

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5414535号  
(P5414535)

(45) 発行日 平成26年2月12日(2014.2.12)

(24) 登録日 平成25年11月22日(2013.11.22)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	B
G O 1 N 33/531 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	J
C O 7 K 16/18 (2006.01)	G O 1 N 33/531	A
請求項の数 6 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-544772 (P2009-544772)  
 (86) (22) 出願日 平成20年12月3日(2008.12.3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/072361  
 (87) 国際公開番号 W02009/072660  
 (87) 国際公開日 平成21年6月11日(2009.6.11)  
 審査請求日 平成22年4月28日(2010.4.28)  
 (31) 優先権主張番号 特願2007-312931 (P2007-312931)  
 (32) 優先日 平成19年12月3日(2007.12.3)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)  
 (31) 優先権主張番号 特願2008-222215 (P2008-222215)  
 (32) 優先日 平成20年8月29日(2008.8.29)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000126757  
 株式会社アドバンス  
 東京都中央区日本橋小舟町5番7号  
 (72) 発明者 稲垣 貴之  
 東京都中央区日本橋小舟町5番7号 株式  
 会社アドバンス内  
 (72) 発明者 吉見 達成  
 東京都中央区日本橋小舟町5番7号 株式  
 会社アドバンス内  
 審査官 野村 英雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1本鎖抗体 s c F v の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

体外で脾臓から分離回収した脾臓細胞を抗原と刺激物質を含む培養液中で免疫する工程、免疫後の前記脾臓細胞の全細胞から total - R N A を取得する工程、前記 total - R N A に対し、目的とする抗体遺伝子に特異的なプライマーを用いて P C R 増幅を行う工程、前記 P C R 増幅を行った遺伝子に対して電気泳動を行い特定のバンドを抽出して増幅された抗体遺伝子を選別する工程、選別された前記抗体遺伝子から s c F v 遺伝子を形成する工程、前記 s c F v 遺伝子を宿主細胞で発現し、s c F v を調製する工程を有する、1本鎖抗体 s c F v の製造方法。

【請求項2】

前記刺激物質が、免疫担当細胞上に発現しているサイトカイン受容体、表面抗原又はシグナル伝達に關与する受容体を刺激する物質である請求項1に記載の1本鎖抗体 s c F v の製造方法。

【請求項3】

前記抗原がペプチド又は低分子化合物である請求項1に記載の1本鎖抗体 s c F v の製造方法。

【請求項4】

前記刺激物質が、サイトカイン受容体に対する刺激物質としての、I L - 4 又は I L - 5、表面抗原に対する刺激物質としての、a n t i - C D 3 8 抗体又は a n t i - C D 4 0 抗体、及びシグナル伝達に關与する受容体に対する刺激物質としての L P S の少なくとも

1つである請求項2に記載の1本鎖抗体s c F vの製造方法。

**【請求項5】**

前記脾臓細胞と、IL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体及びLPSからなる群から選ばれた1以上の刺激物質を含む培養液中で免疫して抗体を製造する請求項1に記載の1本鎖抗体s c F vの製造方法。

**【請求項6】**

選別された前記抗体遺伝子アミノ酸配列を決定する工程とこのアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーと比較し、ホモロジー（相同性）の高い配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーから選択し又は改変調整してヒト化抗体遺伝子を形成する工程とをさらに含む請求項1に記載の1本鎖抗体s c F vの製造方法。

10

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

本発明は、1本鎖抗体s c F vの製造方法に関する。

**【0002】**

**【背景技術】**

周知の通り、生体防御機能のなかでもその中心的な存在である免疫機能の解明は、疾病の診断、治療において、重要な課題となりつつある。例えば、癌、糖尿病等の生活習慣病の他各種疾病の診断に用いられる手法の中で、疾病に深く関わりのあるマーカー物質の濃度、量を目視可能に検出するイムノクロマト法のように、より簡易的診断が可能なものまでも提案されており、研究用試薬、診断用試薬、各種物質モニター用試薬、免疫学的診断、治療の分野はより拡大していくものであるが、当該方法における抗体の安定した確保は、今後より重要になってくることが明らかである。また、ファージディスプレイ系を用いた抗体ライブラリー製造技術が開発され、ヒト抗体単離も可能となっている。

20

**【0003】**

ところで、免疫学的測定に必要なモノクローナル抗体の製造は、まずマウスに抗原を注射（免疫）する工程で約3ヶ月を要する。その後抗体を産生しているB細胞群を取り出し、ミエロマ細胞と細胞融合する。この工程によって、無限に増殖することが可能な抗体産生細胞（ハイブリドーマ）群を構築する。最後にこのハイブリドーマ群の中から、目的にあった抗体を産生している細胞を選別（クローニング）し、この細胞を用いて抗体の大量調製を実施する。このクローニング工程では、ハイブリドーマ群を希釈し、1ウェルに1細胞しかいないという状態にして、1細胞から培養を行う。これを抗体の性質が検討できる細胞濃度まで増殖させ、得られるモノクローナル抗体の性質を検査する。この検査で陽性となったウェルを再度希釈し、上記と同様に検査を実施する。この操作を複数回実施し、使用に耐えうるハイブリドーマを分離取得する。この工程1サイクルに約2週間を要し、全体で約3ヶ月以上を要する場合もある。このようにモノクローナル抗体の製造には手間と時間のかかる作業が必要であり、また、これを専門の業者に依頼すると、抗体の製造費用が高額となる。

30

**【0004】**

ここで、公知文献を挙げて抗体製造方法を具体的に説明すると、特開平10-282097号公報には、アジュバンド物質、サイトカインの組合せを特徴とする抗原に対する特異的な免疫法が記載されている。特開2004-121237号公報には、抗体産生応答の誘導方法により、抗原特異的抗体の産生応答が誘導された末梢血リンパ球細胞を、エプスタインバールウィルスにより不死化し、抗原特異的B細胞を単離して抗原特異的抗体産生B細胞を調製し、さらにこのB細胞を培養することを特徴とする抗原特異的抗体の製造方法が記載されている。特開2006-180708号公報には、標識化抗原をターゲット細胞に結合させる工程と、標識化ターゲット細胞を分離する工程と、抗体遺伝子を調製する工程と、抗体遺伝子を発現ベクターを用いて発現させる工程とを含む抗体製造方法が記載されている。また、特表2006-516408号公報には、一連の工程を経て、目的の抗体からヒト化高親和性抗体を製造する方法が記載されている。

40

**【先行技術文献】**

50

## 【特許文献】

## 【0005】

【特許文献1】特開平10-282097号公報

【特許文献2】特開2004-121237号公報

【特許文献3】特開2006-180708号公報

【特許文献4】特表2006-516408号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明の目的は、したがって、手間と時間が係る作業が必要な抗体製造をより短時間で、しかも容易に抗体が製造できるような新規な抗体製造方法を提供することにある。また、本発明は、これらの新規な抗体製造手法に基づき、腎臓癌マーカーとして今般注目されているS100A10タンパク質の免疫学的測定、治療に有効な抗体製造方法を実現することを目的としている。

10

## 【0007】

S100A10タンパク質は、高山達也他、腎細胞癌におけるS100A10蛋白の特異的発現，腎臓癌研究会会報，28：9-10，2005等で示されるように、腎臓癌マーカーとしても有用であり、当該マーカーは、尿成分からも得られることから、腎臓癌の簡易的な診断においてその価値が高いからである。

## 【課題を解決するための手段】

20

## 【0008】

これらの目的を達成するため、本発明は、体外で免疫細胞を含む組織を抗原と刺激物質を含む培養液中で免疫する工程、免疫後の前記組織の細胞から選別することなく遺伝子を抽出する工程、前記遺伝子に対し、目的とする抗体遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR増幅を行う工程、前記PCR増幅を行った遺伝子に対して電気泳動を行い特定のバンドを抽出して増幅された抗体遺伝子を選別する工程、選別された前記抗体遺伝子からscFvを形成する工程、前記scFvを宿主細胞により抗体又は抗体に類する蛋白質の発現調製をする工程を有する抗体製造方法を提供する。

すなわち、本発明は、いわゆる体外免疫法において、特定の刺激物質を添加した培養液で、抗原による感作免疫細胞を得ることで、通常必要としていた時間の数十分の一の時間で抗体を製造することを実現したものである。より詳細には、まず、異物（抗原）が体内に入ると、マクロファージや樹状細胞がこれを細胞内に取り込む。異物は、細胞内で分解し、分解産物を細胞膜表面上に提示する。次いで、分解産物にナイーブT細胞が近づき、ナイーブT細胞表面のT細胞レセプター（TCR）を介して抗原を認識する。この過程を経てT細胞が活性化され、ヘルパーT細胞（Th2）となる。一方B細胞も体内に侵入した異物（抗原）を細胞表面上のB細胞レセプター（BCR）で認識して細胞内に取り込む。取り込んだ抗原をやはり分解し、分解産物をMHC Class II分子上に提示する。この際に細胞膜表面にCD40という分子も同時に発現する。

30

## 【0009】

このようにしてできたTh2と抗原提示B細胞が近づき、互いに認識することでB細胞の活性化と抗体のクラススイッチが入る。この際に、同じ抗原で活性化した分子同士でなければかかる現象は発現しない。なお、上記の場合には免疫反応を生体内で実施しているけれども、この免疫反応を生体外で発生させる方法が、いわゆる体外免疫法である。本発明は、生体外において、所望の抗体産生細胞を得るために、刺激物質を添加してB細胞を抗体産生細胞（プラズマ細胞）又はメモリーB細胞へと分化誘導するものである。

40

## 【0010】

ここで、刺激物質とは、例えばB細胞、樹状細胞、T細胞などのような免疫担当細胞の膜表面に発現しているレセプター分子と相互作用可能である限り、特に制限はない。本発明の実施には、特にサイトカインレセプターに対する刺激物質として、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-21、表

50

面抗原に対する刺激物質としてTGF- (Transforming Growth Factor-beta)、BAFF (B cell Activating Factor)、APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand)、CD40 ligand、CD38 ligand、BCDF (B Cell Differentiation Factor)、BCAF (B Cell Activation Factor)、シグナル伝達に關与する受容体に対する刺激物質としてLPS (Lipopolysaccharide) 等が例示される。

【0011】

刺激物質の使用濃度は、免疫する細胞濃度に依存して変化するけれども、LPSは10 ng/mL ~ 500 µg/mLの濃度が良く、特に20 ~ 80 µg/mLの濃度が推奨される。また、LPS以外の物質では、一般に1 ng/mL ~ 50 µg/mLの濃度が良く、特に10 ng/mL ~ 40 ng/mLの濃度が推奨される。また、これら物質の機能を代替するアゴニスト抗体であっても問題はない。その分化誘導の過程において、特にIL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体刺激により、抗体の親和性成熟及びクラススイッチを誘導し、より親和性の高い抗体となすことができる。

10

【0012】

当該細胞から得られる抗体遺伝子をPCR (polymerase chain reaction) 法により増幅し、更に大腸菌等の宿主細胞により、好ましくはコロニー化させて抗体を得る工程を組み合わせることで、大量の抗体を短時間で製造することが可能となる。宿主細胞としては、大腸菌の他、ストレプトマイセス、枯草菌、酵母、CHO細胞、COS細胞、HEK293細胞、等が例示される。また、発現ベクターとしては、宿主細胞で発現されるものであれば、特に限定されるものではない。発現ベクターとして、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、染色体、エピソーム、ウィルス由来、レトロウイルス由来のベクターなどを例示することができる。

20

【0013】

上記したような課題に加えて、本発明者らは、体外で免疫細胞を選別し得たとしても、スクリーニングまでの準備としてのハイブリドーマ形成工程を要することなく抗体遺伝子の分離ができないかという課題にも取り組んだ。本発明者らは、体外免疫手法を採るに際し、メモリーB細胞又はプラズマ細胞へ分化誘導及び、その過程で発生すると考えられる抗体の親和性成熟・クラススイッチを所定の刺激物質の添加により実現できるという知見を得、本発明を完成した。従来、高親和性抗体の作製は、生体内においては、繰り返し抗原を免疫することにより、メモリーB細胞又はプラズマ細胞への分化誘導を行い、その過程で発生すると考えられる抗体の親和性成熟・クラススイッチを利用している。分化誘導した免疫細胞からハイブリドーマを形成し、スクリーニングを行うことで高親和性抗体を得ている。

30

【0014】

一方、生体外の場合は、ハイブリドーマや市販のライブラリーなどから得た抗体遺伝子にPCRを用いたランダム変異導入法等により様々な変異を導入したライブラリーを構築し、ファージミドベクターへの組み込みを経て、パニング法によって、強い抗体をスクリーニングする方法が主であった。しかしながら、本発明者らは、生体外で特定の刺激物質を、所定の環境下で、供給することでもメモリーB細胞又はプラズマ細胞への分化誘導及び、その過程で発生すると考えられる抗体の親和性成熟・クラススイッチが可能であることを知見したのである。また、刺激物質の導入は、B細胞をメモリーB細胞、プラズマ細胞へ分化誘導することを可能としていることから、体外免疫における当該手法は、従来の脾臓細胞そのものもしくは、B細胞とT細胞の共培養状態でしか免疫ができなかったものを、B細胞のみであっても免疫可能にし、抗原も従来の体外免疫法同様、生体内での免疫に比べて1/1000 ~ 1/10000程度の少量で可能となった。

40

【0015】

さらに、本発明において使用する刺激物質は、親和性成熟や抗体のクラススイッチに關係している蛋白質の発現を誘導し、その結果、抗体のIgMからIgGへのクラススイッ

50

チを迅速にかつ確実にに行わせることも実現した。要するに、本発明は、いわゆる体外免疫法において、組織片をすり潰す等して得られる細胞に特定の刺激物質を添加した培養液で、抗原による感作を行い免疫細胞を得ることで、通常免疫動物を免疫した場合に必要としていた時間の数十分の一の時間で実現できるようにしたものである。上記のような本発明による抗体製造方法の実施において、生体内及び体外において免疫反応を発生させる方法は、すでに説明したような手法によって有利に実施することができる。本発明における体外免疫手法において、各種の刺激物質と各種の分化、誘導等との関係について以下に説明する。

#### 【0016】

本発明で示す抗原は、免疫用組織片調製直後の1回で充分であるが、2～3日の間隔を置いて、複数回行っても制限はない。またその際の抗原濃度は $1\text{ pmol} \sim 1\text{ mmol}$ が好ましく、例えば $1\text{ nmol}$ を例示することができる。抗原刺激を補助する目的でLPSに代表されるTLR (Toll Like Receptor) を刺激する物質を添加しても良い。この刺激物質の添加は、抗原刺激の度に行うことが好ましく、添加量は $10\text{ ng/mL} \sim 500\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度が良く、特に $20 \sim 80\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度が良い。また、本発明で示す、メモリーB細胞又はプラズマ細胞へ分化誘導及び、その過程で発生すると考えられる抗体の親和性成熟・クラススイッチの誘導用刺激物質としては、前述の刺激物質であれば特に制限はないが、特にIL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体が好ましい。添加濃度は、IL-4、IL-5は $1\text{ ng/mL} \sim 50\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度が良く、特に $10\text{ ng/mL} \sim 40\text{ ng/mL}$ が好ましく、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体は $1\text{ ng/mL} \sim 50\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度が良く、特に $100\text{ ng/mL} \sim 10\text{ }\mu\text{g/mL}$ が好ましい。また、この刺激物質の添加は、抗原刺激の度に行うことが好ましい。

#### 【0017】

本発明における体外で行う免疫用の組織片を構成する細胞としては、例えば、上述したものの他、例えばマウス、ラット、モルモット、ラビットなどのような免疫動物由来の臓器・組織から得た細胞、iPS細胞・ES細胞を分化させて調整した免疫担当細胞、培養細胞株を分化させて調整した免疫担当細胞などを例示することができる。本発明で用いられる抗原には、例えば、h(ヒト)S100A10、he(鶏)EL、h(ヒト)Ras、h(ヒト)rap74、h(ヒト)TOPO2B、b(ウシ)SA、b(ウシ)Casein等のマウス由来以外の蛋白質、マウス由来のm(マウス)S100A10、mSA、mMapk1等の蛋白質、ペプチド(4種類:7mer、10mer、16mer、20mer)などを例示することができる。さらに、本発明の実施では、従来抗体を得るために用いることができない、低分子化合物(ローダミン等の蛍光物質、FITC)も利用可能となる。

