

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/085399

発行日 平成17年8月11日(2005.8.11)

(43) 国際公開日 平成15年10月16日(2003.10.16)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F 1

<b>GO 1 N 33/53</b>	GO 1 N 33/53	S
<b>CO 7 K 16/22</b>	CO 7 K 16/22	Z N A
<b>C 1 2 N 5/10</b>	GO 1 N 33/577	B
<b>GO 1 N 33/577</b>	C 1 2 N 5/00	B
<b>// C 1 2 P 21/08</b>	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 95 頁)

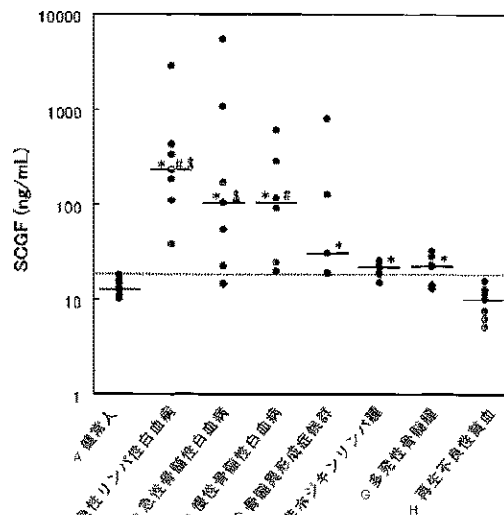
<p>出願番号 特願2003-582535 (P2003-582535)</p> <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP2003/004531</p> <p>(22) 国際出願日 平成15年4月9日(2003.4.9)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2002-106786 (P2002-106786)</p> <p>(32) 優先日 平成14年4月9日(2002.4.9)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国(JP)</p> <p>(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, B A, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, F I, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE , KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, M W, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW</p>	<p>(71) 出願人 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</p> <p>(71) 出願人 000125369 学校法人東海大学 東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号</p> <p>(71) 出願人 000162478 協和メテックス株式会社 東京都中央区晴海一丁目8番10号</p> <p>(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀</p> <p>(72) 発明者 安藤 潔 日本国神奈川県茅ヶ崎市菱沼海岸7-66-311</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の判定方法及び診断薬

(57) 【要約】

造血幹細胞増殖因子 (SCGF) を定量することを特徴とする、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法、白血病と前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判定する方法、再生不良性貧血と骨髓異形成症候群とを判定する方法、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の遅延を判定する方法、または移植片対宿主反応病を判定する方法に関する。また、造血幹細胞増殖因子 (SCGF) に反応する抗体を有効成分として含有してなる白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の診断薬、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着遅延または移植片対宿主反応病 (GVHD) の診断薬を提供することができる。



I (SCGF : 造血幹細胞増殖因子)

- A. NORMAL SUBJECTS
- B. ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA
- C. ACUTE MYELOGENOUS LEUKEMIA
- D. CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA
- E. MYELODYSPLASTIC SYNDROME
- F. NON-HODGKIN'S LYMPHOMA
- G. MULTIPLE MYELOMA
- H. APLASTIC ANEMIA
- I. (SCGF: STEM CELL GROWTH FACTOR)

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生体試料中の造血幹細胞増殖因子（SCGF）を測定することを特徴とする、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法。

**【請求項 2】**

生体試料中の造血幹細胞増殖因子（SCGF）を測定することを特徴とする、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法。

**【請求項 3】**

生体試料中の造血幹細胞増殖因子（SCGF）を測定することを特徴とする、再生不良性貧血と骨髓異形成症候群とを判別する方法。

10

**【請求項 4】**

生体試料中の造血幹細胞増殖因子（SCGF）を測定することを特徴とする、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の状態を判定する方法。

**【請求項 5】**

生体試料中の造血幹細胞増殖因子（SCGF）を定量することを特徴とする、移植片対宿主反応病を判定する方法。

**【請求項 6】**

判定または判別する方法が、免疫学的測定方法である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

免疫学的測定方法が、サンドイッチ法である、請求項 6 記載の方法。

20

**【請求項 8】**

サンドイッチ法が、造血幹細胞増殖因子（SCGF）の異なるエピトープに反応する 2 種類の抗体を用いることを特徴とする、請求項 7 記載の方法。

**【請求項 9】**

抗体が、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体から選ばれる抗体である請求項 8 記載の方法。

**【請求項 10】**

モノクローナル抗体が、配列番号 1 の 6～28 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、29～59 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および 60～302 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体からなる群から選ばれるモノクローナル抗体である、請求項 9 記載の方法。

30

**【請求項 11】**

造血幹細胞増殖因子（SCGF）に反応する抗体を有効成分として含有してなる白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の診断薬。

**【請求項 12】**

造血幹細胞増殖因子（SCGF）に反応する抗体を有効成分として含有してなる造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態の診断薬。

**【請求項 13】**

造血幹細胞増殖因子（SCGF）に反応する抗体を有効成分として含有してなる移植片対宿主反応病の診断薬。

40

**【請求項 14】**

抗体が、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体から選ばれる抗体である請求項 11～13 のいずれか 1 項に記載の診断薬。

**【請求項 15】**

モノクローナル抗体が、配列番号 1 の 6～28 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、29～59 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および 60～302 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体からなる群から選ばれるモノクローナル抗体である、請求項 14 記載の診断薬。

50

## 【請求項 16】

造血幹細胞増殖因子 ( S C G F ) に反応する抗体を含む、白血病、前白血病あるいは非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態または移植片対宿主反応病の診断用キット。

## 【請求項 17】

造血幹細胞増殖因子 ( S C G F ) を含む、請求項 16 記載の診断用キット。

## 【請求項 18】

配列番号 1 の 29 ~ 59 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体。

## 【請求項 19】

配列番号 1 記載の 60 ~ 302 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体。

## 【請求項 20】

請求項 18 または請求項 19 記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

## 【発明の詳細な説明】

## 技術分野

本発明は、造血幹細胞増殖因子 ( S C G F ) を測定することを特徴とする、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法、再生不良性貧血と骨髓異形成症候群とを判別する方法、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の状態を判定する方法、または移植片対宿主反応病を判定する方法に関する。また、造血幹細胞増殖因子 ( S C G F ) に反応する抗体を有効成分として含有してなる白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態または移植片対宿主反応病の診断薬および診断キットに関する。

## 背景技術

白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患の診断、または白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患の治療後の診断は、白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患を治療するための方針を決定するのに重要である。

白血病の初発の診断としては、患者の末梢血中の白血球数を測定し、計測値が正常値を上回る場合に白血病の発生を疑う方法があげられる。しかしながら、風邪などの白血病以外の疾患であっても、体内の免疫反応の亢進により白血球数は増大するので、白血球数の測定だけでは、擬陽性の可能性がある。また、末梢血中の白血球数の正常値は、 $4,000 \sim 8,000$  個 /  $\mu\text{L}$  と幅が広く、擬陰性の可能性がある。そこで、より確度の高い白血病の診断方法が求められている。

白血病再発の診断方法としては、WT - 1 遺伝子の RT - PCR による検出がある [臨床病理 48, 155 (2000)、Blood, 84, 3071 (1994)、日本特許第 3122771 号]。しかしながら、該診断方法は操作が煩雑であるとともに、特殊な装置を必要としている。

また、上述の白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患、先天性代謝疾患、固形癌等の治療方法の一つとして、造血幹細胞移植療法があげられる。造血幹細胞移植療法の問題点としては、提供者の造血幹細胞と患者の造血幹細胞との HLA タイプの不適合、患者側の体調や感染症等などにより、移植した造血幹細胞が生着しない、造血幹細胞の生着が遅延する、移植片対宿主反応病 (以下、GVHD と称する) を発症するなど、造血幹細胞移植治療の効果が十分に得られないことがあげられ、最悪の場合、死の転帰をとることもある。

造血幹細胞の生着遅延に対しては、G - CSF を生体内に投与することにより、造血幹細胞の生着を促進させることができる。また、GVHD に対しては、免疫抑制剤を生体内に投与することにより、提供された造血幹細胞の拒絶反応を抑制させることができる。しかしながら、いずれの薬剤も過剰に投与した場合には、副作用が懸念される。そのため、造血幹細胞の生着状態、GVHD 発症を診断あるいは予知することは治療方針の決定に重要

10

20

30

40

50

である。

造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着を確認する方法としては、末梢血中の白血球数や血小板数を測定し、それらの測定値が上昇すれば造血幹細胞が生着したことを診断することができる。しかしながら、造血幹細胞の生着は、移植後10日から1ヶ月以上を要する事もあるため、末梢血中の白血球数や血小板数を測定することでは早期に造血幹細胞の生着を判断することができない。

G V H D 発症の判定方法としては、造血幹細胞移植後のリカバリー期に現れる皮膚の発疹等を観察することがあげられる。しかしながら、簡便で確度の高いG V H D 発症の判定方法は知られていない。さらにG V H D 発症以前にG V H D の発症を予知する方法は知られていない。

ヒト造血幹細胞増殖因子 ( Stem Cell Growth Factor ; 以下、SCGF と略記する ) は、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質である [ WO 9 8 / 0 8 8 5 9 , Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 9 4 , 7 5 7 7 ( 1 9 9 7 ) , Biochem . Biophys . Res . Comm . , 2 4 9 , 1 2 4 ( 1 9 9 8 ) ] 。

SCGF を認識する抗体としては、遺伝子組換え法により得られたSCGF、ならびにSCGF のN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原として調製したポリクローナル抗体および細胞培養上清から部分精製されたSCGF や遺伝子組換え法により得られたSCGF を免疫原として調製したモノクローナル抗体が知られている [ WO 9 8 / 0 8 8 5 9 ] 。該モノクローナル抗体が中和活性を有すること、また遺伝子組換え法により得られたSCGF を免疫原として調製したポリクローナル抗体がELISAで遺伝子組換え法により得られたSCGF と反応すること、SCGF のN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原として調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより遺伝子組換え法により得られたSCGF を検出できることが報告されている。

また、SCGF のN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原とした抗SCGFモノクローナル抗体KM2142が報告されている [ The Hematology Journal , 2 , 3 0 7 ( 2 0 0 1 ) ] 。

ヒト正常組織に対してノーザンブロッティングを行った結果、SCGF 遺伝子の発現は腎臓に多く、心臓に少なく、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、膵臓では発現が見られないこと [ Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 9 4 , 7 5 7 7 ( 1 9 9 7 ) ] 、脾臓、胸腺、盲腸、骨髄、胎児肝に多く、末梢血に少ないこと [ Biochem . Biophys . Res . Comm . , 2 4 9 , 1 2 4 ( 1 9 9 8 ) ] が知られている。また、正常新生児マウスにインサイテュハイブリダイゼーションを行った結果、骨髄、増殖軟骨、骨膜付近にSCGF が発現していることが報告されている [ The Hematology Journal , 2 , 3 0 7 ( 2 0 0 1 ) ] 。

さらに、骨髄細胞株 ( HT 6 0 , K P B - M 1 5 ) 、単核球細胞株 ( T H P - 1 , U - 9 3 7 ) 、赤芽球細胞株 ( H E L ) 、繊維芽細胞株 ( N H F ) でSCGF 遺伝子の発現が見られるが、B細胞株 ( U 2 6 6 B 1 , I M - 9 ) 、T細胞株 ( M O L T - 4 ) 、赤芽球細胞株 ( K 5 6 2 ) 、上皮系癌細胞株 ( H e L a S 3 , A 4 3 1 ) 、メラノーマ細胞株 ( B o w e s ) 、アデノウイルス形質転換胎生腎臓細胞株 ( 2 9 3 ) 、繊維芽細胞株 ( C C D - 8 L u ) では、SCGF 遺伝子の発現が見られないことが報告されている [ Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 9 4 , 7 5 7 7 ( 1 9 9 7 ) ] 。

しかし、正常及び血液疾患の、或いは造血幹細胞移植を受けたヒトを含む動物の末梢血、骨髄中の血球細胞でのSCGF のmRNA量の差異に関する報告は無い。

組織や細胞のmRNAとコードされるタンパク質の量との相関は低く ( 相関係数 = 0 . 4 8 ) [ Electrophoresis , 1 8 , 5 3 3 ( 1 9 9 7 ) ] 、SCGF のmRNA量からSCGF 蛋白質量を推定する事も困難である。

以上のように、ヒトを含む動物の血清、血漿などの体液および組織中のSCGF 蛋白質の存在、機能、疾患との関係については明らかにされていない。

10

20

30

40

50

本発明の目的は、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の判定、白血病と前白血病または非白血病性悪性血液疾患との判別、再生不良性貧血と骨髄異形成症候群との判別、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態およびGVHDを判定する方法、および白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態およびGVHDの診断薬ならびに診断キットを提供することにある。

発明の開示

本発明は以下(1)～(20)に関する。

(1) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法。

(2) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法。

(3) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、再生不良性貧血と骨髄異形成症候群とを判別する方法。

(4) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の状態を判定する方法。

(5) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を定量することを特徴とする、移植片対宿主反応病を判定する方法。

(6) 判定または判別する方法が、免疫学的測定方法である、上記(1)～(5)のいずれか1項に記載の方法。

(7) 免疫学的測定方法が、サンドイッチ法である、上記(6)項に記載の方法。

(8) サンドイッチ法が、造血幹細胞増殖因子(SCGF)の異なるエピトープに反応する2種類の抗体を用いることを特徴とする、上記(7)記載の方法。

(9) 抗体が、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体から選ばれる抗体である上記(8)記載の方法。

(10) モノクローナル抗体が、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体からなる群から選ばれるモノクローナル抗体である、上記(9)記載の方法。

(11) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を有効成分として含有してなる白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の診断薬。

(12) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を有効成分として含有してなる造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態の診断薬。

(13) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を有効成分として含有してなる移植片対宿主反応病の診断薬。

(14) 抗体が、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体から選ばれる抗体である上記(11)～(13)のいずれか1項に記載の診断薬。

(15) モノクローナル抗体が、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体からなる群から選ばれるモノクローナル抗体である、上記(14)記載の診断薬。

(16) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を含む、白血病、前白血病あるいは非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態または移植片対宿主反応病の診断用キット。

(17) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)を含む、上記(16)記載の診断用キット。

(18) 配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体。

(19) 配列番号1記載の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体。

10

20

30

40

50

(20) 上記(18)または(19)項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法に関する。白血病としては、造血系細胞のうち造血細胞などの未熟な細胞が腫瘍化されたものであればいかなるものも包含するが、急性リンパ性白血病(以下、ALLと称する)、急性骨髄性白血病(以下、AMLと称する)、慢性骨髄性白血病(以下、CMLと称する)などがあげられる。

前白血病としては、造血系細胞のうちリンパ球などの成熟な細胞が腫瘍化されたものであればいかなるものも包含されるが、骨髄異形性症候群(以下、MDSと称する)などがあげられる。

非白血病性悪性血液疾患としてリンパ腫や骨髄腫などがあげられる。

リンパ腫としては、ホジキンリンパ腫や非ホジキンリンパ腫(以下、NHLと称する)などがあげられる。

骨髄腫としては、多発性骨髄腫(以下、MMと称する)などがあげられる。

白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度は、健常人の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて有意に上昇している。したがって、SCGF濃度にカットオフ値を設けて、採取した生体試料中のSCGFを定量し、SCGF濃度がカットオフ値より高い場合に白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患であると判定することができる。

カットオフ値とは、ある物質に着目して目的とする疾患群と非疾患群とを判定する場合に定める値をいう。目的とする疾患と非疾患とを判定する場合に、カットオフ値以下であれば陰性、カットオフ値以上であれば陽性として、またはカットオフ値以下であれば陽性、カットオフ値以上であれば陰性として疾患を判定することができる(金井正光編、臨床検査法提要 金原出版株式会社)。

カットオフ値の臨床的有用性を評価する目的で用いられる指標としては、感度と特異度があげられる。

ある母集団をカットオフ値を用いて判定し、疾病患者のうち、判定で陽性とされたものをa(真陽性)、疾病患者でありながら判定で陰性とされたものをb(偽陰性)、疾病患者でないにも関わらず判定で陽性とされたものをc(偽陽性)、疾病患者でなく判定で陰性とされたものをd(真陰性)と表したときに、 $a / (a + b)$ で表される値を感度(真陽性率)、 $d / (c + d)$ で表される値を特異度(真陰性率)として表すことができる。

目的とする疾患群と非疾患群との測定値の分布は通常、一部重複する。したがって、カットオフ値を上下させることにより、感度と特異度は変化する。カットオフ値を下げることにより感度は高くなるが、特異度は低下し、カットオフ値を上げることにより感度は低くなるが、特異度は上がる。判定方法としては、感度と特異度の両者の値が高いほうが好ましい。また、感度と特異度の値が50%を超えない判定方法は、有用とは認められない。カットオフ値を設定する方法としては、非疾患群の分布の95%を含む、中央からの両端のいずれかの値をカットオフ値として設定する方法、非疾患群の分布が正規分布を示す場合、平均値+2倍の標準偏差(SD)または平均値-2SDをカットオフ値として設定する方法などがあげられる。

白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患であるか否かを判定する場合、カットオフ値を15.0ng/mLに設定した場合には、感度89.5%、特異度70%で判定することができ、カットオフ値を13.0ng/mLに設定した場合には、感度100%、特異度60%で判定することができる。健常人のSCGF濃度よりカットオフ値を平均値+2SDの18.2ng/mLに設定すると、感度89.5%、特異度100%で判定することができる。また、このカットオフ値で白血病であるか否かを感度95%、特異度100%で、非白血病性悪性血液疾患であるか否かを感度76.9%、特異度100%、さらに前白血病であるか否かを感度100%、特異度100%で判定することができる。

生体試料としては、血液、尿、髄液、穿刺液などいかなるものでもよいが、好ましくは血

10

20

30

40

50

液があげられる。血液としては、全血、血漿、血清、血球溶血液、血球内液などがあげられるが、好ましくは血清または血漿があげられる。

本発明は、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法に関する。

白血病患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度は、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて有意に上昇している。したがって、上述の方法で白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患と判定されたのち、さらに白血病と判定されるカットオフ値を設けて、採取した生体試料中のSCGF濃度がそのカットオフ値よりも高い場合には、白血病、低い場合は前白血病または非白血病性悪性血液疾患であると判断することができる。

白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する場合、カットオフ値を23.8 ng/mLに設定した場合には、感度85%、特異度69.2%で判別することができる。また、カットオフ値を非白血病性悪性血液疾患患者の平均値+2SDから32.8 ng/mLに設定した場合には、感度80%、特異度100%で判別することができる。

本発明は、再生不良性貧血と骨髄異形性症候群とを判別する方法に関する。

再生不良性貧血と骨髄異形性症候群は、骨髄および末梢血において白血球の数や形態に異常が生じるのを特徴とする病態で、二つの疾患の判別は難しいとされてきた。

骨髄異形性症候群患者のSCGF濃度は健常人の血液中に含まれるSCGF濃度に比べ有意に上昇しているが、再生不良性貧血患者の血液中SCGF濃度は健常人と変わらない。骨髄異形性症候群患者の血中SCGF濃度は再生不良性貧血患者の血中SCGF濃度より有意に高く、両者の血中SCGF濃度を測定することで、再生不良性貧血か骨髄異形成症候群かと判別することができる。

そこで、白血球の異常が見られる患者のうち、再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者を判別する場合、再生不良性貧血患者のSCGF濃度よりカットオフ値(平均値+2SD=16.6 ng/mL)を設定し、該カットオフ値によって判断すると、感度100%、特異度100%で再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者とを判別することができる。さらに基準値を15.6 ng/mL~18.6 ng/mLに設定すれば、感度100%、特異度100%で再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者とを判別することができる。

また、本発明は、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の遅延を判定する方法に関する。造血幹細胞移植としては、造血幹細胞を移植する方法であればいかなるものでもよいが、骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植等があげられる。

造血幹細胞移植から造血幹細胞の生着までの期間は、患者の末梢血の血球数を基準として以下にあげる4つの時期に分類される。すなわち、移植前で、抗癌剤などを大量投与した状態にあるプレ-コンディショニング期、移植を行った後に血球数が減少した状態にあるアプラスチック期、移植後に血球数が回復した状態にあるリカバリー期、および移植後に造血幹細胞が生着するステイブル期である。

造血幹細胞移植を行った患者のプレ-コンディショニング期およびアプラスチック期での生体試料中に含まれるSCGF濃度は、造血幹細胞の生着が遅延する患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度のほうが造血幹細胞の生着が遅延しない患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて高い。したがって、それぞれの時期のSCGF濃度を測定し、造血幹細胞の生着が遅延するおそれがあると判断されるSCGF濃度をカットオフ値として定め、SCGF濃度がカットオフ値より低い値の場合には生着の遅延は見られず、SCGF濃度がカットオフ値より高い値の場合には生着の遅延が起こると判定することができる。

造血幹細胞の生着遅延を判定するには、プレ-コンディショニング期の場合は、例えばカットオフ値を9.5 ng/mLに定めることにより感度75%、特異度67%で、アプラスチック期の場合は、カットオフ値を12 ng/mLに定めることにより感度75%、特異度63%で判定することができる。

さらに、本発明はGVHDの発症を判定する方法に関する。

造血幹細胞移植を行った患者のアラスチック期およびリカバリー期での生体試料中に含まれるSCGF濃度は、GVHDを発症する患者のほうが、GVHDを発症しない患者に比べて高い。したがって、それぞれの時期のSCGF濃度を測定し、それぞれの時期でGVHDを発症するおそれがあると判定されるカットオフ値を定め、SCGF濃度がカットオフ値より低い値の場合にはGVHDが発症するおそれはないが、SCGF濃度がカットオフ値より高い値の場合にはGVHDが発症するおそれがあると判断することができる。造血幹細胞移植後のGVHDの発症を判定するには、プレ-コンディショニング期においては、カットオフ値を例えば5 ng/mLに定めることにより感度87%、特異度57%で、アラスチック期においてはカットオフ値を例えば10 ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、リカバリー期ではカットオフ値を例えば15 ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、GVHD発症患者と非発症患者とを判定することができる。

生体試料中の造血幹細胞増殖因子(以下、SCGFと称す)を測定する方法としては、免疫学的測定法、分子生物学的測定法などいかなる方法でもよいが、好ましくは免疫学的測定法があげられる。

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノプロットティング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

分子生物学的測定法としては、RT-PCR法、ノーザンプロットティング法、in situハイブリダイゼーション法等があげられる。

イムノアッセイ法は、各種標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体または抗原を検出或いは定量する方法であり、抗原または抗体の標識方法に応じて、放射免疫検出法(RIA)、酵素免疫検出法(EIAまたはELISA)、蛍光免疫検出法(FIA)、発光免疫検出法(luminescent immunoassay)、物理化学的検出法(TIA, LAPIA, PCIA)、フローサイトメトリーなどがあげられるが、好ましくは酵素免疫検出法があげられる。

放射免疫検出法で用いる放射性標識体としては、任意の公知(石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院)の放射性同位元素を用いることができる。例えば、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 等を用いることができる。

酵素免疫検出法で用いる酵素標識体としては、任意の公知(石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院)の酵素を用いることができる。例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ等を用いることができる。

さらに酵素免疫測定法は酵素の作用により生成した物質を測定することにより、測定・検出を行うが、紫外部または可視部に吸収極大を有する物質の吸光度を測定する方法、生成した蛍光物質の蛍光強度を測定する方法、生成した物質の発光強度を測定する方法など多様な測定方法をとることが出来る。例えば酵素標識体としてアルカリホスファターゼを用いる場合は、アルカリホスファターゼ作用により紫外部または可視部に吸収極大を有する物質を生成するようなアルカリ性ホスファターゼの基質としては、例えば4-ニトロフェニルリン酸等が挙げられる。4-ニトロフェニルリン酸はアルカリホスファターゼにより4-ニトロフェノールに変換される。アルカリホスファターゼ作用により発光を生成するようなアルカリホスファターゼの基質としては、例えば3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・二ナトリウム塩(AMP PD)、2-クロロ-5-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1<sup>3,7</sup>]デカン]-4-イル}フェニル ホスフェート・二ナトリウム塩(CDP-Star<sup>TM</sup>)、3-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1<sup>3,7</sup>]デカン]-4-イル}フェニル ホスフェート・二ナトリウム塩(CSPD<sup>TM</sup>)、[10-メチル-9(10H)-アクリジニルイデン]フェノキシメチルリ

10

20

30

40

50

ン酸・二ナトリウム塩 ( Lumigen<sup>TM</sup> APS-5 ) 等が挙げられる。また、アルカリホスファターゼの作用により色素を生成する試薬として、アルカリホスファターゼの基質である NADPH を含有する酵素サイクリング反応試薬 AmpliQ ( ダコ社製 ) が挙げられる。

発光免疫検出法で用いる発光標識体としては、任意の公知 [ 今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店；臨床検査 42 ( 1998 ) ] の発光体を用いることができる。例えば、アクリジニウムエステル、ロフィン等を用いることができる。

蛍光免疫検出法で用いる蛍光標識体としては、任意の公知 ( 川生明著、蛍光抗体法、ソフトサイエンス社製 ) の蛍光を用いることができる。例えば、FITC、RITC等を用いることができる。

イムノアッセイ法における測定方法としては、競合法、サンドイッチ法 [ 免疫学イラストレイテッド第5版 ( 南光堂 ) ] 等があげられるが、好ましくはサンドイッチ法があげられる。

サンドイッチ法は、抗原抗体反応で結合した試料中の目的物質と第二の抗体に、第二の抗体 ( 二次抗体 ) を同時に、または別々に反応させ、試料中の目的物質を同一または別々の抗体で検出または定量する方法である。多くの場合、測定操作中に試料中の非反応のサンプル成分や測定系成分を洗浄する工程を含む。例えば、固相に第一の抗体 ( 一次抗体 ) を固定した後、測定したい試料を第一の試料と接触させる。試料中の非反応のサンプル成分を洗浄し、反応系から除去した後、抗原抗体反応で結合した試料中の目的物質と第一の抗体の複合体に、第二の抗体 ( 二次抗体 ) を反応させ、測定系中の反応に関与しなかった第二次抗体などの成分を洗浄除去した後、反応系に存在する試料中の目的物質を検出または定量する方法である。

サンドイッチ法に用いる固相としては、ポリ塩化ビニル製マイクロタイタープレート、ポリスチレン製マイクロタイタープレート等があげられる。

サンドイッチ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>などの抗体フラグメントを用いてもよい。

サンドイッチ法で用いる一次抗体と二次抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識する抗体の組み合わせであればいかなるものでもよいが、少なくとも1つがモノクローナル抗体であることが好ましい。

本発明のサンドイッチ法で用いられるモノクローナル抗体としては、配列番号1の6~28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体などがあげられる。

配列番号1の6~28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2142 [ The Hematology Journal, 2, 307 ( 2001 ) ] が生産するモノクローナル抗体KM2142があげられる。配列番号1の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

モノクローナル抗体KM2142を生産するハイブリドーマKM2142、モノクローナル抗体KM2804を生産するハイブリドーマKM2804、モノクローナル抗体KM2945を生産するハイブリドーマKM2945は、平成14年2月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター ( 茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6 ) にFERM BP-7922、FERM BP-7923およびFERM BP-7924としてそれぞれ寄託されている。

上述のモノクローナル抗体はSCGFを認識する部位がそれぞれ異なるので、これらのモ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体を組み合わせてサンドイッチ法を行うことができる。好ましいモノクローナル抗体の組み合わせとしては、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、具体的にはハイブリドーマKM2142 [The Hematology Journal, 2, 307 (2001)]が生産するモノクローナル抗体KM2142と、配列番号1記載の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、具体的にはハイブリドーマKM2804 (FERMBP-7923)が生産するモノクローナル抗体KM2804との組み合わせがあげられる。

本発明のサンドイッチ法によるSCGFを検出または定量する方法の具体例を以下に示す。

10

まず、適当な固定担体の表面に上述の抗SCGF抗体(一次抗体)を吸着固定する。一次抗体の固定は、例えば、当該抗体を適当な緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等に希釈した後、これを固定担体の表面に接触させ、そして4～37℃にて30分間以上反応させることなどにより行うことができる。

次に、固定担体表面の蛋白質結合能をブロックする。例えば、固定担体表面上の遊離結合基をブロッキング緩衝液と接触させる。

ブロッキング緩衝液としては、例えば1～10%のウシ血清アルブミン、10～30%ブロックエース(雪印乳業社製)を含有する緩衝液、例えば、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等があげられる。

ブロッキング処理は、4～37℃にて30分間以上反応させることにより行うことができる。

20

次に、一次抗体を生体試料と接触させる。生体試料は必要に応じて、例えば0.01～1%のウシ血清アルブミンなどの蛋白質を含有する緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等で希釈してもよい。

一次抗体と生体試料との接触は、4～37℃にて30分間以上反応させることにより行うことができる。

接触させた後、必要に応じてTween 20等の界面活性剤を含有する緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等を用いて数回洗浄する。

このとき、生体試料中に存在するSCGFが、あらかじめ固定されている抗SCGF抗体と特異的に結合することにより、抗SCGF抗体を介して固定担体に固定される。

30

次に、SCGFが固定された前記担体を、二次抗体を含有する溶液と接触させる。

二次抗体としては、一次抗体とエピトープの異なる抗SCGF抗体であればいかなるものでもよい。また、二次抗体は必要に応じて、前述の標識体で予め標識しておくことができる。

未吸着の二次抗体を除去するには、必要に応じてTween 20等の界面活性剤を含有する緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等を用いて担体を数回洗浄する。これにより該二次抗体は、あらかじめ結合されている一次抗体及びSCGFを介して、固定担体に結合し、二次抗体の結合量が生体試料中のSCGFの量を反映することになる。

上記のようにして固定された二次抗体は、二次抗体の標識体に応じて測定することができる。また、二次抗体に対して特異的な三次抗体を用い、該三次抗体を種々の方法により標識しておき、三次抗体の標識を検出または測定することもできる。

40

上記のようにして、結合された二次抗体の量を測定し、標準物質を用いて検量線を作成し、生体試料中のSCGFの量を測定することができる。

検量線は、標準物質として濃度が既知であるヒトSCGF蛋白質を含む溶液を数点段階希釈したものを準備し、生体試料とともに上述のサンドイッチ法を行うことにより得られる。

本発明の白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の診断薬、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着遅延の診断薬、およびGVHD発症の診断薬に含有されるSCGFに対する抗体としては、SCGFに反応する抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクロー

50

ナル抗体あるいは抗体フラグメントなどいかなるものでもよいが、好ましくはモノクローナル抗体が用いられる。

モノクローナル抗体としては、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体があげられる。

配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2142 (FERM BP-7922) が生産するモノクローナル抗体KM2142があげられる。配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804 (FERM BP-7923) が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945 (FERM BP-7924) が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

本発明のキットとしては、機器または試薬の組み合わせにより構成されるが、以下に述べる各構成要素と本質的に同一、またはその一部と本質的に同一な物質が含まれていれば、構成または形態が異なっても、本発明のキットに包含される。

