)

得られた2, 4-D-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(図1)。

【0018】

(免疫脾細胞の調整)

2, 4-D-BSA抱合体50 μ g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50 μ gの2, 4-D-BSA抱合体アジュバント溶液を2回同様に投与し、最後に2, 4-D-BSA抱合体のみを100 μ g投与し免疫を完了した。3日後にマウスを麻酔下屠殺し、脾臓を摘出した。脾臓を細断した後、100メッシュのナイロン網でろ過し、脾臓の単離細胞を得た。

30

【0019】

(ハイブリドーマの調整)

単離した免疫脾細胞に低張液(155 mM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。マウス骨髄腫細胞もe-RDF培地で3回洗浄した。両細胞数を計測し脾細胞と骨髄腫細胞を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、ポロエチレングリコール(PEG)4,000を培地で希釈した50%液を1.0 ml滴下して融合を行った。37°C、30秒間静置した後、e-RDF培地5 mlを5分間かけて添加した。1,000 rpm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^{-2} M、アミノプテリン 4×10^{-7} Mおよびチミジン 1.5×10^{-5} M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100 μ lずつ分注した。3日毎に同一培地を50 μ l追加し、細胞の増殖を確認した。

40

【0020】

(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、2, 4-DP-HSA抱合体を結合させた別のウエルに添加し、直接ELISAにより2, 4-DPに対するMA b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2, 4-D-HSA抱合体0.1 μ g / 100 μ l / ウエルを分注し、37°Cで1時間インキュベートしてウエルに吸着

50

させた。このウエルに培養上清を100 μ lずつ分注し抗原抗体反応を行った。0.05% Tween 20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100 μ l添加し、1時間後にT-PBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS 0.3mg/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。

【0021】

(抗2,4-DP MA b 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。

10

【0022】

(抗2,4-DP MA b の調整)

上記の抗体産生ハイブリドーマを無血清培地(10 μ g/ml インスリン、35 μ g/ml トランスフェリン、20 μ M エタノールアミン、25nM セレニウム添加 e-RDF 培地)で37 $^{\circ}$ C、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水に対して4回透析し、最後に凍結乾燥して精製抗体をえた。

【0023】

(競合的ELISAによる定量)

2,4-DP-HSA 抱合体溶液(1 μ g/ml)を100 μ lウエルに添加し1時間反応し吸着させる。比特的結合を除去するために5%スキムミルク添加PBS溶液300 μ lを加え1時間反応してブロックする。50 μ lの各種濃度の試料溶液を加え、さらに抗2,4-DP MA b 溶液(1 μ g/ml)50 μ lを添加して1時間インキュベートした。T-PBS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 μ lを加え1時間反応した。1時間後にT-PBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS 0.3mg/ml含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。15分後に発色を405nmで測定。各濃度の2,4-DPの吸光度から検量線を作成した(図2)

20

【0024】

抗2,4-DP MA bを用いて通常の方法により各種関連化合物のクロスリアクションを検討して表の結果を得た。2,4-Dには約15%のクロスリアクションを持つものの、他の化合物にはアフィニティーを持たないことが明らかとなった。

30

【0025】

【表1】

【表1】 各種関連化合物に対する抗2,4-ジクロロフェノールモノクローナル

(2,4-DP)抗体のクロスリアクション

化合物	クロスリアクション (%)
2,4-DP	100
2,4-D	14.7
2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸	<0.4
p-クロロフェノキシ酢酸	<0.4
2,4-ジクロロ安息香酸	<0.4

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例の抗原のハプテン数を調査したマスペクトログラフィー。

【図2】 実施例のMAb抗体の検量線を示す片対数グラフ。

20

【図1】

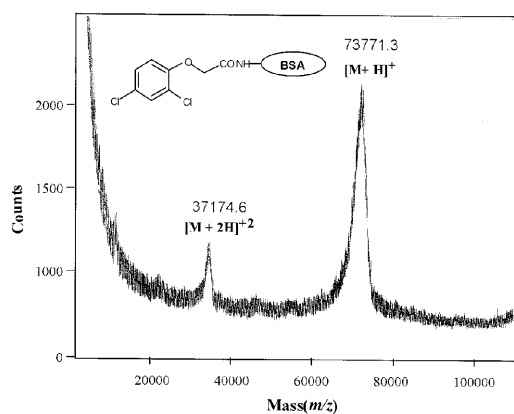


図1 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸-BSA コンジュゲートの MALDI-ToF マスによるハプテン数の分析

【図2】

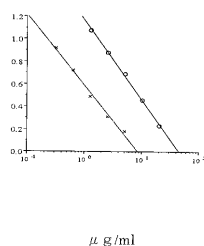


図2 抗2,4-DPモノクローナル抗体を用いた2,4-DP及び2,4-Dの検量線

X印は2,4-DPの濃度、O印は2,4-Dの濃度を示す

专利名称(译)	制备抗2,4-二氯苯酚单克隆抗体的方法和使用抗体定量抗原的方法		
公开(公告)号	JP2005023015A	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2003189538	申请日	2003-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	正山 征洋		
申请(专利权)人(译)	正山 征洋		
[标]发明人	田中宏幸 正山征洋 三浦則雄		
发明人	田中宏幸 正山征洋 三浦則雄		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/44 C12P21/08 G01N33/00		
FI分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.S G01N33/00.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA16 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供抗2,4-二氯苯氧基乙酸及其相关化合物的抗体，用于环境监测。 解决方案：多年以来，大量喷洒了2,4-二氯苯氧基乙酸（2,4-D）作为除草剂，并在土壤中大量积累。2,4-D逐渐代谢并累积为2,4-二氯苯酚（2,4-DP）。2,4-DP是一种重要的标记化合物，可用于了解2,4-D对土壤和水污染的历史背景，但尚未开发出针对该化合物的高灵敏度分析方法。本发明开发了一种生产抗2,4-DP单克隆抗体，建立竞争性ELISA并容易且可重复地分析浓度为几ng/ml的2,4-DP和2,4-D的方法。是的 [选型图]图1