#### 【0018】

本発明は、低分子抗原の利用が可能になるほか、クラススイッチによる好ましい抗体、親和性成熟による抗体が得られる免疫細胞を得ることができる。

#### 【0019】

本発明は、免疫細胞を選別しないで、組織片の細胞の遺伝子を分離したとしても、PCRに使用するプライマーが抗体遺伝子特異的なものであるため、目的の遺伝子のみを取得することが可能であり、抗体遺伝子を抽出する手法を採用する。

#### 【0020】

上述したように、当該細胞から得られる抗体遺伝子をPCR法により増幅し、さらに大腸菌等の宿主細胞により、好ましくはコロニー化させて抗体を得る工程を組み合わせることで、大量の抗体を短時間で製造可能となすことができる。使用しうる宿主細胞及び発現ベクターは、前記した通りである。本発明における抗体の選別方法としては、例えば、ファージや大腸菌、酵母、動物細胞等の表面に抗体を表示させる方法、酵母、大腸菌等を用いる2-ハイブリッド法、IVV法、リボソームディスプレイ法のようなDNAやmRNAに提示させる方法、表面プラズモン共鳴を利用したBIACORE法、ELISA法、

10

20

30

40

50

ウェスタンブロット法、磁気ビーズに抗体もしくは高原を固定化し、磁力を用いた選別 (MACS) 方法等を例示することができる。この選別方法は、タンパク質間相互作用を調べ得る手法であれば、特に限定されるものではない。

本発明によれば、以下の詳細な説明から理解されるように、短時間で、目的とする免疫細胞を分離及び取得することができ、さらには、遺伝子工学的な手法による抗体の製造によって、迅速な抗体の生産及び取得を可能とすることができる。この免疫細胞は、とりわけスクリーニング等に好適である。

#### 【0021】

##### 【図面の簡単な説明】

図1Aは、調製したTotal RNAの電気泳動を示す写真、図1Bはその説明図であり、 10

図2Aは、調製したcDNAの電気泳動を示す写真、図2Bはその説明図であり、

図3Aは、調製したscFv PCR産物の電気泳動を示す写真、図3Bはその説明図であり、

図4Aは、調製した大腸菌クローンの電気泳動を示す写真、図4Bはその説明図であり、  
図5Aは、精製したMBP-scFv蛋白質のSDS-PAGE法による解析図、図5Bはその説明図であり、

図6は、抗原とIgG1陽性率の関係をプロットしたグラフであり、

図7は、マーカー遺伝子とmRNA発現量の関係をプロットしたグラフであり、

図8は、サイトカインの細胞毒性試験の結果を刺激物質と比増殖率の関係としてプロットしたグラフであり、 20

図9A及び図9Bは、それぞれ、刺激物質と比増殖率の関係をプロットしたグラフであり、

#### 【0022】

図10A, 図10B, 図10C及び図10Dは、それぞれ、単独刺激時のBlimp-1発現量、Xbp-1発現量、Bcl-6発現量及びAID発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図11A及び図11Bは、それぞれ、複合刺激、プラズマ細胞分化時のBlimp-1発現量及びXbp-1発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図12A及び図12Bは、それぞれ、複合刺激、体細胞変異時のBcl-6発現量及びAID発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、 30

図13は、複合刺激、プラズマ細胞分化時のBlimp-1発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図14は、複合刺激、プラズマ細胞分化時のXbp-1発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図15は、複合刺激、体細胞変異時のBcl-6発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図16は、複合刺激、体細胞変異時のAID発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図17A及び図17Bは、それぞれ、サイトカイン濃度の上限と下限のマーカー発現量を、抗原1nmolを免疫した場合と抗原0.1nmolを免疫した場合とについてプロットしたグラフであり、 40

図18A及び図18Bは、それぞれ、B細胞の分化の検討の結果を、脾臓細胞中のB細胞の割合と脾臓細胞中のプラズマ細胞の割合とについてプロットしたグラフであり、

#### 【0023】

図19A, 図19B, 図19C及び図19Dは、それぞれ、B細胞の分化の検討の結果を、B細胞中のT1-B細胞の割合、B細胞中のT2-B細胞の割合、B細胞中のB2細胞の割合及びB細胞中のActivated-B細胞の割合についてプロットしたグラフであり、

図20A, 図20B, 図20C及び図20Dは、それぞれ、B細胞分化の検討時のB1 50

imp - 1 発現量、Xbp - 1 発現量、Bcl - 6 発現量及びAID発現量を測定した結果をプロットしたグラフであり、

図21は、Splenicocyteに対して免疫操作を行い取得したanti - Hen Egg Lysozyme / MBP - scFvのELISA結果を示したものであり、抗原特異性をみるために、 $\beta$  - カゼイン、S100A2、S100A14、Hen Egg LysozymeをそれぞれコートしたELISAプレートを用いて比較したグラフであり、

#### 【0024】

図22は、B細胞に対して免疫操作を行い取得したanti - Hen Egg Lysozyme / MBP - scFvのELISA結果を示したものであり、抗原特異性をみるために、 $\beta$  - カゼイン、S100A2、S100A14、Hen Egg LysozymeをそれぞれコートしたELISAプレートを用いて比較したグラフであり、

10

図23は、anti - Hen Egg Lysozyme / MBP - scFv / EGFPのELISA結果を示したものであり、EGFPは、G1 - Linker及びG5 - Linkerを介してscFvに融合されており、また、抗原特異性をみるために、 $\beta$  - カゼイン、S100A2、S100A14、Hen Egg LysozymeをそれぞれコートしたELISAプレートを用いて比較したグラフであり、

図24は、anti -  $\beta$  - Casomorphin7 / MBP - scFv、anti - Angiotensin I / MBP - scFv、anti - PTH / MBP - scFvのELISA結果を示したものであり、抗原特異性をみるために、 $\beta$  - Cas7 - Casomorphin7 (b - Cas7)、Angiotensin I (Ang I)、PTHをそれぞれコートしたELISAプレートを用いて比較したグラフであり、

20

#### 【0025】

図25は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を吸光度 (mAlbuminELISA) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、

図26は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を陽性クローン出現率 (mAlbumin陽性率) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、

図27は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を吸光度 (mS100A10ELISA 1nmolの抗原) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、

図28は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を吸光度 (mS100A10ELISA 1nmolの抗原) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、

30

図29は、抗マウス蛋白質抗体の取得の結果を陽性クローン出現率 (mS100A10陽性率) に関して評価した結果をプロットしたグラフであり、そして図30は、抗低分子化合物抗体の取得を示す電気泳動の写真である。

#### 【0026】

#### 【発明の概要】

発明を実施するための最良の形態

引き続き、本発明の好ましい実施の形態を説明する。なお、本発明は、以下に記載する特定の実施の形態によって限定されるものではないことを理解されたい。

40

本発明は、マウス、ラット等の免疫動物から臓器を摘出し、当該臓器から免疫細胞を含む細胞群を分離して、体外で免疫細胞を含む組織を抗原と刺激物質を含む培養液中で免疫する工程、免疫後の前記組織の細胞から選別することなく遺伝子を抽出する工程、前記遺伝子に対し、目的とする抗体遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCR増幅を行う工程、前記PCR増幅を行った遺伝子に対して電気泳動を行い特定のバンドを抽出して増幅された抗体遺伝子を選別する工程、選別された前記抗体遺伝子からscFvを形成する工程、前記scFvを宿主細胞により抗体又は抗体に類する蛋白質の発現調製をする工程を有する。

50

抗原については、特定しないが、この中で例えば、S100A10タンパク質が尿を検体として用いることができる腎臓癌マーカーとして使用できることから、本発明は、腎臓癌の免疫学的診断のための抗体の製造方法として、好適である。

【0027】

〔マウス由来のヒト抗体の製造について〕

本発明では、マウス由来のヒト抗体の製造工程を更に組み合わせても良い。以下にヒト抗体を取得する工程例を示す。

【0028】

1. 免疫ヒト化マウス由来の脾臓細胞を用いる方法マウスの脾臓細胞内の抗体遺伝子をすべてヒト由来の遺伝子に置き換えた免疫ヒト化マウスが報告されている。これは、抗体遺伝子以外はマウス由来の細胞なので、今回の体外免疫法を直接そのまま使用しての免疫が可能である。この方法で取れてきた抗体はすべてヒト抗体となる。

【0029】

2. 抗体のヒト化を行う方法取得した遺伝子から、抗体のアミノ酸配列を決定する。このアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーと比較する。超可変領域 (Complementarity determining region) 以外の抗体のフレーム部分を特に比較し、ホモロジー (相同性) の高い配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーから選択する。選択したフレーム配列に、取得した抗体遺伝子の超可変領域を組み込み、ヒト化する。この段階では抗体はヒト化マウス抗体である。完全長ヒト抗体は、取得した遺伝子から、抗体のアミノ酸配列を決定する。このアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーと比較する。超可変領域を含む抗体の全長を比較し、ホモロジーの高い配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーから選択する。選択した配列を細胞で発現させれば、完全長ヒト抗体となる。選択した配列の超可変領域を遺伝子工学的手法で改変して元の配列とそっくり同じにしても完全長ヒト抗体とすることもできる。

【0030】

ここで、本発明を要約して示すと、下記の各項に記載される通りである。

(1) 体外で脾臓から分離回収した脾臓細胞を抗原と刺激物質を含む培養液中で免疫する工程、免疫後の前記脾臓細胞の全細胞から total-RNA を取得する工程、前記 total-RNA に対し、目的とする抗体遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅を行う工程、前記 PCR 増幅を行った遺伝子に対して電気泳動を行い特定のバンドを抽出して増幅された抗体遺伝子を選別する工程、選別された前記抗体遺伝子から scFv 遺伝子を形成する工程、前記 scFv 遺伝子を宿主細胞で発現し、scFv を調製する工程を有する、1 本鎖抗体 scFv の製造方法。

(2) 前記刺激物質が、免疫担当細胞上に発現しているサイトカイン受容体、表面抗原又はシグナル伝達に関与する受容体を刺激する物質である上記 (1) 項に記載の 1 本鎖抗体 scFv の製造方法。

【0031】

(3) 前記抗原がペプチド又は低分子化合物である上記 (1) 項に記載の 1 本鎖抗体 scFv の製造方法。

(4) 前記刺激物質が、サイトカイン受容体に対する刺激物質としての、IL-4 又は IL-5、表面抗原に対する刺激物質としての、anti-CD38 抗体又は anti-CD40 抗体、及びシグナル伝達に関与する受容体に対する刺激物質としての LPS の少なくとも 1 つである上記 (2) 項に記載の 1 本鎖抗体 scFv の製造方法。

(5) 前記脾臓細胞と、IL-4、IL-5、anti-CD38 抗体、anti-CD40 抗体及び LPS からなる群から選ばれた 1 以上の刺激物質を含む培養液中で免疫して抗体を製造する上記 (1) 項に記載の 1 本鎖抗体 scFv の製造方法。

(6) 選別された前記抗体遺伝子アミノ酸配列を決定する工程とこのアミノ酸配列をヒト抗体のアミノ酸配列ライブラリーと比較し、ホモロジー (相同性) の高い配列をヒト抗体

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列ライブラリーから選択し又は改変調整してヒト化抗体遺伝子を形成する工程とをさらに含む上記(1)項に記載の1本鎖抗体s c F vの製造方法。

【実施例】

【0032】

引き続き、本発明を下記の実施例によりさらに具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

【実施例1】

【0033】

本例では、S100A10タンパク質を抗原例として用い、抗体IgG1の製造方法について説明する。

10

脾臓細胞 ( Splenocyte) 抽出

マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、洗浄した。2匹分の脾臓をメッシュ上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした後、遠心分離(1300rpm×3min, 4)し、細胞を回収した。次いで、ACK lysing Buffer 3mLに細胞を懸濁した後、10mL PBS(-)を加えた。遠心分離(1300rpm×3min, 4)して細胞を回収し、RPMI1640(-)6mLに懸濁した。セルストレイナーを通して、不溶性の脂肪等を除去した。

20

体外免疫

S100A10タンパク質抗原をアッセイキット(Dc Protein Assay kit、BioRad社製)で濃度を測定した。この際のスタンダードとして、BSA(sigma社製)を用いた。濃度既知のS100A10タンパク質抗原を所定の量(5μg若しくは20μg)分注し、これにアジュバントN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン1mg/mLを100μL(マウス1匹当50μL)で添加し、室温で15分間静置した。脾臓細胞に、調製した抗原溶液を添加し、室温で15分間静置した。RPMI1640(40%FBS)を6mLずつ添加した。刺激物質(IL-4(終濃度10ng/mL)、IL-5(終濃度10ng/mL)、anti-CD38抗体(終濃度1μg/mL)、anti-CD40抗体(終濃度1μg/mL)、LPS(終濃度40μg/mL))を添加した。10cmデッシュに全量を播いた。37CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養(4日間)した。

30

培養終了後、細胞を遠心分離(2000rpm、5分、4)で回収し、Trypan Blue Stain 0.4%(GIBCO社製)で細胞を染色し血球計算盤(アズワン社製)にて免疫後の脾臓細胞数をカウントした。細胞数は5μgのS100A10抗原を免疫した場合、 $1.33 \times 10^7$  cells、20μgのS100A10抗原を免疫した場合、 $0.71 \times 10^7$  cellsであった。この細胞をMedium B(Clona Cell HYキット、StemCell Technology社製)を用いてウォッシュ洗浄(10mL×3times)し、 $100 \times 10^8$  cells/mLに調製した。

40

【0034】

メラノーマ細胞の調製

PAI細胞(マウス由来ミエローマ細胞)をMedium A(Clona Cell HYキット、StemCell Technology社製)を用いて、継代培養しておいた。Medium Bを用いて細胞をウォッシュ洗浄(10mL×3times)し、上記と同じ装置を用いてカウントした。当該細胞数は、細胞融合時に $5 \times 10^7$  cellsが好ましい。

50

細胞融合

脾臓細胞 Splenocyte : メラノーマ細胞 Myeloma = 2 : 1 にて細胞を混合し、遠心して回収した。タッピングした後、PEG (ポリエチレングリコール) 溶液を、5  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 66.5  $\mu$ L、20  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 35.5  $\mu$ L (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して 500  $\mu$ L)、で混合した。

## 【0035】

遠心分離して回収した後、Medium B を、5  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 665  $\mu$ L、20  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 355  $\mu$ L (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して 5 mL)、で一滴ずつ添加した。これに Medium C (Clona Cell HY キット、StemCell Technology 社製) を、5  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 665  $\mu$ L、20  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 355  $\mu$ L (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して 5 mL)、で一滴ずつ添加した。この溶液を、5  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 5.32 mL、20  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 2.84 mL (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して 40 mL)、で Medium C に静かに添加し、37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養 (1 日間) (15 mL 遠沈管にて) した。細胞融合したその日に 4 のインキュベーターに Medium D (Clona Cell HY キット、StemCell Technology 社製) を移し、溶解しておいた。溶解確認後、よく混合した後、室温に戻した。

## 【0036】

クローニング

細胞を遠心して回収し、5  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 1.33 mL、20  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合、0.71 mL (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して 10 mL) の Medium C に懸濁し、これを、5  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 11.97 mL、20  $\mu$ g の S100A10 抗原を免疫した場合 6.39 mL (Splenocyte  $1 \times 10^8$  cells に対して 90 mL) の Medium D に懸濁した。37  $^{\circ}$ C で 15 分インキュベートした後、10 cm デッシュに撒いた。更に、37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養 (10 ~ 14 日間) した。