試薬としてはSCGFに反応する抗体を含み、また、必要に応じ、生体試料の希釈液、抗体固定化固相、反応緩衝液、洗浄液、標識された二次抗体またはその抗体断片、標識体の検出用試薬、SCGFなどの標準物質なども含まれる。

生体試料の希釈液としては、界面活性剤、緩衝剤などにBSAやカゼインなどのタンパク質を含む水溶液などがあげられる。

抗体固定化固相としては、各種高分子素材を用途に合うように整形した素材に、本発明の抗体または抗体断片を固相化したものが用いられる。形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックスなどの微粒子、スティック等が、素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックスや金属などがあげられる。抗体の固相化の方法としては物理的方法と化学的方法またはこれらの併用等公知の方法により調製することができる。例えば、ポリスチレン製96ウェルの免疫測定用マイクロプレートに抗体等を疎水固相化したものがあげられる。

反応緩衝液は、抗体固定化固相の抗体と生体試料中の抗原とが結合反応をする際の溶媒環境を提供するものであればいかなるものでもよいが、界面活性剤、緩衝剤、BSAやカゼインなどの蛋白質、防腐剤、安定化剤、反応促進剤などがあげられる。

洗浄液としては、リン酸やトリス(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)、HEPESやMOPSなどのグッドバッファー類などの緩衝剤などに、ツイーン20、ツイーン40、ツイーン60、ツイーン80、トリトン<sup>TM</sup>X-705などの界面活性剤、NaCl、KClや硫酸アンモニウムなどの塩、BSAやカゼインなどの蛋白質、アジ化ナトリウムなどの防腐剤、塩酸グアニジン、尿素やソディウムドデシルサルフェートなどの変性剤、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸などの安定化剤の少なくとも1種類を含む液があげられる。具体的には、0.15 mol/L塩化ナトリウム、0.05%ツイーン20およびpH7.4の10 mmol/Lリン酸緩衝液からなるツイーンPBS、0.15 mol/L塩化ナトリウム、0.05%ツイーン20およびpH7.4の10 mmol/Lトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)からなるツイーンTBSなどがあげられる。

標識された二次抗体またはその抗体断片としては、本発明の抗体または抗体断片に西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ウシ小腸アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼなどの標識用酵素をラベルしたもの、緩衝剤、BSAやカゼインなどのタンパク質、防腐剤などを混合したものが用いられる。

標識体の検出用試薬としては前記の標識用酵素に応じて、例えば西洋ワサビペルオキシダ

10

20

30

40

50

ーゼであれば、テトラメチルベンジジンやオルトフェニレンジアミンなどの吸光測定用基質、ヒドロキシフェニルヒドロキシフェニルプロピオン酸やヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光基質、ルミノールなどの発光基質が、アルカリフォスファターゼであれば、4-ニトロフェニルフォスフェートなどの吸光度測定用基質、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどの蛍光基質等があげられる。

標準物質としては、WO98/08869に記載の方法により調製できるSCGF、キットに用いられる2種類の抗体のエピトープを含有するペプチドなどがあげられる。

本発明は、また、配列番号1記載の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体に関する。

配列番号1記載の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804(FERM BP-7923)が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945(FERM BP-7924)が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

本発明に用いられるモノクローナル抗体の製造方法としては、公知のモノクローナル抗体の製造方法により製造することができる。

以下に、本発明に用いるモノクローナル抗体の製造方法を詳細に説明する。

#### (1) 抗原の調製

抗原としては、ヒトSCGFをコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入して得られたヒトSCGF蛋白質、ペプチド合成により得られたヒトSCGF部分配列を有する合成ペプチドなどがあげられる。

抗原用部分ペプチドとしては、5~30残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の該蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。KyteとDoolittleの方法[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 157, 105-132(1982)]などにより、親水性の高い部分配列を予測することで、立体構造上蛋白質表面に存在する部分を推測することができる。即ち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多いためである。また、蛋白質のN末端、C末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。さらに、蛋白質の二次構造情報も参考にできる。Chou-Fasmanの方法[アドバンゼズ・イン・エンザイモロジー(Advances in Enzymology), 47, 45-147(1978)]などによりアミノ酸配列から予測した蛋白質二次構造において、ターン構造やランダムコイル構造を有する部分が抗原用ペプチドとして適していると考えることができる。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を確立する抗原となるとは限らない。

部分ペプチドには、蛋白質と架橋するためにシステインを末端に付加する。蛋白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドのN末端はアセチル化、C末端はアミド化する。

部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる[インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ(International Journal of Peptide Protein Research), 35, 161-214(1990)、「ソリッド・フェーズ・ペプタイド・シンセシス(Solid-Phase Peptide Synthesis)」, メソズ・イン・エンザイモロジー第289巻(Methods in Enzymology, vol. 289), グレグ・B・フィールズ(Gregg B. Fields)編, アカデミック・プレス(Academic Press), (1997)、「ペプタイド・シンセシス

10

20

30

40

50

・プロトコール ( Peptide Synthesis Protocols ) , メソ  
 ヅ・イン・モレキュラー・バイオロジー第35巻 ( Methods in Molec  
 ular Biology , vol . 35 ) , マイケル・W・ペニンントン ( Michael  
 W . Pennington ) , ベン・M・ダン ( Ben M . Dunn ) 編 , ヒュー  
 マナ・プレス ( Humana Press ) , ( 1994 ) ] 。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成  
 は、島津製作所製ペプチド合成機、アドバンスド・ケムテック社 ( Advanced C  
 hemTech Inc . , USA、以後ACT社と略称する) 製ペプチド合成機等の市  
 販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護したN - Fmoc - アミノ酸あるいはN  
 - Boc - アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる  
 。原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI社、島津製作所、国産化学 ( 株 ) 、  
 ノババイオケム社 ( Nova Biochem ) 、渡辺化学 ( 株 ) 、ACT社、アナスペック  
 社 ( AnaSpec Inc . ) 、またはペプチド研究所 ( 株 ) 等から入手することができる。

10

### ( 2 ) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

3 ~ 20 週令のマウス、ラットまたはハムスターに ( 1 ) で調製した抗原を免疫して、そ  
 の動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。

免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、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  
 ) や水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど ] とともに抗原を投与することにより  
 行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA ( ウシ血清アルブミン ) やKLH ( Keyhole Limpet Hemocyanin ) などのキャリア蛋白質とコンジュ  
 ゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

20

抗原の投与は、1 回目の投与の後 1 ~ 2 週間おきに 3 ~ 10 回行う。各投与後 3 ~ 7 日  
 目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法 [ Antib  
 odies - A Laboratory Manual , Cold Spring Har  
 bor Laboratory , 1988 ] などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、  
 その血清が十分な抗体価を示したマウス、ラットまたはハムスターを抗体産生細胞の供給  
 源として提供する。

抗体産生細胞と骨髄腫細胞の融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後 3 ~ 7 日  
 目に、免疫したマウス、ラットまたはハムスターより脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。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 ( 1 , 20  
 0 rpm、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 ( pH 7 . 6  
 5 ) で 1 ~ 2 分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で 3 回洗浄して融合用脾細胞として  
 提供する。

30

### ( 3 ) 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 - X63 Ag8 - U1 ( P3 - U  
 1 ) [ Current Topics in Microbiology and Im  
 munology , 18 : 1 - 7 ( 1978 ) ] 、 P3 - NS1 / 1 - Ag41 ( NS -  
 1 ) [ European J . Immunology , 6 : 511 - 519 ( 1976 )  
 ] 、 SP2 / O - Ag14 ( SP - 2 ) [ Nature , 276 : 269 - 270 ( 19  
 78 ) ] 、 P3 - X63 - Ag8653 ( 653 ) [ J . Immunology , 123  
 : 1548 - 1550 ( 1979 ) ] 、 P3 - X63 - Ag8 ( X63 ) [ 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 . 5 mmol / L ) 、 2 - メ  
 ルカプトエタノール (  $5 \times 10^{-5}$  mol / L ) 、 ジェンタマイシン ( 10  $\mu$ g / mL )  
 および牛胎児血清 ( FCS ) 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 ( 15  $\mu$ g / 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  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

40

50

## (4) 細胞融合

(2) で免疫した抗体産生細胞と(3) で得られた骨髄腫細胞をMEM培地または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、ポリエチレングライコール-1,000 (PEG-1,000) 2g、MEM 2mL およびジメチルスルホキシド 0.7mL の混液 0.2 ~ 1mL / 10<sup>6</sup> 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<sup>-4</sup>mol/L)、チミジン (1.5 × 10<sup>-5</sup>mol/L) およびアミノプテリン (4 × 10<sup>-7</sup>mol/L) を加えた培地] 100mL 中に懸濁する。この懸濁液を96穴培養用プレートに100μL / 穴ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub> 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下記に述べる酵素免疫測定法などにより、ヒトSCGFに反応し、ヒトSCGFを含まない抗原に反応しないものを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す [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抗ヒトSCGF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。

酵素免疫測定法

抗原あるいは抗原を発現した細胞などを96ウェルプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に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選択する。

## (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週令のマウスまたはヌードマウスに、(4) で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 2 × 10<sup>6</sup> ~ 5 × 10<sup>7</sup> 細胞 / 匹を腹腔内注射する。10 ~ 21日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% 硫酸アンモニウムで塩析した後、カプリル酸沈殿法、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よる精製を行い、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、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。

## [実施例]

実施例1 . ヒトSCGF部分ペプチドを用いた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製

## (1) ヒトSCGF部分ペプチドの合成

ヒトSCGF蛋白配列を解析し、親水性の高い部分、N末端、C末端、二次構造上ターン構造、ランダムコイル構造を有する部分の中から、抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物1 (SCGF-1) を選択した。

## (略号について)

本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会 (IUPAC-IUB Joint Commission

10

20

30

40

50

on Biochemical Nomenclature) の勧告 [ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry), 138 巻, 9 頁 (1984 年)] に従った。

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

Ala: L - アラニン  
 Arg: L - アルギニン  
 Cys: L - システイン  
 Gln: L - グルタミン  
 Glu: L - グルタミン酸  
 Glx: L - グルタミン酸  
 Gly: グリシン  
 Leu: L - ロイシン  
 Trp: L - トリプトファン

10

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

Fmoc: 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル  
 tBu: t - ブチル  
 Trt: トリチル  
 Boc: t - ブチルオキシカルボニル  
 Pmc: 2, 2, 5, 7, 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルフォニル  
 Fmoc - Arg (Pmc) - OH: N<sup>ε</sup> - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル - N<sup>ε</sup> - 2, 2, 5, 7, 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルフォニル - L - アルギニン  
 Fmoc - Gln (Trt) - OH: N<sup>ε</sup> - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル - N<sup>ε</sup> - トリチル - L - グルタミン  
 Fmoc - Glu (OtBu) - OH: N<sup>ε</sup> - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル - L - グルタミン酸 - t - ブチルエステル  
 Fmoc - Trp (Boc) - OH: N<sup>ind</sup> - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル - N<sup>ind</sup> - t - ブチルオキシカルボニル - L - トリプトファン

20

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

PyBOP: ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシトリピロリジノホスフォニウムヘキサフルオロホスフェート  
 HOBT: N - ヒドロキシベンゾトリアゾール  
 NMM: N - メチルモルホリン  
 DMF: N, N - ジメチルホルムアミド  
 TFA: トリフルオロ酢酸

30

以下の実施例において、化合物の理化学的性質は次の方法により測定した。

質量分析は、日本電子 JMS - HX 110 A を用い FAB - MS 法により、もしくはブルカー社製質量分析装置 REFLEX を用い MALDI - TOFMS 法により行った。行った。アミノ酸分析は、コーエン (Cohen, S. A.) らの方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 222, 19 (1994)] により行った。加水分解は塩酸蒸気中 110 で 20 時間行い、加水分解物のアミノ酸組成はウォーターズ・アキュ・タグ (Waters AccQ - Tag) アミノ酸分析計 (Waters 社製) を用い分析した。

40

1 化合物 1 (SCGF - 1) (配列番号 4) (Ac - Arg - Glu - Trp - Glu - Gly - Gly - Trp - Gly - Gly - Ala - Gln - Glu - Glu - Glu - Arg - Glu - Arg - Glu - Ala - Leu - Cys - OH) の合成

Fmoc - Cys (Trt)、14.1 μmol が結合した担体樹脂 (H - Cys (Trt) - 2 - Cl Trt resin 樹脂、ノババイオケム社製) 30 mg を自動合成機 (島津製作所) の反応容器に入れ、600 μL の DMF を加えて 3 分間攪拌し溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) 30% ピペリジン - DMF 溶液 900 μL を加えて混合物を 4 分間攪拌し、該溶液

50

を排出し、この操作をもう1回繰り返した。

(b) 担体樹脂を900  $\mu$ LのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を5回繰り返した。

(c) Fmoc-Leu-OH (141  $\mu$ mol)、PyBOP (141  $\mu$ mol)、HOBt 1水和物 (141  $\mu$ mol) およびNMM (212  $\mu$ mol) をDMF (494  $\mu$ L) 中で3分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を30分間攪拌し、溶液を排出した。

(d) 担体樹脂を900  $\mu$ LのDMFで1分間洗浄後溶液を排出し、これを5回繰り返した。

こうして、Fmoc-Leu-Cys(Trt) が担体上に合成された。

10

次に、(a)(b)の工程の後、(c)の工程でFmoc-Ala-OHを用いて縮合反応を行い、(d)の洗浄工程を経て、Fmoc-Ala-Leu-Cys(Trt) が担体上に合成された。

以下、工程(c)において、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OHを順次用いて、(a)~(d)を繰り返した後、(a)(b)の脱保護、洗浄工程を経て、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下12時間乾燥して、N末端が無保護であり側鎖が保護されたペプチドの結合した担体樹脂を得た。次に得られた担体樹脂に対し次の(e)~(g)の操作を行った。

20

(e) 担体樹脂を800  $\mu$ LのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を3回繰り返した。

(f) 無水酢酸 (282  $\mu$ mol) 及びDMF (500  $\mu$ L) を樹脂に加えて混合物を2時間攪拌し、溶液を排出した。

(g) 担体樹脂を800  $\mu$ LのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を3回繰り返した。

30

この後、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下12時間乾燥して、N末端がアセチル化された側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、5mg/mLの濃度で2-メチルインドールを含むTFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2-エタンジチオール (2.5%) およびチオフェノール (2%) からなる混合溶液1mLを加えて室温で6時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約10mLを加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして44.6mgを取得した。この粗生成物全量をジチオスレイトールおよびDMFからなる混合溶液に溶解し、逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mmID X 250mm) を用いたHPLCで精製した。0.1% TFA水溶液に、TFA 0.1%を含む90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nmで検出し、化合物1を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物1を1.6mg得た。

40

質量分析 [TOFMS];  $m/z = 2520.7 (M + H^+)$

アミノ酸分析; Glx 7.6 (8), Gly 4.0 (4), Arg 2.9 (3), Ala 2.2 (2), Leu 1.2 (1), Cys 1.7 (1) (2) 免疫原の調製

実施例1(1)で得られたヒトSCGF部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で以下の方法でKLH (カルビオケム社製) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLHをPBSに溶解して10mg/mLに調整し、1/10容量の25mg/mL

50

MBS (ナカライテスク社製) を滴下して30分間攪拌反応させる。あらかじめPBSで平衡化したセファデックスG-25カラムなどのゲルろ過カラムでフリーのMBSを除いて得られたKLH-MB2.5mgを0.1mol/Lリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)に溶解したペプチド1mgと混合し、室温で3時間、攪拌反応させた。反応後、PBSで透析した。

### (3) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例1(2)で調製したペプチド-KLHコンジュゲート100 $\mu$ gをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)1 $\times$ 10<sup>9</sup>細胞とともに5週令雌ラット(SD)に投与し、2週間後より100 $\mu$ gのコンジュゲートを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の(4)に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫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(1,200rpm、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。

### (4) 酵素免疫測定法(バインディングELISA)

アッセイ用の抗原には実施例1(1)で得られたヒトSCGF部分ペプチドをサイログロブリン(以下、THYと略す。)とコンジュゲートしたものをを用いた。作製方法は実施例1(2)に記した通りであるが、架橋剤にはMBSの代わりにSMCC(シグマ社製)を用いた。96穴のEIA用プレート(グライナー社製)に、上述のように調製したコンジュゲートを10 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ L/穴で分注し、4 $\times$ で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA-PBSを100 $\mu$ L/穴に加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、被免疫マウス抗血清、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を50 $\mu$ L/穴で分注し2時間反応させた。tween-PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン(ダコ社製)を50 $\mu$ L/穴に加えて室温、1時間反応させ、tween-PBSで洗浄後ABTS基質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させOD415nmの吸光度をプレートリーダー(E-max; Molecular Devices社製)にて測定した。

### (5) 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 $\times$ 10<sup>7</sup>以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

### (6) ハイブリドーマの作製

実施例1(3)で得られたラット脾細胞と(5)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 $\times$ で、ポリエチレングライコール-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<sup>8</sup>ラット脾細胞を加え、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100mL中に懸濁した。

この懸濁液を96穴培養用プレートに100 $\mu$ L/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 $\times$ で10~14日間、培養した。この培養上清を実施例1(4)に記載した酵素免疫測定法で調べ、ヒトSCGF部分ペプチド(化合物1)に反応して、別のSCGF部分ペプチドである配列番号1の140~156番目のアミノ酸配列からなるペプチドに反応しない穴を選び、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、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2141、KM2142、KM2143、KM2144、KM2145を確立した。

### (7) 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)に実施例1(6)で得られた

10

20

30

40

50

ハイブリドーマ株を  $5 \sim 20 \times 10^6$  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(1～8 mL/匹)し、遠心分離(3,000 rpm、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%硫酸アンモニウムにて塩析し、塩化ナトリウム0.5 M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)(ベクトルボリューム750 mL)のカラムに流速15 mL/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。

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行い決定した(表1)。

(表1)

抗体名	抗体クラス
KM2141	G2a
KM2142	G2a
KM2143	G2a
KM2144	G2a
KM2145	G1

#### (8) ヒトSCGF部分ペプチドとの反応性(酵素免疫測定法)

実施例1(6)で選択された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のヒトSCGF部分ペプチド(化合物1)との反応性を(4)に示した酵素免疫測定法にて調べた。コントロールペプチドとしては、化合物1とは異なるSCGF部分ペプチドである配列番号1の140～156番目のアミノ酸配列からなるペプチドを用いた。第1図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体(KM2141～2145)は化合物1に特異的に反応し、コントロールペプチドには反応しなかった。

#### 実施例2. 動物細胞を用いたヒトSCGFの発現と精製

(1) ヒトSCGF発現用プラスミドpAGE-SCGFの構築およびヒトSCGFの動物細胞での発現

動物細胞用発現ベクターpAGE210(WO96/34016)のHindIII/KpnI処理断片とSCGFタンパク質をコードするDNA[Mio et al., BBRC 249, 124-130(1998)]とを連結することにより、ヒトSCGF発現ベクターpAGE-SCGFを構築した。

動物細胞へのプラスミドの導入は宮地等の方法に従いエレクトロポレーション法[Miyaji et al., Cytotechnology, 3, 133-140(1990)]により行った。4 μgのpAGE-SCGF-aを  $4 \times 10^6$  個のdhfr遺伝子欠損CHO細胞株[Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220(1980)]へ導入した。この細胞を10 mLのMEMa2000-dFCS(5)培地[dFCSを5%、7.5% NaHCO<sub>3</sub>を1/40量、200 mLグルタミン溶液(GIBCO/BRL社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO/BRL社製、5,000単位/mLペニシリンおよび5,000 mg/mLストレプトマイシン含有)を0.5%含むMEMa2000培地(GIBCO/BRL社製)]に懸濁し、10 cmプレート(IWAKI社製)に入れ、37 °CのCO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間培養した。ハイグロマイシン(GIBCO/BRL社製)を終濃度0.3 mg/mLになるよう添加し、さらに1～2週間培養した。形質転換細胞がコンフルエントになった時点で回収し、ハイグロマイシンを0.3 mg/mL、methotrexate(MTX)を50 nmol/L含むMEMa

2000-dFCS(5)培地に $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/mLになるように懸濁し、F75フラスコ(Greiner社製)に2mL分注した。1~2週間の培養後、50nmol/L MTX耐性の細胞を0.3mg/mLハイグロマイシン、200nmol/L MTX含有MEMa2000-dFCS(5)培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mLになるように懸濁し、F75フラスコ(Greiner社製)に2mL分注した。1~2週間の培養後、200nmol/L MTX耐性の細胞を得た。この200nmol/L MTX耐性細胞を下記に示す培地1)および培地2)を用いて、2Lのローラーボトル(Greiner社製)で37、80回転/分で培養を行った。

培地1)無血清Ex-cell 301培地(JRH Biosciences社製)  
培地2)10mg/Lのaprotinin(Sigma社製)を含む無血清Ex-cell 301培地

約5日間の培養後、細胞を遠心分離し、培養上清サンプルを得た。

(2)モノクローナル抗体KM2142を用いたウェスタンブロッティングによる培養上清中のSCGFタンパク質の存在確認

実施例1で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を用いたウェスタンブロッティングにより、前記(1)で得られた培養上清中のSCGFタンパク質の存在を、以下の方法により確認した。

後述(3)および(4)のSCGFタンパク質のクロマトグラフィーによる精製における各精製画分をSDS-PAGEで分離後、P.Matsudairaの方法[J.B.C. 262, 10035-10038(1987)]に従ってPVDF膜(Immobilon Transfer Membranes、ミリポア社製)へ電氣的に転写した。転写膜はブロッキング溶液[1%BSAを含むPBSバッファー(137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 9.6mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH7.2))]中で30分間振盪した後、ブロッキング溶液で1mg/mLに希釈した抗SCGFモノクローナル抗体を含む溶液中で室温60分間振盪した。該転写膜はさらに0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、パーオキシダーゼで標識された抗ラットIgG抗体(anti-rat immunoglobulin 1.3g/L, DAKO社製)をPBSで1/1,000に希釈した溶液中で室温60分間振盪した。0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、発光法(ECL Western blotting detection reagents、アマシャム ファルマシア バイオテック社製)により検出を行った。

(3)CHO細胞培養上清からのヒトSCGFタンパク質の精製

実施例3に記載する抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製を行うために、上記(1)の培地1)の培養条件で得たCHO細胞培養上清から以下の2段階のクロマトグラフィーによって精製ヒトSCGFタンパク質を取得した。

第1段階：亜鉛キレートクロマトグラフィー

$\text{Zn}^{2+}$ イオンで飽和させたChelating Sepharose Fast Flow担体(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)を2.5cm x 20cmのカラム(BioRad社製)に11cmの高さまで充填し、0.5mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で平衡化した。これに上記(1)で得たCHO細胞培養上清2.4Lを添加し、同緩衝液で十分に洗浄後、0~100mmol/Lヒスチジン直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS-PAGEを行い、上記(2)で示したモノクローナル抗体KM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

第2段階：MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー

上記亜鉛キレートクロマトグラフィー粗精製画分に終濃度65%となるように硫酸アンモニウムを添加して攪拌後、4で2時間放置した。18,800xgで30分間遠心分離して得られた沈澱を10mmol/Lトリス塩酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、同トリ

10

20

30

40

50

ス塩酸緩衝液で平衡化したMono Q HR5/5カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に添加した。同緩衝液で十分洗浄後、0~1mol/L塩化ナトリウム直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS-PAGEを行い、上記(2)で示したモノクローナル抗体KM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した(第2図のレーン2)。

(4)CHO培養上清からのヒトSCGFタンパク質の高純度精製

実施例6に記載するヒトSCGF定量系で用いるヒトSCGFタンパク質標準品は、上記(1)の培地2)の培養条件で得たCHO細胞培養上清から以下の3段階のクロマトグラフィーにより精製し、取得した。

#### 第1段階：亜鉛キレートクロマトグラフィー

Zn<sup>2+</sup>イオンで飽和させたChelating Sepharose Fast Flow担体(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)を5.0cm x 20cmのカラム(BioRad社製)に14.5cmの高さまで充填し、0.5mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で平衡化した。これに上記(1)で得たCHO細胞培養上清12Lを添加し、同緩衝液で十分に洗浄後、0~100mmol/Lヒスチジン直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS-PAGEを行い、上記(2)で示したKM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

#### 第2段階：Mono Q陰イオン交換クロマトグラフィー

上記亜鉛キレートクロマトグラフィー粗精製画分に終濃度50%となるように硫酸アンモニウムを添加して攪拌後、4 で2時間放置した。18,800gで30分間遠心分離して得られた沈澱を10mmol/Lトリス塩酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、同トリス塩酸緩衝液で平衡化したMono Q HR10/10カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に添加した。同緩衝液で十分洗浄後、0~1mol/L塩化ナトリウム直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS-PAGEを行い、上記(2)で示したKM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

#### 第3段階：S-400ゲルろ過クロマトグラフィー

Sephacryl S-400 HR担体(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)をXK50/60カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に51.5cmの高さまで充填したカラムとXK50/100カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に93cmの高さまで充填したカラムを直列に連結し、PBSバッファーで十分平衡化した。これに上記Mono Q陰イオン交換クロマトグラフィー精製画分28mLを添加し、6mL/分の流速でPBSバッファーにより溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS-PAGEを行い、上記(2)で示したモノクローナル抗体KM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

(5)ヒトSCGFタンパク質のN末端アミノ酸配列解析

実施例2(3)で得られた精製ヒトSCGFタンパク質のN末端アミノ酸配列はタンパク質化学の常法に従い決定した。精製ヒトSCGFタンパク質を含む画分をSDS-PAGE後、銀染色(第2図レーン2)あるいはP.Matsuda i r aの方法に従ってPVDF膜(ProBlott, アプライド バイオシステムズ社製)へ電氣的に転写した。転写した膜はクマジーブルー染色し、見かけ上分子量が45kDa(第2図レーン2、バンドA)、41kDa(第2図レーン2、バンドB)、34kDa(第2図レーン2、バンドC)の各バンドを切り出し、気相プロテインシーケンサー(PPSQ-10、島津製作所)を用いてメーカー推奨の方法によりアミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列は配列番号5、6、7に記載したように、配列番号1に記載したSCGFのアミノ酸配列のN末端から1アミノ酸残基目、29アミノ酸残基目、60アミノ酸残基目からのアミノ酸配列にそれぞれ一致した。以下、第2図レーン2に示した見かけ分子量約41kDaのN末端28残基欠失SCGFタンパク質を28体、約34kDaのN末端59残基欠

10

20

30

40

50

失SCGFタンパク質を59体と称する。

### 実施例3 . CHO細胞発現ヒトSCGF蛋白質を用いた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製

#### (1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例2(3)で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質(SCGF、28体、59体のSCGF混合物)100 $\mu$ gをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)1 $\times$ 10<sup>9</sup>細胞とともに6週令雌マウス(Balb/c)に投与し、2週間後より100 $\mu$ gのヒトSCGF蛋白質を1週間に1回、計3回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を実施例1(4)で示した酵素免疫測定法(ただしアッセイ用の抗原にはCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質、コントロール抗原として

10

1%BSA-PBSを用いた。)および以下に示すサンドイッチELISA法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

抗体産生細胞の調製は実施例1(3)と同様に行った。

#### (2) サンドイッチELISA法

96穴のEIAプレート(グライナー社製)に実施例1で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を10 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ L/穴で分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA-PBSを100 $\mu$ L/穴に加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を5 $\mu$ g/mLで1%BSA-PBS希釈したものを50 $\mu$ L/穴で分注し、室温2時間反応させた。対象として1%BSA-PBSを50 $\mu$ L/穴分注し、

20

同様に反応させた。tween-PBSで洗浄後、上記(1)で得られた被免疫マウス抗血清の培養上清を50 $\mu$ L/穴で分注し、2時間反応させた。tween-PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン(ラット血清蛋白吸収済み;カルタグ社製)を50 $\mu$ L/穴で加えて室温で1時間反応させた。tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2.2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させOD415nmの吸光度をプレートリーダー(Emax;Molecular Devices社製)にて測定した。

(3) マウス骨髄腫細胞の調製

実施例1(5)と同様に調製を行った。

#### (4) ハイブリドーマの作製

実施例1(6)と同様に実施例3(1)で得られたマウス脾細胞と(3)で得られた骨髄腫細胞との細胞融合を行った。

30

得られた細胞懸濁液を96穴培養用プレートに100 $\mu$ L/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで10~14日間、培養した。この培養上清を実施例3(2)に記載したサンドイッチELISA法で調べ、ヒトSCGF蛋白質に反応してコントロールである1%BSA-PBSに反応しない穴を選び、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、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2801、KM2802、KM2803およびKM2804を確立した。

#### (5) モノクローナル抗体の精製

実施例1(7)と同様に実施例3(4)で得られたハイブリドーマ株をヌード雌マウスに腹腔内投与を行い、得られた腹水より精製モノクローナル抗体を取得した。

40

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行い、決定した。その結果を表2に示す。

(表 2)

抗体名	抗体クラス
K M 2 8 0 1	G 1
K M 2 8 0 2	G 1
K M 2 8 0 3	G 1
K M 2 8 0 4	G 1

## (6) CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質との反応性(酵素免疫測定法)

実施例3(4)で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のCHO細胞発現ヒトSCGF蛋白質との反応性を実施例1(4)に示した酵素免疫測定法にて調べた。第3図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体(KM2801、KM2802、KM2803およびKM2804)はCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質に特異的に反応し、コントロールの1%BSA-PBSには反応しなかった。

10

## 実施例4. SDS変性ヒトSCGFタンパク質(CHO細胞発現)を用いた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製

実施例3記載の未変性ヒトSCGF蛋白質を免疫原に用いた場合には、59体に反応するモノクローナル抗体は得られなかった。そこで、59体に反応するモノクローナル抗体を作製するため、SDS変性SCGFを免疫原に用いてハイブリドーマの作製を試みた。

20

## (1) 免疫原の調製

実施例2(3)で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質をSDS(ラウリル硫酸ナトリウム;ナカライテスク社製)を加えて変性させたものを作製し、免疫原とした。すなわち5%SDS-PBSを調製し、CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質に9分の1量加え、100で5分間煮沸したものをSDS変性ヒトSCGFタンパク質とした。

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例4(1)で得られたSDS変性ヒトSCGFタンパク質100 $\mu$ gをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)1 $\times$ 10<sup>9</sup>細胞とともに6週令雌マウス(Balb/c)に投与し、2週間後より100 $\mu$ gのSDS変性ヒトSCGFタンパク質を1週間に1回、計3回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を実施例1(4)で示した酵素免疫測定法(ただしアッセイ用の抗原にはSDS変性ヒトSCGF蛋白質、コントロール抗原として1%BSA-PBSを用いた。)で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