ハーベスト

細胞コロニーを目視下でカウントし、その全てを 96 well plate (ウェルプレート) に移し、200  $\mu$ L の Medium E (Clona Cell HY キット、StemCell Technology 社製) を加えた。次いで、37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養 (4 日間) した。上清を 150  $\mu$ L 回収し、S100A10 ELISA による確認を行った。

S100A10 ELISA Plate の調製

S100A10 抗原を PBS (-) にて 5  $\mu$ g / mL に希釈し、100  $\mu$ L ずつ 96 well plate (Nunc - Immuno module F8 maxisoap, Nunc 社製) に添加した。これを 4  $^{\circ}$ C で 1 日間静置した後、上清を捨て、0.1% BSA / PBS (-) を 200  $\mu$ L ずつ添加した。室温で 1 時間静置した後、PBS (-) で 3 回洗浄し、S100A10 ELISA Plate を調製した。

## 【0037】

10

20

30

40

50

S 1 0 0 A 1 0 E L I S A

S 1 0 0 A 1 0 E L I S A P l a t e に上記ハーベストの項で取得した150 $\mu$ Lの培養上清を加え、37 $^{\circ}$ Cインキュベーターにて1時間静置した。上清を捨て、PBS(-)で3回洗浄し、PBS(-)で5000倍に希釈した二次抗体(anti-Mouse IgG1-HRP、フナコシ社製)を50 $\mu$ L添加し、37 $^{\circ}$ Cインキュベーターにて1時間静置した。上清を捨て、PBS(-)で3回洗浄し、100 $\mu$ LのTMB溶液を添加し、37 $^{\circ}$ Cインキュベーターにて10分間静置した。その後直ちに1N HCl(和光純薬社製)を100 $\mu$ L添加し、反応を停止させた。その後、各ウェルの450nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Model 550, BioRad社製)にて測定した。得られた結果を下記の第1表に示す。

【表1】

第1表

抗原	免疫量 ( $\mu$ g)	免疫後の Splenocyte数 ( $\times 10^6$ cells)	ハイブリドーマ数			クローニング 後の増殖		IgG1 発現株数
			大コロニー	小コロニー	総計	++	+	
S100A10	5	1.33	27	32	59	15	14	4
	20	0.71	108	35	143	51	40	20

次いで、ハイブリドーマをコロニー化し、そのコロニーの大小を肉眼で確認した。それらのコロニーを上記手法によりクローニングし、その後の増殖を確認した。増殖したクローンの培養上清をS100A10 ELISAによって、抗S100A10 IgG1抗体を産生しているクローン数を確認した。上記第1表に記載の通り、体外免疫法によって、IgG1が製造できることを確認した。免疫工程で要した日数は、約5日と、通常(2~3ヶ月)に比べ非常に早い時間でS100A10タンパク質に対するIgG1が製造できた。

【実施例2】

【0038】

本例では、抗S100A10抗体遺伝子の抽出及び大腸菌による抗体の発現工程について説明する。

DNA抽出、一本鎖抗体scFvプラスミドの作製

免疫後のB細胞やハイブリドーマ $1.5 \times 10^6$  cells(セル)より、Isogen(ニッポンジーン社製)を用いてTotal RNAを取得した。なお、前記実施例1で説明した体外免疫工程で得られる免疫細胞を当該工程で用いても良い。次いで、1.2% Agarose Gel(アガロースゲル)電気泳動により、取得確認を実施した。得られた結果を図1A及び図1Bに示す。取得したTotal RNAをテンプレートとして、マウス(mouse) VH遺伝子特異的プライマー若しくはmouse VL遺伝子特異的プライマーとし、ReverTra Ace(TOYOBO社製)試薬を用いて一本鎖cDNAを合成した。調製したcDNAをテンプレートとしてプライマー-VH forward primer mix/VH reverse primer mix若しくはVL forward primer mix/VL reverse primer mixを用いて、PrimeSTAR HS Polymerase(Takara社製)により、1st PCRを実施した。

【0039】

使用したプライマー配列は、Antibody Engineering a pra

critical approach (pp. 210 - 211) に紹介されているものを利用した。その後、2% Agarose Gel 電気泳動により、取得確認を実施した。得られた結果を図 2 A 及び図 2 B に示す。電気泳動後のアガロースゲルから目的のバンドを切り取り、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN 社製) を用いて V H 遺伝子及び V L 遺伝子を抽出し、精製した。次いで、その V H 遺伝子及び V L 遺伝子の各 10 ng を用いて、PrimeSTAR HS Polymerase (Takara 社製) により、プライマーを添加せず、Link PCR を実施した。その後、Link PCR のサンプルにプライマー 2nd PCR Primer Premix を加えてそのまま PCR 増幅を実施した。その後、2% Agarose Gel 電気泳動により、取得確認を実施した。得られた結果を図 3 A 及び図 3 B に示す。これらの結果から、目的の scFv PCR 産物が得られたことが確認できた。

10

#### 【0040】

次いで、scFv PCR 産物を、制限酵素 EcoRI 及び HindIII と 37 °C で 1 時間反応させて分解し、電気泳動後のアガロースゲルから目的のバンドを切り取り、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN 社製) を用いて scFv 遺伝子を抽出し、精製した。同様に、プラスミドベクター pMAL-p2X を制限酵素 EcoRI 及び HindIII と 37 °C で 1 時間反応させて分解し、電気泳動後のアガロースゲルから目的のバンドを切り取り、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN 社製) を用いてプラスミドベクター遺伝子を抽出し、精製した。これらの精製物をプラスミドベクター遺伝子 1 mol に対し scFv 遺伝子 6 mol の割合で混合し、DNA Ligation kit Mighty Mix > (Takara 社製) を用いてライゲーションした。ライゲーション溶液 20 µL を大腸菌 JM109 株のコンピテントセルと混合し、大腸菌 JM109 株を形質転換した。

20

#### 【0041】

この形質転換体を 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布し、37 °C で 18 時間培養した。scFv 遺伝子の連結したプラスミドを持つ大腸菌クローンをセレクトするため、上記の工程で形成したコロニーをコロニー PCR 法に供し、さらに 2% Agarose Gel 電気泳動により、取得確認を実施した。得られた結果を図 4 A 及び図 4 B に示す。上記のようにして得たクローンを 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 液体培地により 37 °C で 18 時間培養し、QIAprep Miniprep kit (QIAGEN 社製) を用いて、プラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミドの DNA 配列を DNA シークエンサー Megabase 1000 (GEヘルスケア社製) を用いて確認した。この抗体遺伝子の取得工程には、3 日を要した。

30

#### 【0042】

### 大腸菌による一本鎖抗体 scFv の発現

シークエンスを確認したプラスミドを用いて、大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した。この形質転換体を 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布し、37 °C で 18 時間培養した。次いで、上記のようにして形成したコロニーを、5 mL の 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB G 液体培地により 30 °C で 18 時間培養した。この培養液 1 mL を 100 mL の 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB G 液体培地により 30 °C で培養した。培養 1 時間ごとに 660 nm の吸光度を分光光度計 UV-1200 (島津製作所社製) にて測定した。吸光度が 0.5 に達した時点で、IPTG を終濃度 0.5 mM になるように添加し、23 °C で 20 時間培養した。培養終了後、遠心分離 (6000 rpm, 20 min, 4 °C) により大腸菌菌体を回収した。これを Sol. A 5 mL (20% Sucrose, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM APMSF) に溶解し、室温で 10 分間静置した。遠心分離 (6000 rpm, 20 min, 4 °C) により大腸菌菌体を回収し、氷冷した Sol. B 5 mL (5 mM MgSO<sub>4</sub>) に溶解し氷上に 10 分間静置した。

40

50

## 【0043】

その後遠心分離（6000rpm, 20min, 4℃）により、上清を回収した。その後、上記のようにして回収した上清をアミロースレジンカラム（10mL、2.5cm × 3.3cm）に供した。上清が全てカラムを通過した後、ウォッシュ緩衝液（200mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8.0）40mLでカラムを洗浄した。この洗浄を2回実施した後、Elute緩衝液（5mM Maltose, 200mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8.0）40mLでカラムに吸着したMBP（Maltose binding protein）-scFv蛋白質を溶出し、精製した。精製したMBP-scFv蛋白質をSDS-PAGE法により解析した。得られた結果を図5A及び図5Bに示す。また、精製したMBP-scFv蛋白質の濃度を、アッセイキット（Dc Protein Assay kit, BioRad社製）で測定した。

10

## 【0044】

その結果、50mLの培養液から0.345mgのMBP-scFv蛋白質が得られたことがわかった。ところで、上記の精製工程には3日を要した。本方法は、抗体遺伝子の取得工程から数えれば、6日で終了し、通常の方法（2~3ヶ月を要する）に比べ非常に早い時間でS100A10タンパク質に対するscFvを製造できたことがわかる。なお、本発明は、実施例として抗S100A10抗体を大量に生産することを可能とすることを示したが、抗体は抗S100A10抗体に限られるものではなく、その他のさまざまな抗体にも有利に適用可能であることを理解されたい。

20

## 【実施例3】

## 【0045】

前記実施例1に記載の手法を反復した。但し、本例の場合、S100A1タンパク質及びS100A10タンパク質を抗原として使用し、前記実施例1と同様の手法で体外免疫法を実施し、IgG1陽性率を計算した。

図6は、このようにして得られた結果をプロットしたものである。抗原によってバラつきがでるものの、どちらも60%以上という高い確率でIgG1へのクラススイッチが発生していることを図6から確認することができる。本発明では、体外（in vitro）での免疫において、LPS（40µg/mL）、IL-4、IL-5（10ng/mL）、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体（1µg/mL）等の刺激物質を抗原免疫後に1回添加し、4日間刺激物質存在下で培養することで有効なクラススイッチが実現可能であることが明らかになった。

30

## 【実施例4】

## 【0046】

前記実施例1に記載の手法を反復した。

但し、本例の場合、S100A10蛋白質を抗原として前記実施例1と同様の手法で体外免疫法を実施し、培養を行った4日目と7日目に全細胞を回収し、そこからTotal-RNAを取得した。Total-RNA 600ngをテンプレートとして、ReverTra Ace（TOYOBO社）を用いて逆転写反応を実施した。反応組成は、メーカープロトコールに従い20µLの容量で、プライマーとして、oligo(dT)20（TOYOBO社）を用いた。反応条件は、42℃ 20分、99℃ 5分、4℃ 5分で実施した。この産物1µLをテンプレートとして、PowerSYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems社）を用いてReal-time PCRを実施した。反応条件は、95℃ 10分（95℃ 15秒、60℃ 1分）を40サイクルで行った。また、本例で使用した機材は、7500Fast（Applied Biosystems社）である。得られた結果を内部標準であるアクチンで標準化し、グラフ化した。得られた結果を図7に示す。図7から、すべてのマーカー遺伝子（Bcl6、AID、xbp1、Blimp1）で発現量の上昇が確認され、抗体の親和性、抗体産生細胞の分化、誘導がより高まることが確認された。

40

ここで、Bcl6やAIDは、主に抗体の親和性成熟やクラススイッチに関与する遺伝

50

子であめ、X b p 1 は、多機能転写因子であって、抗体産生細胞への分化にもかかわっているとされ、B l i m p 1 も X b p 1 と同様に、B 細胞が抗体産生細胞（プラズマ細胞）へ分化する際に働く因子である。

【実施例 5】

【0047】

本例では、サイトカインの細胞毒性試験の実験方法について説明する。B A L B / c マウス（4 週齢、 $\text{SPF/VAF}$ ）を頸椎脱臼にて殺し、マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、70%エタノールで洗浄した。さらに、PBSで洗浄した後、2 匹分の脾臓をセルストレイナー上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした。セルストレイナーを4 mLのPBS（-）で3回洗浄することで脾臓細胞をセルストレイナーから溶出させた。これを遠心分離（ $1300 \text{ rpm} \times 3 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ）し、細胞を回収した。ACK lysing Buffer 3 mLに細胞を懸濁した後、10 mL PBS（-）を加えることで赤血球を除去し、遠心分離（ $1300 \text{ rpm} \times 3 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ）して脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞はRPMI 1640培地10 mLに懸濁し、セルストレイナーを通すことにより、不溶性の脂肪等を除去した。

10

【0048】

細胞数を血球計算盤を用いて計測し、 $1 \times 10^7 \text{ cells/mL}$ になるように濃縮した。刺激物質（IL-4（標準の終濃度 $10 \text{ ng/mL}$ ）、IL-5（標準の終濃度 $10 \text{ ng/mL}$ ）、anti-CD38抗体（標準の終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ ）、anti-CD40抗体（標準の終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ ）LPS（標準の終濃度 $40 \mu\text{g/mL}$ ）を標準の終濃度の10000倍にて調製した。これをPBS（-）を用いて10倍の段階希釈を行った。これにより、 $10^{-6} \sim 10^4$ 倍までの刺激物質希釈系列を調製した。この刺激物質 $1.5 \mu\text{L}$ （ $1/1000$ 容量）と脾臓細胞 $300 \mu\text{L}$ を混合し、40% FBSを含むRPMI 1640培地で、細胞濃度 $2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ に調製し、4日間37のCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。培養後、細胞溶液 $100 \mu\text{L}$ を96well plateに分注し、37のCO<sub>2</sub>インキュベーターで2時間保温した。そこにCell Counting kit-8（Dojindo社製）を10 mL添加し、さらに1時間保温した。マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸光度を測定し、ブランクとして650 nmの吸光度を測定した。450 nmの測定値から650 nmの測定値を減じ、測定値を得た。

20

30

それぞれの測定値を刺激物質無添加の場合の測定値で割ることにより、比増殖率を得た。得られた結果を図8のグラフに示す。グラフ化した際に、 $10^{-5}$ 以下の結果は $10^{-4}$ の結果と同一の値を示したため割愛した。また、刺激物質の各希釈倍率での終濃度は、下記の第2表に示す通りである。

【0049】

【表2】

第2表

希釈倍率	LPS	IL-4	IL-5	anti-CD38抗体	anti-CD40抗体
10	400 $\mu$ g/mL	100ng/mL	100ng/mL	10 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL
1	40 $\mu$ g/mL	10ng/mL	10ng/mL	1 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL
0.1	4 $\mu$ g/mL	1ng/mL	1ng/mL	100ng/mL	100ng/mL
0.01	400ng/mL	100pg/mL	100pg/mL	10ng/mL	10ng/mL
0.001	40ng/mL	10pg/mL	10pg/mL	1ng/mL	1ng/mL
0.0001	4ng/mL	1pg/mL	1pg/mL	100pg/mL	100pg/mL
10 <sup>-5</sup>	400pg/mL	100fg/mL	100fg/mL	10pg/mL	10pg/mL
10 <sup>-6</sup>	40pg/mL	10fg/mL	10fg/mL	1pg/mL	1pg/mL
10 <sup>-7</sup>	4pg/mL	1fg/mL	1fg/mL	100fg/mL	100fg/mL
10 <sup>-8</sup>	400fg/mL	100at/mL	100at/mL	10fg/mL	10fg/mL
10 <sup>-9</sup>	40fg/mL	100ng/mL	10ng/mL	1fg/mL	1fg/mL

上記したように、サイトカインの細胞毒性試験の結果を図8にグラフで示すが、このグラフは、縦軸が比増殖率、横軸が刺激物質の希釈倍率となっている。図中矢印で示した濃度が通常使用している濃度である。実験は3回独立して行い、平均をグラフ化した。標準の終濃度で細胞毒性は観察されなかった。LPSに関しては現在の10倍濃度を使用することで、細胞死が観察される場合があった。しかし刺激物を何も加えなかった場合と同程度までにしか下がっていないことからこの濃度でも使用可能であることが明らかとなった。また、標準の終濃度では、どの刺激物質を加えた場合も細胞の増殖が観察されたので、最も効率よく免疫されると考えられる。