30

抗体産生細胞の調製は実施例1(3)に記載の方法と同様に行った。

## (3) マウス骨髄腫細胞の調製

実施例1(5)に記載の方法と同様の調製を行った。

## (4) ハイブリドーマの作製

実施例1(6)と同様にして、実施例4(2)で得られたマウス脾細胞と(3)で得られた骨髄腫細胞との細胞融合を行った。

得られた細胞懸濁液を96穴培養用プレートに100 $\mu$ L/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37で10~14日間、培養した。この培養上清を実施例1(4)で示した酵素免疫測定法で調べ、SDS変性ヒトSCGF蛋白質に反応してコントロールである1%BSA-PBSに反応しない穴を選び、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抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2941、KM2942、KM2943、KM2944およびKM2945を確立した。

40

## (5) モノクローナル抗体の精製

実施例1(7)と同様に実施例4(4)で得られたハイブリドーマ株をヌード雌マウスの腹腔内投与を行い、得られた腹水より精製モノクローナル抗体を取得した。

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行い、決定した。その結果を表3に示す。

50

(表 3)

抗体名	抗体クラス
K M 2 9 4 1	G 1
K M 2 9 4 2	G 1
K M 2 9 4 3	G 1
K M 2 9 4 4	G 1
K M 2 9 4 5	G 1

## (6) SDS変性ヒトSCGFタンパク質との反応性(酵素免疫測定法)

10

実施例4(4)で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のSDS変性ヒトSCGFタンパク質との反応性を実施例1(4)に示した酵素免疫測定法にて調べた。第4図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体(KM2941、KM2942、KM2943、KM2944およびKM2945)はSDS変性ヒトSCGFタンパク質に特異的に反応し、コントロールの1%BSA-PBSには反応しなかった。

## 実施例5. 抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の反応性の検討

## (1) ヒトおよびマウスSCGFタンパク質に対する反応性

実施例1、3および4で作製された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のヒトおよびマウスSCGFタンパク質に対する反応性を酵素免疫測定法(バインディングELISA)で検討した。マウスSCGFタンパク質は実施例2記載の方法に準じて作製した。

20

アッセイ用の抗原としてCHO細胞発現ヒトおよびマウスSCGFタンパク質を用い、実施例1(4)に記載の方法により行った。結果を第5図に示す。

抗SCGFモノクローナル抗体KM2142は配列番号1に示すSCGFのアミノ酸配列のN末端から6残基目から25残基目までに相当する部分ペプチド(化合物1)を抗原に用いて作製されたハイブリドーマ由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2142は、SCGFタンパク質に対する反応性をも有していることが示された。また、抗SCGFモノクローナル抗体KM2142はヒトおよびマウスSCGFタンパク質の両方に反応性を有していた。

抗SCGFモノクローナル抗体KM2804はCHO細胞発現ヒトSCGFを抗原に用いて作製したハイブリドーマ由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2804はヒトSCGFにのみ反応し、マウスSCGFに対する交叉反応性は示さなかった。

30

抗SCGFモノクローナル抗体KM2945はSDS変性SCGFタンパク質(CHO細胞発現)を抗原に用いて作製したハイブリドーマ由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2945は、未変性のSCGFタンパク質に対する反応性をも有していることが示された。また、抗SCGFモノクローナル抗体KM2945はマウスSCGFに対する交叉反応性は示さなかった。

## (2) ウェスタンブロッティング

実施例2(3)で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を用い、実施例3および4で作製された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2804およびKM2945のウェスタンブロッティングにおける反応性を検討した。

40

実施例2(2)と同様にPVDF膜に転写したサンプルを、ブロッキング溶液中で室温30分間振盪後、ブロッキング溶液で1mg/mLに希釈した抗SCGFモノクローナル抗体で室温60分間振盪した。転写膜はさらに0.05% tween 20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、PBSで1/1,000に希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(アマシャムファルマシア バイオテック社製)溶液中で室温60分間振盪した。0.05% tween 20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、上述のECL発光法により検出した。

第2図におけるレーン3、4、5はそれぞれKM2142、KM2804、KM2945を用いた精製ヒトSCGFタンパク質のウェスタンブロッティング結果を示す。KM28

50

04はN末端59残基欠失SCGFタンパク質である。59体には反応性を有していないが、全長SCGFおよびN末端28残基欠失SCGFタンパク質である。28体には反応性を有していた。また、KM2945は全長SCGFおよび欠失体のいずれも反応性を有していた。

#### 実施例6. ヒトSCGF定量系

実施例1で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を以下の方法によりビオチン標識した。実施例1で得られたKM2142精製抗体をPBSで1mg/mLに希釈し、1/4容量の0.5mol/L炭酸バッファー(pH9.2)を加えた。さらにバッファーと同量のNHS-Lc-Biotin(1mg/mLにジメチルホルムアミドにて溶解;ピラス社製)を攪拌下滴下した。3時間、室温で攪拌反応を行った後、PBSで一晩透析したものをビオチン標識KM2142として用いた。

96穴のEIA用プレート(グライナー社製)に、実施例3で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2804を5μg/mL、50μL/穴で分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA-PBSを100μL/穴に加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、実施例2(4)で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を血清希釈液(協和メデックス社製)で17.5ng/mLから2倍希釈系列で14点希釈したものを50μL/穴で分注し室温で2時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、上記で得られたビオチン標識KM2142(0.2μg/mLにBSA-PBSにて希釈)を50μL/穴で加えて室温、2時間反応させ、Tween-PBSで洗浄後、さらにアルカリフォスファターゼ標識アビジン(ザイメッド社製)を32,000倍希釈で50μL/穴で加えて室温、1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、AmpliQ(DAKO社製)を用いて発色させOD490nmの吸光度をプレートリーダー(E-max;Molecular Devices社製)にて測定した。その結果、第6図に示すように、本定量系によりヒトSCGFタンパク質を0.04~2.0ng/mLの範囲で定量することが可能であった。

#### 実施例7. 白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の血清SCGF濃度

インフォームドコンセントを得た白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の血清中のSCGF濃度を実施例6の方法で測定した。また血球検査値が正常値を示す男女10名の健常人を対象例として同じく血清中のSCGF濃度を測定した。その結果を第7図に示す。

健常人の値の分布が正規分布を示すことを確認した後、この群より平均値とスタンダードデビエーション(SD)を計算し、平均値+2SDの値を正常と異常とを区別する基準値に設定した。この基準値をもとに、白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の値を正常・異常に分別し、白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患がSCGF測定値で検出可能か否かを確認した。その結果を表4に示す。

(表 4)

	患者数	陽性者数	陽性率(%)
A L L	7	7	100.0
A M L	7	6	85.7
C M L	6	6	100.0
M D S	5	5	100.0
N H L	7	6	85.7
M M	6	4	66.7
A A	7	0	0.0

カットオフ値は健常人の平均値+2SD=18.2ng/mL

とした。

健常人群に比較し、急性骨髄性白血病 (A M L)、急性リンパ性白血病 (A L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、骨髄異形成症候群 (M D S)、非ホジキンリンパ腫 (N H L)、多発性骨髄腫 (M M) の患者の中央値は有意に高く、S C G F 測定値がこれら疾患で有意に上昇していることが示された (第 7 図)。

また健常人の値から定めたカットオフ値を用いて白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患を高い感度で検出できることが示された (表 4)。一方、同じ血液疾患でありながら、再生不良性貧血 (A A) 患者の値は健常人との有意差が観察されず、またカットオフ値を用いてもこの疾患を検出出来なかった。

血液細胞数の異常を伴う疾患である非ホジキンリンパ腫 (N H L)、多発性骨髄腫 (M M)、骨髄異形成症候群 (M D S)、急性骨髄性白血病 (A M L)、急性リンパ性白血病 (A L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L) を比較すると、急性骨髄性白血病 (A M L)、急性リンパ性白血病 (A L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L) などの白血病患者の F 血液中 S C G F 濃度は、非ホジキンリンパ腫 (N H L)、多発性骨髄腫 (M M)、骨髄異形成症候群 (M D S) などの他の前白血病や非白血病性悪性血液疾患患者の血液中 S C G F 濃度に比較して有意に高く、血液中 S C G F 濃度は白血病と前白血病や非白血病性悪性血液疾患との判別に利用可能であった。また、判別診断の難しい A A 患者と M D S 患者を比較してみると、M D S 患者血中 S C G F 濃度は A A 患者のそれと比較して有意に高く、両者を血中 S C G F 濃度で判別診断することが可能であった。

#### 実施例 8 . 造血幹細胞移植後 G V H D 発症と S C G F 濃度

インフォームドコンセントを得た白血病および前白血病患者で造血幹細胞移植を受けた 23 例の内、G V H D を発症した例 15 例、発症しなかった例 8 例の血清中 S C G F 濃度を実施例 6 の方法を用いて各ステージ毎に測定した。その結果を第 8 図に示す。

造血幹細胞移植を受けた患者の S C G F 濃度はプレーコンディショニング期やアプラスチック期に比べ、リカバリー期やステイブル期の方が有意に高値を示した。

造血幹細胞移植を受けた患者のうち、G V H D を発症した症例は発症しなかった例に比べ、アプラスチック期およびリカバリー期において有意に血清中 S C G F 濃度が高いので、血清中の S C G F 濃度を測定することによって、G V H D 発症を判定可能であった。

さらにカットオフ値を定めて G V H D 発症例と非発症例とを判定できないかを検討した。その結果を第 9 図に示す。プレーコンディショニング期においては、カットオフ値を例えば 5 n g / m L に定めることにより感度 87%、特異度 57% で、アプラスチック期においてはカットオフ値を 10 n g / m L に定めることで感度 87%、特異度 63% で、リカバリー期ではカットオフ値を 15 n g / m L に定めることで感度 87%、特異度 63% で、それぞれ S C G F 濃度を測定し、これを診断に用いなかった時に比べて有意 ( p < 0 . 05 ) に G V H D 発症例と非発症例とを判別 G V H D 可能であった。

20

30

40

50

**実施例 9 . 移植造血幹細胞の生着と血清 S C G F 濃度**

インフォームドコンセントを得た血液疾患患者で造血幹細胞移植を受けた 23 例のうち、生着が遅延した例 4 例、遅延しなかった例 19 例の血清中 S C G F 濃度を実施例 6 の方法を用いて各ステージ毎に測定した。結果を第 10 図に示す。

生着非遅延例では、リカバリー期およびステイブル期の S C G F 濃度は、プレーコンディショニング期に比して有意に上昇した。一方、生着遅延例では、これらの期においても有意な上昇は観察されなかった。

そこで、造血幹細胞移植患者の S C G F 濃度を測定し、そのカットオフ値を定めてその値と個々患者の値比較から造血幹細胞生着遅延例と非遅延例を判定できないかを検討した。その結果を第 11 図に示す。プレーコンディショニング期においては、カットオフ値を例えば 9 . 5 n g / m L に定めることにより感度 75 %、特異度 67 % で、アプラスチック期においてはカットオフ値を 12 n g / m L に定めることで感度 75 %、特異度 63 % で、造血幹細胞生着遅延例と非遅延例とを判別することが可能であった。

**実施例 10 . 白血病患者の末梢血細胞における S C G F の発現**

インフォームドコンセントを得た種々の白血病患者の末梢血細胞を R n e a s y M i n i K i t ( Q i a g e n 社製) を用い、プロトコールにしたがって全 RNA を抽出し、全 RNA 1 μ g を D N a s e I ( G I B C O 社製) 処理し、S u p e r S c r i p t F i r s t - S t r a n d S y n t h e s i s S y s t e m f o r R T - P C R ( G I B C O 社製) を用いて逆転写し、F i r s t - S t r a n d D N A を調製した。T a q P o l y m e r a s e ( T a K a R a 社製) を用い、調製した F i r s t - S t r a n d D N A を鋳型とし、配列番号 8 および 9 ならびに配列番号 10 および 11 の塩基配列を有するオリゴ DNA をプライマーとして、それぞれ、ヒト G 3 P D H、S C G F 遺伝子の検出を検討したところ、G 3 P D H の検出量がほぼ同等となる条件下で、健常人 1 人では、S C G F の発現を検出できなかったが、急性リンパ性白血病 ( A L L ) 2 例中 1 例、急性骨髄性白血病 ( A M L ) 2 例中 2 例で S C G F の発現が検出された。

**産業上の利用可能性**

本発明は、S C G F に反応する抗体を用いた、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法、造血幹細胞移植後の造血幹細胞生着遅延および移植片対宿主反応病を判定する方法、およびそれらの診断薬ならびに診断キットを提供する。

**【配列表】**

10

20

30



Val Glu Gly Lys Glu Asp Trp Glu Met Glu Glu Asp Gln Gly Glu Glu  
 50 55 60

Glu Glu Glu Glu Ala Thr Pro Thr Pro Ser Ser Gly Pro Ser Pro Ser  
 65 70 75 80

Pro Thr Pro Glu Asp Ile Val Thr Tyr Ile Leu Gly Arg Leu Ala Gly  
 85 90 95

Leu Asp Ala Gly Leu His Gln Leu His Val Arg Leu His Ala Leu Asp  
 100 105 110

Thr Arg Val Val Glu Leu Thr Gln Gly Leu Arg Gln Leu Arg Asn Ala  
 115 120 125

Ala Gly Asp Thr Arg Asp Ala Val Gln Ala Leu Gln Glu Ala Gln Gly  
 130 135 140

Arg Ala Glu Arg Glu His Gly Arg Leu Glu Gly Cys Leu Lys Gly Leu  
 145 150 155 160

Arg Leu Gly His Lys Cys Phe Leu Leu Ser Arg Asp Phe Glu Ala Gln  
 165 170 175

Ala Ala Ala Gln Ala Arg Cys Thr Ala Arg Gly Gly Ser Leu Ala Gln  
 180 185 190

Pro Ala Asp Arg Gln Gln Met Glu Ala Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ala  
 195 200 205

Ala Leu Ala Pro Tyr Asn Trp Pro Val Trp Leu Gly Val His Asp Arg  
 210 215 220

Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Leu Phe Glu Asn Gly Gln Arg Val Ser Phe  
 225 230 235 240

Phe Ala Trp His Arg Ser Pro Arg Pro Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ser

245

250

255

Ala Ser Pro His Pro Leu Ser Pro Asp Gln Pro Asn Gly Gly Thr Leu

260

265

270

Glu Asn Cys Val Ala Gln Ala Ser Asp Asp Gly Ser Trp Trp Asp His

275

280

285

Asp Cys Gln Arg Arg Leu Tyr Tyr Val Cys Glu Phe Pro Phe

290

295

300

<210> 2

<211> 224

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Arg Gly Ala Glu Arg Glu Trp Glu Gly Gly Trp Gly Gly Ala Gln

1

5

10

15

Glu Glu Glu Arg Glu Arg Glu Ala Leu Met Leu Lys His Leu Gln Glu

20

25

30

Ala Leu Gly Leu Pro Ala Gly Arg Gly Asp Glu Asn Pro Ala Gly Thr

35

40

45

Val Glu Gly Lys Glu Asp Trp Glu Met Glu Glu Asp Gln Gly Glu Glu

50

55

60

Glu Glu Glu Glu Ala Thr Pro Thr Pro Ser Ser Gly Pro Ser Pro Ser

65

70

75

80

Pro Thr Pro Glu Asp Ile Val Thr Tyr Ile Leu Gly Arg Leu Ala Gly  
                                   85                                  90                                  95

Leu Asp Ala Gly Leu His Gln Leu His Val Arg Leu His Ala Leu Asp  
                                   100                                  105                                  110

Thr Arg Val Val Glu Leu Thr Gln Gly Leu Arg Gln Leu Arg Asn Ala  
                                   115                                  120                                  125

Ala Gly Asp Thr Arg Asp Ala Val Gln Ala Leu Gln Glu Ala Gln Gly  
                                   130                                  135                                  140

Arg Ala Glu Arg Glu His Gly Arg Leu Glu Gly Cys Leu Lys Gly Leu  
                                   145                                  150                                  155                                  160

Arg Leu Gly His Lys Cys Phe Leu Leu Ser Arg Asp Phe Glu Ala Gln  
                                   165                                  170                                  175

Pro Ser Ala Ser Pro His Pro Leu Ser Pro Asp Gln Pro Asn Gly Gly  
                                   180                                  185                                  190

Thr Leu Glu Asn Cys Val Ala Gln Ala Ser Asp Asp Gly Ser Trp Trp  
                                   195                                  200                                  205

Asp His Asp Cys Gln Arg Arg Leu Tyr Tyr Val Cys Glu Phe Pro Phe  
                                   210                                  215                                  220

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr  
 1 5 10 15

Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr  
 20 25 30

Val Pro Gly Met Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met  
 35 40 45

Val Val Gln Leu Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser  
 50 55 60

Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val  
 65 70 75 80

Asn Ile Val Asp Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser Lys  
 85 90 95

Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr Pro  
 100 105 110

Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp  
 115 120 125

Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr Leu  
 130 135 140

Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu  
 145 150 155 160

Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn  
 165 170 175

Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp Ser Ser Leu His Trp Ala Ala  
 180 185 190

Met Ala Leu Pro Ala Leu Phe Ser Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly  
 195 200 205

Ala Leu Tyr Trp Lys Lys Arg Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val Glu  
 210 215 220

Asn Ile Gln Ile Asn Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu  
 225 230 235 240

Lys Glu Arg Glu Phe Gln Glu Val  
 245

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Glu Trp Glu Gly Gly Gly Trp Gly Gly Ala Gln Glu Glu Glu Arg  
 1 5 10 15

Glu Arg Glu Ala Leu Cys  
 20

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Arg Gly Ala Glu Arg Glu Trp Glu Gly  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> unsure  
 <222> (1)  
 <223> Xaa is unsure

<400> 6  
 Xaa Leu Gln Glu Ala Leu Gly Leu Pro Ala  
 1                    5                    10

<210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 Asp Gln Gly Glu Glu Glu Glu Glu Ala  
 1                    5                    10

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<400> 8  
 cccatcacca tcttccagga gc

22

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ttcaccaccl tcttgaigtc atcata

26

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

glccctctttt cccctcaaca

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

ttttgggggc ttgggtgg

18

【図面の簡単な説明】

30

第1図は、モノクローナル抗体のヒトSCGF部分ペプチド（化合物1）に対する反応性を示す図である（バインディングELISA）。

第2図は、精製ヒトSCGFタンパク質のSDS-PAGEとウェスタンブロッティング結果を示す。レーン1および2は分子量マーカースと精製ヒトSCGFタンパク質のSDS-PAGEパターンを示す。レーン3、4、5はそれぞれKM2142、KM2804、KM2945を用いた精製ヒトSCGFタンパク質のウェスタンブロッティング結果を示す図である。

1：分子量マーカのレーン

2：精製SCGFを解析し、銀染色したレーン

3：抗SCGF抗体KM2142を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

4：抗SCGF抗体KM2804を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

5：抗SCGF抗体KM2945を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

A：SCGFタンパク質の分子量を示す。

B：N末端28残基欠失SCGFタンパク質 28体の分子量を示す。

C：N末端59残基欠失SCGFタンパク質 59体の分子量を示す。

第3図は、モノクローナル抗体の、CHO細胞発現ヒトSCGF蛋白に対する反応性を示す図である（バインディングELISA）。

第4図は、モノクローナル抗体の、SDS変性ヒトSCGF蛋白（CHO細胞発現）に対する反応性を示す図である（バインディングELISA）。

40

50

第5図は、モノクローナル抗体の、ヒトおよびマウスSCGF蛋白（CHO細胞発現）に対する反応性を示す。（バインディングELISA）

第6図は、モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによるヒトSCGF蛋白の定量曲線を示す図である。

第7図は、各種血液疾患患者血清中SCGF濃度を示す。横実線は各種血液疾患群の中央値を、横点線は健常人群から求めたカットオフ値（ $18.2 \text{ ng/mL}$ ）を示す図である。

。

\*：Normal（健常人群）あるいはAA（再生不良性貧血群）との有意差  $p < 0.05$ 、

#：NHL（非ホジキンリンパ腫）との有意差  $P < 0.05$ 、\$：MM（多発性骨髄腫）との有意差  $p < 0.05$

第8図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度によるGVHD発症および非発症の差を示す図である。横実線は各群の中央値を示す。

\*：GVHD非発症例との有意差  $p < 0.05$ 、

#：プレ-コンディショニング期との有意差  $p < 0.05$ 、

\$：アプラスチック期との有意差  $p < 0.05$ 、

&：リカバリー期との有意差  $p < 0.05$

第9図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度とGVHD発症患者の検出感度、非発症患者の特異度との関係を示す図である。：感度、：特異度、縦点線は仮のカットオフ値を示す。

第10図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度による生着遅延および非遅延の差を示す図である。横実線は各群の中央値を示す。

#：プレ-コンディショニング期との有意差  $p < 0.05$ 、

\$：アプラスチック期との有意差  $p < 0.05$ 、

&：リカバリー期との有意差  $p < 0.05$

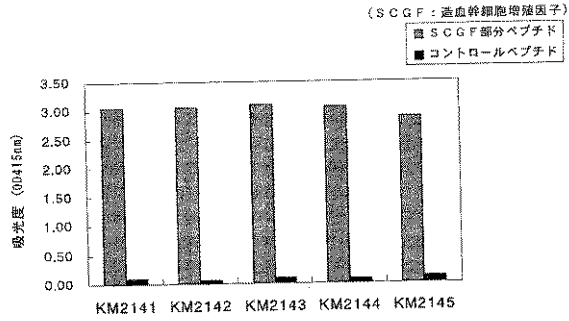
第11図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度と造血幹細胞生着遅延例の検出感度、非遅延例の特異度との関係を示す図である。：感度、：特異度、縦点線は仮のカットオフ値を示す。

10

20

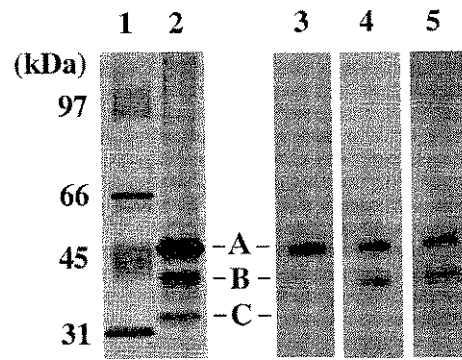
【 図 1 】

第 1 図



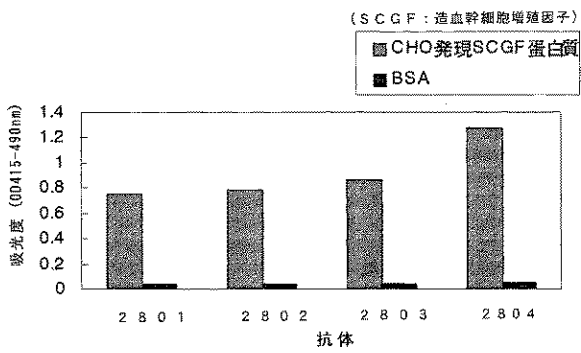
【 図 2 】

第 2 図



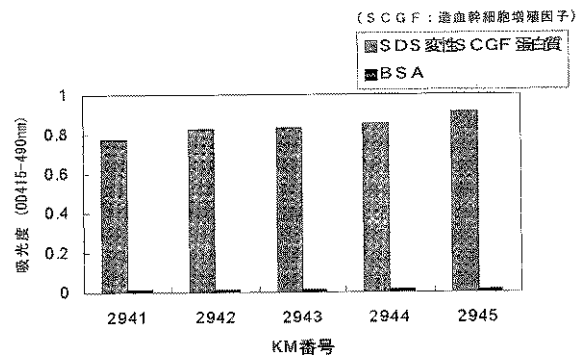
【 図 3 】

第 3 図



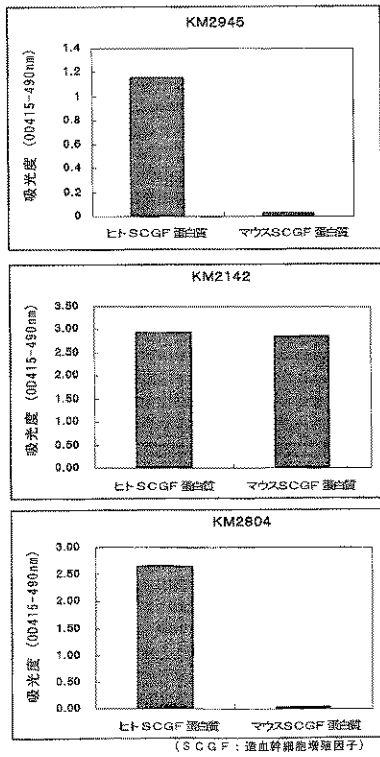
【 図 4 】

第 4 図



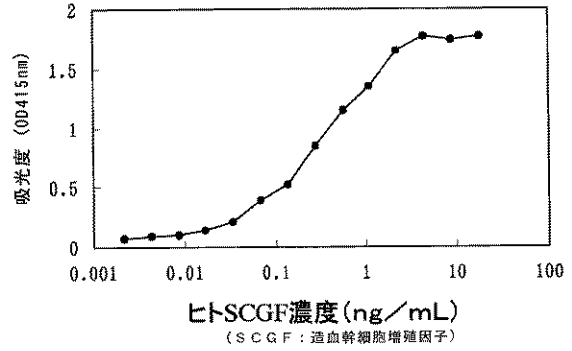
【 図 5 】

第 5 図



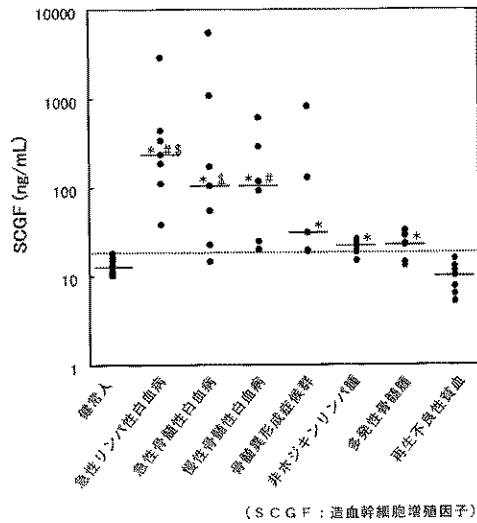
【 図 6 】

第 6 図



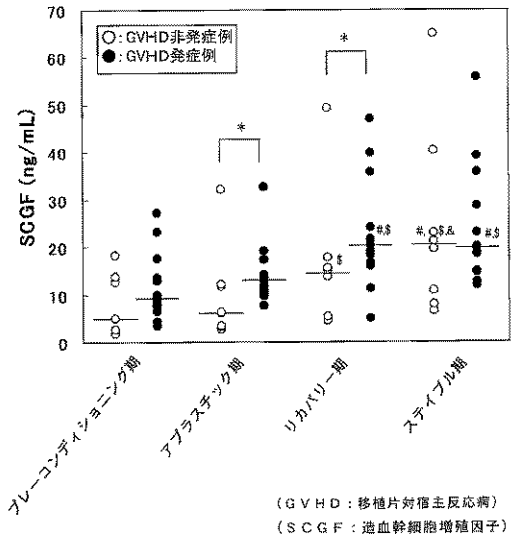
【 図 7 】

第 7 図



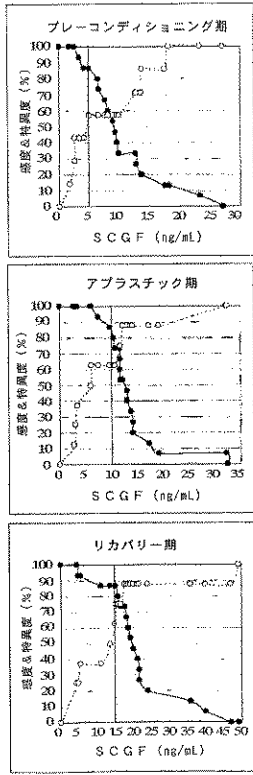
【 図 8 】

第 8 図



【 図 9 】

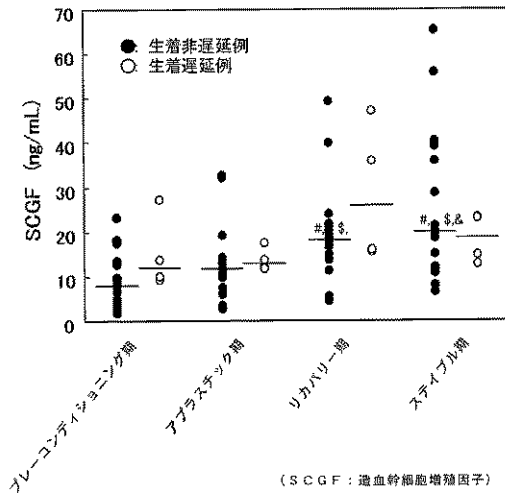
第 9 図



(SCGF : 造血幹細胞増殖因子)

【 図 10 】

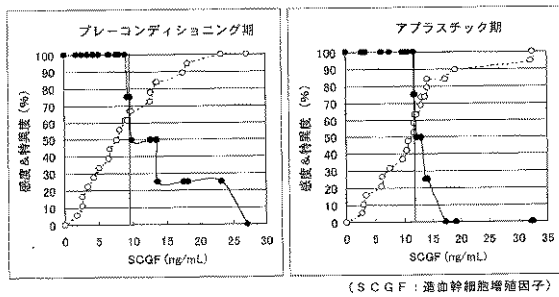
第 10 図



(SCGF : 造血幹細胞増殖因子)

【 図 11 】

第 11 図



(SCGF : 造血幹細胞増殖因子)

【手続補正書】

【提出日】平成16年11月1日(2004.11.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】 明細書

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法、再生不良性貧血と骨髓異形成症候群とを判別する方法、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の状態を判定する方法、または移植片対宿主反応病を判定する方法に関する。また、造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を有効成分として含有してなる白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態または移植片対宿主反応病の診断薬および診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

20

白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患の診断、または白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患の治療後の診断は、白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患を治療するための方針を決定するのに重要である。

【0003】

白血病の初発の診断としては、患者の末梢血中の白血球数を測定し、計測値が正常値を上回る場合に白血病の発生を疑う方法があげられる。しかしながら、風邪などの白血病以外の疾患であっても、体内の免疫反応の亢進により白血球数は増大するので、白血球数の測定だけでは、擬陽性の可能性がある。また、末梢血中の白血球数の正常値は、4,000~8,000個/ $\mu$ Lと幅が広く、擬陰性の可能性がある。そこで、より確度の高い白血病の診断方法が求められている。

【0004】

30

白血病再発の診断方法としては、WT 1遺伝子のRT PCRによる検出がある[臨床病理48,155(2000)、Blood, 84, 3071 (1994)、日本特許第3122771号]。しかしながら、該診断方法は操作が煩雑であるとともに、特殊な装置を必要としている。

【0005】

また、上述の白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患、先天性代謝疾患、固形癌等の治療方法の一つとして、造血幹細胞移植療法があげられる。造血幹細胞移植療法の問題点としては、提供者の造血幹細胞と患者の造血幹細胞とのHLAタイプの不適合、患者側の体調や感染症等などにより、移植した造血幹細胞が生着しない、造血幹細胞の生着が遅延する、移植片対宿主反応病(以下、GVHDと称する)を発症するなど、造血幹細胞移植治療の効果が十分に得られないことがあげられ、最悪の場合、死の転帰をとることもある。

40

【0006】

造血幹細胞の生着遅延に対しては、G-CSFを生体内に投与することにより、造血幹細胞の生着を促進させることができる。また、GVHDに対しては、免疫抑制剤を生体内に投与することにより、提供された造血幹細胞の拒絶反応を抑制させることができる。しかしながら、いずれの薬剤も過剰に投与した場合には、副作用が懸念される。そのため、造血幹細胞の生着状態、GVHD発症を診断あるいは予知することは治療方針の決定に重要である。

【0007】

造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着を確認する方法としては、末梢血中の白血球数や血小板数を測定し、それらの測定値が上昇すれば造血幹細胞が生着したことを診断するこ

50

とができる。しかしながら、造血幹細胞の生着は、移植後10日から1ヶ月以上を要する事もあるため、末梢血中の白血球数や血小板数を測定することでは早期に造血幹細胞の生着を判断することができない。

【 0 0 0 8 】

GVHD発症の判定方法としては、造血幹細胞移植後のリカバリー期に現れる皮膚の発疹等を観察することがあげられる。しかしながら、簡便で確度の高いGVHD発症の判定方法は知られていない。さらにGVHD発症以前にGVHDの発症を予知する方法は知られていない。

【 0 0 0 9 】

ヒト造血幹細胞増殖因子 (Stem Cell Growth Factor ; 以下、SCGFと略記する) は、配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質である [ WO98/08869、Proc . Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7577 (1997)、Biochem. Biophys. Res. Comm., 249, 124 (1998) ] 。

【 0 0 1 0 】

SCGFを認識する抗体としては、遺伝子組換え法により得られたSCGF、ならびにSCGFのN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原として調製したポリクローナル抗体および細胞培養上清から部分精製されたSCGFや遺伝子組換え法により得られたSCGFを免疫原として調製したモノクローナル抗体が知られている [ WO98/08869 ] 。

該モノクローナル抗体が中和活性を有すること、また遺伝子組換え法により得られたSCGFを免疫原として調製したポリクローナル抗体がELISAで遺伝子組換え法により得られたSCGFと反応すること、SCGFのN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原として調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより遺伝子組換え法により得られたSCGFを検出できることが報告されている。

【 0 0 1 1 】

また、SCGFのN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原とした抗SCGFモノクローナル抗体KM2142が報告されている [ The Hematology Journal, 2, 307 (2001) ] 。

【 0 0 1 2 】

ヒト正常組織に対してノーザンブロッティングを行った結果、SCGF遺伝子の発現は腎臓に多く、心臓に少なく、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、膵臓では発現が見られないこと [ Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7577 (1997) ]、脾臓、胸腺、盲腸、骨髄、胎児肝に多く、末梢血に少ないこと [ Biochem. Biophys. Res. Comm., 249, 124 (1998) ] が知られている。また、正常新生児マウスにインサイテュハイブリダイゼーションを行った結果、骨髄、増殖軟骨、骨膜付近にSCGFが発現していることが報告されている [ The Hematology Journal, 2, 307 (2001) ] 。

【 0 0 1 3 】

さらに、骨髄細胞株(HT60、KPB M15)、単核球細胞株(THP 1、U 937)、赤芽球細胞株(HEL)、繊維芽細胞株(NHF)でSCGF遺伝子の発現が見られるが、B細胞株(U266B1、IM 9)、T細胞株(MOLT 4)、赤芽球細胞株(K562)、上皮系癌細胞株(HeLaS3、A431)、メラノーマ細胞株(Bowes)、アデノウイルス形質転換胎生腎臓細胞株(293)、繊維芽細胞株(CCD 8Lu)では、SCGF遺伝子の発現が見られないことが報告されている [ Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7577 (1997) ] 。

【 0 0 1 4 】

しかし、正常及び血液疾患の、或いは造血幹細胞移植を受けたヒトを含む動物の末梢血、骨髄中の血球細胞でのSCGFのmRNA量の差異に関する報告は無い。

組織や細胞のmRNAとコードされるタンパク質の量との相関は低く (相関係数 = 0.48) [ Electrophoresis, 18, 533 (1997) ]、SCGFのmRNA量からSCGF蛋白質量を推定する事も困難である。

【 0 0 1 5 】

以上のように、ヒトを含む動物の血清、血漿などの体液および組織中のSCGF蛋白質の存在、機能、疾患との関係については明らかにされていない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 6 】

本発明の目的は、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の判定、白血病と前白血病または非白血病性悪性血液疾患との判別、再生不良性貧血と骨髓異形成症候群との判別、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態およびGVHDを判定する方法、および白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態およびGVHDの診断薬ならびに診断キットを提供することにある。

## 【 発明の開示 】

## 【 0 0 1 7 】

本発明は以下(1)～(20)に関する。

(1) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法。 10

(2) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法。

(3) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、再生不良性貧血と骨髓異形成症候群とを判別する方法。

(4) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の状態を判定する方法。

(5) 生体試料中の造血幹細胞増殖因子(SCGF)を定量することを特徴とする、移植片対宿主反応病を判定する方法。

(6) 判定または判別する方法が、免疫学的測定方法である、上記(1)～(5)のいずれか1項に記載の方法。 20

(7) 免疫学的測定方法が、サンドイッチ法である、上記(6)項に記載の方法。

(8) サンドイッチ法が、造血幹細胞増殖因子(SCGF)の異なるエピトープに反応する2種類の抗体を用いることを特徴とする、上記(7)記載の方法。

(9) 抗体が、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体から選ばれる抗体である上記(8)記載の方法。

(10) モノクローナル抗体が、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体からなる群から選ばれるモノクローナル抗体である、上記(9)記載の方法。 30

(11) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を有効成分として含有してなる白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の診断薬。

(12) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を有効成分として含有してなる造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態の診断薬。

(13) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を有効成分として含有してなる移植片対宿主反応病の診断薬。

(14) 抗体が、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体から選ばれる抗体である上記(11)～(13)のいずれか1項に記載の診断薬。

(15) モノクローナル抗体が、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体からなる群から選ばれるモノクローナル抗体である、上記(14)記載の診断薬。 40

(16) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を含む、白血病、前白血病あるいは非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態または移植片対宿主反応病の診断用キット。

(17) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)を含む、上記(16)記載の診断用キット。

(18) 配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体。 50

(19) 配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体。

(20) 上記(18)または(19)項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明は、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法に関する。

【0019】

白血病としては、造血系細胞のうち造血細胞などの未熟な細胞が腫瘍化されたものであればいかなるものも包含するが、急性リンパ性白血病(以下、ALLと称する)、急性骨髄性白血病(以下、AMLと称する)、慢性骨髄性白血病(以下、CMLと称する)などがあげられる。

10

【0020】

前白血病としては、造血系細胞のうちリンパ球などの成熟な細胞が腫瘍化されたものであればいかなるものも包含されるが、骨髄異形性症候群(以下、MDSと称する)などがあげられる。

【0021】

非白血病性悪性血液疾患としてリンパ腫や骨髄腫などがあげられる。

リンパ腫としては、ホジキンリンパ腫や非ホジキンリンパ腫(以下、NHLと称する)などがあげられる。

20

【0022】

骨髄腫としては、多発性骨髄腫(以下、MMと称する)などがあげられる。

白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度は、健常人の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて有意に上昇している。したがって、SCGF濃度にカットオフ値を設けて、採取した生体試料中のSCGFを定量し、SCGF濃度がカットオフ値より高い場合に白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患であると判定することができる。

【0023】

カットオフ値とは、ある物質に着目して目的とする疾患群と非疾患群とを判定する場合に定める値をいう。目的とする疾患と非疾患とを判定する場合に、カットオフ値以下であれば陰性、カットオフ値以上であれば陽性として、またはカットオフ値以下であれば陽性、カットオフ値以上であれば陰性として疾患を判定することができる(金井正光編、臨床検査法提要 金原出版株式会社)。

30

【0024】

カットオフ値の臨床的有用性を評価する目的で用いられる指標としては、感度と特異度があげられる。

【0025】

ある母集団をカットオフ値を用いて判定し、疾病患者のうち、判定で陽性とされたものをa(真陽性)、疾病患者でありながら判定で陰性とされたものをb(偽陰性)、疾病患者でないにも関わらず判定で陽性とされたものをc(偽陽性)、疾病患者でなく判定で陰性とされたものをd(真陰性)と表したときに、 $a / (a + b)$ で表される値を感度(真陽性率)、 $d / (c + d)$ で表される値を特異度(真陰性率)として表すことができる。

40

【0026】

目的とする疾患群と非疾患群との測定値の分布は通常、一部重複する。したがって、カットオフ値を上下させることにより、感度と特異度は変化する。カットオフ値を下げることにより感度は高くなるが、特異度は低下し、カットオフ値を上げることにより感度は低くなるが、特異度は上がる。判定方法としては、感度と特異度の両者の値が高いほうが好ましい。また、感度と特異度の値が50%を超えない判定方法は、有用とは認められない。

【0027】

50

カットオフ値を設定する方法としては、非疾患群の分布の95%を含む、中央からの両端のいずれかの値をカットオフ値として設定する方法、非疾患群の分布が正規分布を示す場合、平均値 + 2倍の標準偏差 (SD) または平均値 - 2SD をカットオフ値として設定する方法などがあげられる。

【0028】

白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患であるか否かを判定する場合、カットオフ値を15.0ng/mLに設定した場合には、感度89.5%、特異度70%で判定することができ、カットオフ値を13.0ng/mLに設定した場合には、感度100%、特異度60%で判定することができる。健常人のSCGF濃度よりカットオフ値を平均値 + 2SD の18.2ng/mLに設定すると、感度89.5%、特異度100%で判定することができる。また、このカットオフ値で白血病であるか否かを感度95%、特異度100%で、非白血病性悪性血液疾患であるか否かを感度76.9%、特異度100%、さらに前白血病であるか否かを感度100%、特異度100%で判定することができる。

10

【0029】

生体試料としては、血液、尿、髄液、穿刺液などいかなるものでもよいが、好ましくは血液があげられる。血液としては、全血、血漿、血清、血球溶血液、血球内液などがあげられるが、好ましくは血清または血漿があげられる。

【0030】

本発明は、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法に関する。

20

【0031】

白血病患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度は、前白血病または非白血病性悪性血液患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて有意に上昇している。したがって、上述の方法で白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患と判定されたのち、さらに白血病と判定されるカットオフ値を設けて、採取した生体試料中のSCGF濃度がそのカットオフ値よりも高い場合には、白血病、低い場合は前白血病または非白血病性悪性血液疾患であると判断することができる。

【0032】

白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する場合、カットオフ値を23.8ng/mLに設定した場合には、感度85%、特異度69.2%で判別することができる。また、カットオフ値を非白血病性悪性血液疾患患者の平均値 + 2SD から32.8ng/mLに設定した場合には、感度80%、特異度100%で判別することができる。

30

【0033】

本発明は、再生不良性貧血と骨髄異形性症候群とを判別する方法に関する。

再生不良性貧血と骨髄異形性症候群は、骨髄および末梢血において白血球の数や形態に異常が生じるのを特徴とする病態で、二つの疾患の判別は難しいとされてきた。

【0034】

骨髄異形性症候群患者のSCGF濃度は健常人の血液中に含まれるSCGF濃度に比べ有意に上昇しているが、再生不良性貧血患者の血液中SCGF濃度は健常人と変わらない。骨髄異形性症候群患者の血中SCGF濃度は再生不良性貧血患者の血中SCGF濃度より有意に高く、両者の血中SCGF濃度を測定することで、再生不良性貧血か骨髄異形成症候群かと判別することができる。

40

【0035】

そこで、白血球の異常が見られる患者のうち、再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者を判別する場合、再生不良性貧血患者のSCGF濃度よりカットオフ値 (平均値 + 2SD = 18.6ng/mL) を設定し、該カットオフ値によって判断すると、感度100%、特異度100%で再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者とを判別することができる。さらに基準値を15.6ng/mL ~ 18.6ng/mLに設定すれば、感度100%、特異度100%で再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者とを判別することができる。

【0036】

50

また、本発明は、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の遅延を判定する方法に関する。

【0037】

造血幹細胞移植としては、造血幹細胞を移植する方法であればいかなるものでもよいが、骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植等があげられる。

【0038】

造血幹細胞移植から造血幹細胞の生着までの期間は、患者の末梢血の血球数を基準として以下にあげる4つの時期に分類される。すなわち、移植前で、抗癌剤などを大量投与した状態にあるプレ-コンディショニング期、移植を行った後に血球数が減少した状態にあるアプラスチック期、移植後に血球数が回復した状態にあるリカバリー期、および移植後に造血幹細胞が生着するステイブル期である。

【0039】

造血幹細胞移植を行った患者のプレ-コンディショニング期およびアプラスチック期での生体試料中に含まれるSCGF濃度は、造血幹細胞の生着が遅延する患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度のほうが造血幹細胞の生着が遅延しない患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて高い。したがって、それぞれの時期のSCGF濃度を測定し、造血幹細胞の生着が遅延するおそれがあると判断されるSCGF濃度をカットオフ値として定め、SCGF濃度がカットオフ値より低い値の場合には生着の遅延は見られず、SCGF濃度がカットオフ値より高い値の場合には生着の遅延が起こると判定することができる。

【0040】

造血幹細胞の生着遅延を判定するには、プレ-コンディショニング期の場合は、例えばカットオフ値を9.5ng/mLに定めることにより感度75%、特異度67%で、アプラスチック期の場合は、カットオフ値を12ng/mLに定めることにより感度75%、特異度63%で判定することができる。

【0041】

さらに、本発明はGVHDの発症を判定する方法に関する。

【0042】

造血幹細胞移植を行った患者のアプラスチック期およびリカバリー期での生体試料中に含まれるSCGF濃度は、GVHDを発症する患者のほうが、GVHDを発症しない患者に比べて高い。したがって、それぞれの時期のSCGF濃度を測定し、それぞれの時期でGVHDを発症するおそれがあると判断されるカットオフ値を定め、SCGF濃度がカットオフ値より低い値の場合にはGVHDが発症するおそれはないが、SCGF濃度がカットオフ値より高い値の場合にはGVHDが発症するおそれがあると判断することができる。

【0043】

造血幹細胞移植後のGVHDの発症を判定するには、プレ-コンディショニング期においては、カットオフ値を例えば5ng/mLに定めることにより感度87%、特異度57%で、アプラスチック期においてはカットオフ値を例えば10ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、リカバリー期ではカットオフ値を例えば15ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、GVHD発症患者と非発症患者とを判定することができる。

【0044】

生体試料中の造血幹細胞増殖因子(以下、SCGFと称す)を測定する方法としては、免疫学的測定法、分子生物学的測定法などいかなる方法でもよいが、好ましくは免疫学的測定法があげられる。

【0045】

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノプロットティング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

【0046】

分子生物学的測定法としては、RT PCR法、ノーザンプロットティング法、in situハイブ

10

20

30

40

50

リダイゼーション法等があげられる。

【 0 0 4 7 】

イムノアッセイ法は、各種標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体または抗原を検出或いは定量する方法であり、抗原または抗体の標識方法に応じて、放射免疫検出法 (RIA)、酵素免疫検出法 (EIAまたはELISA)、蛍光免疫検出法 (FIA)、発光免疫検出法 (luminescent immunoassay)、物理化学的検出法 (TIA, LAPIA, PCIA)、フローサイトメトリーなどがあげられるが、好ましくは酵素免疫検出法があげられる。

【 0 0 4 8 】

放射免疫検出法で用いる放射性標識体としては、任意の公知 (石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院) の放射性同位元素を用いることができる。例えば、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I 等を用いることができる。

10

【 0 0 4 9 】

酵素免疫検出法で用いる酵素標識体としては、任意の公知 (石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院) の酵素を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ等を用いることができる。

【 0 0 5 0 】

さらに酵素免疫測定法は酵素の作用により生成した物質を測定することにより、測定・検出を行うが、紫外部または可視部に吸収極大を有する物質の吸光度を測定する方法、生成した蛍光物質の蛍光強度を測定する方法、生成した物質の発光強度を測定する方法など多様な測定方法をとることが出来る。例えば酵素標識体としてアルカリフォスファターゼを用いる場合は、アルカリホスファターゼ作用により紫外部または可視部に吸収極大を有する物質を生成するようなアルカリ性ホスファターゼの基質としては、例えば4 - ニトロフェニルリン酸等が挙げられる。4 - ニトロフェニルリン酸はアルカリホスファターゼにより4 - ニトロフェノールに変換される。アルカリホスファターゼ作用により発光を生成するようなアルカリホスファターゼの基質としては、例えば3 - (2' - スピロアダマントン) - 4 - メトキシ - 4 - (3' - ホスホリルオキシ)フェニル - 1, 2 - ジオキセタン・二ナトリウム塩 (AMP PD)、2 - クロロ - 5 - {4 - メトキシスピロ [1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - (5' - クロロ)トリシクロ [3.3.1<sup>3,7</sup>]デカン} - 4 - イル}フェニル ホスフェート・二ナトリウム塩 (CDP - Star<sup>TM</sup>)、3 - {4 - メトキシスピロ [1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - (5' - クロロ)トリシクロ [3.3.1<sup>3,7</sup>]デカン} - 4 - イル}フェニル ホスフェート・二ナトリウム塩 (CSPD<sup>TM</sup>)、[10 - メチル - 9 (10H) - アクリジニルイデン]フェノキシメチルリン酸・二ナトリウム塩 (Lumigen<sup>TM</sup> APS - 5) 等が挙げられる。また、アルカリホスファターゼの作用により色素を生成する試薬として、アルカリホスファターゼの基質であるNADPHを含有する酵素サイクリング反応試薬Ampliq (ダコ社製) が挙げられる。

20

30

【 0 0 5 1 】

発光免疫検出法で用いる発光標識体としては、任意の公知 [今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店; 臨床検査42(1998)] の発光体を用いることができる。例えば、アクリジニウムエステル、ロフィン等を用いることができる。

40

蛍光免疫検出法で用いる蛍光標識体としては、任意の公知 (川生明著、蛍光抗体法、ソフトサイエンス社製) の蛍光を用いることができる。例えば、FITC、RITC等を用いることができる。

【 0 0 5 2 】

イムノアッセイ法における測定方法としては、競合法、サンドイッチ法 [免疫学イラストレイテッド 第5版 (南光堂)] 等があげられるが、好ましくはサンドイッチ法があげられる。

【 0 0 5 3 】

サンドイッチ法は、抗原抗体反応で結合した試料中の目的物質と第一の抗体に、第二の抗体 (二次抗体) を同時に、または別々に反応させ、試料中の目的物質を同一または別々

50

の抗体で検出または定量する方法である。多くの場合、測定操作中に試料中の非反応のサンプル成分や測定系成分を洗浄する工程を含む。例えば、固相に第一の抗体（一次抗体）を固定した後、測定したい試料を第一の試料と接触させる。試料中の非反応のサンプル成分を洗浄し、反応系から除去した後、抗原抗体反応で結合した試料中の目的物質と第一の抗体の複合体に、第二の抗体（二次抗体）を反応させ、測定系中の反応に関与しなかった第二次抗体などの成分を洗浄除去した後、反応系に存在する試料中の目的物質を検出または定量する方法である。

【 0 0 5 4 】

サンドイッチ法に用いる固相としては、ポリ塩化ビニル製マイクロタイタープレート、ポリスチレン製マイクロタイタープレート等があげられる。

10

【 0 0 5 5 】

サンドイッチ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>などの抗体フラグメントを用いてもよい。

【 0 0 5 6 】

サンドイッチ法で用いる一次抗体と二次抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識する抗体の組み合わせであればいかなるものでもよいが、少なくとも1つがモノクローナル抗体であることが好ましい。

【 0 0 5 7 】

本発明のサンドイッチ法で用いられるモノクローナル抗体としては、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体などがあげられる。

20

【 0 0 5 8 】

配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2142 [ The Hematology Journal, 2, 307 (2001) ] が生産するモノクローナル抗体KM2142があげられる。配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1記載の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

30

【 0 0 5 9 】

モノクローナル抗体KM2142を生産するハイブリドーマKM2142、モノクローナル抗体KM2804を生産するハイブリドーマKM2804、モノクローナル抗体KM2945を生産するハイブリドーマKM2945は、平成14年2月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6）にFERM BP 7922、FERM BP 7923 およびFERM BP 7924としてそれぞれ寄託されている。

【 0 0 6 0 】

上述のモノクローナル抗体はSCGFを認識する部位がそれぞれ異なるので、これらのモノクローナル抗体を組み合わせさせてサンドイッチ法を行うことができる。好ましいモノクローナル抗体の組み合わせとしては、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、具体的にはハイブリドーマKM2142 [ The Hematology Journal, 2, 307 (2001) ] が生産するモノクローナル抗体KM2142と、配列番号1記載の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、具体的にはハイブリドーマKM2804(FERM BP 7923)が生産するモノクローナル抗体KM2804との組み合わせがあげられる。

40

【 0 0 6 1 】

本発明のサンドイッチ法によるSCGFを検出または定量する方法の具体例を以下に示す。

【 0 0 6 2 】

まず、適当な固定担体の表面に上述の抗SCGF抗体（一次抗体）を吸着固定する。一次抗

50

体の固定は、例えば、当該抗体を適当な緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等に希釈した後、これを固定担体の表面に接触させ、そして4~37 にて30分間以上反応させることなどにより行うことができる。

【0063】

次に、固定担体表面の蛋白質結合能をブロックする。例えば、固定担体表面上の遊離結合基をブロッキング緩衝液と接触させる。

【0064】

ブロッキング緩衝液としては、例えば1~10%のウシ血清アルブミン、10~30%ブロックエース(雪印乳業社製)を含有する緩衝液、例えば、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等があげられる。

【0065】

ブロッキング処理は、4~37 にて30分間以上反応させることにより行うことができる。

【0066】

次に、一次抗体を生体試料と接触させる。生体試料は必要に応じて、例えば0.01~1%のウシ血清アルブミンなどの蛋白質を含有する緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等で希釈してもよい。

【0067】

一次抗体と生体試料との接触は、4~37 にて30分間以上反応させることにより行うことができる。

【0068】

接触させた後、必要に応じてTween20等の界面活性剤を含有する緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等を用いて数回洗浄する。

【0069】

このとき、生体試料中に存在するSCGFが、あらかじめ固定されている抗SCGF抗体と特異的に結合することにより、抗SCGF抗体を介して固定担体に固定される。

【0070】

次に、SCGFが固定された前記担体を、二次抗体を含有する溶液と接触させる。

【0071】

二次抗体としては、一次抗体とエピトープの異なる抗SCGF抗体であればいかなるものでもよい。また、二次抗体は必要に応じて、前述の標識体で予め標識しておくことができる。

【0072】

未吸着の二次抗体を除去するには、必要に応じてTween20等の界面活性剤を含有する緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等を用いて担体を数回洗浄する。これにより該二次抗体は、あらかじめ結合されている一次抗体及びSCGFを介して、固定担体に結合し、二次抗体の結合量が生体試料中のSCGFの量を反映することになる。

【0073】

上記のようにして固定された二次抗体は、二次抗体の標識体に応じて測定することができる。また、二次抗体に対して特異的な三次抗体を用い、該三次抗体を種々の方法により標識しておき、三次抗体の標識を検出または測定することもできる。

【0074】

上記のようにして、結合された二次抗体の量を測定し、標準物質を用いて検量線を作成し、生体試料中のSCGFの量を測定することができる。

【0075】

検量線は、標準物質として濃度が既知であるヒトSCGF蛋白質を含む溶液を数点段階希釈したものを準備し、生体試料とともに上述のサンドイッチ法を行うことにより得られる。

【0076】

本発明の白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の診断薬、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着遅延の診断薬、およびGVHD発症の診断薬に含有されるSCGFに対する抗

10

20

30

40

50

体としては、SCGFに反応する抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントなどいかなるものでもよいが、好ましくはモノクローナル抗体が用いられる。

【0077】

モノクローナル抗体としては、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体があげられる。

【0078】

配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2142(FERM BP 7922)が生産するモノクローナル抗体KM2142があげられる。配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804(FERM BP 7923)が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945(FERM BP 7924)が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

【0079】

本発明のキットとしては、機器または試薬の組み合わせにより構成されるが、以下に述べる各構成要素と本質的に同一、またはその一部と本質的に同一な物質が含まれていれば、構成または形態が異なっても、本発明のキットに包含される。

【0080】

試薬としてはSCGFに反応する抗体を含み、また、必要に応じ、生体試料の希釈液、抗体固定化固相、反応緩衝液、洗浄液、標識された二次抗体またはその抗体断片、標識体の検出用試薬、SCGFなどの標準物質なども含まれる。

【0081】

生体試料の希釈液としては、界面活性剤、緩衝剤などにBSAやカゼインなどのタンパク質を含む水溶液などがあげられる。

【0082】

抗体固定化固相としては、各種高分子素材を用途に合うように整形した素材に、本発明の抗体または抗体断片を固相化したものが用いられる。形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックスなどの微粒子、スティック等が、素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックスや金属などがあげられる。抗体の固相化の方法としては物理的方法と化学的方法またはこれらの併用等公知の方法により調製することができる。例えば、ポリスチレン製96ウェルの免疫測定用マイクロタプレートに抗体等を疎水固相化したものがあげられる。

【0083】

反応緩衝液は、抗体固定化固相の抗体と生体試料中の抗原とが結合反応をする際の溶媒環境を提供するものであればいかなるものでもよいが、界面活性剤、緩衝剤、BSAやカゼインなどの蛋白質、防腐剤、安定化剤、反応促進剤などがあげられる。

【0084】

洗浄液としては、リン酸やトリス(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)、HEPESやMOPSなどのグッドバッファー類などの緩衝剤などに、ツイーン20、ツイーン40、ツイーン60、ツイーン80、トリトン<sup>TM</sup>X-705などの界面活性剤、NaCl、KClや硫酸アンモニウムなどの塩、BSAやカゼインなどの蛋白質、アジ化ナトリウムなどの防腐剤、塩酸グアニジン、尿素やソディウムドデシルサルフェートなどの変性剤、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸などの安定化剤の少なくとも1種類を含む液があげられる。具体的には、0.15mol/L塩化ナトリウム、0.05%ツイーン20およびpH7.4の10mm

0.1/Lリン酸緩衝液からなるツイーンPBS、0.15mol/L塩化ナトリウム、0.05%ツイーン20およびpH7.4の10mmol/L トリス-塩酸緩衝液(pH7.4)からなるツイーンTBSなどがあげられる。

【0085】

標識された二次抗体またはその抗体断片としては、本発明の抗体または抗体断片に西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ウシ小腸アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼなどの標識用酵素をラベルしたもの、緩衝剤、BSAやカゼインなどのタンパク質、防腐剤などを混合したものが用いられる。

【0086】

標識体の検出用試薬としては前記の標識用酵素に応じて、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼであれば、テトラメチルベンジジンやオルトフェニレンジアミンなどの吸光測定用基質、ヒドロキシフェニルヒドロキシフェニルプロピオン酸やヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光基質、ルミノールなどの発光基質が、アルカリフォスファターゼであれば、4-ニトロフェニルフォスフェートなどの吸光度測定用基質、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどの蛍光基質等があげられる。

【0087】

標準物質としては、W098/08869に記載の方法により調製できるSCGF、キットに用いられる2種類の抗体のエピトープを含有するペプチドなどがあげられる。

【0088】

本発明は、また、配列番号1記載の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体に関する。

【0089】

配列番号1記載の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804(FERM BP 7923)が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945(FERM BP 7924)が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

【0090】

本発明に用いられるモノクローナル抗体の製造方法としては、公知のモノクローナル抗体の製造方法により製造することができる。

以下に、本発明に用いるモノクローナル抗体の製造方法を詳細に説明する。

(1) 抗原の調製

抗原としては、ヒトSCGFをコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入して得られたヒトSCGF蛋白質、ペプチド合成により得られたヒトSCGF部分配列を有する合成ペプチドなどがあげられる。

抗原用部分ペプチドとしては、5~30残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の該蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。KyteとDoolittleの方法[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 157, 105-132 (1982)]などにより、親水性の高い部分配列を予測することで、立体構造上蛋白質表面に存在する部分を推測することができる。即ち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多いためである。また、蛋白質のN末端、C末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。さらに、蛋白質の二次構造情報も参考にできる。Chou Fasmanの方法[アドバンセズ・イン・エンザイモロジー(Advances in Enzymology), 47, 45-147 (1978)]などによりアミノ酸配列から予測した蛋白質二次構造において、ターン構造やランダムコイル構造を有する部分が抗原用ペプチドとして適していると考えられる。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を確立する抗原となるとは限らない。

10

20

30

40

50

部分ペプチドには、蛋白質と架橋するためにシステインを末端に付加する。蛋白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドのN末端はアセチル化、C末端はアミド化する。

部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる [インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ(International Journal of Peptide Protein Research), 35, 161-214 (1990)、「ソリッド・フェーズ・ペプタイド・シンセシス(Solid Phase Peptide Synthesis)」, メソッズ・イン・エンザイモロジー - 第289巻(Methods in Enzymology, vol. 289), グレグ・B・フィールズ(Gregg B. Fields)編, アカデミック・プレス(Academic Press), (1997)、「ペプタイド・シンセシス・プロトコール(Peptide Synthesis Protocols)」, メソッズ・イン・モレキュラー・バイオロジー - 第35巻(Methods in Molecular Biology, vol. 35), マイケル・W・ペニンントン(Michael W. Pennington), ベン・M・ダン(Ben M. Dunn)編, ヒューマナ・プレス(Humana Press), (1994)]。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アドバンスト・ケムテック社(Advanced ChemTech Inc., USA、以後 ACT社と略称する)製ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した N-Fmoc アミノ酸あるいは N-Boc アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI社、島津製作所、国産化学(株)、ノババイオケム社(NovaBiochem)、渡辺化学(株)、ACT社、アナスペック社(AnaSpec Inc.)、またはペプチド研究所(株)等から入手することができる。

#### 【0091】

##### (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウス、ラットまたはハムスターに(1)で調製した抗原を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。

免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、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)や水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど]とともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA(ウシ血清アルブミン)やKLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法[Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウス、ラットまたはハムスターを抗体産生細胞の供給源として提供する。

抗体産生細胞と骨髄腫細胞の融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後3~7日目に、免疫したマウス、ラットまたはハムスターより脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。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(1,200rpm、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(pH 7.65)で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で3回洗浄して融合用脾細胞として提供する。

#### 【0092】

##### (3) 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)[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18:17 (1978)]、P3 NS1/1 Ag41(NS1)[European J. Immunology, 6: 511-519 (1976)]、SP2/0 Ag14(SP2)[Nature, 276: 269-270 (1978)]、P3 X63 Ag8653(653)[J. Immunology, 123:1548-1550 (1979)]、P3 X63 Ag8(X63)[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(1.5mmol/L)、2-メルカプトエタノール