## 【実施例6】

## 【0050】

本例では、刺激物質組み合わせ検討の実験方法について説明する。BALB/cマウス(4週齢、SPF/VAF)を頸椎脱臼にて殺し、マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、70%エタノールで洗浄した。さらに、PBSで洗浄した後、2匹分の脾臓をセルストレイナー上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした。セルストレイナーを4mLのPBS(-)で3回洗浄することで脾臓細胞をセルストレイナーから溶出させた。これを遠心分離(1300rpm×3min, 4)し、細胞を回収した。ACK lysing Buffer 3mLに細胞を懸濁した後、10mL PBS(-)を加えることで赤血球を除去し、遠心分離(1300rpm×3min, 4)して脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞をRPMI 1640培地10mLに懸濁させ、セルストレイナーを通すことにより、不溶性の脂肪等を除去した。細胞数を血球計算盤を用いて計測し、 $1 \times 10^7$  cells/mLになるように濃縮した。

## 【0051】

刺激物質(IL-4(標準の終濃度10ng/mL)、IL-5(標準の終濃度10ng/mL)、anti-CD38抗体(標準の終濃度1 $\mu$ g/mL)、anti-CD40抗体(標準の終濃度1 $\mu$ g/mL)LPS(標準の終濃度40 $\mu$ g/mL))を標準の終濃度の1000倍にて調製した。この刺激物質1.5 $\mu$ L(1/1000容量)と脾臓

細胞  $300 \mu\text{L}$  を混合し、 $40\%$  FBS を含む RPMI 1640 培地で、細胞濃度  $2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$  に調製し、4 日間  $37^\circ\text{C}$  の  $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養した。培養後、細胞溶液  $100 \mu\text{L}$  を 96 well plate に分注し、 $37^\circ\text{C}$  の  $\text{CO}_2$  インキュベーターで 2 時間保温した。そこに Cell Counting kit-8 (Dojindo 社製) を  $10 \text{ mL}$  添加し、さらに 1 時間保温した。マイクロプレートリーダーを用いて  $450 \text{ nm}$  の吸光度を測定し、ブランクとして  $650 \text{ nm}$  の吸光度を測定した。 $450 \text{ nm}$  の測定値から  $650 \text{ nm}$  の測定値を減じ、測定値を得た。

#### 【0052】

それぞれの測定値を刺激物質無添加の場合の測定値で割ることにより、比増殖率を得た。得られた結果を図 9 A 及び図 9 B に示す。なお、グラフの縦軸は比増殖率を示し、横軸は添加した刺激物質の種類を示している。また、培養後の残りの細胞を回収し、ISOG EN (ニッポンジーン社製) を用いて Total RNA を回収した。この Total RNA  $600 \text{ ng}$  を鋳型として、ReverTra Ace (TOYOBO 社) を用いて逆転写反応を実施した。反応組成は、メーカープロトコールに従い  $20 \mu\text{L}$  の容量で、プライマーとして、oligo (dT) 20 (TOYOBO 社) を用いた。反応条件は、 $42^\circ\text{C}$  20 分、 $99^\circ\text{C}$  5 分、 $4^\circ\text{C}$  5 分で実施した。この産物  $1 \mu\text{L}$  をテンプレートとして、PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて Real-time PCR を実施した。反応条件は、 $95^\circ\text{C}$  10 分 ( $95^\circ\text{C}$  15 秒、 $60^\circ\text{C}$  1 分) を 40 サイクルで行った。また、本例で使用した機材は、7500 Fast (Applied Biosystems 社) であった。得られた結果を内部標準である アクチンで標準化した。この数値を無添加の場合の値でさらに標準化してグラフ化した。

#### 【0053】

得られた結果を、図 10 A ~ 図 10 D、図 11 A 及び図 11 B、図 12 A 及び図 12 B、図 13、図 14、図 15 及び図 16 に示す。刺激物質組み合わせ検討の結果を示す一連のグラフから、細胞増殖に関しては、antiCD40 刺激と LPS 刺激が効果的であることが明らかとなった。しかし、その際に LPS と antiCD40 が共存する場合には増殖が抑えられることが明らかとなった。これは、細胞に入る刺激が強すぎた結果、アポトーシスが誘導されたことによると思われる。一方、プラズマ細胞の分化マーカーの発現量は、LPS、antiCD38、IL5 のいずれかを添加した場合に増加しており、これら刺激によって分化が進行することが示唆された。

#### 【0054】

また、これら刺激を複合して添加することで、発現量の増大が確認された。また、LPS には細胞増殖効果も存在するため、共存させることで全体の細胞数が増加し、結果として発現量が減少するという結果が得られた。また、分化マーカーの発現量がいずれか 2 種を添加することで、ほぼ飽和していることから、分化刺激は現在の使用濃度で充分目的を達していることが明らかとなった。さらに、IL4 と antiCD40 を添加することで、全体の細胞数が上昇するので、結果として発現量は減少しているが、ここに IL5 や antiCD38、LPS を添加することで分化マーカーの発現量を上昇させることが可能であることを確認できた。さらに、体細胞変異のマーカー発現量は、同様に LPS、antiCD38、IL5 のいずれかを添加した場合に増加していた。細胞があまり増殖しない条件 (IL4、antiCD40、LPS が存在しない条件) では IL5 と antiCD38 刺激によって体細胞変異マーカーの発現量が増大するが、細胞が増殖する条件では LPS 刺激によるマーカー発現量の増大が確認された。

#### 【0055】

これは、LPS によって抗原非依存的に B 細胞の活性化・分化が進行することを示唆している。LPS は大腸菌のペプチドグリカン構成するリポ多糖であり、これが共存している状態は、生体内では微生物に感染した状態であることを意味している。生体防御という観点から、LPS 刺激によって、B 細胞の体細胞変異・活性化を誘導し、より適した抗体を産生する細胞を作りだす働きが免疫担当細胞に備わっていることが考えられる。今回

10

20

30

40

50

の体外免疫方法では、まずもともとの脾臓細胞中に存在したB細胞のうち、目的の抗体を産生している細胞はIL4、antiCD40によって増殖し、IL5、antiCD38によって体細胞変異を受け、アフィニティのバリエーションをもった細胞群となることが予想された。また、抗原と反応しない細胞はLPS刺激によって増殖・体細胞変異を受け、抗原と反応できるように変異を蓄積していくシステムであることが示唆された。

【実施例7】

【0056】

本例では、サイトカイン濃度の上限と下限のマーカー発現量の実験方法について説明する。BALB/cマウス(4週齢、SPF/VAF)を頸椎脱臼にて殺し、マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、70%エタノールで洗浄した。

10

さらに、PBSで洗浄した後、2匹分の脾臓をセルストレイナー上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした。セルストレイナーを4mLのPBS(-)で3回洗浄することで脾臓細胞をセルストレイナーから溶出させた。これを遠心分離(1300rpm×3min, 4)し、細胞を回収した。ACK lysing Buffer 3mLに細胞を懸濁した後、10mL PBS(-)を加えることで赤血球を除去し、遠心分離(1300rpm×3min, 4)して脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞をRPMI1640培地10mLに懸濁させ、セルストレイナーを通すことにより、不溶性の脂肪等を除去した。細胞数を血球計算盤を用いて計測し、 $1 \times 10^7$  cells/mLになるように濃縮した。抗原として精製したhS100A10蛋白質を用い、0.1nmolもしくは1nmolを用いて、脾臓細胞 $1 \times 10^7$  cellsを免疫した。

20

【0057】

この際、アジュバントとしてムラミルジペプチド(SIGMA社)を50µg添加した。免疫反応は室温で15分静置して実施した。刺激物質(IL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体、LPS)は下記の第3表の終濃度になるように調製した。この刺激物質と、免疫した脾臓細胞を混合し、40%FBSを含むRPMI1640培地で、細胞濃度 $2 \times 10^6$  cells/mLに調製し、4日間37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。培養後、全ての細胞を回収し、ISOGEN(ニッポンジーン社製)を用いてTotal RNAを回収した。このTotal-RNA600ngを鋳型として、ReverTra Ace(TOYOBO社)を用いて逆転写反応を実施した。反応組成は、メーカープロトコールに従い20µLの容量で、プライマーとして、oligo(dT)20(TOYOBO社)を用いた。反応条件は、42°C 20分、99°C 5分、45°C 5分で実施した。

30

【0058】

この産物1µLをテンプレートとして、PowerSYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems社)を用いてReal-time PCRを実施した。反応条件は、95°C 10分(95°C 15秒、60°C 1分)を40サイクルで行った。また、本例で使用した機材は、7500Fast(Applied Biosystems社)であった。得られた結果を内部標準であるアクチンで標準化した。この数値を無添加の場合の値でさらに標準化してグラフ化した。得られた結果を図17A及び図17Bに示す。

40

【0059】

【表3】

第3表

希釈倍率	LPS	IL-4	IL-5	anti-CD38抗体	anti-CD40抗体
無添加	0 $\mu$ g/mL	0ng/mL	0ng/mL	0 $\mu$ g/mL	0 $\mu$ g/mL
下限濃度	10ng/mL	1pg/mL	1pg/mL	1ng/mL	1ng/mL
通常濃度	40 $\mu$ g/mL	10ng/mL	10ng/mL	1 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL
上限濃度	500 $\mu$ g/mL	50ng/mL	50ng/mL	50 $\mu$ g/mL	50 $\mu$ g/mL

10

サイトカイン濃度の上限と下限のマーカー発現量の結果を示す図17A及び図17Bにおいて、グラフの横軸は調べたマーカー遺伝子の名称を示し、縦軸はmRNAの発現量を示す。

グラフの縦軸において、数値が0.05減少した場合、mRNA発現量が約2倍になったと換算できる。図から、抗原濃度が0.1nmolでも1nmolでも、上限及び下限の刺激物質濃度で、無添加の場合と同等もしくはそれ以上のマーカーの発現を確認することができた。このことから、これらの範囲で刺激物質を添加することで抗原によって免疫された細胞が、形質細胞に分化し、その過程で抗体の親和性成熟やクラススイッチが発生していることが示唆された。

20

## 【実施例8】

## 【0060】

本例では、B細胞の分化の検討の実験方法について説明する。BALB/cマウス(4週齢、SPF/VAF)を頸椎脱臼にて殺し、マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、70%エタノールで洗浄した。さらに、PBSで洗浄した後、2匹分の脾臓をセルストレーナー上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした。セルストレーナーを4mLのPBS(-)で3回洗浄することで脾臓細胞をセルストレーナーから溶出させた。

これを遠心分離(1300rpm×3min, 4℃)し、細胞を回収した。ACK Lysing Buffer 3mLに細胞を懸濁した後、10mL PBS(-)を加えることで赤血球を除去し、遠心分離(1300rpm×3min, 4℃)して脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞をRPMI 1640培地10mLに懸濁させ、セルストレーナーを通すことにより、不溶性の脂肪等を除去した。細胞数を血球計算盤を用いて計測し、 $1 \times 10^7$  cells/mLになるように濃縮した。抗原として精製したhS100A10蛋白質1nmolを用いて、脾臓細胞 $2 \times 10^7$  cellsを免疫した。この際、アジュバントとしてムラミルジペプチド(SIGMA社)を100  $\mu$ g添加した。

30

## 【0061】

免疫反応は室温で15分静置して実施した。刺激物質(IL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体、LPS)は標準の終濃度の1000倍になるように調製した。この刺激物質10  $\mu$ Lと、免疫した脾臓細胞(2mL)を混合し、40% FBSを含むRPMI 1640培地で、細胞濃度 $2 \times 10^6$  cells/mLに調製し、4日間37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。コントロールとして、抗原のみ添加したものと刺激物質のみ添加したもの、無添加のものを同時に行った。培養後、全ての細胞を回収し、 $1 \times 10^8$  cells/mLになるように、染色バッファー(0.5% BSA, 2mM EDTAを含むPBS(-)バッファー)に懸濁した。この細胞20  $\mu$ Lを抗体で染色した。表に記載の通りである。

40

## 【0062】

## 【表4】

第4表

ターゲット細胞	抗体	染色方法
B細胞	anti-CD45R-PE (ミルテニーバイオテック社)	染色バッファーで20倍希釈した抗体を2μL添加した。これを冷蔵庫で10分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。
Plasma細胞	anti-Syndecan-1 (コスモバイオ社)	抗体を2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。その後2次抗体として、anti-19G(F(ab) <sub>2</sub> ), Goat(Donkey)PE-Cy5ラベル抗体を染色バッファーで20倍希釈し、2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。
T1-B細胞	anti-ClqR(M-20), Mouse(Goat) (別名anti-CD93) (コスモバイオ社) anti-CD23-FITC (コスモバイオ社)	抗体をそれぞれ2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。その後2次抗体として、anti-IgG(F(ab) <sub>2</sub> ), Goat(Donkey), PE-Cy5ラベル抗体を染色バッファーで20倍希釈し、2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。
T2-B細胞	anti-ClqR(M-20), Mouse(Goat) (別名anti-CD93) (コスモバイオ社) anti-CD23-FITC (コスモバイオ社)	抗体をそれぞれ2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。その後2次抗体として、anti-IgG(F(ab) <sub>2</sub> ), Goat(Donkey)PE-Cy5ラベル抗体を染色バッファーで20倍希釈し、2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。
B細胞	anti-ClqR(M-20), Mouse(Goat) (別名anti-CD93) (コスモバイオ社) anti-CD23-FITC (コスモバイオ社)	抗体をそれぞれ2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。その後2次抗体として、anti-IgG(F(ab) <sub>2</sub> ), Goat(Donkey)PE-Cy5ラベル抗体を染色バッファーで20倍希釈し、2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。
Activated B細胞	anti-BCMA mouse(Rat) (コスモバイオ社)	Mouse IgG (SIGMA社)を2μgを添加し、室温で15分静置した。ここに抗体を2μL添加した。これを氷上で45分間静置し、染色バッファーで未反応の抗体を洗浄した。

染色した細胞を500mLの染色バッファーに懸濁し、FACSCaliberを用いて、解析した。各細胞の陽性率を測定し、グラフ化した。得られた結果を、図18A、図18B、図19A～図19Dに示す。グラフは、縦軸が各細胞の陽性率で、横軸に抗原・刺激の有無を示す。B細胞の分化の検討の結果を示す一連のグラフから、脾臓細胞を生体外で免疫することによって、B細胞の活性化・増殖及び、プラズマ細胞への分化を確認した。B細胞の活性化・成熟は、抗原ではなく刺激物質によって引き起こされていることが明らかとなった。抗原のみの場合は、プラズマ細胞への分化は確認されたが、B細胞の成熟はあまり確認されなかったことから、プラズマ細胞への分化は主に抗原刺激によって引き起こされていることが示唆された。B細胞の増殖は抗原のみを添加した場合でも刺激物質のみを添加した場合と同様に確認できたことから、B細胞の増殖に関してはアジュバントによる効果であることが示唆された。

【0063】

これは、アジュバントの構造がLPSの末端構造と同一であることと、LPSによって細胞増殖が観察されるという結果からも示唆される。得られたプラズマ細胞の割合が、刺

10

20

30

40

50

激物質のみを添加した場合においても上昇していたことから、抗原非依存的に分化し得ることが示唆された。また、脾臓中のB細胞は、抗原や刺激物質によって、T1-B細胞 T2-B細胞 B2細胞 Activated B細胞と成熟し、プラズマ細胞に分化していく。実際、今回の手法によってB細胞がより成熟し、特にB2細胞が免疫しない場合に比べて大幅に増加していることが明らかとなった。

【0064】

また、Activated-B細胞の割合が免疫の有無によってほとんど変化がなかったことから、Activated-B細胞からプラズマ細胞への分化は非常に迅速に行われていることが示唆された。抗原と刺激物質を共に添加した場合、刺激物質のみ添加した場合と比較して、B2細胞の割合が上昇していた。このことから、抗原が同時に添加されることによって、抗原依存的なB細胞の活性化が優先され、抗原非依存的な活性化が減少することが示唆された。つまり、今回の体外免疫法によって、目的の抗体を産生している細胞を優先的に分化させ得ることが示唆された。