ール ( $5 \times 10^5$  mol/L)、ジェンタマイシン ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) および牛胎児血清(FCS)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 ( $15 \mu\text{g/mL}$ ) 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  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

#### 【 0 0 9 3 】

##### ( 4 ) 細胞融合

( 2 ) で免疫した抗体産生細胞と ( 3 ) で得られた骨髓腫細胞を MEM 培地または 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、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髓腫細胞 = 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 °C で、ポリエチレングライコール - 1,000 (PEG 1,000) 2g、MEM 2mL およびジメチルスルホキシド 0.7mL の混液 0.2 ~ 1mL/10<sup>5</sup> 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 ( $10^{-4}$  mol/L)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}$  mol/L) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$  mol/L) を加えた培地 ] 100mL 中に懸濁する。この懸濁液を 96 穴培養用プレートに  $100 \mu\text{L}$ /穴ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37 °C で 7 ~ 14 日間培養する。

10

培養後、培養上清の一部をとり下記に述べる酵素免疫測定法などにより、ヒト SCGF に反応し、ヒト SCGF を含まない抗原に反応しないものを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返す [ 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抗ヒト SCGF 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。

20

##### 酵素免疫測定法

抗原あるいは抗原を発現した細胞などを 96 ウェルプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

30

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に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選択する。

#### 【 0 0 9 4 】

##### ( 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 週令のマウスまたはヌードマウスに、( 4 ) で得られた抗ヒト SCGF モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $2 \times 10^5$  ~  $5 \times 10^5$  細胞/匹を腹腔内注射する。10 ~ 21 日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% 硫酸アンモニウムで塩析した後、カプリル酸沈殿法、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よる精製を行い、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。

40

抗体のサブクラスの決定は、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行う。蛋白質の定量は、ローリー法および 280nm での吸光度より算出する。

##### [ 実施例 ]

#### 【 0 0 9 5 】

実施例 1 . ヒト SCGF 部分ペプチドを用いた抗ヒト SCGF モノクローナル抗体の作製

##### ( 1 ) ヒト SCGF 部分ペプチドの合成

ヒト SCGF 蛋白配列を解析し、親水性の高い部分、N 末端、C 末端、二次構造上ターン構造

50

、ランダムコイル構造を有する部分の中から、抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物1(SCGF 1)を選択した。

(略号について)

本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC IUB委員会 (IUPAC IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) の勧告 [ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry), 138巻, 9頁 (1984年)] に従った。

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

Ala: L アラニン

Arg: L アルギニン

Cys: L システイン

Gln: L グルタミン

Glu: L グルタミン酸

Glx: L グルタミン酸

Gly: グリシン

Leu: L ロイシン

Trp: L トリプトファン

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

Fmoc: 9 フルオレニルメチルオキシカルボニル

tBu: t ブチル

Trt: トリチル

Boc: t ブチルオキシカルボニル

Pmc: 2, 2, 5, 7, 8 ペンタメチルクロマン 6 スルフォニル

Fmoc Arg(Pmc) OH: N 9 フルオレニルメチルオキシカルボニル

N<sup>2,2,5,7,8</sup> ペンタメチルクロマン 6 スルフォニル L アルギニン

Fmoc Gln(Trt) OH: N 9 フルオレニルメチルオキシカルボニル N トリチル L グルタミン

Fmoc Glu(OtBu) OH: N - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル L グルタミン酸 t ブチルエステル

Fmoc Trp(Boc) OH: N 9 フルオレニルメチルオキシカルボニル N<sup>ind</sup> t ブチルオキシカルボニル L トリプトファン

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

PyBOP: ベンゾトリアゾール 1 イルオキシトリピロリジノホスフォニウムヘキサフルオロホスフェート

HOBt: N ヒドロキシベンゾトリアゾール

NMM: N メチルモルホリン

DMF: N,N ジメチルホルムアミド

TFA: トリフルオロ酢酸

#### 【 0 0 9 6 】

以下の実施例において、化合物の理化学的性質は次の方法により測定した。

質量分析は、日本電子JMS HX110Aを用いFAB MS法により、もしくはブルカー社製質量分析装置REFLEXを用いMALDI TOFMS法により行った。行った。アミノ酸分析は、コーエン (Cohen, S. A.) らの方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 222, 19 (1994)] により行った。加水分解は塩酸蒸気中110 で20時間行い、加水分解物のアミノ酸組成はウォーターズ・アキュ・タグ (Waters AccQ Tag) アミノ酸分析計 (Waters社製) を用い分析した。

#### 【 0 0 9 7 】

(1)化合物 1 (SCGF 1) (配列番号 4) (Ac Arg Glu Trp Glu Gly Gly Trp Gly Gly Ala Gln Glu Glu Glu Arg Glu Arg Glu Ala Leu Cys OH) の合成

Fmoc Cys(Trt)、14.1 μmol が結合した担体樹脂 (H Cys(Trt) 2 ClTrt resin樹脂、ノ

バビオケム社製) 30mgを自動合成機(島津製作所)の反応容器に入れ、600 μ LのDMFを加えて3分間攪拌し溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) 30%ピペリジン DMF溶液900 μ Lを加えて混合物を4分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう1回繰り返した。

(b) 担体樹脂を900 μ LのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を5回繰り返した。

(c) Fmoc Leu OH (141 μ mol)、PyBOP (141 μ mol)、HOBt1水和物(141 μ mol)およびNMM(212 μ mol)をDMF (494 μ L)中で3分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を30分間攪拌し、溶液を排出した。

(d) 担体樹脂を900 μ LのDMFで1分間洗浄後溶液を排出し、これを5回繰り返した。

【 0 0 9 8 】

こうして、Fmoc Leu Cys(Trt) が担体上に合成された。

次に、(a) (b) の工程の後、(c) の工程で Fmoc Ala OH を用いて縮合反応を行い、(d) の洗浄工程を経て、Fmoc Ala Leu Cys(Trt) が担体上に合成された。

以下、工程 (c) において、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Arg(Pmc) OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Arg(Pmc) OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Gln(Trt) OH、Fmoc Ala OH、Fmoc Gly OH、Fmoc Gly OH、Fmoc Trp(Boc) OH、Fmoc Gly OH、Fmoc Gly OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Trp OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Arg(Pmc) OH を順次用いて、(a)~(d) を繰り返した後、(a) (b) の脱保護、洗浄工程を経て、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下12時間乾燥して、N末端が無保護であり側鎖が保護されたペプチドの結合した担体樹脂を得た。次に得られた担体樹脂に対し次の (e)~(g) の操作を行った。

(e) 担体樹脂を800 μ LのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を3回繰り返した。

(f) 無水酢酸 (282 μ mol) 及びDMF(500 μ L) を樹脂に加えて混合物を2時間攪拌し、溶液を排出した。

(g) 担体樹脂を 800 μ LのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を3回繰り返した。

【 0 0 9 9 】

この後、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下 12 時間乾燥して、N末端がアセチル化された側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、5mg/mLの濃度で2メチルインドールを含むTFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2エタンジチオール (2.5%) およびチオフェノール (2%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で6時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約 10mL を加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして44.6mgを取得した。この粗生成物全量をジチオスレイトールおよびDMFからなる混合溶液に溶解し、逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mmI.D. X 250mm) を用いた HPLC で精製した。0.1% TFA 水溶液に、TFA 0.1% を含む 90% アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nm で検出し、化合物1を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物1を1.6mg 得た。

質量分析 [ TOFMS ] ; m/z = 2520.7 (M+H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析; Glx 7.6 (8), Gly 4.0 (4), Arg 2.9 (3), Ala 2.2 (2), Leu 1.2 (1), Cys 1.7 (1)

【 0 1 0 0 】

( 2 ) 免疫原の調製

実施例 1 ( 1 ) で得られたヒトSCGF部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で以下の方法でKLH (カルビオケム社製) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLHをPBSに溶解して10mg/mLに調整し、1/10 容量の25mg/mL MBS (ナカライテスク社製) を

10

20

30

40

50

滴下して30分間攪拌反応させる。あらかじめPBSで平衡化したセファデックスG 25カラムなどのゲルろ過カラムでフリーのMBSを除いて得られたKLH MB 2.5mgを 0.1mol/Lリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に溶解したペプチド 1mg と混合し、室温で3時間、攪拌反応させた。反応後、PBSで透析した。

【 0 1 0 1 】

( 3 ) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 1 ( 2 ) で調製したペプチド KLHコンジュゲート 100 μg をアルミニウムゲル 2 mg および百日咳ワクチン ( 千葉県血清研究所製 ) 1 × 10<sup>8</sup> 細胞とともに5週令雌ラット ( SD ) に投与し、 2 週間後より 100 μg のコンジュゲートを 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の ( 4 ) に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

10

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 ( 1,200rpm、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 ( pH 7.65 ) 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。

【 0 1 0 2 】

( 4 ) 酵素免疫測定法 ( バインディング E L I S A )

アッセイ用の抗原には実施例 1 ( 1 ) で得られたヒトSCGF部分ペプチドをサイログロブリン ( 以下、THYと略す。 ) とコンジュゲートしたものをを用いた。作製方法は実施例 1 ( 2 ) に記した通りであるが、架橋剤にはMBSの代わりにSMCC ( シグマ社製 ) を用いた。96 穴のEIA用プレート ( グライナー社製 ) に、上述のように調製したコンジュゲートを 10 μg / mL、50 μ L / 穴で分注し、 4 時間で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1% BSA PBSを 100 μ L / 穴に加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1% BSA PBSを捨て、被免疫マウス抗血清、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を 50 μ L / 穴で分注し 2 時間反応させた。Tween PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン ( ダコ社製 ) を 50 μ L / 穴に加えて室温、 1 時間反応させ、Tween PBSで洗浄後ABTS基質液 [ 2.2 アジノピス ( 3 エチルベンゾチアゾール 6 スルホン酸 ) アンモニウム ] を用いて発色させOD415nmの吸光度をプレートリーダー ( E max ; Molecular Devices社製 ) にて測定した。

20

【 0 1 0 3 】

( 5 ) 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<sup>7</sup> 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

30

【 0 1 0 4 】

( 6 ) ハイブリドーマの作製

実施例 1 ( 3 ) で得られたラット脾細胞と ( 5 ) 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 °C で、ポリエチレングライコール - 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<sup>8</sup> ラット脾細胞を加え、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 100mL 中に懸濁した。

40

この懸濁液を96穴培養用プレートに 100 μ L / 穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 °C で 10 ~ 14 日間、培養した。この培養上清を実施例 1 ( 4 ) に記載した酵素免疫測定法で調べ、ヒトSCGF部分ペプチド ( 化合物 1 ) に反応して、別のSCGF部分ペプチドである配列番号 1 の 140 ~ 156 番目のアミノ酸配列からなるペプチドに反応しない穴を選び、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、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ KM2141、KM2142、KM2143、KM2144、KM2145 を確立した。

【 0 1 0 5 】

( 7 ) モノクローナル抗体の精製

50

プリスタン処理した8週令ヌード雌マウス(Balb/c)に実施例1(6)で得られたハイブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^5$ 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%硫酸アンモニウムにて塩析し、塩化ナトリウム0.5Mを添加したPBSで透析後、セルロフアインGSL2000(生化学工業社製)(ベットボリウム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。

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行い決定した(表1)。

10

【0106】

【表1】

抗体名	抗体クラス
KM2141	G2a
KM2142	G2a
KM2143	G2a
KM2144	G2a
KM2145	G1

【0107】

(8) ヒトSCGF部分ペプチドとの反応性(酵素免疫測定法)

実施例1(6)で選択された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のヒトSCGF部分ペプチド(化合物1)との反応性を(4)に示した酵素免疫測定法にて調べた。コントロールペプチドとしては、化合物1とは異なるSCGF部分ペプチドである配列番号1の140~156番目のアミノ酸配列からなるペプチドを用いた。第1図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体(KM2141~2145)は化合物1に特異的に反応し、コントロールペプチドには反応しなかった。

【0108】

30

実施例2. 動物細胞を用いたヒトSCGFの発現と精製

【0109】

(1) ヒトSCGF発現用プラスミドpAGE SCGF の構築およびヒトSCGFの動物細胞での発現  
動物細胞用発現ベクターpAGE210(WO96/34016)のHindIII/KpnI処理断片とSCGFタンパク質をコードするDNA[Mio et al., BBRC 249, 124-130 (1998)]とを連結することにより、ヒトSCGF発現ベクターpAGE SCGF を構築した。

動物細胞へのプラスミドの導入は宮地等の方法に従いエレクトロポレーション法[Miyaji et al., Cytotechnology, 3, 133-140 (1990)]により行った。4 $\mu$ gのpAGE SCGF aを $4 \times 10^5$ 個のdhfr遺伝子欠損CHO細胞株[Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)]へ導入した。この細胞を10mLのMEMa2000 dFCS(5)培地[dFCSを5%、7.5% NaHCO<sub>3</sub>を1/40量、200mL グルタミン溶液(GIBCO/BRL社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO/BRL社製、5,000単位/mLペニシリンおよび5,000 mg/mLストレプトマイシン含有)を0.5%含むMEM a2000培地(GIBCO/BRL社製)]に懸濁し、10cmプレート(IWAKI社製)に入れ、37 $^{\circ}$ CのCO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間培養した。ハイグロマイシン(GIBCO/BRL社製)を終濃度0.3 mg/mLになるよう添加し、さらに1~2週間培養した。形質転換細胞がコンフルエントになった時点で回収し、ハイグロマイシンを0.3mg/mL、methotrexate (MTX)を50nmol/L含むMEMa2000 dFCS(5)培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mLになるように懸濁し、F75フラスコ(Greiner社製)に2 mL分注した。1~2週間の培養後、50nmol/L MTX耐性の細胞を0.3 mg/mLハイグロマイシン、200nmol/L MTX含有MEMa2000 dFCS(5)培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mLになるように懸濁し、F75フラスコ(Greiner社製)に2mL分注し

40

50

た。1~2週間の培養後、200nmol/L MTX耐性の細胞を得た。この200 nmol/L MTX耐性細胞を下記に示す培地 1 ) および培地 2 ) を用いて、2 Lのローラーボトル ( Greiner社製 ) で 37 、 80回転/分で培養を行った。

培地 1 ) 無血清Ex cell 301 培地 ( JRH Biosciences社製 )

培地 2 ) 10mg/Lのaprotinin ( Sigma社製 ) を含む無血清 Ex cell 301

培地

#### 【 0 1 1 0 】

約5日間の培養後、細胞を遠心分離し、培養上清サンプルを得た。

#### 【 0 1 1 1 】

( 2 ) モノクローナル抗体KM2142を用いたウェスタンブロッティングによる培養上清中の SCGFタンパク質の存在確認

10

実施例 1 で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を用いたウェスタンブロッティングにより、前記 ( 1 ) で得られた培養上清中のSCGFタンパク質の存在を、以下の方法により確認した。

後述 ( 3 ) および ( 4 ) のSCGFタンパク質のクロマトグラフィーによる精製における各精製画分をSDS PAGEで分離後、P. Matsudairaの方法 [ J.B.C. 262, 10035 10038 (1987)

] に従ってPVDF膜 ( Immobilon Transfer Membranes、ミリポア社製 ) へ電氣的に転写した

。転写膜はブロッキング溶液 [ 1% BSAを含むPBSバッファー (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L

KCl, 9.6 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.2)] 中で30分間振盪した後、ブロッキング溶液

で1mg/mLに希釈した抗SCGFモノクローナル抗体を含む溶液中で室温60分間振盪した。該

20

転写膜はさらに0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーで

の5分間洗浄を1回実施した後、パーオキシダーゼで標識された抗ラットIgG抗体 ( anti ra

t immunoglobulin 1.3g/L, DAKO社製 ) をPBSで1/1,000に希釈した溶液中で室温60分間振

盪した。0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間

洗浄を1回実施した後、発光法 ( ECL Western blotting detection reagents、アマシャム

ファルマシア バイオテック社製 ) により検出を行った。

#### 【 0 1 1 2 】

( 3 ) CHO細胞培養上清からのヒトSCGFタンパク質の精製

実施例 3 に記載する抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製を行うために、上記 ( 1 ) の培地 1 ) の培養条件で得たCHO細胞培養上清から以下の2段階のクロマトグラフィーによ

30

って精製ヒトSCGFタンパク質を取得した。

第1段階：亜鉛キレートクロマトグラフィー

$\text{Zn}^{2+}$ イオンで飽和させたChelating Sepharose Fast Flow担体 ( アマシャム ファルマシ

ア バイオテック社製 ) を2.5 cm × 20 cmのカラム ( BioRad社製 ) に11 cmの高さまで充填

し、0.5mol/L 塩化ナトリウムを含む20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 ( pH 7.1 ) で平

衡化した。これに上記 ( 1 ) で得たCHO細胞培養上清2.4Lを添加し、同緩衝液で十分に洗

浄後、0~100 mmol/L ヒスチジン直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS

PAGEを行い、上記 ( 2 ) で示したモノクローナル抗体KM2142によるウェスタンブロッティ

ングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

第2段階：MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー

40

上記亜鉛キレートクロマトグラフィー粗精製画分に終濃度65%となるように硫酸アンモ

ニウムを添加して攪拌後、4 で2時間放置した。18,800 × gで30分間遠心分離して得られ

た沈澱を10mmol/L トリス塩酸緩衝液 ( pH 7.0 ) に溶解し、同トリス塩酸緩衝液で平衡化し

たMonoQ HR 5/5 カラム ( アマシャム ファルマシア バイオテック社製 ) に添加した。同緩

衝液で十分に洗浄後、0~1 mol/L 塩化ナトリウム直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一

部を用いてSDS PAGEを行い、上記 ( 2 ) で示したモノクローナル抗体KM2142によるウェス

タンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した ( 第2図のレーン

2 ) 。

#### 【 0 1 0 3 】

( 4 ) CHO培養上清からのヒトSCGFタンパク質の高純度精製

50

実施例 6 に記載するヒト SCGF 定量系で用いるヒト SCGF タンパク質標準品は、上記 ( 1 ) の培地 2 ) の培養条件で得た CHO 細胞培養上清から以下の 3 段階のクロマトグラフィーにより精製し、取得した。

第 1 段階：亜鉛キレートクロマトグラフィー

Zn<sup>2+</sup> イオンで飽和させた Chelating Sepharose Fast Flow 担体 ( アマシャム ファルマシア バイオテク社製 ) を 5.0cm x 20cm のカラム ( BioRad 社製 ) に 14.5cm の高さまで充填し、0.5mol/L 塩化ナトリウムを含む 20mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 ( pH 7.1 ) で平衡化した。これに上記 ( 1 ) で得た CHO 細胞培養上清 12L を添加し、同緩衝液で十分に洗浄後、0 ~ 100mmol/L ヒスチジン直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いて SDS PAGE を行い、上記 ( 2 ) で示した KM2142 によるウェスタンブロッティングで交差する約 45kDa のバンドを含む画分を回収した。

10

第 2 段階：MonoQ 陰イオン交換クロマトグラフィー

上記亜鉛キレートクロマトグラフィー粗精製画分に終濃度 50% となるように硫酸アンモニウムを添加して攪拌後、4 で 2 時間放置した。18,800 g で 30 分間遠心分離して得られた沈澱を 10mmol/L トリス塩酸緩衝液 ( pH 7.0 ) に溶解し、同トリス塩酸緩衝液で平衡化した MonoQ HR 10/10 カラム ( アマシャム ファルマシア バイオテク社製 ) に添加した。同緩衝液で十分洗浄後、0 ~ 1 mol/L 塩化ナトリウム直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いて SDS PAGE を行い、上記 ( 2 ) で示した KM2142 によるウェスタンブロッティングで交差する約 45kDa のバンドを含む画分を回収した。

20

第 3 段階：S 400 ゲルろ過クロマトグラフィー

Sephacryl S 400 HR 担体 ( アマシャム ファルマシア バイオテク社製 ) を XK50/60 カラム ( アマシャム ファルマシア バイオテク社製 ) に 51.5cm の高さまで充填したカラムと XK50/100 カラム ( アマシャム ファルマシア バイオテク社製 ) に 93cm の高さまで充填したカラムを直列に連結し、PBS バッファーで十分平衡化した。これに上記 MonoQ 陰イオン交換クロマトグラフィー精製画分 28mL を添加し、6mL/分の流速で PBS バッファーにより溶出した。溶出画分の一部を用いて SDS PAGE を行い、上記 ( 2 ) で示したモノクローナル抗体 KM2142 によるウェスタンブロッティングで交差する約 45kDa のバンドを含む画分を回収した。

【 0 1 0 4 】

( 5 ) ヒト SCGF タンパク質の N 末端 アミノ酸配列解析

実施例 2 ( 3 ) で得られた精製ヒト SCGF タンパク質の N 末端アミノ酸配列はタンパク質化学の常法に従い決定した。精製ヒト SCGF タンパク質を含む画分を SDS PAGE 後、銀染色 ( 第 2 図レーン 2 ) あるいは P. Matsudaira の方法に従って PVDF 膜 ( ProBlott、アプライド バイオシステムズ社製 ) へ電氣的に転写した。転写した膜はクマジーブルー染色し、見かけ上分子量が 45kDa ( 第 2 図レーン 2、バンド A )、41kDa ( 第 2 図レーン 2、バンド B )、34kDa ( 第 2 図レーン 2、バンド C ) の各バンドを切り出し、気相プロテインシーケンサー ( PPSQ 10、島津製作所 ) を用いてメーカー推奨の方法によりアミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列は配列番号 5、6、7 に記載したように、配列番号 1 に記載した SCGF のアミノ酸配列の N 末端から 1 アミノ酸残基目、29 アミノ酸残基目、60 アミノ酸残基目からのアミノ酸配列にそれぞれ一致した。以下、第 2 図レーン 2 に示した見かけ分子量約 41kDa の N 末端 28 残基欠失 SCGF タンパク質を 28 体、約 34kDa の N 末端 59 残基欠失 SCGF タンパク質を 59 体と称する。

30

40

【 0 1 0 5 】

実施例 3 . CHO 細胞発現ヒト SCGF 蛋白質を用いた抗ヒト SCGF モノクローナル抗体の作製

【 0 1 0 6 】

( 1 ) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 2 ( 3 ) で得られた CHO 細胞発現ヒト SCGF タンパク質 ( SCGF、28 体、59 体の SCGF 混合物 ) 100 μg をアルミニウムゲル 2mg および百日咳ワクチン ( 千葉県血清研究所製 ) 1 x 10<sup>8</sup> 細胞とともに 6 週令雌マウス ( Balb/c ) に投与し、2 週間後より 100 μg のヒト SCGF 蛋白を 1 週間に 1 回、計 3 回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を実施例 1 ( 4 ) で示した酵素免疫測定法 ( ただしアッセイ用の抗原には CHO 細胞発現ヒト SCGF

50

タンパク質、コントロール抗原として1%BSA - PBSを用いた。)および以下に示すサンドイッチELISA法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

抗体産生細胞の調製は実施例1(3)と同様に行った。

【0107】

(2) サンドイッチELISA法

96穴のEIAプレート(グライナー社製)に実施例1で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を10 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ L/穴で分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA PBSを100 $\mu$ L/穴で加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA PBSを捨て、CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を5 $\mu$ g/mLで1%BSA PBS希釈したものを50 $\mu$ L/穴で分注し、室温2時間反応させた。対象として1%BSA PBSを50 $\mu$ L/穴分注し、同様に反応させた。tween PBSで洗浄後、上記(1)で得られた被免疫マウス抗血清の培養上清を50 $\mu$ L/穴で分注し、2時間反応させた。tween PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン(ラット血清蛋白吸収済み;カルタグ社製)を50 $\mu$ L/穴で加えて室温で1時間反応させた。tween PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させOD415nmの吸光度をプレートリーダー(Emax;Molecular Devices社製)にて測定した。

10

【0108】

(3) マウス骨髄腫細胞の調製

実施例1(5)と同様に調製を行った。

20

【0109】

(4) ハイブリドーマの作製

実施例1(6)と同様に実施例3(1)で得られたマウス脾細胞と(3)で得られた骨髄腫細胞との細胞融合を行った。

得られた細胞懸濁液を96穴培養用プレートに100 $\mu$ L/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで10~14日間、培養した。この培養上清を実施例3(2)に記載したサンドイッチELISA法で調べ、ヒトSCGF蛋白質に反応してコントロールである1%BSA PBSに反応しない穴を選び、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、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2801、KM2802、KM2803およびKM2804を確立した。

30

【0110】

(5) モノクローナル抗体の精製

実施例1(7)と同様に実施例3(4)で得られたハイブリドーマ株をヌード雌マウスに腹腔内投与を行い、得られた腹水より精製モノクローナル抗体を取得した。

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行い、決定した。その結果を表2に示す。

【0111】

【表2】

抗体名	抗体クラス
KM2801	G1
KM2802	G1
KM2803	G1
KM2804	G1

【0112】

(6) CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質との反応性(酵素免疫測定法)

実施例3(4)で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のCHO細胞発現ヒトSCGF蛋白質との反応性を実施例1(4)に示した酵素免疫測定法にて調べた。第3図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体(KM2801、KM2802、KM2803およびKM2804)はCHO細胞発

50

現ヒトSCGFタンパク質に特異的に反応し、コントロールの1% BSA PBSには反応しなかった。

実施例4 . SDS変性ヒトSCGFタンパク質(CHO細胞発現)を用いた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製

実施例3記載の未変性ヒトSCGF蛋白質を免疫原に用いた場合には、59体に反応するモノクローナル抗体は得られなかった。そこで、59体に反応するモノクローナル抗体を作製するため、SDS変性SCGFを免疫原に用いてハイブリドーマの作製を試みた。

#### 【0113】

##### (1) 免疫原の調製

実施例2(3)で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質をSDS(ラウリル硫酸ナトリウム;ナカライテスク社製)を加えて変性させたものを作製し、免疫原とした。すなわち5% SDS - PBSを調製し、CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質に9分の1量加え、100 で5分間煮沸したものをSDS変性ヒトSCGFタンパク質とした。

10

#### 【0114】

##### (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例4(1)で得られたSDS変性ヒトSCGFタンパク質100 $\mu$ gをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)1 $\times$ 10<sup>8</sup>細胞とともに6週令雌マウス(Balb/c)に投与し、2週間後より100 $\mu$ gのSDS変性ヒトSCGFタンパク質を1週間に1回、計3回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を実施例1(4)で示した酵素免疫測定法(ただしアッセイ用の抗原にはSDS変性ヒトSCGF蛋白質、コントロール抗原として1% BSA PBSを用いた。)で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

20

#### 【0115】

抗体産生細胞の調製は実施例1(3)に記載の方法と同様に行った。

#### 【0116】

##### (3) マウス骨髄腫細胞の調製

実施例1(5)に記載の方法と同様の調製を行った。

#### 【0117】

##### (4) ハイブリドーマの作製

実施例1(6)と同様にして、実施例4(2)で得られたマウス脾細胞と(3)で得られた骨髄腫細胞との細胞融合を行った。

30

得られた細胞懸濁液を96穴培養用プレートに100 $\mu$ L/穴ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 で10~14日間、培養した。この培養上清を実施例1(4)で示した酵素免疫測定法で調べ、SDS変性ヒトSCGF蛋白に反応してコントロールである1% BSA PBSに反応しない穴を選び、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抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2941、KM2942、KM2943、KM2944およびKM2945を確立した。

#### 【0118】

##### (5) モノクローナル抗体の精製

実施例1(7)と同様に実施例4(4)で得られたハイブリドーマ株をヌード雌マウスの腹腔内投与を行い、得られた腹水より精製モノクローナル抗体を取得した。

40

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行い、決定した。その結果を表3に示す。

#### 【0119】

#### 【表3】

抗体名	抗体クラス
K M 2 9 4 1	G 1
K M 2 9 4 2	G 1
K M 2 9 4 3	G 1
K M 2 9 4 4	G 1
K M 2 9 4 5	G 1

## 【 0 1 2 0 】

( 6 ) SDS変性ヒトSCGFタンパク質との反応性 ( 酵素免疫測定法 )

10

実施例 4 ( 4 ) で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のSDS変性ヒトSCGFタンパク質との反応性を実施例 1 ( 4 ) に示した酵素免疫測定法にて調べた。第 4 図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体 ( KM2941、KM2942、KM2943、KM2944およびKM2945 ) はSDS変性ヒトSCGFタンパク質に特異的に反応し、コントロールの 1 % BSA PBSには反応しなかった。

## 【 0 1 2 1 】

実施例 5 . 抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の反応性の検討

( 1 ) ヒトおよびマウスSCGFタンパク質に対する反応性

実施例 1、3および4で作製された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のヒトおよびマウスSCGFタンパク質に対する反応性を酵素免疫測定法 ( バインディングELISA ) で検討した。マウスSCGFタンパク質は実施例 2 記載の方法に準じて作製した。

20

アッセイ用の抗原としてCHO細胞発現ヒトおよびマウスSCGFタンパク質を用い、実施例 1 ( 4 ) に記載の方法により行った。結果を第 5 図に示す。

抗SCGFモノクローナル抗体KM2142は配列番号 1 に示すSCGFのアミノ酸配列のN末端から6残基目から25残基目までに相当する部分ペプチド ( 化合物 1 ) を抗原に用いて作製されたハイブリドーマ由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2142は、SCGFタンパク質に対する反応性をも有していることが示された。また、抗SCGFモノクローナル抗体KM2142はヒトおよびマウスSCGFタンパク質の両方に反応性を有していた。

抗SCGFモノクローナル抗体KM2804はCHO細胞発現ヒトSCGFを抗原に用いて作製したハイブリドーマ由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2804はヒトSCGFにのみ反応し、マウスSCGFに対する交叉反応性は示さなかった。

30

抗SCGFモノクローナル抗体KM2945はSDS変性SCGFタンパク質 ( CHO細胞発現 ) を抗原に用いて作製したハイブリドーマ由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2945は、未変性のSCGFタンパク質に対する反応性をも有していることが示された。また、抗SCGFモノクローナル抗体KM2945はマウスSCGFに対する交叉反応性は示さなかった。

## 【 0 1 1 2 】

( 2 ) ウェスタンブロッティング

実施例 2 ( 3 ) で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を用い、実施例 3 および 4 で作製された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2804およびKM2945のウェスタンブロッティングにおける反応性を検討した。

40

実施例 2 ( 2 ) と同様にPVDF膜に転写したサンプルを、ブロッキング溶液中で室温30分間振盪後、ブロッキング溶液で1mg/mLに希釈した抗SCGFモノクローナル抗体で室温60分間振盪した。転写膜はさらに0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、PBSで1/1,000に希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 ( アマシャム ファルマシア バイオテク社製 ) 溶液中で室温60分間振盪した。0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、上述のECL発光法により検出した。