10

【実施例9】

【0065】

本例では、B細胞分化の検討マーカー発現量の実験方法について説明する。BALB/cマウス(4週齢、SPF/VAF)を頸椎脱臼にて殺し、マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、70%エタノールで洗浄した。

さらに、PBSで洗浄した後、2匹分の脾臓をセルストレイナー上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした。セルストレイナーを4mLのPBS(-)で3回洗浄することで脾臓細胞をセルストレイナーから溶出させた。これを遠心分離(1300rpm×3min, 4℃)し、細胞を回収した。ACK Lysing Buffer 3mLに細胞を懸濁した後、10mL PBS(-)を加えることで赤血球を除去し、遠心分離(1300rpm×3min, 4℃)して脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞をRPMI1640培地10mLに懸濁させ、セルストレイナーを通すことにより、不溶性の脂肪等を除去した。細胞数を血球計算盤を用いて計測し、 $1 \times 10^7$  cells/mLになるように濃縮した。抗原として精製したhS100A10蛋白質1nmolを用いて、脾臓細胞 $2 \times 10^7$  cellsを免疫した。この際、アジュバントとしてムラミルジペプチド(SIGMA社)を100μg添加した。

20

【0066】

免疫反応は室温で15分静置して実施した。刺激物質(IL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体、LPS)は標準の終濃度の1000倍になるように調製した。この刺激物質10μLと、免疫した脾臓細胞(2mL)を混合し、40%FBSを含むRPMI1640培地で、細胞濃度 $2 \times 10^6$  cells/mLに調製し、4日間37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。コントロールとして、抗原のみ添加したものと刺激物質のみ添加したもの、無添加のものを同時に行った。培養後、全ての細胞を回収し、ISOGEN(ニッポンジーン社製)を用いてTotal RNAを回収した。このTotal-RNA600ngを鋳型として、ReverTra Ace(TOYOBO社)を用いて逆転写反応を実施した。反応組成は、メーカープロトコールに従い20μLの容量で、プライマーとして、Oligo(dT)20(TOYOBO社)を用いた。反応条件は、42℃20分、99℃5分、4℃5分で実施した。この産物1μLをテンプレートとして、PowerSYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems社)を用いてReal-time PCRを実施した。

30

40

【0067】

反応条件は、95℃10分(95℃15秒、60℃1分)を40サイクルで行った。また、本例で使用した機材は、7500Fast(Applied Biosystems社)であった。得られた結果を内部標準であるアクトチンの数値を、同時に測定したPlasma細胞もしくはActivated B細胞の割合とかけあわせることでそれぞれの細胞由来のアクトチンの発現量を得た。このPlasma細胞由来のアクトチンの発

50

現量で B l i m p - 1 及び X b p - 1 の発現量を、A c t i v a t e d B 細胞由来のアクチンの発現量で B c l - 6 及び A I D の発現量をそれぞれ標準化した。この値を、無添加の場合でさらに標準化し、グラフ化した。得られた結果を図 20 A ~ 図 20 D に示す。B 細胞分化の検討マーカー発現量の結果を示す一連のグラフからわかるように、抗体染色の結果と同様に、抗原を添加した場合にプラズマ細胞への分化マーカーである B l i m p - 1 や X b p - 1 の発現量が上昇していた。

また、体細胞変異のマーカーである B c l - 6 や A I D は、刺激物質を添加することによって高発現となることが明らかとなった。これにより、抗原のみでなく、刺激物質を加えることで、より高親和性の抗体が得やすくなる可能性があることが確認された。さらに、抗原と刺激物質を共に加えた場合に、刺激物質のみを加えた場合よりも体細胞変異マーカーの発現量が減少していることから、特定の抗原が共存することで、体細胞変異をある程度抑制し、変異が入りすぎることによる活性の低下を防ぐシステムがあることが示唆された。

また、免疫前の脾臓細胞では、分化マーカーはほとんど発現していないが、体細胞変異マーカーは高い発現量を示した。これは、体細胞変異によって抗体のレパートリーを増やす反応を常に行っているためであると考えられる。

#### 【実施例 10】

##### 【0068】

本例では、E L I S A 実験方法について説明する。5 m l L B 培地で培養し集菌した後、1 m l の P B S に懸濁して超音波破碎を行い、可溶性の M B P - s c F v を含む破碎上清画分を採取した。この上清画分を 3 % B S A / P B S で 50 倍に希釈し、この 50  $\mu$  l を E L I S A 法に用いた。得られた結果を図 21 ~ 図 24 に示す。図 21 に示す E L I S A 法では、本体外免疫法に則り、モデル抗原として、H e n E g g L y s o z y m e ( H E L ) を免疫し構築した a n t i - H E L / M B P - s c F v の活性を E L I S A により測定した。抗原特異性を調べるために、- C a s e i n , S 1 0 0 A 2 , S 1 0 0 A 1 4 , H e n E g g L y s o z y m e をそれぞれコートした E L I S A プレートを用いて測定を行った。この結果、本法を用いることで H e n E g g L y s o z y m e に対して明らかに特異性のある s c F v が得られていることが確認された。

##### 【0069】

図 22 に示す E L I S A 法では、本体外免疫法の変法として、S p l e n o c y t e に代えて、M A C S を用いて分離した、B 細胞に対して H e n E g g L y s o z y m e を免疫した。図 21 と同様にして、構築した a n t i - H E L / M B P - s c F v の特異性を確認したところ、十分な特異性を持つ s c F v が得られていることが確認された。このことから、本法では、分離された B 細胞に対しても、直接的に有効な免疫操作が可能であることが示された。図 23 に示す E L I S A 法では、本体外免疫法で目的の s c F v の遺伝子配列が得られる。これを利用することで、s c F v にさらに機能を付け加えることも可能である。その一例として、a n t i - H E L / M B P - s c F v の C 末端に蛍光蛋白質の 1 つである E G F P を融合させた、a n t i - H E L / M B P - s c F v - E G F P を製造した。

##### 【0070】

s c F v と E G F P の間は、G l y および G l y - G l y - G l y - G l y - G l y といった長さの異なるリンカーを介したものを 2 種類製造した。図 21 と同様にして、構築した M B P - s c F v - E G F P の特異性を確認したところ、H e n E g g L y s o z y m e に対して特異性を持ち、且つ、蛍光を有する s c F v の製造が可能であることが確認された。蛋白質以外のモデル抗原として、本法に則りペプチドを免疫した。一般の免疫方法では、ペプチドの様な低分子量のものは、K L H や B S A 等の蛋白質にコンジュゲートしたものを抗原として用いるが、本法では、体外において B 細胞を直接標的にすることから、ペプチドそのものでも免疫反応が生じると考えられる。そこで、長さの異なる 4 種類のペプチドをモデル抗原として使い、ペプチドを直接免疫した。

##### 【0071】

用いたペプチドは、次の通りである： - casomorphin - 7 (Bovine ; Y P F P G P I , 7 a . a . ) , Angiotensin I (Human ; D R V Y I H P F H L , 1 0 a . a . ) , Parathyroid Hormone ; P T H ( Human ; E A D K A D V N V L Y K A K S Q , 1 6 a . a . ) 。各ペプチドを P B S に溶かし、 $10\mu\text{g}$  を免疫した。図 24 に示す E L I S A 法では、本法に則り構築した anti - - Casomorphin 7 / M B P - s c F v , anti - Angiotensin I / M B P - s c F v , anti - P T H / M B P - s c F v の活性を E L I S A により測定した。特異性を調べるために、 - Casomorphin - 7 , Angiotensin I , P T H をそれぞれコートした E L I S A プレートを用いて測定を行った。この結果、各ペプチドに対して有意に特異性を持つ s c F v が得られることが確認された。本法では、ペプチドそのものを抗原として添加するだけで、短いペプチドに対しても s c F v の取得が可能であることが示された。

10

#### 【実施例 11】

##### 【0072】

本例では、抗 mouse (マウス) 蛋白質抗体の取得実験方法について説明する。BALB / c マウス (4 週齢、SPF / V A F) を頸椎脱臼にて殺し、マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、70% エタノールで洗浄した。さらに、P B S で洗浄した後、2 匹分の脾臓をセルストレイナー上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした。セルストレイナーを 4 mL の P B S ( - ) で 3 回洗浄することで脾臓細胞をセルストレイナーから溶出させた。これを遠心分離 ( $1300\text{rpm} \times 3\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) し、細胞を回収した。A C K l y s i n g B u f f e r 3 mL に細胞を懸濁した後、10 mL P B S ( - ) を加えることで赤血球を除去し、遠心分離 ( $1300\text{rpm} \times 3\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) して脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞を R P M I 1 6 4 0 培地 10 mL に懸濁させ、セルストレイナーを通すことにより、不溶性の脂肪等を除去した。細胞数を血球計算盤を用いて計測し、 $1 \times 10^7\text{cells/mL}$  になるように濃縮した。抗原として精製した h S 1 0 0 A 1 0 蛋白質及び、購入した m A l b u m i n ( S I G M A 社) を用いた。それぞれ  $1\text{nmol}$ 、 $10\text{nmol}$  を用いて、脾臓細胞  $2 \times 10^7\text{cells}$  を免疫した。

20

##### 【0073】

この際、アジュバントとしてムラミルジペプチド ( S I G M A 社) を  $100\mu\text{g}$  添加した。免疫反応は室温で 15 分静置して実施した。刺激物質 ( I L - 4、I L - 5、anti - C D 3 8 抗体、anti - C D 4 0 抗体、L P S ) は標準の終濃度の 1000 倍になるように調製した。この刺激物質  $10\mu\text{L}$  と、免疫した脾臓細胞 ( 2 mL ) を混合し、40% F B S を含む R P M I 1 6 4 0 培地で、細胞濃度  $2 \times 10^6\text{cells/mL}$  に調製し、4 日間 37 °C の C O <sub>2</sub> インキュベーターで培養した。培養後、全ての細胞を回収し、I S O G E N ( ニッポンジーン社製) を用いて T o t a l R N A を回収した。この T o t a l - R N A  $600\text{ng}$  を鋳型として、R e v e r T r a A c e ( T O Y O B O 社) を用いて逆転写反応を実施した。反応組成は、メーカープロトコールに従い  $20\mu\text{L}$  の容量で、プライマーとして、o l i g o ( d T ) 2 0 ( T O Y O B O 社) を用いた。

30

##### 【0074】

反応条件は、42 °C 20 分、99 °C 5 分、4 °C 5 分で実施した。この産物  $10\mu\text{L}$  をテンプレートとして、P C R によって抗体の H 鎖及び L 鎖の超可変領域を増幅した。P C R には P r i m e S T A R H S ( T a K a R a 社) を用い、反応組成・反応条件はメーカープロトコールに従った。得られた  $400\text{bp}$  のフラグメントをアガロースゲル電気泳動 ( 2 . 0 % S e a k e m G T G A g a r o s e ( T a K a R a 社) / T A E バッファー、 $150\text{V} \times 30\text{min}$ ) によって分離し、Q I A E X I I G e l E x t r a c t i o n k i t ( Q I A G E N 社) を用いて抽出精製した。実験方法は、メーカープロトコールに従った。抽出したフラグメント各  $50\text{ng}$  をテンプレートとして、P C R によって  $800\text{bp}$  の s c F v フラグメントを調製した。P C R には P r i m e S T A R H S ( T a K a R a 社) を用い、反応組成・反応条件はメーカープロトコールに従った。

40

##### 【0075】

50

得られた800bpのフラグメントを制限酵素KpnIおよびHindIII(共にTOYOBO社製)で切断し、pMal-c2Eベクター(NEB社)にサブクローニングした。サブクローニングしたDNAを用いて、大腸菌JM109株を形質転換し、得られたクローンをOvernight Express Auto Induction System(Novagen社)を添加したLB培地5mLで培養した。27℃で一晩培養した後、1.5mLの培養液から菌体を回収し、1mM AEB SF(SIGMA社)を含むBug Buster Protein Extraction Reagent 300μLで可溶性蛋白質を回収した。回収した可溶性蛋白質5μLをSDS-PAGE法(10%ポリアクリルアミドゲル、25mA 60min)でMBP-scfvの発現を確認した。また、ELISA法を用いて、抗体のアフィニティを検証した。ELISA用のプレートとして、mS100A10もしくはmAlbuminを固定化したプレートを調製した。1ウェル当たり、1μgの蛋白質を添加し、4℃で一晩固定化した。PBS(-)で洗浄後、mS100A10 plateは3%BSA(牛血清アルブミン(和光純薬社))/PBS(-)で、mAlbumin plateは1%HEL(ニワトリ卵白リゾチーム(生化学工業社))/PBS(-)で、それぞれブロッキングを行った。

10

## 【0076】

室温で1時間ブロッキングを行った後、PBSで洗浄した。このように調製したプレートに、MBP-scfv抗体サンプルを添加した。抗体はmS100A10 plateに添加するものは3%BSA/PBS(-)で、mAlbumin plateに添加するものは1%HEL/PBS(-)で、それぞれ50倍に希釈し、室温で30分間静置した。このサンプル50μLを調製したプレートに添加し、37℃で1時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、2次抗体(anti-MBP, HRP conjugate(NEB社))をPBS(-)で2000倍に希釈した溶液を50μL添加し、37℃で1時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、SureBlue Reserve(RPL社)を100μL添加して、発色させた。発色反応は室温で3分間行い、反応を停止するために1N HCl(和光純薬社)を100μL添加した。

20

## 【0077】

その後、マイクロプレートリーダーモデル680(BioRad社)で450nm/655nmの吸光度を測定した。測定値から、ブランクの値を差し引き、グラフ化した。グラフの縦軸には吸光度を、横軸にはサンプルNoを記載した。mAlbuminを免疫したクローンはmAlbumin plateでの値をポジティブ値、mS100A10 plateでの値をネガティブ値とした。特に差の見られたクローンには星印を加えた。また、ポジティブ値をネガティブ値で割り、マイナスの値を示し、かつポジティブ値が正の値を示したクローンを++、2以上の値を示したクローンを+、1~2の値を示したクローンを±、1以下の値を示したクローンを-と定義し、それぞれの陽性率をグラフ化した。このようにして得られた結果を図25~図29に示す。抗mouse蛋白質抗体の取得結果を示す一連のグラフから理解されるように、mS100A10に関しては、多数の抗体を取得することができた。抗体のアフィニティ分布を調べた結果、高濃度の抗原を免疫することで、アフィニティのないクローンが多数得られた。

30

## 【0078】

しかしながら、高アフィニティの抗体の陽性率は低濃度の抗原で免疫した場合と大差ないことから、体細胞変異の頻度が上昇したため、抗原に反応できなくなったクローンが増加したと考えられる。このことから、抗原性の低い抗原を使用する場合は、なるべく高濃度を使用することで、より目的に即した抗体を得られる可能性が示唆された。一方、mAlbuminに対する抗体は、非常の取得困難であることが明らかとなった。この原因として、マウスの血液中に多量に存在しているので、これに対する抗体を作成しやすいと自己免疫疾患になる確率が急上昇する。このため、骨髄から脾臓に免疫担当細胞が運ばれる前にセレクションを受けて可能性のあるクローンを排除していることが考えられる。よって、これらに対する抗体を製造する場合には、骨髄から免疫担当細胞を取得して免疫する方が効率よく抗体を取得できる可能性がある。さらに、mS100A10抗体を取得した

40

50

結果から、 $10\text{ nmol}$ よりも濃い濃度で免疫することで効率よく抗体を取得できる可能性が示唆された。また、弱いながらも、*mAlbumin*に反応する抗体が取得できているため、遺伝子に人為的に変異を導入することで、目的の抗体を取得する手法も採用することができる。