第2図におけるレーン 3、4、5 はそれぞれKM2142、KM2804、KM2945を用いた精製ヒトSCGFタンパク質のウェスタンブロッティング結果を示す。KM2804はN末端59残基欠失SCGFタンパク質である。59体には反応性を有していないが、全長SCGFおよびN末端28残基

50

欠失SCGFタンパク質である 28体には反応性を有していた。また、KM2945は全長SCGFおよび欠失体のいずれも反応性を有していた。

【0114】

実施例6 . ヒトSCGF定量系

実施例1で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を以下の方法によりビオチン標識した。実施例1で得られたKM2142精製抗体をPBSで1mg/mLに希釈し、1/4容量の0.5mol/L炭酸バッファー (pH 9.2)を加えた。さらにバッファーと同量のNHS Lc Biotin (1mg/mL)にジメチルホルムアミドにて溶解;ピアス社製)を攪拌下滴下した。3時間、室温で攪拌反応を行った後、PBSで一晩透析したものをビオチン標識KM2142として用いた。

96穴のEIA用プレート(グライナー社製)に、実施例3で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2804を5µg/mL、50µL/穴で分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA PBSを100µL/穴に加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA PBSを捨て、実施例2(4)で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を血清希釈液(協和メデックス社製)で17.5ng/mLから2倍希釈系列で14点希釈したものを50µL/穴で分注し室温で2時間反応させた。Tween PBSで洗浄後、上記で得られたビオチン標識KM2142(0.2µg/mLにBSA PBSにて希釈)を50µL/穴で加えて室温、2時間反応させ、Tween PBSで洗浄後、さらにアルカリフォスファターゼ標識アビジン(ザイメッド社製)を32,000倍希釈で50µL/穴で加えて室温、1時間反応させた。Tween PBSで洗浄後、AmpliQ(DAKO社製)を用いて発色させOD490nmの吸光度をプレートリーダー(E max; Molecular Devices社製)にて測定した。その結果、第6図に示すように、本定量系によりヒトSCGFタンパク質を0.04~2.0ng/mLの範囲で定量することが可能であった。

10

20

【0115】

実施例7 . 白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の血清SCGF濃度

インフォームドコンセントを得た白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の血清中のSCGF濃度を実施例6の方法で測定した。また血球検査値が正常値を示す男女10名の健常人を対象例として同じく血清中のSCGF濃度を測定した。その結果を第7図に示す。

健常人の値の分布が正規分布を示すことを確認した後、この群より平均値とスタンダードデビエーション(SD)を計算し、平均値+2SDの値を正常と異常とを区別する基準値に設定した。この基準値をもとに、白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の値を正常・異常に分別し、白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患がSCGF測定値で検出可能か否かを確認した。その結果を表4に示す。

30

【0116】

【表4】

	患者数	陽性者数	陽性率(%)
ALL	7	7	100.0
AML	7	6	85.7
CML	6	6	100.0
MDS	5	5	100.0
NHL	7	6	85.7
MM	6	4	66.7
AA	7	0	0.0

カットオフ値は健常人の平均値+2SD=18.2ng/mL

とした。

【0116】

健常人群に比較し、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、骨髄異形成症候群(MDS)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄

50

腫 (MM) の患者の中央値は有意に高く、SCGF測定値がこれら疾患で有意に上昇していることが示された (第7図)。

【0117】

また健常人の値から定めたカットオフ値を用いて白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患を高い感度で検出できることが示された (表4)。一方、同じ血液疾患でありながら、再生不良性貧血 (AA) 患者の値は健常人との有意差が観察されず、またカットオフ値を用いてもこの疾患を検出出来なかった。

血液細胞数の異常を伴う疾患である非ホジキンリンパ腫 (NHL)、多発性骨髄腫 (MM)、骨髄異形成症候群 (MDS)、急性骨髄性白血病 (AML)、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性骨髄性白血病 (CML) を比較すると、急性骨髄性白血病 (AML)、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性骨髄性白血病 (CML) などの白血病患者のF血液中SCGF濃度は、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、多発性骨髄腫 (MM)、骨髄異形成症候群 (MDS) などの他の前白血病や非白血病性悪性血液疾患患者の血液中SCGF濃度に比較して有意に高く、血液中SCGF濃度は白血病と前白血病や非白血病性悪性血液疾患との判別に利用可能であった。また、判別診断の難しいAA患者とMDS患者を比較してみると、MDS患者血中SCGF濃度はAA患者のそれと比較して有意に高く、両者を血中SCGF濃度で判別診断することが可能であった。

10

【0118】

実施例8 . 造血幹細胞移植後GVHD発症とSCGF濃度

インフォームドコンセントを得た白血病および前白血病患者で造血幹細胞移植を受けた23例の内、GVHDを発症した例15例、発症しなかった例8例の血清中SCGF濃度を実施例6の方法を用いて各ステージ毎に測定した。その結果を第8図に示す。

20

造血幹細胞移植を受けた患者のSCGF濃度はプレ - コンディショニング期やアプラスチック期に比べ、リカバリー期やステイブル期の方が有意に高値を示した。

造血幹細胞移植を受けた患者のうち、GVHDを発症した症例は発症しなかった例に比べ、アプラスチック期およびリカバリー期において有意に血清中SCGF濃度が高いので、血清中のSCGF濃度を測定することによって、GVHD発症を判定可能であった。

さらにカットオフ値を定めてGVHD発症例と非発症例とを判定できないかを検討した。その結果を第9図に示す。プレ - コンディショニング期においては、カットオフ値を例えば5ng/mLに定めることにより感度87%、特異度57%で、アプラスチック期においてはカットオフ値を10ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、リカバリー期ではカットオフ値を15ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、それぞれSCGF濃度を測定し、これを診断に用いなかった時に比べて有意 ( $p < 0.05$ ) にGVHD発症例と非発症例とを判別GVHD可能であった。

30

【0119】

実施例9 . 移植造血幹細胞の生着と血清SCGF濃度

インフォームドコンセントを得た血液疾患患者で造血幹細胞移植を受けた23例のうち、生着が遅延した例4例、遅延しなかった例19例の血清中SCGF濃度を実施例6の方法を用いて各ステージ毎に測定した。結果を第10図に示す。

生着非遅延例では、リカバリー期およびステイブル期のSCGF濃度は、プレ - コンディショニング期に比して有意に上昇した。一方、生着遅延例では、これらの期においても有意な上昇は観察されなかった。

40

そこで、造血幹細胞移植患者のSCGF濃度を測定し、そのカットオフ値を定めてその値と個々患者の値比較から造血幹細胞生着遅延例と非遅延例を判定できないかを検討した。その結果を第11図に示す。プレ - コンディショニング期においては、カットオフ値を例えば9.5ng/mLに定めることにより感度75%、特異度67%で、アプラスチック期においてはカットオフ値を12ng/mLに定めることで感度75%、特異度63%で、造血幹細胞生着遅延例と非遅延例とを判別することが可能であった。

【0120】

実施例10 . 白血病患者の末梢血細胞におけるSCGFの発現

インフォームドコンセントを得た種々の白血病患者の末梢血細胞をRneasy Mini Kit (Q

50

iagen社製)を用い、プロトコールにしたがって全RNAを抽出し、全RNA1  $\mu$ gをDNaseI (GIBCO社製)処理し、SuperScript First Strand Synthesis Systemfor RT PCR (GIBCO社製)を用いて逆転写し、First Strand DNAを調製した。Taq Polymerase (TaKaRa社製)を用い、調製したFirst Strand DNAを鋳型とし、配列番号8および9ならびに配列番号10および11の塩基配列を有するオリゴDNAをプライマーとして、それぞれ、ヒトG3PDH、SCGF遺伝子の検出を検討したところ、G3PDHの検出量がほぼ同等となる条件下で、健康人1人では、SCGFの発現を検出できなかったが、急性リンパ性白血病(ALL)2例中1例、急性骨髄性白血病(AML)2例中2例でSCGFの発現が検出された。

【産業上の利用可能性】

【0121】

本発明は、SCGFに反応する抗体を用いた、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法、造血幹細胞移植後の造血幹細胞生着遅延および移植片対宿主反応病を判定する方法、およびそれらの診断薬ならびに診断キットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0122】

第1図は、モノクローナル抗体のヒトSCGF部分ペプチド(化合物1)に対する反応性を示す図である(バインディングELISA)。

第2図は、精製ヒトSCGFタンパク質のSDS PAGEとウェスタンブロッティング結果を示す。レーン1および2は分子量マーカーと精製ヒトSCGFタンパク質のSDS PAGEパターンを示す。レーン3、4、5はそれぞれKM2142、KM2804、KM2945を用いた精製ヒトSCGFタンパク質のウェスタンブロッティング結果を示す図である。

1:分子量マーカーのレーン

2:精製SCGFを解析し、銀染色したレーン

3:抗SCGF抗体KM2142を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

4:抗SCGF抗体KM2804を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

5:抗SCGF抗体KM2945を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

A:SCGFタンパク質の分子量を示す。

B:N末端28残基欠失SCGFタンパク質 28体の分子量を示す。

C:N末端59残基欠失SCGFタンパク質 59体の分子量を示す。

第3図は、モノクローナル抗体の、CHO細胞発現ヒトSCGF蛋白に対する反応性を示す図である(バインディングELISA)。

第4図は、モノクローナル抗体の、SDS変性ヒトSCGF蛋白(CHO細胞発現)に対する反応性を示す図である(バインディングELISA)。

第5図は、モノクローナル抗体の、ヒトおよびマウスSCGF蛋白(CHO細胞発現)に対する反応性を示す。(バインディングELISA)

第6図は、モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによるヒトSCGF蛋白の定量曲線を示す図である。

第7図は、各種血液疾患患者血清中SCGF濃度を示す。横実線は各種血液疾患群の中央値を、横点線は健康人群から求めたカットオフ値(18.2ng/mL)を示す図である。

\* : Normal(健康人群)あるいはAA(再生不良性貧血群)との有意差  $p < 0.05$ 、

# : NHL(非ホジキンリンパ腫)との有意差  $P < 0.05$ 、\$ : MM(多発性骨髄腫)との有意差  $p < 0.05$

第8図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度によるGVHD発症および非発症の差を示す図である。横実線は各群の中央値を示す。

\* : GVHD非発症例との有意差  $p < 0.05$ 、

# : プレ-コンディショニング期との有意差  $p < 0.05$ 、

\$ : アプラスチック期との有意差  $p < 0.05$ 、

& : リカバリー期との有意差  $p < 0.05$

第9図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度とGVHD発症患者の検出感度、非発症患者の特異度との関係を示す図である。 : 感度、 : 特異度、縦点線は仮のカットオフ値を

10

20

30

40

50

示す。

第10図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度による生着遅延および非遅延の差を示す図である。横実線は各群の中央値を示す。

# : プレ - コンディショニング期との有意差  $p < 0.05$ 、

\$ : アプラスチック期との有意差  $p < 0.05$ 、

& : リカバリー期との有意差  $p < 0.05$

第11図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度と造血幹細胞生着遅延例の検出感度、非遅延例の特異度との関係を示す図である。 : 感度、 : 特異度、縦点線は仮のカットオフ値を示す。

【手続補正書】

【提出日】平成17年4月20日(2005.4.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、造血幹細胞増殖因子(SCGF)を測定することを特徴とする、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法、再生不良性貧血と骨髓異形成症候群とを判別する方法、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の状態を判定する方法、または移植片対宿主反応病を判定する方法に関する。また、造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を有効成分として含有してなる白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態または移植片対宿主反応病の診断薬および診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患の診断、または白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患の治療後の診断は、白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患を治療するための方針を決定するのに重要である。

【0003】

白血病の初発の診断としては、患者の末梢血中の白血球数を測定し、計測値が正常値を上回る場合に白血病の発生を疑う方法があげられる。しかしながら、風邪などの白血病以外の疾患であっても、体内の免疫反応の亢進により白血球数は増大するので、白血球数の測定だけでは、擬陽性の可能性がある。また、末梢血中の白血球数の正常値は、4,000~8,000個/ $\mu$ Lと幅が広く、擬陰性の可能性がある。そこで、より確度の高い白血病の診断方法が求められている。

【0004】

白血病再発の診断方法としては、WT 1遺伝子のRT PCRによる検出がある[臨床病理48,155(2000)、Blood, 84, 3071 (1994)、日本特許第3122771号]。しかしながら、該診断方法は操作が煩雑であるとともに、特殊な装置を必要としている。

【0005】

また、上述の白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患、先天性代謝疾患、固形癌等の治療方法の一つとして、造血幹細胞移植療法があげられる。造血幹細胞移植療法の問題点としては、提供者の造血幹細胞と患者の造血幹細胞とのHLAタイプの不適合、患者側の体調や感染症等などにより、移植した造血幹細胞が生着しない、造血幹細胞の生着が遅延する、移植片対宿主反応病(以下、GVHDと称する)を発症するなど、造血幹細胞移植治療の効果が十分に得られないことがあげられ、最悪の場合、死の転帰をとることもある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 6 】

造血幹細胞の生着遅延に対しては、G-CSFを生体内に投与することにより、造血幹細胞の生着を促進させることができる。また、GVHDに対しては、免疫抑制剤を生体内に投与することにより、提供された造血幹細胞の拒絶反応を抑制させることができる。しかしながら、いずれの薬剤も過剰に投与した場合には、副作用が懸念される。そのため、造血幹細胞の生着状態、GVHD発症を診断あるいは予知することは治療方針の決定に重要である。

## 【 0 0 0 7 】

造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着を確認する方法としては、末梢血中の白血球数や血小板数を測定し、それらの測定値が上昇すれば造血幹細胞が生着したことを診断することができる。しかしながら、造血幹細胞の生着は、移植後10日から1ヶ月以上を要する事もあるため、末梢血中の白血球数や血小板数を測定することでは早期に造血幹細胞の生着を判断することができない。

10

## 【 0 0 0 8 】

GVHD発症の判定方法としては、造血幹細胞移植後のリカバリー期に現れる皮膚の発疹等を観察することがあげられる。しかしながら、簡便で確度の高いGVHD発症の判定方法は知られていない。さらにGVHD発症以前にGVHDの発症を予知する方法は知られていない。

## 【 0 0 0 9 】

ヒト造血幹細胞増殖因子 (Stem Cell Growth Factor ; 以下、SCGFと略記する) は、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質である [ WO98/08869、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7577 (1997)、Biochem. Biophys. Res. Comm., 249, 124 (1998) ] 。

20

## 【 0 0 1 0 】

SCGFを認識する抗体としては、遺伝子組換え法により得られたSCGF、ならびにSCGFのN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原として調製したポリクローナル抗体および細胞培養上清から部分精製されたSCGFや遺伝子組換え法により得られたSCGFを免疫原として調製したモノクローナル抗体が知られている [ WO98/08869 ]。該モノクローナル抗体が中和活性を有すること、また遺伝子組換え法により得られたSCGFを免疫原として調製したポリクローナル抗体がELISAで遺伝子組換え法により得られたSCGFと反応すること、SCGFのN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原として調製したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより遺伝子組換え法により得られたSCGFを検出できることが報告されている。

30

## 【 0 0 1 1 】

また、SCGFのN末端から6残基目から25残基目までの部分ペプチドを免疫原とした抗SCGFモノクローナル抗体KM2142が報告されている [ The Hematology Journal, 2, 307 (2001) ] 。

## 【 0 0 1 2 】

ヒト正常組織に対してノーザンブロッティングを行った結果、SCGF遺伝子の発現は腎臓に多く、心臓に少なく、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、膵臓では発現が見られないこと [ Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7577 (1997) ]、脾臓、胸腺、盲腸、骨髄、胎児肝に多く、末梢血に少ないこと [ Biochem. Biophys. Res. Comm., 249, 124 (1998) ] が知られている。また、正常新生児マウスにインサイテュハイブリダイゼーションを行った結果、骨髄、増殖軟骨、骨膜付近にSCGFが発現していることが報告されている [ The Hematology Journal, 2, 307 (2001) ] 。

40

## 【 0 0 1 3 】

さらに、骨髄細胞株(HT60、KPB M15)、単核球細胞株(THP 1、U 937)、赤芽球細胞株(HEL)、繊維芽細胞株(NHF)でSCGF遺伝子の発現が見られるが、B細胞株(U266B1、IM 9)、T細胞株(MOLT 4)、赤芽球細胞株(K562)、上皮系癌細胞株(HeLaS3、A431)、メラノーマ細胞株(Bowes)、アデノウイルス形質転換胎生腎臓細胞株(293)、繊維芽細胞株(CCD 8Lu)では、SCGF遺伝子の発現が見られないことが報告されている [ Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7577 (1997) ] 。

50

## 【 0 0 1 4 】

しかし、正常及び血液疾患の、或いは造血幹細胞移植を受けたヒトを含む動物の末梢血、骨髄中の血球細胞でのSCGFのmRNA量の差異に関する報告は無い。

組織や細胞のmRNAとコードされるタンパク質の量との相関は低く（相関係数 = 0.48） [ Electrophoresis, 18, 533 (1997) ]、SCGFのmRNA量からSCGF蛋白質量を推定する事も困難である。

## 【 0 0 1 5 】

以上のように、ヒトを含む動物の血清、血漿などの体液および組織中のSCGF蛋白質の存在、機能、疾患との関係については明らかにされていない。

## 【 0 0 1 6 】

本発明の目的は、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の判定、白血病と前白血病または非白血病性悪性血液疾患との判別、再生不良性貧血と骨髄異形成症候群との判別、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態およびGVHDを判定する方法、および白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態およびGVHDの診断薬ならびに診断キットを提供することにある。

## 【 発明の開示 】

## 【 0 0 1 7 】

本発明は以下（ 1 ）～（ 2 0 ）に関する。

（ 1 ） 生体試料中の造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）を測定することを特徴とする、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法。

（ 2 ） 生体試料中の造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）を測定することを特徴とする、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法。

（ 3 ） 生体試料中の造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）を測定することを特徴とする、再生不良性貧血と骨髄異形成症候群とを判別する方法。

（ 4 ） 生体試料中の造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）を測定することを特徴とする、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の状態を判定する方法。

（ 5 ） 生体試料中の造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）を定量することを特徴とする、移植片対宿主反応病を判定する方法。

（ 6 ） 判定または判別する方法が、免疫学的測定方法である、上記（ 1 ）～（ 5 ）のいずれか 1 項に記載の方法。

（ 7 ） 免疫学的測定方法が、サンドイッチ法である、上記（ 6 ）項に記載の方法。

（ 8 ） サンドイッチ法が、造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）の異なるエピトープに反応する 2 種類の抗体を用いることを特徴とする、上記（ 7 ）記載の方法。

（ 9 ） 抗体が、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体から選ばれる抗体である上記（ 8 ）記載の方法。

（ 1 0 ） モノクローナル抗体が、配列番号 1 の 6 ～ 2 8 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、 2 9 ～ 5 9 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および 6 0 ～ 3 0 2 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体からなる群から選ばれるモノクローナル抗体である、上記（ 9 ）記載の方法。

（ 1 1 ） 造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）に反応する抗体を有効成分として含有してなる白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の診断薬。

（ 1 2 ） 造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）に反応する抗体を有効成分として含有してなる造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態の診断薬。

（ 1 3 ） 造血幹細胞増殖因子（ SCGF ）に反応する抗体を有効成分として含有してなる移植片対宿主反応病の診断薬。

（ 1 4 ） 抗体が、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体から選ばれる抗体である上記（ 1 1 ）～（ 1 3 ）のいずれか 1 項に記載の診断薬。

（ 1 5 ） モノクローナル抗体が、配列番号 1 の 6 ～ 2 8 番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、 2 9 ～ 5 9 番目のアミノ酸配列で示された領域を

10

20

30

40

50

認識するモノクローナル抗体および60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体からなる群から選ばれるモノクローナル抗体である、上記(14)記載の診断薬。

(16) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)に反応する抗体を含む、白血病、前白血病あるいは非白血病性悪性血液疾患、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着状態または移植片対宿主反応病の診断用キット。

(17) 造血幹細胞増殖因子(SCGF)を含む、上記(16)記載の診断用キット。

(18) 配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体。

(19) 配列番号1記載の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体。

10

(20) 上記(18)または(19)項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明は、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法に関する。

【0019】

白血病としては、造血系細胞のうち造血細胞などの未熟な細胞が腫瘍化されたものであればいかなるものも包含するが、急性リンパ性白血病(以下、ALLと称する)、急性骨髄性白血病(以下、AMLと称する)、慢性骨髄性白血病(以下、CMLと称する)などがあげられる。

20

【0020】

前白血病としては、造血系細胞のうちリンパ球などの成熟な細胞が腫瘍化されたものであればいかなるものも包含されるが、骨髄異形性症候群(以下、MDSと称する)などがあげられる。

【0021】

非白血病性悪性血液疾患としてリンパ腫や骨髄腫などがあげられる。

リンパ腫としては、ホジキンリンパ腫や非ホジキンリンパ腫(以下、NHLと称する)などがあげられる。

【0022】

骨髄腫としては、多発性骨髄腫(以下、MMと称する)などがあげられる。

30

白血病、前白血病および非白血病性悪性血液疾患患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度は、健常人の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて有意に上昇している。したがって、SCGF濃度にカットオフ値を設けて、採取した生体試料中のSCGFを定量し、SCGF濃度がカットオフ値より高い場合に白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患であると判定することができる。

【0023】

カットオフ値とは、ある物質に着目して目的とする疾患群と非疾患群とを判定する場合に定める値をいう。目的とする疾患と非疾患とを判定する場合に、カットオフ値以下であれば陰性、カットオフ値以上であれば陽性として、またはカットオフ値以下であれば陽性、カットオフ値以上であれば陰性として疾患を判定することができる(金井正光編、臨床検査法提要 金原出版株式会社)。

40

【0024】

カットオフ値の臨床的有用性を評価する目的で用いられる指標としては、感度と特異度があげられる。

【0025】

ある母集団をカットオフ値を用いて判定し、疾病患者のうち、判定で陽性とされたものをa(真陽性)、疾病患者でありながら判定で陰性とされたものをb(偽陰性)、疾病患者でないにも関わらず判定で陽性とされたものをc(偽陽性)、疾病患者でなく判定で陰性とされたものをd(真陰性)と表したときに、 $a / (a + b)$ で表される値を感度(真

50

陽性率)、 $d / (c + d)$  で表される値を特異度 (真陰性率) として表すことができる。

【0026】

目的とする疾患群と非疾患群との測定値の分布は通常、一部重複する。したがって、カットオフ値を上下させることにより、感度と特異度は変化する。カットオフ値を下げることにより感度は高くなるが、特異度は低下し、カットオフ値を上げることにより感度は低くなるが、特異度は上がる。判定方法としては、感度と特異度の両者の値が高いほうが好ましい。また、感度と特異度の値が50%を超えない判定方法は、有用とは認められない。

【0027】

カットオフ値を設定する方法としては、非疾患群の分布の95%を含む、中央からの両端のいずれかの値をカットオフ値として設定する方法、非疾患群の分布が正規分布を示す場合、平均値 + 2 倍の標準偏差 (SD) または平均値 - 2 SD をカットオフ値として設定する方法などがあげられる。

10

【0028】

白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患であるか否かを判定する場合、カットオフ値を15.0ng/mLに設定した場合には、感度89.5%、特異度70%で判定することができ、カットオフ値を13.0ng/mLに設定した場合には、感度100%、特異度60%で判定することができる。健常人のSCGF濃度よりカットオフ値を平均値 + 2 SD の18.2ng/mLに設定すると、感度89.5%、特異度100%で判定することができる。また、このカットオフ値で白血病であるか否かを感度95%、特異度100%で、非白血病性悪性血液疾患であるか否かを感度76.9%、特異度100%、さらに前白血病であるか否かを感度100%、特異度100%で判定することができる。

20

【0029】

生体試料としては、血液、尿、髄液、穿刺液などいかなるものでもよいが、好ましくは血液があげられる。血液としては、全血、血漿、血清、血球溶血液、血球内液などがあげられるが、好ましくは血清または血漿があげられる。

【0030】

本発明は、白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する方法に関する。

【0031】

白血病患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度は、前白血病または非白血病性悪性血液患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて有意に上昇している。したがって、上述の方法で白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患と判定されたのち、さらに白血病と判定されるカットオフ値を設けて、採取した生体試料中のSCGF濃度がそのカットオフ値よりも高い場合には、白血病、低い場合は前白血病または非白血病性悪性血液疾患であると判断することができる。

30

【0032】

白血病と、前白血病または非白血病性悪性血液疾患とを判別する場合、カットオフ値を23.8ng/mLに設定した場合には、感度85%、特異度69.2%で判別することができる。また、カットオフ値を非白血病性悪性血液疾患患者の平均値 + 2 SD から32.8ng/mLに設定した場合には、感度80%、特異度100%で判別することができる。

40

【0033】

本発明は、再生不良性貧血と骨髄異形性症候群とを判別する方法に関する。

再生不良性貧血と骨髄異形性症候群は、骨髄および末梢血において白血球の数や形態に異常が生じるのを特徴とする病態で、二つの疾患の判別は難しいとされてきた。

【0034】

骨髄異形性症候群患者のSCGF濃度は健常人の血液中に含まれるSCGF濃度に比べ有意に上昇しているが、再生不良性貧血患者の血液中SCGF濃度は健常人と変わらない。骨髄異形性症候群患者の血中SCGF濃度は再生不良性貧血患者の血中SCGF濃度より有意に高く、両者の血中SCGF濃度を測定することで、再生不良性貧血か骨髄異形成症候群かと判別することが

50

できる。

【0035】

そこで、白血球の異常が見られる患者のうち、再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者を判別する場合、再生不良性貧血患者のSCGF濃度よりカットオフ値（平均値 + 2SD=16.6ng/mL）を設定し、該カットオフ値によって判断すると、感度100%、特異度100%で再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者とを判別することができる。さらに基準値を15.6ng/mL ~ 18.6ng/mLに設定すれば、感度100%、特異度100%で再生不良性貧血患者と骨髄異形性症候群患者とを判別することができる。

【0036】

また、本発明は、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着の遅延を判定する方法に関する。

10

【0037】

造血幹細胞移植としては、造血幹細胞を移植する方法であればいかなるものでもよいが、骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植等があげられる。

【0038】

造血幹細胞移植から造血幹細胞の生着までの期間は、患者の末梢血の血球数を基準として以下にあげる4つの時期に分類される。すなわち、移植前で、抗癌剤などを大量投与した状態にあるプレ - コンディショニング期、移植を行った後に血球数が減少した状態にあるアプラスチック期、移植後に血球数が回復した状態にあるリカバリー期、および移植後に造血幹細胞が生着するステイブル期である。

20

【0039】

造血幹細胞移植を行った患者のプレ - コンディショニング期およびアプラスチック期での生体試料中に含まれるSCGF濃度は、造血幹細胞の生着が遅延する患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度のほうが造血幹細胞の生着が遅延しない患者の生体試料中に含まれるSCGF濃度に比べて高い。したがって、それぞれの時期のSCGF濃度を測定し、造血幹細胞の生着が遅延するおそれがあると判断されるSCGF濃度をカットオフ値として定め、SCGF濃度がカットオフ値より低い値の場合には生着の遅延は見られず、SCGF濃度がカットオフ値より高い値の場合には生着の遅延が起こると判定することができる。

【0040】

造血幹細胞の生着遅延を判定するには、プレ - コンディショニング期の場合は、例えばカットオフ値を9.5ng/mLに定めることにより感度75%、特異度67%で、アプラスチック期の場合は、カットオフ値を12ng/mLに定めることにより感度75%、特異度63%で判定することができる。

30

【0041】

さらに、本発明はGVHDの発症を判定する方法に関する。

【0042】

造血幹細胞移植を行った患者のアプラスチック期およびリカバリー期での生体試料中に含まれるSCGF濃度は、GVHDを発症する患者のほうが、GVHDを発症しない患者に比べて高い。したがって、それぞれの時期のSCGF濃度を測定し、それぞれの時期でGVHDを発症するおそれがあると判定されるカットオフ値を定め、SCGF濃度がカットオフ値より低い値の場合にはGVHDが発症するおそれはないが、SCGF濃度がカットオフ値より高い値の場合にはGVHDが発症するおそれがあると判断することができる。

40

【0043】

造血幹細胞移植後のGVHDの発症を判定するには、プレ - コンディショニング期においては、カットオフ値を例えば5ng/mLに定めることにより感度87%、特異度57%で、アプラスチック期においてはカットオフ値を例えば10ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、リカバリー期ではカットオフ値を例えば15ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、GVHD発症患者と非発症患者とを判定することができる。

【0044】

生体試料中の造血幹細胞増殖因子（以下、SCGFと称す）を測定する方法としては、免疫

50

学的測定法、分子生物学的測定法などいかなる方法でもよいが、好ましくは免疫学的測定法があげられる。

【0045】

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノプロット法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

【0046】

分子生物学的測定法としては、RT PCR法、ノーザンプロット法、in situハイブリダイゼーション法等があげられる。

【0047】

イムノアッセイ法は、各種標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体または抗原を検出或いは定量する方法であり、抗原または抗体の標識方法に応じて、放射免疫検出法 (RIA)、酵素免疫検出法 (EIAまたはELISA)、蛍光免疫検出法 (FIA)、発光免疫検出法 (luminescent immunoassay)、物理化学的検出法 (TIA, LAPIA, PCIA)、フローサイトメトリなどがあげられるが、好ましくは酵素免疫検出法があげられる。

【0048】

放射免疫検出法で用いる放射性標識体としては、任意の公知 (石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院) の放射性同位元素を用いることができる。例えば、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I等を用いることができる。

【0049】

酵素免疫検出法で用いる酵素標識体としては、任意の公知 (石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院) の酵素を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ等を用いることができる。

【0050】

さらに酵素免疫測定法は酵素の作用により生成した物質を測定することにより、測定・検出を行うが、紫外部または可視部に吸収極大を有する物質の吸光度を測定する方法、生成した蛍光物質の蛍光強度を測定する方法、生成した物質の発光強度を測定する方法など多様な測定方法をとることが出来る。例えば酵素標識体としてアルカリフォスファターゼを用いる場合は、アルカリホスファターゼ作用により紫外部または可視部に吸収極大を有する物質を生成するようなアルカリ性ホスファターゼの基質としては、例えば4-ニトロフェニルリン酸等が挙げられる。4-ニトロフェニルリン酸はアルカリホスファターゼにより4-ニトロフェノールに変換される。アルカリホスファターゼ作用により発光を生成するようなアルカリホスファターゼの基質としては、例えば3-(2'-スピロアダマントン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン・二ナトリウム塩 (AMP PD)、2-クロロ-5-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1<sup>3,7</sup>]デカン]-4-イル}フェニル ホスフェート・二ナトリウム塩 (CDP-Star<sup>TM</sup>)、3-{4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1<sup>3,7</sup>]デカン]-4-イル}フェニル ホスフェート・二ナトリウム塩 (CSPD<sup>TM</sup>)、[10-メチル-9(10H)-アクリジニルイデン]フェノキシメチルリン酸・二ナトリウム塩 (Lumigen<sup>TM</sup> APS-5)等が挙げられる。また、アルカリホスファターゼの作用により色素を生成する試薬として、アルカリホスファターゼの基質であるNADPHを含有する酵素サイクリング反応試薬Ampliq (ダコ社製)が挙げられる。