#### 【実施例12】

##### 【0079】

本例では、抗低分子化合物抗体の取得及び実験方法について説明する。

BALB/cマウス(4週齢、SPF/VAF)を頸椎脱臼にて殺し、マウスの脾臓を肉眼で確認した後、摘出し、70%エタノールで洗浄した。さらに、PBSで洗浄した後、2匹分の脾臓をセルストレイナー上に乗せ、セルスクレイパーにてすりつぶした。セルストレイナーを4mLのPBS(-)で3回洗浄することで脾臓細胞をセルストレイナーから溶出させた。これを遠心分離( $1300\text{ rpm} \times 3\text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ )し、細胞を回収した。ACK lysing Buffer 3mLに細胞を懸濁した後、10mL PBS(-)を加えることで赤血球を除去し、遠心分離( $1300\text{ rpm} \times 3\text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ )して脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞はRPMI 1640培地10mLに懸濁し、セルストレイナーを通すことにより、不溶性の脂肪等を除去した。細胞数を血球計算盤を用いて計測し、 $1 \times 10^7\text{ cells/mL}$ になるように濃縮した。

##### 【0080】

抗原としてHEL-Cy3蛋白質及びHEL-ITCを用いた。それぞれCy3 Mono Reactive Dye Pack(GEヘルスケア社)、FITC(フナコシ社)を用いてHEL(生化学工業社)をラベル化した。ラベル化率を測定し、低分子化合物 $1\text{ nmol}$ 相当を用いて、脾臓細胞 $2 \times 10^7\text{ cells}$ を免疫した。この際、アジュバントとしてムラミルジペプチド(SIGMA社)を $100\text{ }\mu\text{g}$ 添加した。免疫反応は室温で15分静置して実施した。刺激物質(IL-4、IL-5、anti-CD38抗体、anti-CD40抗体、LPS)は標準の終濃度の1000倍になるように調製した。この刺激物質 $10\text{ }\mu\text{L}$ と、免疫した脾臓細胞(2mL)を混合し、40%FBSを含むRPMI 1640培地で、細胞濃度 $2 \times 10^6\text{ cells/mL}$ に調製し、4日間37のCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。

##### 【0081】

培養後、全ての細胞を回収し、ISOGEN(ニッポンジーン社製)を用いてTotal RNAを回収した。このTotal-RNA $600\text{ ng}$ を鋳型として、Reverse Transcriptase(TOYOBO社)を用いて逆転写反応を実施した。反応組成は、メーカープロトコールに従い $20\text{ }\mu\text{L}$ の容量で、プライマーとして、oligo(dT) $20$ (TOYOBO社)を用いた。反応条件は、 $42^\circ\text{C}$  20分、 $99^\circ\text{C}$  5分、 $4^\circ\text{C}$  5分で実施した。この産物 $10\text{ }\mu\text{L}$ をテンプレートとして、PCRによって抗体のH鎖及びL鎖の超可変領域を増幅したPCRにはPrimeSTAR HS(TAKARA社)を用い、反応組成・反応条件はメーカープロトコールに従った。得られた $400\text{ bp}$ のフラグメントをアガロースゲル電気泳動( $2.0\%$  Seakem GTG Agarose(TAKARA社)/TAEバッファー、 $150\text{ V}$  30min)によって分離し、QIAEX II Gel Extraction kit(QIAGEN社)を用いて抽出精製した。実験方法は、メーカープロトコールに従った。

##### 【0082】

抽出したフラグメント各 $50\text{ ng}$ をテンプレートとして、PCRによって $800\text{ bp}$ のscFvフラグメントを調製した。PCRにはPrimeSTAR HS(TAKARA社)を用い、反応組成・反応条件はメーカープロトコールに従った。得られた $800\text{ bp}$ のフラグメントを制限酵素KpnI及びHindIII(共にTOYOBO社製)で切断し、pMal-c2Eベクター(NEB社)にサブクローニングした。サブクローニングしたDNAを用いて、大腸菌JM109株を形質転換し、得られたクローンをOvernight Express Auto Induction System(Novag

10

20

30

40

50

en社)を添加したLB培地5mLで培養した。

【0083】

27で一晩培養したのち、1.5mLの培養液から菌体を回収し、1mM AEBSF(SIGMA社)を含むBug Buster Protein Extraction Reagent 300 $\mu$ Lで可溶性蛋白質を回収した。回収した可溶性蛋白質5 $\mu$ LをSDS-PAGE法(10%ポリアクリルアミドゲル、25mA 60min)でMBP-scfvの発現を確認した。図30は、抗低分子化合物抗体の取得を示す電気泳動写真を示したものである。Cy3-HEL、FITC-HELともに、目的の蛋白質(図中の矢印部分)の高発現を確認できた。このことから、目的の抗体を取得できたことが示唆された。

10

【産業上の利用の可能性】

【0084】

以上に説明したように、本発明によれば、抗原抗体反応に基づいた疾病の診断における抗体の製造を短期間に大量に行えることから、疾病診断に限らず、免疫学的マーカー検査分野の拡大を促進することができる。

また、抗原抗体反応に基づいた疾病の治療に利用する抗体を短期間に多種類取得できることから、抗体医薬分野の拡大を促進することができる。さらには、腎臓癌マーカーの1つであるS100A10タンパク質の検出を可能とする抗体の製造を短期間に大量に行えることから、抗体の製造コストが下がり、癌検診を目的とした尿検査を頻繁に低コストでできるようになる。

20

【図1B】

Fig.1B

<p>Total RNA Electrophoresis Check  2<math>\mu</math>L each load  1.5% SeakemGTG Agarose/TAE  150V 15min</p> <p>1: Hybridoma 11-2  2: Hybridoma 11-6  3: Hybridoma 12-1  4: Hybridoma 12-6  5: Hybridoma 12-22  6: Negative Control(Medium Only)  M: 100bp DNA Ladder(TaKaRa)</p>
---

【図2B】

Fig.2B

<p>RT-PCR Electrophoresis Check  5<math>\mu</math>L each load  2.0% SeakemGTG Agarose/TAE  150V 25min</p> <p>1: Hybridoma 11-2 VH  2: Hybridoma 11-2 VL  3: Hybridoma 11-6 VH  4: Hybridoma 11-6 VL  M: 200bp DNA Ladder(TaKaRa)  5: Hybridoma 12-1 VH  6: Hybridoma 12-1 VL  7: Hybridoma 12-6 VH  8: Hybridoma 12-6 VL</p>
--

【 図 3 B 】

Fig.3B

2ndPCR Electrophoresis Check  
 5  $\mu$ L each load  
 2.0% SeakemGTG Agarose/TAE  
 150V 25min

1 : Hybridoma 11-2  
 2 : Hybridoma 11-6  
 M : 200bp DNA Ladder(TaKaRa)  
 3 : Hybridoma 12-1  
 4 : Hybridoma 12-6

【 図 4 B 】

Fig.4B

Colony PCR Electrophoresis Check  
 5  $\mu$ L each load  
 2.0% SeakemGTG Agarose/TAE  
 150V 25min

1 : Hybridoma 11-2由来clone No.1  
 2 : Hybridoma 11-2由来clone No.2  
 3 : Hybridoma 11-2由来clone No.3  
 4 : Hybridoma 11-2由来clone No.4  
 5 : Hybridoma 11-2由来clone No.5  
 M : 200bp DNA Ladder(TaKaRa)  
 6 : Hybridoma 11-6由来clone No.1  
 N : Negative Control(pMal-p2X)  
 1 : Hybridoma 12-1由来clone No.1  
 2 : Hybridoma 12-1由来clone No.2  
 M : 200bp DNA Ladder(TaKaRa)  
 1 : Hybridoma 12-6由来clone No.1  
 2 : Hybridoma 12-6由来clone No.2  
 3 : Hybridoma 12-6由来clone No.3  
 N : Negative Control(pMal-p2X)

【 図 5 B 】

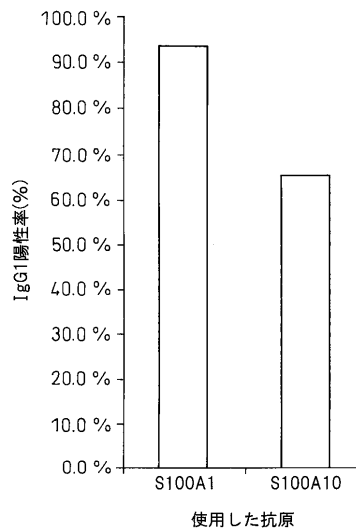
Fig.5B

MBP-scFv Purification  
 15  $\mu$ L each load  
 10% Polyacrylamid Gel 30mA 60min

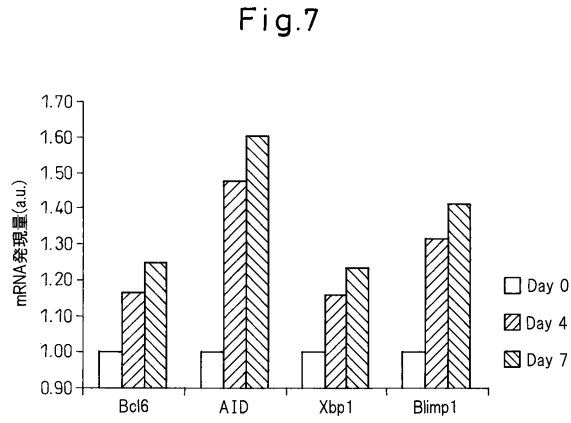
1 : pMA1-p2X誘導(-)Flow Through  
 2 : pMA1-p2X誘導(-)Elute  
 3 : pMA1-p2X誘導(+)Flow Through  
 4 : pMA1-p2X誘導(+)Wash 1  
 5 : pMA1-p2X誘導(+)Wash 2  
 6 : pMA1-p2X誘導(+)Elute  
 M : 200bp DNA Ladder(TaKaRa)  
 7 : scFv 11-2-3誘導(-)Flow Through  
 8 : scFv 11-2-3誘導(-)Elute  
 9 : scFv 11-2-3誘導(+)Flow Through  
 10 : scFv 11-2-3誘導(+)Wash 1  
 11 : scFv 11-2-3誘導(+)Wash 2  
 12 : scFv 11-2-3誘導(+)Elute

【 図 6 】

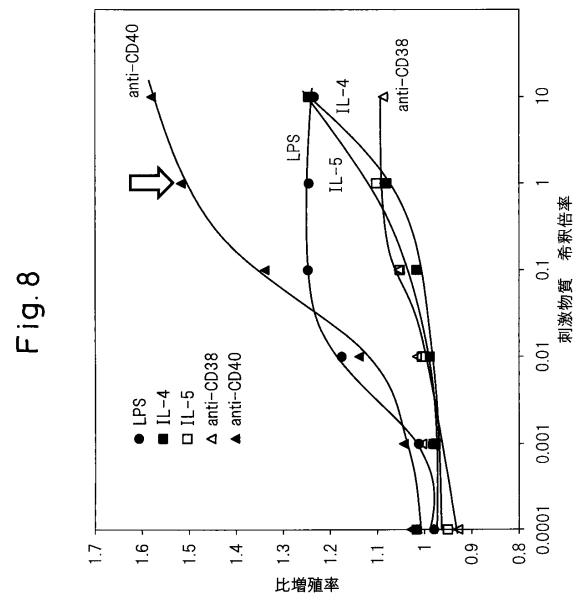
Fig.6



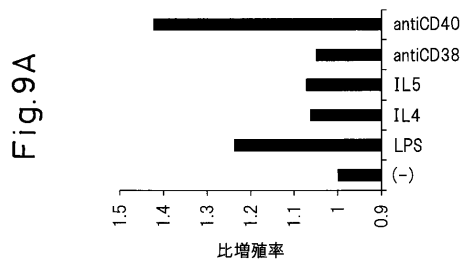
【 図 7 】



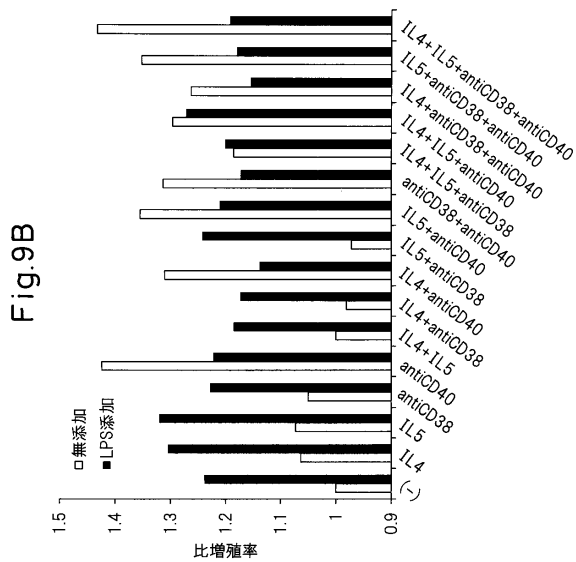
【 図 8 】



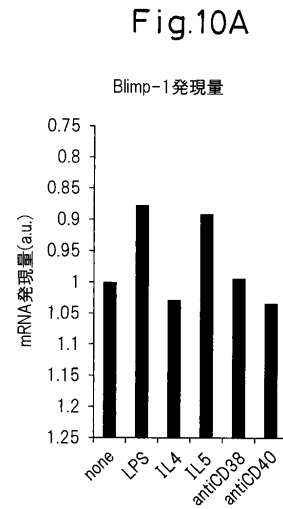
【 図 9 A 】



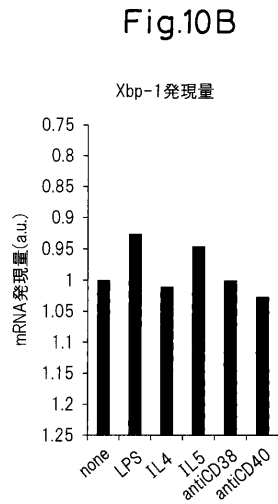
【 図 9 B 】



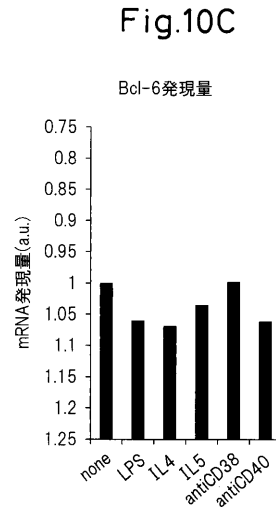
【 図 10 A 】



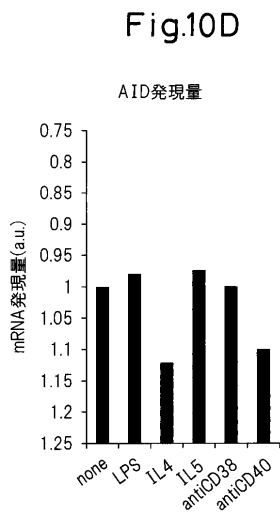
【 図 1 0 B 】



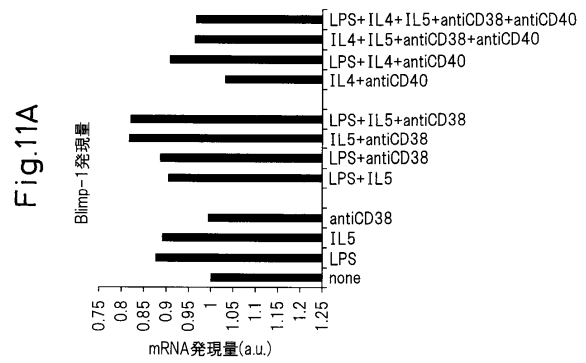
【 図 1 0 C 】



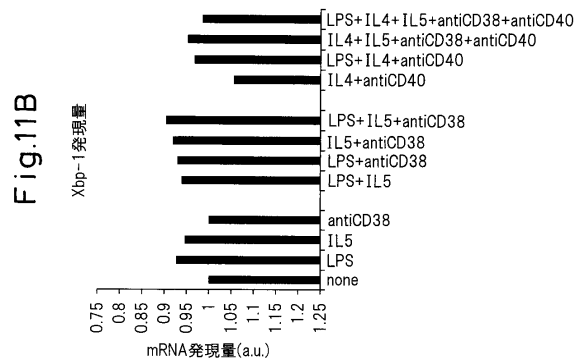
【 図 1 0 D 】



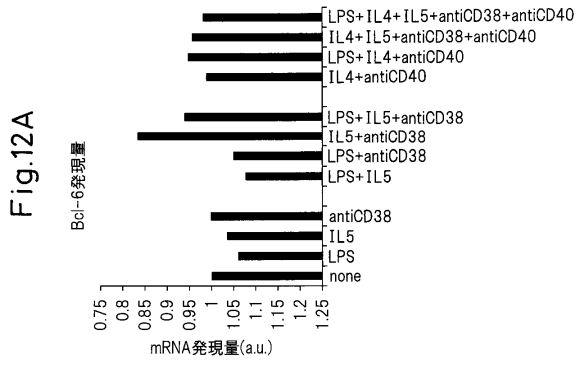
【 図 1 1 A 】



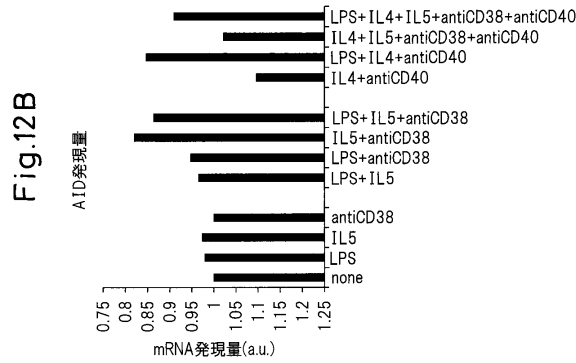
【 図 1 1 B 】



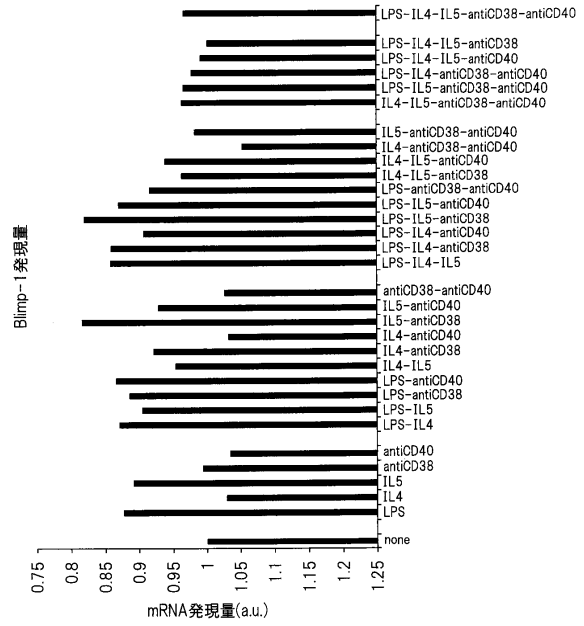
【 図 1 2 A 】



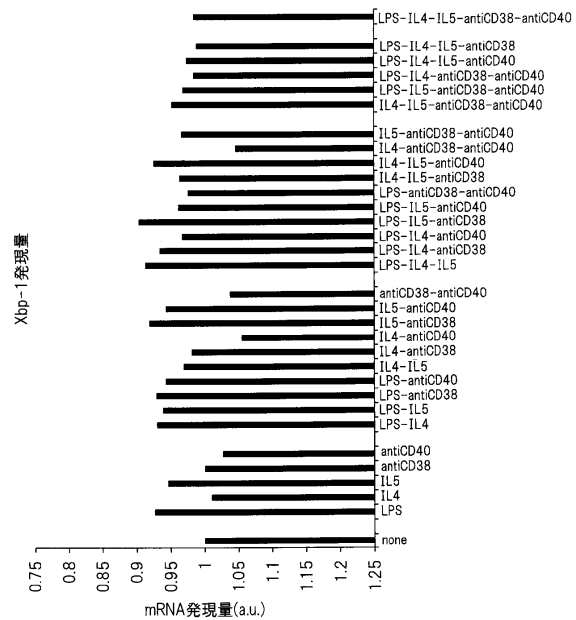
【 図 1 2 B 】



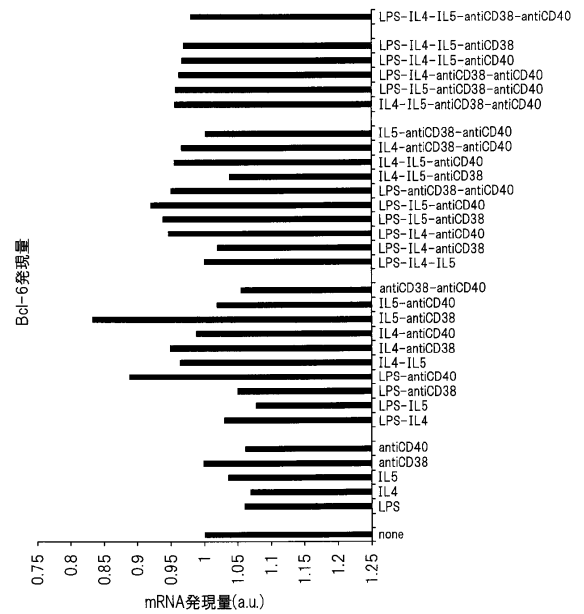
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 16 】

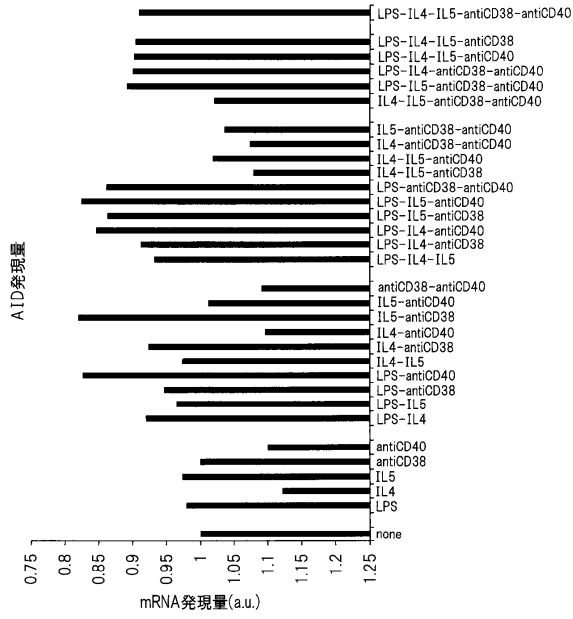


Fig.16

【 図 17 A 】

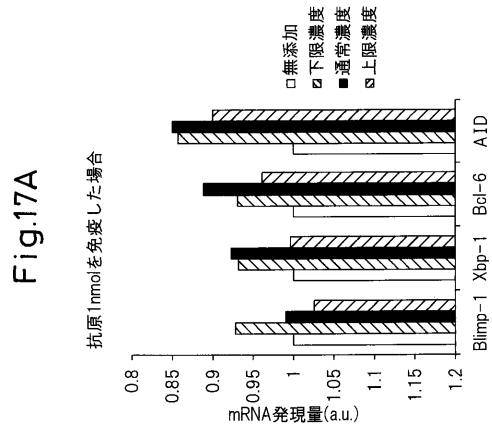


Fig.17A

【 図 17 B 】

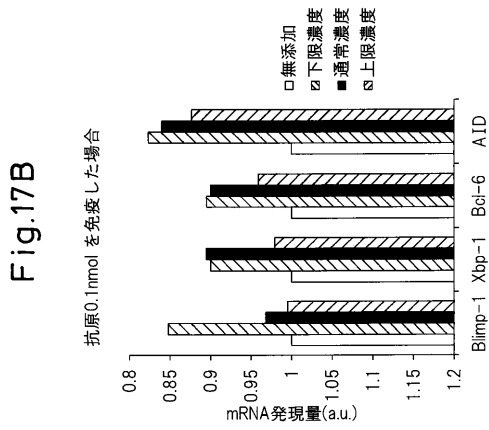


Fig.17B

【 図 18 A 】

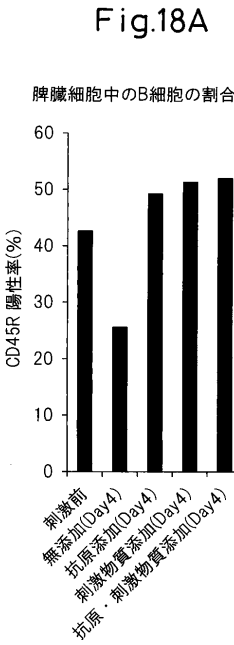
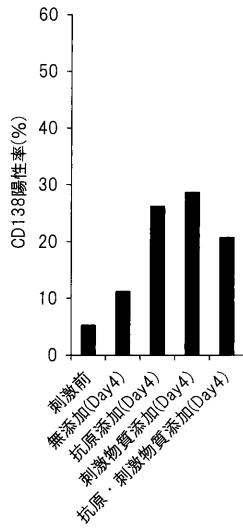


Fig.18A

【図18B】

Fig.18B

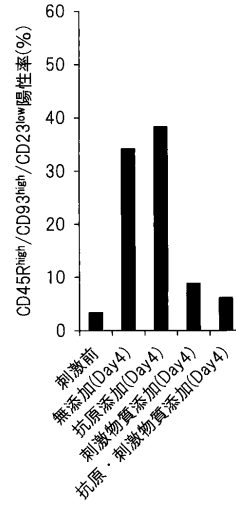
脾臓細胞中のPlasma 細胞の割合



【図19A】

Fig.19A

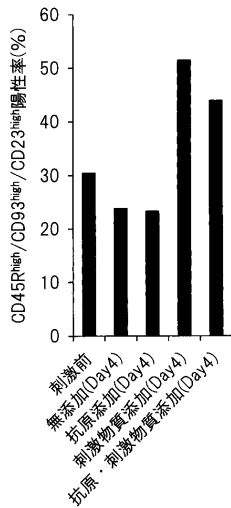
B細胞中のT1-B細胞の割合



【図19B】

Fig.19B

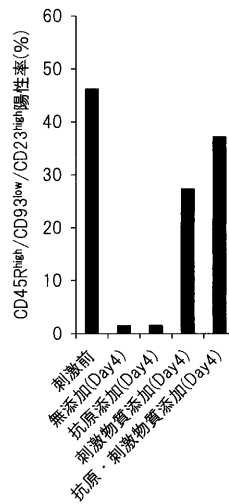
B細胞中のT2-B細胞の割合



【図19C】

Fig.19C

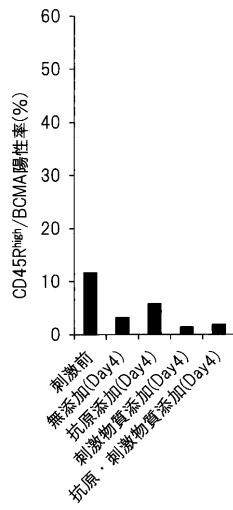
B細胞中のB2細胞の割合



【図19D】

Fig.19D

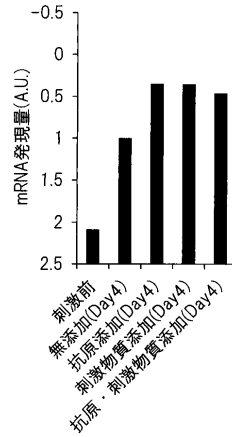
B細胞中のActivated-B細胞の割合



【図20A】

Fig.20A

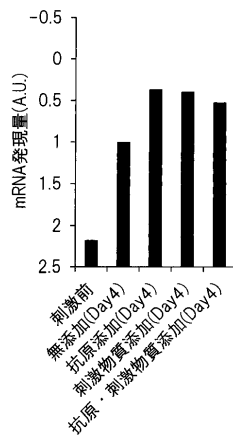
Blimp-1発現量



【図20B】

Fig.20B

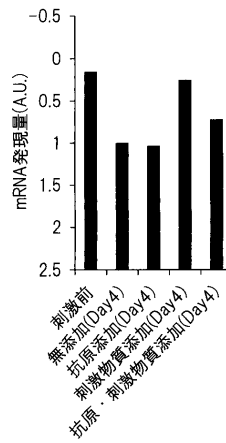
Xbp-1発現量



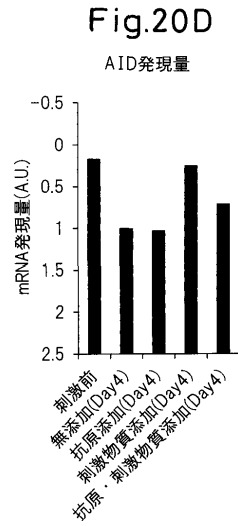
【図20C】

Fig.20C

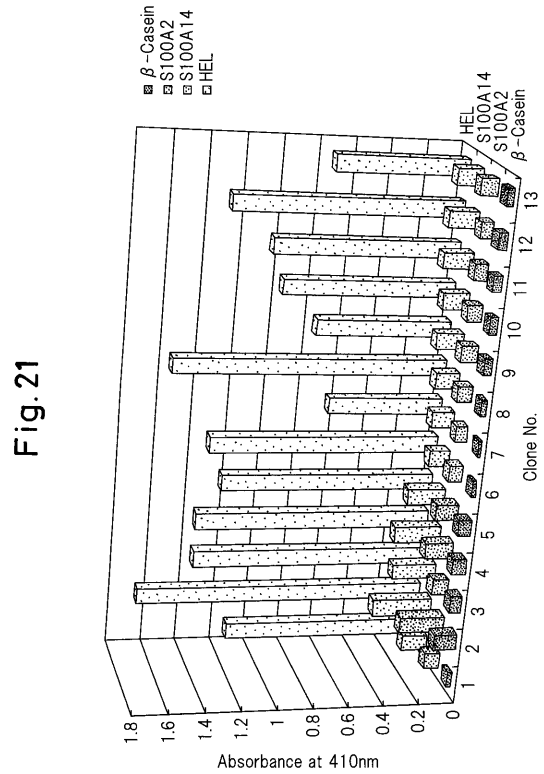
Bcl-6発現量



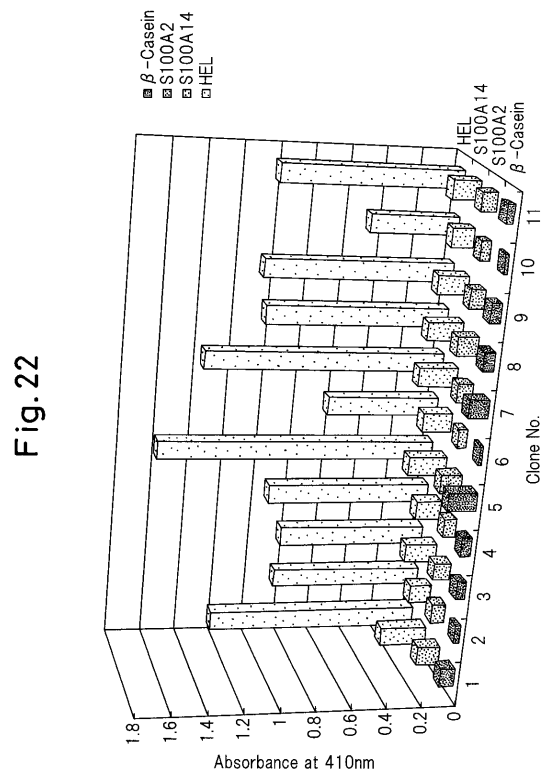
【 図 2 0 D 】



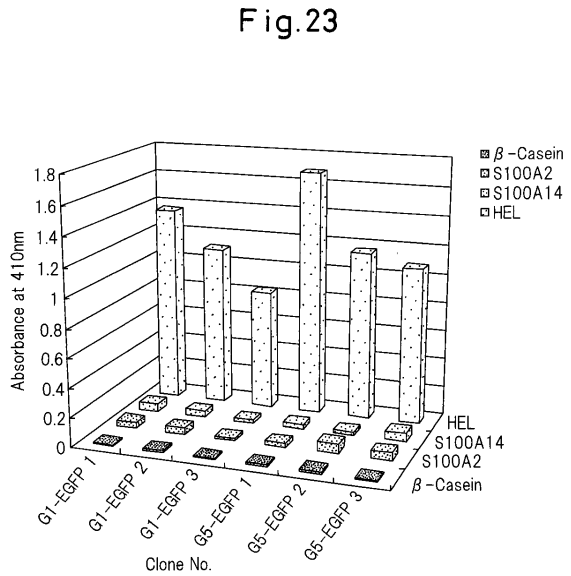
【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