【0051】

発光免疫検出法で用いる発光標識体としては、任意の公知 [今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店; 臨床検査42(1998)] の発光体を用いることができる。例えば、アクリジニウムエステル、ロフィン等を用いることができる。

蛍光免疫検出法で用いる蛍光標識体としては、任意の公知 (川生明著、蛍光抗体法、ソ

10

20

30

40

50

フトサイエンス社製)の蛍光を用いることができる。例えば、FITC、RITC等を用いることができる。

【0052】

イムノアッセイ法における測定方法としては、競合法、サンドイッチ法[免疫学イラストレイテッド 第5版(南光堂)]等があげられるが、好ましくはサンドイッチ法があげられる。

【0053】

サンドイッチ法は、抗原抗体反応で結合した試料中の目的物質と第一の抗体に、第二の抗体(二次抗体)を同時に、または別々に反応させ、試料中の目的物質を同一または別々の抗体で検出または定量する方法である。多くの場合、測定操作中に試料中の非反応のサンプル成分や測定系成分を洗浄する工程を含む。例えば、固相に第一の抗体(一次抗体)を固定した後、測定したい試料を第一の抗体と接触させる。試料中の非反応のサンプル成分を洗浄し、反応系から除去した後、抗原抗体反応で結合した試料中の目的物質と第一の抗体の複合体に、第二の抗体(二次抗体)を反応させ、測定系中の反応に関与しなかった第二次抗体などの成分を洗浄除去した後、反応系に存在する試料中の目的物質を検出または定量する方法である。

10

【0054】

サンドイッチ法に用いる固相としては、ポリ塩化ビニル製マイクロタイタープレート、ポリスチレン製マイクロタイタープレート等があげられる。

【0055】

サンドイッチ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>などの抗体フラグメントを用いてもよい。

20

【0056】

サンドイッチ法で用いる一次抗体と二次抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識する抗体の組み合わせであればいかなるものでもよいが、少なくとも1つがモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0057】

本発明のサンドイッチ法で用いられるモノクローナル抗体としては、配列番号1の6~28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体などがあげられる。

30

【0058】

配列番号1の6~28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2142[The Hematology Journal, 2, 307 (2001)]が生産するモノクローナル抗体KM2142があげられる。配列番号1の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

40

【0059】

モノクローナル抗体KM2142を生産するハイブリドーマKM2142、モノクローナル抗体KM2804を生産するハイブリドーマKM2804、モノクローナル抗体KM2945を生産するハイブリドーマKM2945は、平成14年2月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6)にFERM BP 7922、FERM BP 7923 およびFERM BP 7924としてそれぞれ寄託されている。

【0060】

上述のモノクローナル抗体はSCGFを認識する部位がそれぞれ異なるので、これらのモノクローナル抗体を組み合わせることでサンドイッチ法を行うことができる。好ましいモノクローナル抗体の組み合わせとしては、配列番号1の6~28番目のアミノ酸配列で示された領

50

域を認識するモノクローナル抗体、具体的にはハイブリドーマKM2142 [ The Hematology Journal, 2, 307 (2001) ] が生産するモノクローナル抗体KM2142と、配列番号1記載の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、具体的にはハイブリドーマKM2804(FERM BP 7923)が生産するモノクローナル抗体KM2804との組み合わせがあげられる。

【0061】

本発明のサンドイッチ法によるSCGFを検出または定量する方法の具体例を以下に示す。

【0062】

まず、適当な固定担体の表面に上述の抗SCGF抗体（一次抗体）を吸着固定する。一次抗体の固定は、例えば、当該抗体を適当な緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等に希釈した後、これを固定担体の表面に接触させ、そして4～37℃にて30分間以上反応させることなどにより行うことができる。

【0063】

次に、固定担体表面の蛋白質結合能をブロックする。例えば、固定担体表面上の遊離結合基をブロッキング緩衝液と接触させる。

【0064】

ブロッキング緩衝液としては、例えば1～10%のウシ血清アルブミン、10～30%ブロックエース（雪印乳業社製）を含有する緩衝液、例えば、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等があげられる。

【0065】

ブロッキング処理は、4～37℃にて30分間以上反応させることにより行うことができる。

【0066】

次に、一次抗体を生体試料と接触させる。生体試料は必要に応じて、例えば0.01～1%のウシ血清アルブミンなどの蛋白質を含有する緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等で希釈してもよい。

【0067】

一次抗体と生体試料との接触は、4～37℃にて30分間以上反応させることにより行うことができる。

【0068】

接触させた後、必要に応じてTween20等の界面活性剤を含有する緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等を用いて数回洗浄する。

【0069】

このとき、生体試料中に存在するSCGFが、あらかじめ固定されている抗SCGF抗体と特異的に結合することにより、抗SCGF抗体を介して固定担体に固定される。

【0070】

次に、SCGFが固定された前記担体を、二次抗体を含有する溶液と接触させる。

【0071】

二次抗体としては、一次抗体とエピトープの異なる抗SCGF抗体であればいかなるものでもよい。また、二次抗体は必要に応じて、前述の標識体で予め標識しておくことができる。

【0072】

未吸着の二次抗体を除去するには、必要に応じてTween20等の界面活性剤を含有する緩衝液、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液等を用いて担体を数回洗浄する。これにより該二次抗体は、あらかじめ結合されている一次抗体及びSCGFを介して、固定担体に結合し、二次抗体の結合量が生体試料中のSCGFの量を反映することになる。

【0073】

上記のようにして固定された二次抗体は、二次抗体の標識体に応じて測定することができる。また、二次抗体に対して特異的な三次抗体を用い、該三次抗体を種々の方法により標識しておき、三次抗体の標識を検出または測定することもできる。

10

20

30

40

50

## 【0074】

上記のようにして、結合された二次抗体の量を測定し、標準物質を用いて検量線を作成し、生体試料中のSCGFの量を測定することができる。

## 【0075】

検量線は、標準物質として濃度が既知であるヒトSCGF蛋白質を含む溶液を数点段階希釈したものを準備し、生体試料とともに上述のサンドイッチ法を行うことにより得られる。

## 【0076】

本発明の白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患の診断薬、造血幹細胞移植後の造血幹細胞の生着遅延の診断薬、およびGVHD発症の診断薬に含有されるSCGFに対する抗体としては、SCGFに反応する抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントなどいかなるものでもよいが、好ましくはモノクローナル抗体が用いられる。

10

## 【0077】

モノクローナル抗体としては、配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体、配列番号1の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体があげられる。

## 【0078】

配列番号1の6～28番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2142(FERM BP 7922)が生産するモノクローナル抗体KM2142があげられる。配列番号1の29～59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804(FERM BP 7923)が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1の60～302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945(FERM BP 7924)が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

20

## 【0079】

本発明のキットとしては、機器または試薬の組み合わせにより構成されるが、以下に述べる各構成要素と本質的に同一、またはその一部と本質的に同一な物質が含まれていれば、構成または形態が異なっても、本発明のキットに包含される。

## 【0080】

試薬としてはSCGFに反応する抗体を含み、また、必要に応じ、生体試料の希釈液、抗体固定化固相、反応緩衝液、洗浄液、標識された二次抗体またはその抗体断片、標識体の検出用試薬、SCGFなどの標準物質なども含まれる。

30

## 【0081】

生体試料の希釈液としては、界面活性剤、緩衝剤などにBSAやカゼインなどのタンパク質を含む水溶液などがあげられる。

## 【0082】

抗体固定化固相としては、各種高分子素材を用途に合うように整形した素材に、本発明の抗体または抗体断片を固相化したものが用いられる。形状としてはチューブ、ビーズ、プレート、ラテックスなどの微粒子、スティック等が、素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックスや金属などがあげられる。抗体の固相化の方法としては物理的方法と化学的方法またはこれらの併用等公知の方法により調製することができる。例えば、ポリスチレン製96ウェルの免疫測定用マイクロプレートに抗体等を疎水固相化したものがあげられる。

40

## 【0083】

反応緩衝液は、抗体固定化固相の抗体と生体試料中の抗原とが結合反応をする際の溶媒環境を提供するものであればいかなるものでもよいが、界面活性剤、緩衝剤、BSAやカゼインなどの蛋白質、防腐剤、安定化剤、反応促進剤などがあげられる。

50

## 【0084】

洗浄液としては、リン酸やトリス（トリスヒドロキシメチルアミノメタン）、HEPESやMOPSなどのグッドバッファー類などの緩衝剤などに、ツイーン20、ツイーン40、ツイーン60、ツイーン80、トリトン<sup>TM</sup>X-705などの界面活性剤、NaCl、KClや硫酸アンモニウムなどの塩、BSAやカゼインなどの蛋白質、アジ化ナトリウムなどの防腐剤、塩酸グアニジン、尿素やソディウムドデシルサルフェートなどの変性剤、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸などの安定化剤の少なくとも1種類を含む液があげられる。具体的には、0.15mol/L塩化ナトリウム、0.05%ツイーン20およびpH7.4の10mmol/Lリン酸緩衝液からなるツイーンPBS、0.15mol/L塩化ナトリウム、0.05%ツイーン20およびpH7.4の10mmol/L トリス-塩酸緩衝液（pH7.4）からなるツイーンTBSなどがあげられる。

10

## 【0085】

標識された二次抗体またはその抗体断片としては、本発明の抗体または抗体断片に西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ウシ小腸アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼなどの標識用酵素をラベルしたもの、緩衝剤、BSAやカゼインなどのタンパク質、防腐剤などを混合したものが用いられる。

## 【0086】

標識体の検出用試薬としては前記の標識用酵素に応じて、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼであれば、テトラメチルベンジジンやオルトフェニレンジアミンなどの吸光測定用基質、ヒドロキシフェニルヒドロキシフェニルプロピオン酸やヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光基質、ルミノールなどの発光基質が、アルカリフォスファターゼであれば、4-ニトロフェニルフォスフェートなどの吸光度測定用基質、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどの蛍光基質等があげられる。

20

## 【0087】

標準物質としては、[WO98/08869](#)に記載の方法により調製できるSCGF、キットに用いられる2種類の抗体のエピトープを含有するペプチドなどがあげられる。

## 【0088】

本発明は、また、配列番号1記載の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体および配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体に関する。

30

## 【0089】

配列番号1記載の29~59番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2804(FERM BP 7923)が生産するモノクローナル抗体KM2804があげられる。配列番号1記載の60~302番目のアミノ酸配列で示された領域を認識するモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM2945(FERM BP 7924)が生産するモノクローナル抗体KM2945があげられる。

## 【0090】

本発明に用いられるモノクローナル抗体の製造方法としては、公知のモノクローナル抗体の製造方法により製造することができる。

40

以下に、本発明に用いるモノクローナル抗体の製造方法を詳細に説明する。

## (1) 抗原の調製

抗原としては、ヒトSCGFをコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入して得られたヒトSCGF蛋白質、ペプチド合成により得られたヒトSCGF部分配列を有する合成ペプチドなどがあげられる。

抗原用部分ペプチドとしては、5~30残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の該蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。KyteとDoolittleの方法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 157, 105-132 (1982)] などにより、親水性の高い部分配列を予

50

測することで、立体構造上蛋白質表面に存在する部分を推測することができる。即ち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多いためである。また、蛋白質のN末端、C末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。さらに、蛋白質の二次構造情報も参考にできる。Chou Fasmanの方法 [アドバンセズ・イン・エンザイモロジー (Advances in Enzymology), 47, 45-147 (1978)] などによりアミノ酸配列から予測した蛋白質二次構造において、ターン構造やランダムコイル構造を有する部分が抗原用ペプチドとして適していると考えられることができる。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を確立する抗原となるとは限らない。

部分ペプチドには、蛋白質と架橋するためにシステインを末端に付加する。蛋白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドのN末端はアセチル化、C末端はアミド化する。

部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる [インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプタイド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide Protein Research), 35, 161-214 (1990)、 「ソリッド・フェーズ・ペプタイド・シンセシス (Solid Phase Peptide Synthesis)」, メソッズ・イン・エンザイモロジー 第289巻 (Methods in Enzymology, vol. 289), グレグ・B・フィールズ (Gregg B. Fields) 編, アカデミック・プレス (Academic Press), (1997)、 「ペプタイド・シンセシス・プロトコール (Peptide Synthesis Protocols)」, メソッズ・イン・モレキュラー・バイオロジー 第35巻 (Methods in Molecular Biology, vol. 35), マイケル・W・ペニンントン (Michael W. Pennington), ベン・M・ダン (Ben M. Dunn) 編, ヒューマナ・プレス (Humana Press), (1994)]。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アドバンスト・ケムテック社 (Advanced ChemTech Inc., USA、以後 ACT社と略称する) 製ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した N-Fmoc アミノ酸あるいは N-Boc アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI社、島津製作所、国産化学(株)、ノババイオケム社 (NovaBiochem)、渡辺化学(株)、ACT社、アナスペック社 (AnaSpec Inc.)、またはペプチド研究所(株)等から入手することができる。

#### 【0091】

##### (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウス、ラットまたはハムスターに(1)で調製した抗原を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。

免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、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) や水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど] とともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA (ウシ血清アルブミン) やKLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法 [Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウス、ラットまたはハムスターを抗体産生細胞の供給源として提供する。

抗体産生細胞と骨髄腫細胞の融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後3~7日目に、免疫したマウス、ラットまたはハムスターより脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。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 (1,200rpm、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 (pH 7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で3回洗浄して融合用脾細胞として提供する。

## 【 0 0 9 2 】

## ( 3 ) 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 ( B A L B / c 由来 ) 骨髄腫細胞株 P3 X63Ag8 U1(P3 U1) [ Current Topics in Microbiology and Immunology, 18:1 7 (1978) ]、P3 NS1/1 Ag41 ( NS 1 ) [ European J. Immunology, 6: 511 519 (1976) ]、SP2/0 Ag14(SP 2) [ Nature,276: 269 270 (1978) ]、P3 X63 Ag8653(653) [ J.Immunology, 123:1548 1550 (1979) ]、P3 X63 Ag8(X6 3) [ 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 [ R P M I - 1 6 4 0 培地にグルタミン ( 1.5mmol/L )、2 - メルカプトエタノール (  $5 \times 10^{-5}$  mol/L )、ジェンタマイシン ( 10  $\mu$ g/mL ) および牛胎児血清(FCS)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 ( 15  $\mu$ g/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  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

## 【 0 0 9 3 】

## ( 4 ) 細胞融合

( 2 ) で免疫した抗体産生細胞と ( 3 ) で得られた骨髄腫細胞を M E M 培地または P B S ( 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、pH 7.2 ) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髄腫細胞 = 5 ~ 1 0 : 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、ポリエチレングライコール - 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 H A T 培地 [ 正常培地にヒポキサンチン (  $10^{-4}$  mol/L )、チミジン (  $1.5 \times 10^{-5}$  mol/L ) およびアミノプテリン (  $4 \times 10^{-7}$  mol/L ) を加えた培地 ] 100mL 中に懸濁する。この懸濁液を 96 穴培養用プレートに 100  $\mu$  L / 穴ずつ分注し、5% CO<sub>2</sub> 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下記に述べる酵素免疫測定法などにより、ヒト SCGF に反応し、ヒト SCGF を含まない抗原に反応しないものを選択する。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抗ヒト SCGF 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。

## 酵素免疫測定法

抗原あるいは抗原を発現した細胞などを 96 ウェルプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に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選択する。

## 【 0 0 9 4 】

## ( 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 ~ 1 0 週令のマウスまたはヌードマウスに、( 4 ) で得られた抗ヒト SCGF モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $2 \times 10^5$  ~  $5 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内注射する。10 ~ 21 日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% 硫酸アンモニウムで塩析した後、カプリル酸沈殿法、D E A E - 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よる精製を行い、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、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。

[ 実施例 ]

【 0 0 9 5 】

実施例 1 . ヒトSCGF部分ペプチドを用いた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製

( 1 ) ヒトSCGF部分ペプチドの合成

ヒトSCGF蛋白配列を解析し、親水性の高い部分、N末端、C末端、二次構造上ターン構造、ランダムコイル構造を有する部分の中から、抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物1(SCGF 1)を選択した。

10

( 略号について )

本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC IUB委員会 ( IUPAC IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature ) の勧告 [ ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー ( European Journal of Biochemistry ) , 138巻, 9頁 ( 1984 年 ) ] に従った。

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

Ala: L アラニン

Arg: L アルギニン

Cys: L システイン

Gln: L グルタミン

Glu: L グルタミン酸

Glx: L グルタミン酸

Gly: グリシン

Leu: L ロイシン

Trp: L トリプトファン

20

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

Fmoc: 9 フルオレニルメチルオキシカルボニル

tBu: t ブチル

Trt: トリチル

Boc: t ブチルオキシカルボニル

Pmc: 2, 2, 5, 7, 8 ペンタメチルクロマン 6 スルフォニル

Fmoc Arg(Pmc) OH: N 9 フルオレニルメチルオキシカルボニル

N<sup>2,2,5,7,8</sup> ペンタメチルクロマン 6 スルフォニル L アルギニン

Fmoc Gln(Trt) OH: N 9 フルオレニルメチルオキシカルボニル N トリチル L グルタミン

30

Fmoc Glu(OtBu) OH: N 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル L グルタミン酸

t ブチルエステル

Fmoc Trp(Boc) OH: N 9 フルオレニルメチルオキシカルボニル N<sup>ind</sup> t ブチルオキシカルボニル L トリプトファン

40

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

PyBOP: ベンゾトリアゾール 1 イルオキシトリピロリジノホスフォニウムヘキサフルオロホスフェート

HOBt: N ヒドロキシベンゾトリアゾール

NMM: N メチルモルホリン

DMF: N,N ジメチルホルムアミド

TFA: トリフルオロ酢酸

【 0 0 9 6 】

以下の実施例において、化合物の理化学的性質は次の方法により測定した。

質量分析は、日本電子JMS HX110Aを用いFAB MS法により、もしくはブルカー社製質量分

50

析装置REFLEXを用いMALDI TOFMS法により行った。行った。アミノ酸分析は、コーエン (Cohen, S. A.) らの方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 222, 19 (1994)] により行った。加水分解は塩酸蒸気中110 で20時間行い、加水分解物のアミノ酸組成はウォーターズ・アキュ・タグ (Waters AccQ Tag) アミノ酸分析計 (Waters社製) を用い分析した。

#### 【 0 0 9 7 】

(1)化合物 1 (SCGF 1) (配列番号 4) (Ac Arg Glu Trp Glu Gly Gly Trp Gly Gly Ala Gln Glu Glu Glu Arg Glu Arg Glu Ala Leu Cys OH) の合成

Fmoc Cys(Trt)、14.1 μmol が結合した担体樹脂 (H Cys(Trt) 2 ClTrt resin樹脂、ノバピオケム社製) 30mgを自動合成機 (島津製作所) の反応容器に入れ、600 μLのDMFを加えて3分間攪拌し溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) 30%ピペリジン DMF溶液900 μLを加えて混合物を4分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう1回繰り返した。

(b) 担体樹脂を900 μLのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を5回繰り返した。

(c) Fmoc Leu OH (141 μmol)、PyBOP (141 μmol)、HOBT1水和物(141 μmol)およびNMM(212 μmol)をDMF (494 μL)中で3分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を30分間攪拌し、溶液を排出した。

(d) 担体樹脂を900 μLのDMFで1分間洗浄後溶液を排出し、これを5回繰り返した。

#### 【 0 0 9 8 】

こうして、Fmoc Leu Cys(Trt) が担体上に合成された。

次に、(a) (b) の工程の後、(c) の工程で Fmoc Ala OH を用いて縮合反応を行い、(d) の洗浄工程を経て、Fmoc Ala Leu Cys(Trt) が担体上に合成された。

以下、工程 (c) において、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Arg(Pmc) OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Arg(Pmc) OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Gln(Trt) OH、Fmoc Ala OH、Fmoc Gly OH、Fmoc Gly OH、Fmoc Trp(Boc) OH、Fmoc Gly OH、Fmoc Gly OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Trp OH、Fmoc Glu(OtBu) OH、Fmoc Arg(Pmc) OH を順次用いて、(a)~(d) を繰り返した後、(a) (b) の脱保護、洗浄工程を経て、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下12時間乾燥して、N末端が無保護であり側鎖が保護されたペプチドの結合した担体樹脂を得た。次に得られた担体樹脂に対し次の (e)~(g) の操作を行った。

(e) 担体樹脂を800 μLのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を3回繰り返した。

(f) 無水酢酸 (282 μmol) 及びDMF(500 μL) を樹脂に加えて混合物を2時間攪拌し、溶液を排出した。

(g) 担体樹脂を 800 μLのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を3回繰り返した。

#### 【 0 0 9 9 】

この後、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下 12 時間乾燥して、N末端がアセチル化された側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、5mg/mLの濃度で2メチルインドールを含むTFA (82.5%)、チオアニソール (5%)、水 (5%)、エチルメチルスルフィド (3%)、1,2エタンジチオール (2.5%) およびチオフェノール (2%) からなる混合溶液 1mL を加えて室温で6時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約 10mL を加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして44.6mgを取得した。この粗生成物全量をジチオスレイトールおよびDMFからなる混合溶液に溶解し、逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mmI.D. X 250mm) を用いた HPLC で精製した。0.1% TFA 水溶液に、TFA 0.1% を含む 90% アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nm で検出し、化合物1を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して

、化合物1を1.6mg 得た。

質量分析 [ TOFMS ] ;  $m/z = 2520.7 (M+H^+)$

アミノ酸分析; Glx 7.6 (8), Gly 4.0 (4), Arg 2.9 (3), Ala 2.2 (2), Leu 1.2 (1), Cys 1.7 (1)

【 0 1 0 0 】

( 2 ) 免疫原の調製

実施例 1 ( 1 ) で得られたヒト SCGF 部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で以下の方法で KLH ( カルピオケム社製 ) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLH を PBS に溶解して 10mg/mL に調整し、1/10 容量の 25mg/mL MBS ( ナカライテスク社製 ) を滴下して 30 分間攪拌反応させる。あらかじめ PBS で平衡化したセファデックス G 25 カラムなどのゲルろ過カラムでフリーの MBS を除いて得られた KLH MB 2.5mg を 0.1mol/L リン酸ナトリウムバッファー ( pH 7.0 ) に溶解したペプチド 1mg と混合し、室温で 3 時間、攪拌反応させた。反応後、PBS で透析した。

10

【 0 1 0 1 】

( 3 ) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 1 ( 2 ) で調製したペプチド KLH コンジュゲート 100  $\mu$ g をアルミニウムゲル 2 mg および百日咳ワクチン ( 千葉県血清研究所製 )  $1 \times 10^8$  細胞とともに 5 週令雌ラット ( SD ) に投与し、2 週間後より 100  $\mu$ g のコンジュゲートを 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の ( 4 ) に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

20

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 ( 1,200 rpm、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 ( pH 7.65 ) 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。

【 0 1 0 2 】

( 4 ) 酵素免疫測定法 ( バインディング E L I S A )

アッセイ用の抗原には実施例 1 ( 1 ) で得られたヒト SCGF 部分ペプチドをサイログロブリン ( 以下、THY と略す。 ) とコンジュゲートしたものをを用いた。作製方法は実施例 1 ( 2 ) に記した通りであるが、架橋剤には MBS の代わりに SMCC ( シグマ社製 ) を用いた。96 穴の EIA 用プレート ( グライナー社製 ) に、上述のように調製したコンジュゲートを 10  $\mu$ g/mL、50  $\mu$ L/穴で分注し、4 時間で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1% BSA PBS を 100  $\mu$ L/穴で加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1% BSA PBS を捨て、被免疫マウス抗血清、抗ヒト SCGF モノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を 50  $\mu$ L/穴で分注し 2 時間反応させた。Tween PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン ( ダコ社製 ) を 50  $\mu$ L/穴で加えて室温、1 時間反応させ、Tween PBS で洗浄後 ABTS 基質液 [ 2.2 アジノビス ( 3 エチルベンゾチアゾール 6 スルホン酸 ) アンモニウム ] を用いて発色させ OD415nm の吸光度をプレートリーダー ( E max ; Molecular Devices 社製 ) にて測定した。

30

【 0 1 0 3 】

( 5 ) 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  $2 \times 10^7$  以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

40

【 0 1 0 4 】

( 6 ) ハイブリドーマの作製

実施例 1 ( 3 ) で得られたラット脾細胞と ( 5 ) 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 ( 1,200 rpm、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  $^{\circ}$ C で、ポリエチレングライコール - 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<sup>8</sup> ラット脾細胞を加え、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 になるようにした。遠心分離 ( 900 rpm、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 100mL 中に懸

50

濁した。

この懸濁液を96穴培養用プレートに100  $\mu$ L/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で10～14日間、培養した。この培養上清を実施例1(4)に記載した酵素免疫測定法で調べ、ヒトSCGF部分ペプチド(化合物1)に反応して、別のSCGF部分ペプチドである配列番号1の140～156番目のアミノ酸配列からなるペプチドに反応しない穴を選び、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、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2141、KM2142、KM2143、KM2144、KM2145を確立した。

【0105】

(7)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)に実施例1(6)で得られたハイブリドーマ株を5～20×10<sup>5</sup>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%硫酸アンモニウムにて塩析し、塩化ナトリウム0.5Mを添加したPBSで透析後、セルロフアイン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。

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行い決定した(表1)。

【0106】

【表1】

抗体名	抗体クラス
KM2141	G2a
KM2142	G2a
KM2143	G2a
KM2144	G2a
KM2145	G1

【0107】

(8)ヒトSCGF部分ペプチドとの反応性(酵素免疫測定法)

実施例1(6)で選択された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のヒトSCGF部分ペプチド(化合物1)との反応性を(4)に示した酵素免疫測定法にて調べた。コントロールペプチドとしては、化合物1とは異なるSCGF部分ペプチドである配列番号1の140～156番目のアミノ酸配列からなるペプチドを用いた。第1図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体(KM2141～2145)は化合物1に特異的に反応し、コントロールペプチドには反応しなかった。

【0108】

実施例2.動物細胞を用いたヒトSCGFの発現と精製

【0109】

(1)ヒトSCGF発現用プラスミドpAGE SCGF の構築およびヒトSCGFの動物細胞での発現

動物細胞用発現ベクターpAGE210(WO96/34016)のHindIII/KpnI処理断片とSCGFタンパク質をコードするDNA[Mio et.al., BBRC 249, 124-130 (1998)]とを連結することにより、ヒトSCGF発現ベクターpAGE SCGF を構築した。

10

20

40

50

動物細胞へのプラスミドの導入は宮地等の方法に従いエレクトロポレーション法 [ Miya ji et al., Cytotechnology, 3, 133 140 (1990) ] により行った。4  $\mu$ gのpAGE SCGF aを  $4 \times 10^6$ 個のdhfr遺伝子欠損CHO細胞株 [ Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 4220 (1980) ] へ導入した。この細胞を10mLのMEMa2000 dFCS(5)培地 [ dFCSを5%、7.5% NaHCO<sub>3</sub>を1/40量、200mL グルタミン溶液 (GIBCO/BRL社製) を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (GIBCO/BRL社製、5,000単位/mLペニシリンおよび5,000 mg/mLストレプトマイシン含有) を0.5%含むMEM a2000培地 (GIBCO/BRL社製) ] に懸濁し、10cmプレート (IWAKI社製) に入れ、37 °CのCO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間培養した。ハイグロマイシン (GIBCO/BRL社製) を終濃度0.3 mg/mLになるよう添加し、さらに1~2週間培養した。形質転換細胞がコンフルエントになった時点で回収し、ハイグロマイシンを0.3mg/mL、methotrexate (MTX) を50nmol/L含むMEMa2000 dFCS(5)培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mLになるように懸濁し、F75フラスコ (Greiner社製) に2 mL分注した。1~2週間の培養後、50nmol/L MTX耐性の細胞を0.3 mg/mLハイグロマイシン、200nmol/L MTX含有MEMa2000 dFCS(5)培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mLになるように懸濁し、F75フラスコ (Greiner社製) に2mL分注した。1~2週間の培養後、200nmol/L MTX耐性の細胞を得た。この200 nmol/L MTX耐性細胞を下記に示す培地 1 ) および培地 2 ) を用いて、2 Lのローラーボトル (Greiner社製) で37 °C、80回転/分で培養を行った。

培地 1 ) 無血清Ex cell 301 培地 ( JRH Biosciences社製 )

培地 2 ) 10mg/Lのaprotinin ( Sigma社製 ) を含む無血清 Ex cell 301 培地

#### 【 0 1 1 0 】

約5日間の培養後、細胞を遠心分離し、培養上清サンプルを得た。

#### 【 0 1 1 1 】

( 2 ) モノクローナル抗体KM2142を用いたウェスタンブロッティングによる培養上清中のSCGFタンパク質の存在確認

実施例 1 で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を用いたウェスタンブロッティングにより、前記 ( 1 ) で得られた培養上清中のSCGFタンパク質の存在を、以下の方法により確認した。

後述 ( 3 ) および ( 4 ) のSCGFタンパク質のクロマトグラフィーによる精製における各精製画分をSDS PAGEで分離後、P. Matsudairaの方法 [ J.B.C. 262, 10035 10038 (1987) ] に従ってPVDF膜 ( Immobilon Transfer Membranes、ミリポア社製 ) へ電氣的に転写した。転写膜はブロッキング溶液 [ 1% BSAを含むPBSバッファー (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 9.6 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2)) ] 中で30分間振盪した後、ブロッキング溶液で1mg/mLに希釈した抗SCGFモノクローナル抗体を含む溶液中で室温60分間振盪した。該転写膜はさらに0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、パーオキシダーゼで標識された抗ラットIgG抗体 ( anti ra t immunoglobulin 1.3g/L, DAKO社製 ) をPBSで1/1,000に希釈した溶液中で室温60分間振盪した。0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、発光法 ( ECL Western blotting detection reagents、アマシャム ファルマシア バイオテク社製 ) により検出を行った。

#### 【 0 1 1 2 】

( 3 ) CHO細胞培養上清からのヒトSCGFタンパク質の精製

実施例 3 に記載する抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製を行うために、上記 ( 1 ) の培地 1 ) の培養条件で得たCHO細胞培養上清から以下の2段階のクロマトグラフィーによって精製ヒトSCGFタンパク質を取得した。

第1段階：亜鉛キレートクロマトグラフィー

Zn<sup>2+</sup>イオンで飽和させたChelating Sepharose Fast Flow担体 (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を2.5 cm  $\times$  20 cmのカラム (BioRad社製) に11 cmの高さまで充填し、0.5mol/L 塩化ナトリウムを含む20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.1) で平衡化した。これに上記 ( 1 ) で得たCHO細胞培養上清2.4Lを添加し、同緩衝液で十分に洗