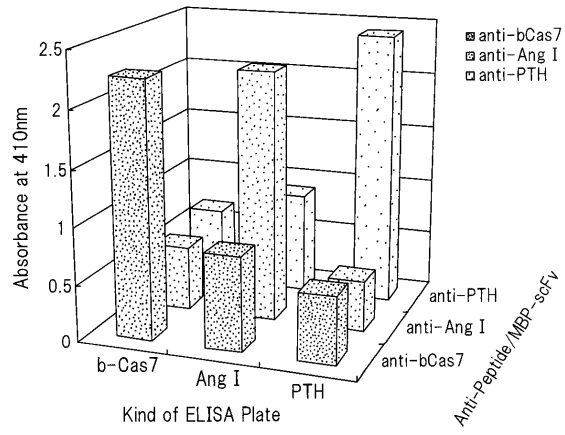
【 図 2 3 】



G1-EGFP ; scFvのC末端にGlycineを介してEGFPが融合されている  
 G5-EGFP ; scFvのC末端にGly(5)を介してEGFPが融合されている

【 図 2 4 】

Fig.24



【 図 2 5 】

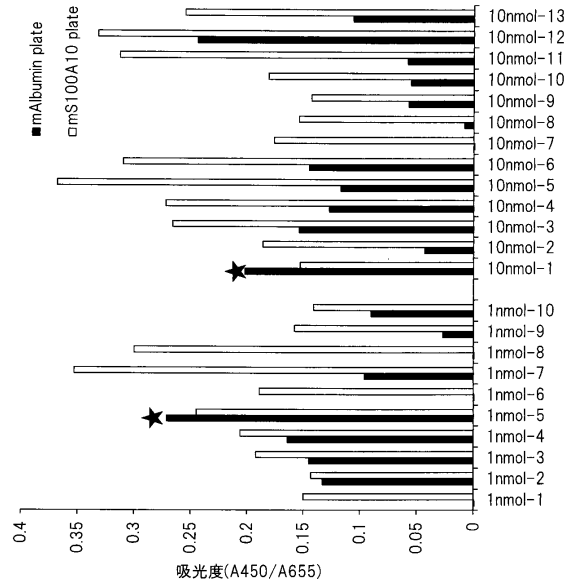
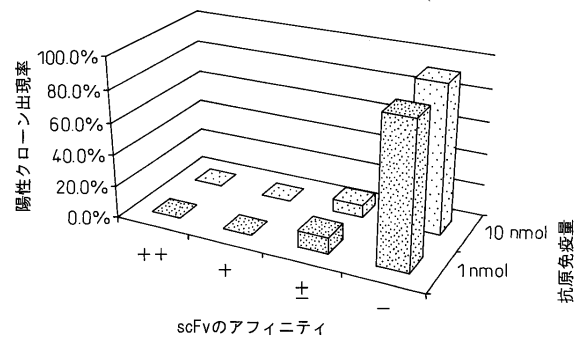


Fig.25

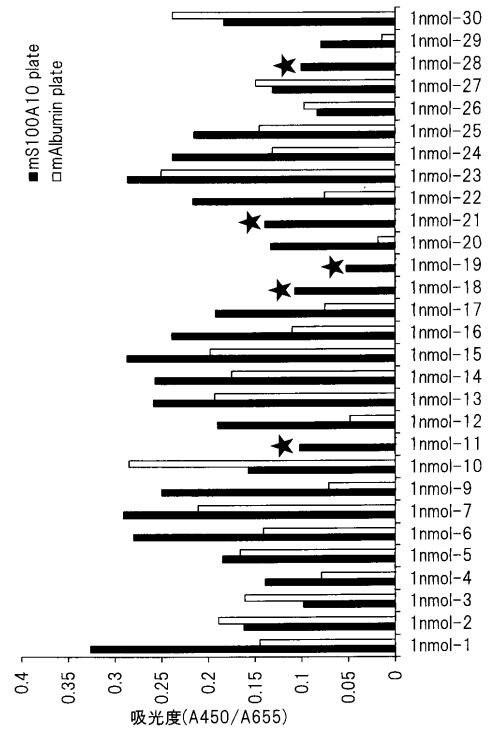
【 図 2 6 】

Fig.26

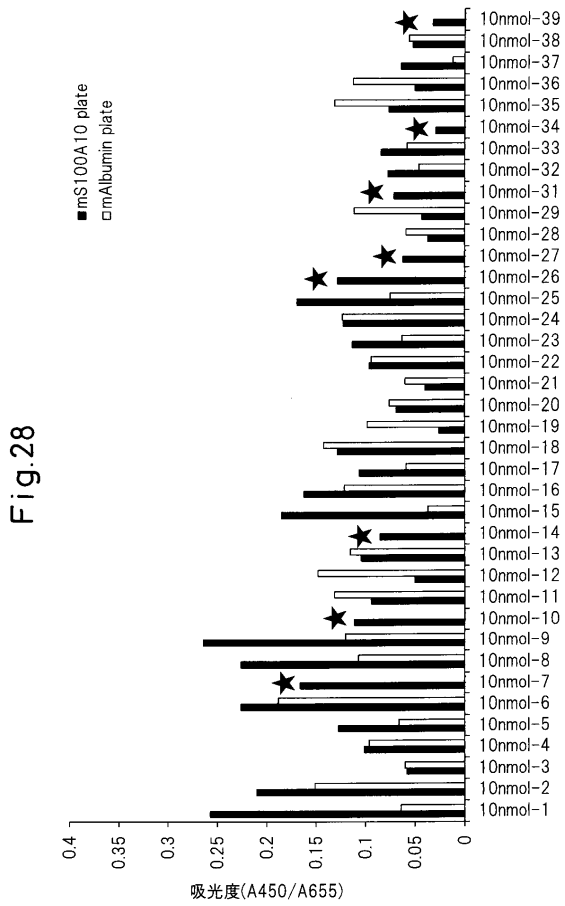


【 図 2 7 】

Fig.27

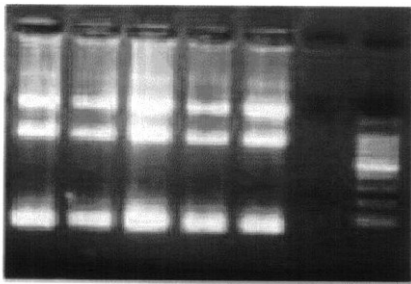


【 図 2 8 】

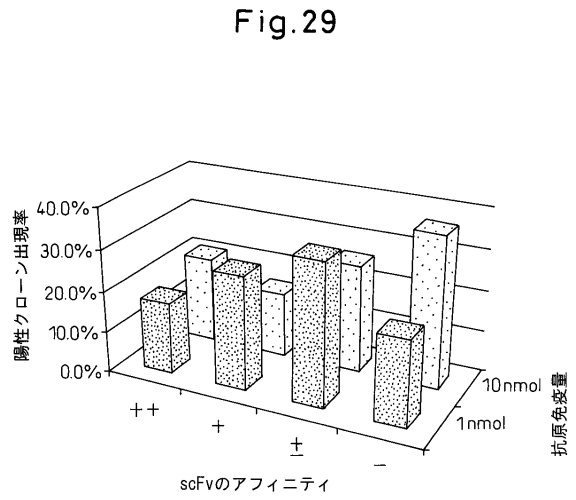


【 図 1 A 】

Fig.1A

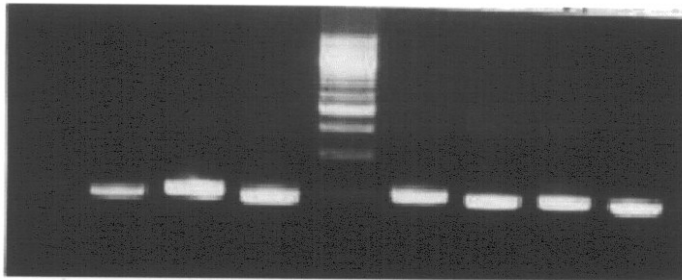


【 図 2 9 】



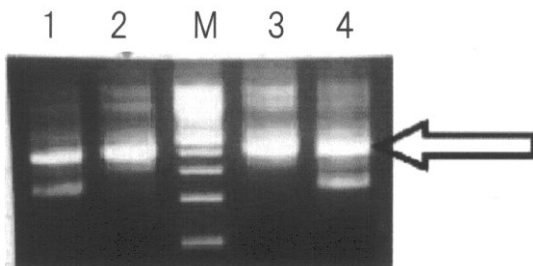
【 2 A 】

Fig.2A



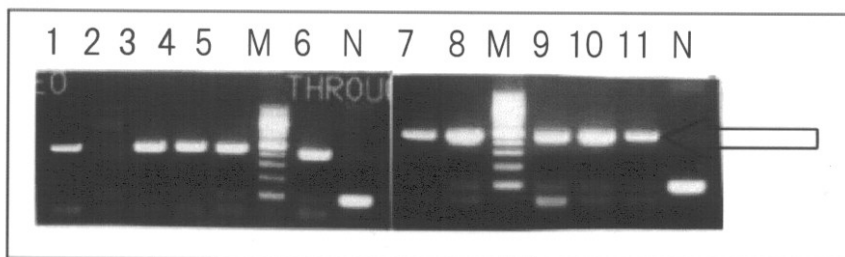
【 3 A 】

Fig.3A



【 4 A 】

Fig.4A



【 5 A 】

# Fig.5A

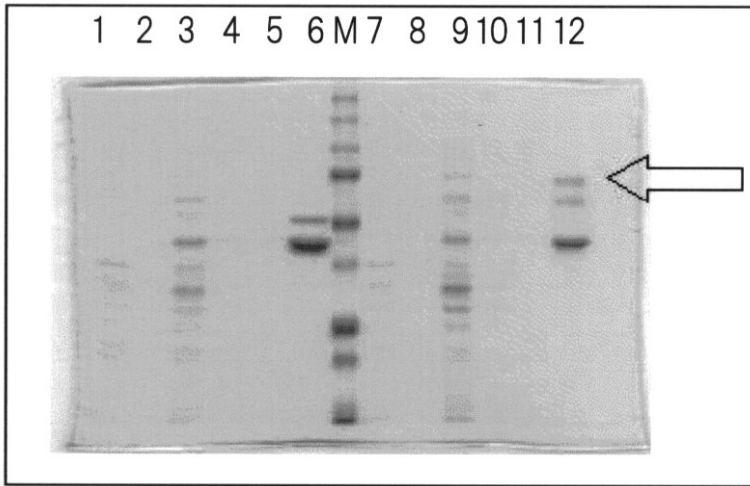
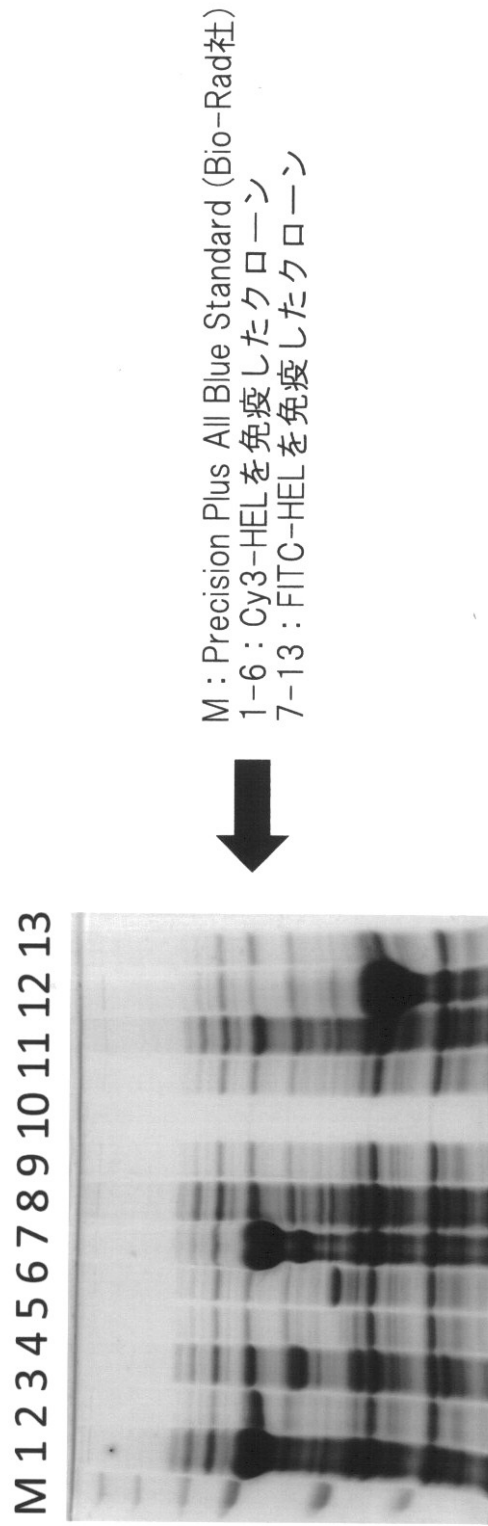


Fig.30



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 16/18

(56)参考文献 特表2003-531578(JP,A)  
特開2004-121237(JP,A)  
DE JAEGER, G. et al., "Use of phage display for isolation and characterization of single-chain variable fragments against dihydroflavonol 4-reductase from *Petunia hybrida*." , FEBS LETTERS , 1997年 2月17日, Vol.403, No.2, P.116-122  
GATHURU, J.K. et al., "In vitro immunization of rat spleen lymphocytes with Forssman glycosphingolipid antigen and the generation of a monoclonal antibody." , JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS , 1991年 3月 1日, Vol.137, No.1, P.95-102  
日本薬学会年会要旨集, (2004), vol.124, no.1, p.170「0948」  
日本農芸化学会大会講演要旨集, (2003), vol.2003, p.75「2A20p16」, 「2A20p17」, 「2A20p18」  
日本農芸化学会大会講演要旨集, (2007 3月), vol.2007, p.233「3A20p24」  
日本癌学会学術総会記事, (2005), vol.64, p.292「PA2-0657」

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
P u b M e d  
S c i e n c e D i r e c t  
C i N i i

专利名称(译)	制备单链抗体scFv的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5414535B2</a>	公开(公告)日	2014-02-12
申请号	JP2009544772	申请日	2008-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	联合胶体有限公司		
申请(专利权)人(译)	提前有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	提前有限公司		
[标]发明人	稻垣貴之 吉見達成		
发明人	稻垣 貴之 吉見 達成		
IPC分类号	C12P21/08 C12N15/09 A61K39/395 G01N33/531 C07K16/18		
CPC分类号	C07K16/00 C07K16/18 C07K16/3038 C07K2317/622 C07K2317/92		
FI分类号	C12P21/08 C12N15/00.A A61K39/395.B A61K39/395.J G01N33/531.A C07K16/18		
审查员(译)	野村 英雄		
优先权	2007312931 2007-12-03 JP 2008222215 2008-08-29 JP		
其他公开文献	JPWO2009072660A1 JPWO2009072660A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种产生抗体的方法，包括以下步骤：在含有抗原和刺激物质的培养液中外免疫含有用于免疫的细胞的组织，选择免疫细胞，并从上述选择的免疫细胞获得抗体。根据这种产生抗体的方法，可以在短时间内大量制备抗体，从而有助于增加免疫测试的使用。

抗原	免疫量 ( $\mu$ g)	免疫後の Splenocyte数 ( $\times 10^6$ cells)	ハイブリドーマ数			クローニング 後の増殖		IgG1 発現株数
			大コロニー	小コロニー	総計	++	+	
S200A10	5	1.33	27	32	59	15	14	4
	20	0.7	108	33	143	51	40	20