浄後、0~100 mmol/L ヒスチジン直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS PAGEを行い、上記(2)で示したモノクローナル抗体KM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

第2段階：MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー

上記亜鉛キレートクロマトグラフィー粗精製画分に終濃度65%となるように硫酸アンモニウムを添加して攪拌後、4 で2時間放置した。18,800 × gで30分間遠心分離して得られた沈澱を10mmol/L トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し、同トリス塩酸緩衝液で平衡化したMonoQ HR 5/5 カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に添加した。同緩衝液で十分洗浄後、0~1 mol/L 塩化ナトリウム直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS PAGEを行い、上記(2)で示したモノクローナル抗体KM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した(第2図のレーン2)。

10

【0113】

(4) CHO培養上清からのヒトSCGFタンパク質の高純度精製

実施例6に記載するヒトSCGF定量系で用いるヒトSCGFタンパク質標準品は、上記(1)の培地2)の培養条件で得たCHO細胞培養上清から以下の3段階のクロマトグラフィーにより精製し、取得した。

第1段階：亜鉛キレートクロマトグラフィー

Zn<sup>2+</sup>イオンで飽和させたChelating Sepharose Fast Flow担体(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)を5.0cm × 20cmのカラム(BioRad社製)に14.5cmの高さまで充填し、0.5mol/L 塩化ナトリウムを含む20mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.1)で平衡化した。これに上記(1)で得たCHO細胞培養上清12Lを添加し、同緩衝液で十分に洗浄後、0~100mmol/L ヒスチジン直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS PAGEを行い、上記(2)で示したKM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

20

第2段階：MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー

上記亜鉛キレートクロマトグラフィー粗精製画分に終濃度50%となるように硫酸アンモニウムを添加して攪拌後、4 で2時間放置した。18,800 gで30分間遠心分離して得られた沈澱を10mmol/L トリス塩酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し、同トリス塩酸緩衝液で平衡化したMonoQ HR 10/10 カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に添加した。同緩衝液で十分洗浄後、0~1 mol/L 塩化ナトリウム直線濃度勾配で溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS PAGEを行い、上記(2)で示したKM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

30

第3段階：S 400ゲルろ過クロマトグラフィー

Sephacryl S 400 HR担体(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)をXK50/60カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に51.5cmの高さまで充填したカラムとXK 50/100カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に93cmの高さまで充填したカラムを直列に連結し、PBSバッファーで十分平衡化した。これに上記MonoQ陰イオン交換クロマトグラフィー精製画分28mLを添加し、6mL/分の流速でPBSバッファーにより溶出した。溶出画分の一部を用いてSDS PAGEを行い、上記(2)で示したモノクローナル抗体KM2142によるウェスタンブロッティングで交差する約45kDaのバンドを含む画分を回収した。

40

【0114】

(5) ヒトSCGFタンパク質のN末端アミノ酸配列解析

実施例2(3)で得られた精製ヒトSCGFタンパク質のN末端アミノ酸配列はタンパク質化学の常法に従い決定した。精製ヒトSCGFタンパク質を含む画分をSDS PAGE後、銀染色(第2図レーン2)あるいはP. Matsudairaの方法に従ってPVDF膜(ProBlott、アプライドバイオシステムズ社製)へ電氣的に転写した。転写した膜はクマジーブルー染色し、見かけ上分子量が45kDa(第2図レーン2、バンドA)、41kDa(第2図レーン2、バンドB)、34kDa(第2図レーン2、バンドC)の各バンドを切り出し、気相プロテインシーケンサー(PPSQ 10、島津製作所)を用いてメーカー推奨の方法によりアミノ酸配列を決定した。

50

得られたアミノ酸配列は配列番号5、6、7に記載したように、配列番号1に記載したSCGFのアミノ酸配列のN末端から1アミノ酸残基目、29アミノ酸残基目、60アミノ酸残基目からのアミノ酸配列にそれぞれ一致した。以下、第2図レーン2に示した見かけ分子量約41kDaのN末端28残基欠失SCGFタンパク質を28体、約34kDaのN末端59残基欠失SCGFタンパク質を59体と称する。

#### 【0115】

実施例3．CHO細胞発現ヒトSCGF蛋白質を用いた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製

#### 【0116】

##### (1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例2(3)で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質(SCGF、28体、59体のSCGF混合物)100 $\mu$ gをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)1 $\times$ 10<sup>10</sup>細胞とともに6週令雌マウス(Balb/c)に投与し、2週間後より100 $\mu$ gのヒトSCGF蛋白質を1週間に1回、計3回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を実施例1(4)で示した酵素免疫測定法(ただしアッセイ用の抗原にはCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質、コントロール抗原として1%BSA-PBSを用いた。)および以下に示すサンドイッチELISA法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

抗体産生細胞の調製は実施例1(3)と同様に行った。

#### 【0117】

##### (2) サンドイッチELISA法

96穴のEIAプレート(グライナー社製)に実施例1で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を10 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ L/穴で分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA PBSを100 $\mu$ L/穴で加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA PBSを捨て、CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を5 $\mu$ g/mLで1%BSA PBS希釈したものを50 $\mu$ L/穴で分注し、室温2時間反応させた。対象として1%BSA PBSを50 $\mu$ L/穴分注し、同様に反応させた。tween PBSで洗浄後、上記(1)で得られた被免疫マウス抗血清の培養上清を50 $\mu$ L/穴で分注し、2時間反応させた。tween PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgMグロブリン(ラット血清蛋白吸収済み;カルタグ社製)を50 $\mu$ L/穴で加えて室温で1時間反応させた。tween PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させOD415nmの吸光度をプレートリーダー(Emax;Molecular Devices社製)にて測定した。

#### 【0118】

##### (3) マウス骨髄腫細胞の調製

実施例1(5)と同様に調製を行った。

#### 【0119】

##### (4) ハイブリドーマの作製

実施例1(6)と同様に実施例3(1)で得られたマウス脾細胞と(3)で得られた骨髄腫細胞との細胞融合を行った。

得られた細胞懸濁液を96穴培養用プレートに100 $\mu$ L/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで10~14日間、培養した。この培養上清を実施例3(2)に記載したサンドイッチELISA法で調べ、ヒトSCGF蛋白質に反応してコントロールである1%BSA PBSに反応しない穴を選び、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、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2801、KM2802、KM2803およびKM2804を確立した。

#### 【0120】

##### (5) モノクローナル抗体の精製

実施例1(7)と同様に実施例3(4)で得られたハイブリドーマ株をヌード雌マウスに腹腔内投与を行い、得られた腹水より精製モノクローナル抗体を取得した。

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行い、決定した。その結果を表2に示す。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

【表 2】

抗体名	抗体クラス
K M 2 8 0 1	G 1
K M 2 8 0 2	G 1
K M 2 8 0 3	G 1
K M 2 8 0 4	G 1

【 0 1 2 2 】

( 6 ) CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質との反応性 ( 酵素免疫測定法 )

実施例 3 ( 4 ) で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のCHO細胞発現ヒトSCGF蛋白質との反応性を実施例 1 ( 4 ) に示した酵素免疫測定法にて調べた。第 3 図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体 ( KM2801、KM2802、KM2803およびKM2804 ) はCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質に特異的に反応し、コントロールの 1 % BSA PBSには反応しなかった。

20

実施例 4 . SDS変性ヒトSCGFタンパク質 ( CHO細胞発現 ) を用いた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の作製

実施例 3 記載の未変性ヒトSCGF蛋白質を免疫原に用いた場合には、 5 9 体に反応するモノクローナル抗体は得られなかった。そこで、 5 9 体に反応するモノクローナル抗体を作製するため、SDS変性SCGFを免疫原に用いてハイブリドーマの作製を試みた。

【 0 1 2 3 】

( 1 ) 免疫原の調製

実施例 2 ( 3 ) で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質をSDS ( ラウリル硫酸ナトリウム ; ナカライテスク社製 ) を加えて変性させたものを作製し、免疫原とした。すなわち 5 % SDS - PBSを調製し、CHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質に9分の 1 量加え、100 で5分間煮沸したものをSDS変性ヒトSCGFタンパク質とした。

30

【 0 1 2 4 】

( 2 ) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例 4 ( 1 ) で得られたSDS変性ヒトSCGFタンパク質100  $\mu$ gをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン ( 千葉県血清研究所製 )  $1 \times 10^8$ 細胞とともに6週令雌マウス ( Balb/c ) に投与し、2週間後より100  $\mu$ gのSDS変性ヒトSCGFタンパク質を1週間に1回、計3回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を実施例 1 ( 4 ) で示した酵素免疫測定法 ( ただしアッセイ用の抗原にはSDS変性ヒトSCGF蛋白質、コントロール抗原として1 % BSA PBSを用いた。 ) で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

40

【 0 1 2 5 】

抗体産生細胞の調製は実施例 1 ( 3 ) に記載の方法と同様に行った。

【 0 1 2 6 】

( 3 ) マウス骨髄腫細胞の調製

実施例 1 ( 5 ) に記載の方法と同様の調製を行った。

【 0 1 2 7 】

( 4 ) ハイブリドーマの作製

50

実施例 1 ( 6 ) と同様にして、実施例 4 ( 2 ) で得られたマウス脾細胞と ( 3 ) で得られた骨髓腫細胞との細胞融合を行った。

得られた細胞懸濁液を96穴培養用プレートに100 $\mu$ L/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで10~14日間、培養した。この培養上清を実施例 1 ( 4 ) で示した酵素免疫測定法で調べ、SDS変性ヒトSCGF蛋白に反応してコントロールである1%BSA PBSに反応しない穴を選び、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抗ヒトSCGFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM2941、KM2942、KM2943、KM2944およびKM2945を確立した。

【 0 1 2 8 】

( 5 ) モノクローナル抗体の精製

実施例 1 ( 7 ) と同様実施例 4 ( 4 ) で得られたハイブリドーマ株をヌード雌マウスの腹腔内投与を行い、得られた腹水より精製モノクローナル抗体を取得した。

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行い、決定した。その結果を表3に示す。

【 0 1 2 9 】

【表3】

抗体名	抗体クラス
K M 2 9 4 1	G 1
K M 2 9 4 2	G 1
K M 2 9 4 3	G 1
K M 2 9 4 4	G 1
K M 2 9 4 5	G 1

10

【 0 1 3 0 】

( 6 ) SDS変性ヒトSCGFタンパク質との反応性 ( 酵素免疫測定法 )

実施例 4 ( 4 ) で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のSDS変性ヒトSCGFタンパク質との反応性を実施例 1 ( 4 ) に示した酵素免疫測定法にて調べた。第4図に示すように、抗ヒトSCGFモノクローナル抗体 ( KM2941、KM2942、KM2943、KM2944およびKM2945 ) はSDS変性ヒトSCGFタンパク質に特異的に反応し、コントロールの1%BSA PBSには反応しなかった。

【 0 1 3 1 】

実施例 5 . 抗ヒトSCGFモノクローナル抗体の反応性の検討

( 1 ) ヒトおよびマウスSCGFタンパク質に対する反応性

実施例 1、3および4で作製された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体のヒトおよびマウスSCGFタンパク質に対する反応性を酵素免疫測定法 ( バインディングELISA ) で検討した。マウスSCGFタンパク質は実施例 2 記載の方法に準じて作製した。

アッセイ用の抗原としてCHO細胞発現ヒトおよびマウスSCGFタンパク質を用い、実施例 1 ( 4 ) に記載の方法により行った。結果を第5図に示す。

抗SCGFモノクローナル抗体KM2142は配列番号1に示すSCGFのアミノ酸配列のN末端から6残基目から25残基目までに相当する部分ペプチド ( 化合物1 ) を抗原に用いて作製されたハイブリドーマ由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2142は、SCGFタンパク質に対する反応性をも有していることが示された。また、抗SCGFモノクローナル抗体KM2142はヒトおよびマウスSCGFタンパク質の両方に反応性を有していた。

抗SCGFモノクローナル抗体KM2804はCHO細胞発現ヒトSCGFを抗原に用いて作製したハイ

30

40

50

ブリドーム由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2804はヒトSCGFにのみ反応し、マウスSCGFに対する交叉反応性は示さなかった。

抗SCGFモノクローナル抗体KM2945はSDS変性SCGFタンパク質（CHO細胞発現）を抗原に用いて作製したハイブリドーム由来の抗体である。抗SCGFモノクローナル抗体KM2945は、未変性のSCGFタンパク質に対する反応性をも有していることが示された。また、抗SCGFモノクローナル抗体KM2945はマウスSCGFに対する交叉反応性は示さなかった。

#### 【 0 1 3 2 】

##### ( 2 ) ウェスタンブロッティング

実施例 2 ( 3 ) で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を用い、実施例 3 および 4 で作製された抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2804およびKM2945のウェスタンブロッティングにおける反応性を検討した。

実施例 2 ( 2 ) と同様にPVDF膜に転写したサンプルを、ブロッキング溶液中で室温30分間振盪後、ブロッキング溶液で1mg/mLに希釈した抗SCGFモノクローナル抗体で室温60分間振盪した。転写膜はさらに0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、PBSで1/1,000に希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）溶液中で室温60分間振盪した。0.05% tween20を含むPBSバッファーで5分間洗浄を2回、PBSバッファーでの5分間洗浄を1回実施した後、上述のECL発光法により検出した。

第2図におけるレーン 3、4、5 はそれぞれKM2142、KM2804、KM2945を用いた精製ヒトSCGFタンパク質のウェスタンブロッティング結果を示す。KM2804はN末端 5 9 残基欠失SCGFタンパク質である 5 9 体には反応性を有していないが、全長SCGFおよびN末端 2 8 残基欠失SCGFタンパク質である 2 8 体には反応性を有していた。また、KM2945は全長SCGFおよび欠失体のいずれも反応性を有していた。

#### 【 0 1 3 3 】

##### 実施例 6 . ヒトSCGF定量系

実施例 1 で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2142を以下の方法によりピオチン標識した。実施例 1 で得られたKM2142精製抗体をPBSで1mg/mLに希釈し、1/4容量の0.5mol/L炭酸バッファー（pH 9.2）を加えた。さらにバッファーと同量のNHS Lc Biotin（1mg/mLにジメチルホルムアミドにて溶解；ピラス社製）を攪拌下滴下した。3時間、室温で攪拌反応を行った後、PBSで一晩透析したものをピオチン標識KM2142として用いた。

96穴のEIA用プレート（グライナー社製）に、実施例 3 で得られた抗ヒトSCGFモノクローナル抗体KM2804を5  $\mu$ g/mL、50  $\mu$ L/穴で分注し、4 時間で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA PBSを100  $\mu$ L/穴に加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA PBSを捨て、実施例 2 ( 4 ) で得られたCHO細胞発現ヒトSCGFタンパク質を血清希釈液（協和メデックス社製）で17.5ng/mLから 2 倍希釈系列で14点希釈したものを50  $\mu$ L/穴で分注し室温で 2 時間反応させた。tween PBSで洗浄後、上記で得られたピオチン標識KM2142（0.2  $\mu$ g/mLにBSA PBSにて希釈）を50  $\mu$ L/穴で加えて室温、2 時間反応させ、tween PBSで洗浄後、さらにアルカリフォスファターゼ標識アビジン（ザイメッド社製）を32,000倍希釈で50  $\mu$ L/穴で加えて室温、1 時間反応させた。tween PBSで洗浄後、AmpliQ（DAKO社製）を用いて発色させOD490nmの吸光度をプレートリーダー（E max ; Molecular Devices社製）にて測定した。その結果、第 6 図に示すように、本定量系によりヒトSCGFタンパク質を0.04 ~ 2.0ng/mLの範囲で定量することが可能であった。

#### 【 0 1 3 4 】

##### 実施例 7 . 白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の血清SCGF濃度

インフォームドコンセントを得た白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の血清中のSCGF濃度を実施例 6 の方法で測定した。また血球検査値が正常値を示す男女10名の健常人を対象例として同じく血清中のSCGF濃度を測定した。その結果を第 7 図に示す。

健常人の値の分布が正規分布を示すことを確認した後、この群より平均値とスタンダードデビエーション（SD）を計算し、平均値 + 2 SD の値を正常と異常とを区別する基準

値に設定した。この基準値をもとに、白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患の値を正常・異常に分別し、白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患がSCGF測定値で検出可能か否かを確認した。その結果を表4に示す。

【0135】

【表4】

	患者数	陽性者数	陽性率(%)
ALL	7	7	100.0
AML	7	6	85.7
CML	6	6	100.0
MDS	5	5	100.0
NHL	7	6	85.7
MM	6	4	66.7
AA	7	0	0.0

カットオフ値は健常人の平均値+2SD=18.2ng/mL

とした。

【0136】

健常人群に比較し、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、骨髄異形成症候群(MDS)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄腫(MM)の患者の中央値は有意に高く、SCGF測定値がこれら疾患で有意に上昇していることが示された(第7図)。

30

【0137】

また健常人の値から定めたカットオフ値を用いて白血病、前白血病患者および非白血病性悪性血液疾患を高い感度で検出できることが示された(表4)。一方、同じ血液疾患でありながら、再生不良性貧血(AA)患者の値は健常人との有意差が観察されず、またカットオフ値を用いてもこの疾患を検出出来なかった。

血液細胞数の異常を伴う疾患である非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄腫(MM)、骨髄異形成症候群(MDS)、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)を比較すると、急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)などの白血病患者のF血液中SCGF濃度は、非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄腫(MM)、骨髄異形成症候群(MDS)などの他の前白血病患者や非白血病性悪性血液疾患患者の血液中SCGF濃度に比較して有意に高く、血液中SCGF濃度は白血病と前白血病患者や非白血病性悪性血液疾患との判別に利用可能であった。また、判別診断の難しいAA患者とMDS患者を比較してみると、MDS患者血中SCGF濃度はAA患者のそれと比較して有意に高く、両者を血中SCGF濃度で判別診断することが可能であった。

40

【0138】

実施例8．造血幹細胞移植後GVHD発症とSCGF濃度

インフォームドコンセントを得た白血病および前白血病患者で造血幹細胞移植を受けた23例の内、GVHDを発症した例15例、発症しなかった例8例の血清中SCGF濃度を実施例6の

50

方法を用いて各ステージ毎に測定した。その結果を第8図に示す。

造血幹細胞移植を受けた患者のSCGF濃度はプレ・コンディショニング期やアプラスチック期に比べ、リカバリー期やステイブル期の方が有意に高値を示した。

造血幹細胞移植を受けた患者のうち、GVHDを発症した症例は発症しなかった例に比べ、アプラスチック期およびリカバリー期において有意に血清中SCGF濃度が高いので、血清中のSCGF濃度を測定することによって、GVHD発症を判定可能であった。

さらにカットオフ値を定めてGVHD発症例と非発症例とを判定できないかを検討した。その結果を第9図に示す。プレ・コンディショニング期においては、カットオフ値を例えば5ng/mLに定めることにより感度87%、特異度57%で、アプラスチック期においてはカットオフ値を10ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、リカバリー期ではカットオフ値を15ng/mLに定めることで感度87%、特異度63%で、それぞれSCGF濃度を測定し、これを診断に用いなかった時に比べて有意( $p < 0.05$ )にGVHD発症例と非発症例とを判別GVHD可能であった。

10

#### 【0139】

実施例9．移植造血幹細胞の生着と血清SCGF濃度

インフォームドコンセントを得た血液疾患患者で造血幹細胞移植を受けた23例のうち、生着が遅延した例4例、遅延しなかった例19例の血清中SCGF濃度を実施例6の方法を用いて各ステージ毎に測定した。結果を第10図に示す。

生着非遅延例では、リカバリー期およびステイブル期のSCGF濃度は、プレ・コンディショニング期に比して有意に上昇した。一方、生着遅延例では、これらの期においても有意な上昇は観察されなかった。

20

そこで、造血幹細胞移植患者のSCGF濃度を測定し、そのカットオフ値を定めてその値と個々患者の値比較から造血幹細胞生着遅延例と非遅延例を判定できないかを検討した。その結果を第11図に示す。プレ・コンディショニング期においては、カットオフ値を例えば9.5ng/mLに定めることにより感度75%、特異度67%で、アプラスチック期においてはカットオフ値を12ng/mLに定めることで感度75%、特異度63%で、造血幹細胞生着遅延例と非遅延例とを判別することが可能であった。

#### 【0140】

実施例10．白血病患者の末梢血細胞におけるSCGFの発現

インフォームドコンセントを得た種々の白血病患者の末梢血細胞をRneasy Mini Kit (Qiagen社製)を用い、プロトコールにしたがって全RNAを抽出し、全RNA1 $\mu$ gをDNaseI (GIBCO社製)処理し、SuperScript First Strand Synthesis System for RT PCR (GIBCO社製)を用いて逆転写し、First Strand DNAを調製した。Taq Polymerase (TaKaRa社製)を用い、調製したFirst Strand DNAを鋳型とし、配列番号8および9ならびに配列番号10および11の塩基配列を有するオリゴDNAをプライマーとして、それぞれ、ヒトG3PDH、SCGF遺伝子の検出を検討したところ、G3PDHの検出量がほぼ同等となる条件下で、健常人1人では、SCGFの発現を検出できなかったが、急性リンパ性白血病(ALL)2例中1例、急性骨髄性白血病(AML)2例中2例でSCGFの発現が検出された。

30

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0141】

本発明は、SCGFに反応する抗体を用いた、白血病、前白血病または非白血病性悪性血液疾患を判定する方法、造血幹細胞移植後の造血幹細胞生着遅延および移植片対宿主反応病を判定する方法、およびそれらの診断薬ならびに診断キットを提供する。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0142】

第1図は、モノクローナル抗体のヒトSCGF部分ペプチド(化合物1)に対する反応性を示す図である(バインディングELISA)。

第2図は、精製ヒトSCGFタンパク質のSDS PAGEとウェスタンブロッティング結果を示す。レーン1および2は分子量マーカーと精製ヒトSCGFタンパク質のSDS PAGEパターンを示す。レーン3、4、5はそれぞれKM2142、KM2804、KM2945を用いた精製ヒトSCGFタンパク

50

質のウェスタンブロッティング結果を示す図である。

1:分子量マーカーのレーン

2:精製SCGFを解析し、銀染色したレーン

3:抗SCGF抗体KM2142を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

4:抗SCGF抗体KM2804を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

5:抗SCGF抗体KM2945を用いてウェスタンブロッティングしたレーン

A:SCGFタンパク質の分子量を示す。

B:N末端28残基欠失SCGFタンパク質 28体の分子量を示す。

C:N末端59残基欠失SCGFタンパク質 59体の分子量を示す。

第3図は、モノクローナル抗体の、CHO細胞発現ヒトSCGF蛋白に対する反応性を示す図である(バインディングELISA)。

10

第4図は、モノクローナル抗体の、SDS変性ヒトSCGF蛋白(CHO細胞発現)に対する反応性を示す図である(バインディングELISA)。

第5図は、モノクローナル抗体の、ヒトおよびマウスSCGF蛋白(CHO細胞発現)に対する反応性を示す。(バインディングELISA)

第6図は、モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによるヒトSCGF蛋白の定量曲線を示す図である。

第7図は、各種血液疾患患者血清中SCGF濃度を示す。横実線は各種血液疾患群の中央値を、横点線は健常人群から求めたカットオフ値(18.2ng/mL)を示す図である。

\* : Normal (健常人群)あるいはAA(再生不良性貧血群)との有意差  $p < 0.05$ 、

20

# : NHL(非ホジキンリンパ腫)との有意差  $P < 0.05$ 、\$ : MM(多発性骨髄腫)との有意差  $p < 0.05$

第8図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度によるGVHD発症および非発症の差を示す図である。横実線は各群の中央値を示す。

\* : GVHD非発症例との有意差  $p < 0.05$ 、

# : プレ-コンディショニング期との有意差  $p < 0.05$ 、

\$ : アプラスチック期との有意差  $p < 0.05$ 、

& : リカバリー期との有意差  $p < 0.05$

第9図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度とGVHD発症患者の検出感度、非発症患者の特異度との関係を示す図である。 : 感度、 : 特異度、縦点線は仮のカットオフ値を示す。

30

第10図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度による生着遅延および非遅延の差を示す図である。横実線は各群の中央値を示す。

# : プレ-コンディショニング期との有意差  $p < 0.05$ 、

\$ : アプラスチック期との有意差  $p < 0.05$ 、

& : リカバリー期との有意差  $p < 0.05$

第11図は、造血幹細胞移植患者血清中SCGF濃度と造血幹細胞生着遅延例の検出感度、非遅延例の特異度との関係を示す図である。 : 感度、 : 特異度、縦点線は仮のカットオフ値を示す。

40

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP03/04531
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/53, C07K16/22, C12N5/16  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/53, C07K16/22, C12N5/16  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA, SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ (GENETYX)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Perrin et al., "Expression of LSLCL, a new C-type lectin, is closely restricted, in bone marrow, to Immature neutrophils", C.R.Acad.Sci.Paris, Sciences de la vie, Vol.324, No.12, 2001, pages 1125 to 1132, see "3. Results" especially table 1	1-20
A	WO 98/08869 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 05 March, 1998 (05.03.98), & EP 860447 A & US 2002/099196 A & US 6541217 A & AU 731647 A & AU 4030997 A	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 June, 2003 (18.06.03)		Date of mailing of the international search report 01 July, 2003 (01.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office  Facsimile No.		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/04531

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 17 relate to the diagnosis and detection of leukemia, pre-leukemia, an aleukemic malignant blood disease, etc. based on the correlation among SCGF and these diseases. In contrast, claims 18 to 20 relate to a monoclonal antibody and hybridomas producing the monoclonal antibody which never relate to these diseases. Thus, the requirement of unity of invention is not fulfilled between claims 1 to 17 and claims 18 to 20.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/04581								
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))										
Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/53, C07K16/22, C12N5/16										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))										
Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/53, C07K16/22, C12N5/16										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの										
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2003年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2003年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2003年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2003年	日本国登録実用新案公報	1994-2003年	日本国実用新案登録公報	1996-2003年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2003年									
日本国登録実用新案公報	1994-2003年									
日本国実用新案登録公報	1996-2003年									
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)										
CA, SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ (GENETYX)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号								
X	Perrin et al, "Expression of LSLCL, a new C-type lectin, is closely restricted, in bone marrow, to immature neutrophils" C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie vol. 324, no. 12, 2001, p1125-1132 see "3. Results" especially Table 1.	1-20								
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー										
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの            「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの            「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)            「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献            「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願         </td> <td style="vertical-align: top;">           の日の後に公表された文献            「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの            「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの            「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの            「&amp;」 同一パテントファミリー文献         </td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献						
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日	18.06.03	国際調査報告の発送日								
		01.07.03								
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J 9408								
日本国特許庁 (ISA/JP)	加々美 一恵									
郵便番号 100-8915										
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101	内線 3251								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/04531
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 98/08869 A(協和発酵工業株式会社) 1998.03.05  & EP 860447 A & US 2002/099196 A & US 6541217 A & AU 731647 A & AU 4030997 A	I-20

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/04531

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT I 7条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
- 2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
- 3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-17は、SCGFと白血病、前白血病、非白血病性悪性血液疾患等の相関から、これらの疾病を診断検出するものであるのに対し、請求の範囲18-20はこれら疾病とは何ら関係のないモノクローナル抗体及び該モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマである。よって、請求の範囲1-17と、請求の範囲18-20の間には、発明の単一性は満たされていない。

- 1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- 2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
- 4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

---

フロントページの続き

(72)発明者 堀田 知光

日本国愛知県名古屋市天白区原5 - 1 2 0 1

(72)発明者 伊東 千絵

日本国神奈川県伊勢原市伊勢原1 - 2 9 - 1 - 4 0 5

(72)発明者 佐藤 秀尚

日本国東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 古谷 安希子

日本国東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 設楽 研也

日本国東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 杉本 整治

日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社 本社内

(72)発明者 河野 弘明

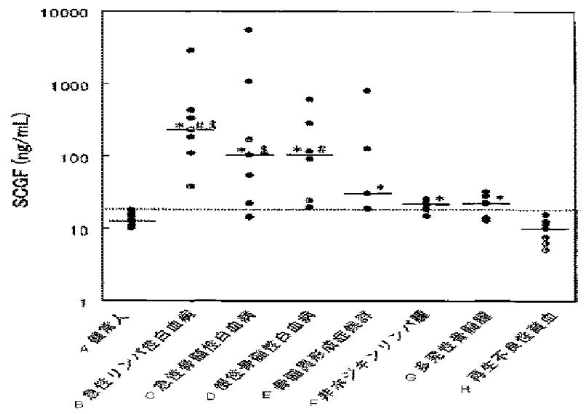
日本国東京都中央区入船二丁目1番1号 協和メデックス株式会社 本社内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	白血病，白血病或非白血病恶性血液病的测定方法和诊断剂		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2003085399A1</a>	公开(公告)日	2005-08-11
申请号	JP2003582535	申请日	2003-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人东海大学 协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社 学校法人东海大学 协和メデックス株式会社		
[标]发明人	安藤 潔 堀田 知光 伊東 千絵 佐藤 秀尚 古谷 安希子 設楽 研也 杉本 整治 河野 弘明		
发明人	安藤 潔 堀田 知光 伊東 千絵 佐藤 秀尚 古谷 安希子 設楽 研也 杉本 整治 河野 弘明		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/22 C12N5/10 G01N33/574 G01N33/577 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/22 G01N33/57426 G01N2333/475		
FI分类号	G01N33/53.S C07K16/22.ZNA G01N33/577.B C12N5/00.B C12P21/08		
优先权	2002106786 2002-04-09 JP		
其他公开文献	JPWO2003085399A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及诊断白血病，白血病前期或白血病恶性血液病的方法，鉴别白血病与白血病前期或白血病恶性血液病的方法，鉴别再生障碍性贫血与骨髓增生异常综合征的方法，诊断延迟的方法移植造血干细胞后植入造血干细胞的植入，以及诊断移植物抗宿主病的方法，所述方法中的每一种包括定量干细胞生长因子 ( SCGF )。本发明还可以提供用于诊断白血病，白血病前期或白血病恶性血液病的药剂和用于诊断造血干细胞移植后造血干细胞延迟植入的药剂或用于诊断移植物抗宿主的药剂。疾病 ( GVHD )，各自含有与干细胞生长因子 ( SCGF ) 反应的抗体作为活性成分。



I (SCGF : 造血幹細胞増殖因子)

- A. NORMAL SUBJECTS
- B. ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA
- C. ACUTE MYELOGENOUS LEUKEMIA
- D. CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA
- E. MYELODYSPLASTIC SYNDROME
- F. NON-HODGKIN'S LYMPHOMA
- G. MULTIPLE MYELOMA
- H. APLASTIC ANEMIA
- I. SCGF: STEM CELL GROWTH FACTOR